

N° d'ordre : 556

50376
1982
11

50376
1982
11

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR ÈS SCIENCES

par

Brigitte BAUVOIS

Attaché de Recherches à l'I.N.S.E.R.M.

ÉTUDES DES SIALYLTRANSFÉRASES DE LA PLAQUETTE SANGUINE HUMAINE : MISE EN ÉVIDENCE, LOCALISATION ET CARACTÉRISATION DE DEUX ACTIVITÉS



030 00410

Présentée le 30 juin 1982 devant la Commission d'Examen

Président	J. MONTREUIL
Rapporteurs	J. CAEN E. LUSCHER A. VERBERT
Examineur	A. NURDEN

A mes Parents

.... *Il n'y a jamais grand-chose
Ni petites choses
Il y a autre chose
Autre chose
C'est ce que j'aime qui me plaît
Et que je fais*

Jacques Prévert

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Monsieur le Professeur Jacques CAEN qui m'a accueillie il y a 6 ans dans son laboratoire. Qu'il soit ici remercié de m'avoir intégrée dans son équipe. Mes remerciements vont également à Alan NURDEN, Chargé de Recherches au C.N.R.S., qui, en me confiant ce sujet de recherches, m'a permis d'accéder à la thèse.

Les travaux, dont les résultats sont exposés dans ce mémoire, ont débuté en 1978 à l'Unité I.N.S.E.R.M. 76 à Paris. Je voudrais témoigner ma gratitude à Monsieur le Professeur Charles SALMON qui m'a ouvert les portes de son laboratoire et à Monsieur Jean-Pierre CARTRON, Maître de Recherches à l'I.N.S.E.R.M. avec qui nous avons débuté ce travail.

Monsieur le Professeur Jean MONTREUIL m'a accordé sa confiance en m'accueillant en 1979 dans son laboratoire pour la poursuite de ce travail ; je lui dois beaucoup. Je suis heureuse de pouvoir ici le remercier.

Je remercie vivement le Professeur Maurice GOUDEMAN, Directeur du Centre Régional de Transfusion Sanguine de Lille, ainsi que son service pour la diligence et la gentillesse avec lesquelles ils ont toujours mis à notre disposition les plasmas riches en plaquettes.

Monsieur le Professeur Ernst LUSCHER de l'Institut Theodor Kocher de Berne (Suisse) a accepté de me faire profiter de sa haute compétence en jugeant ce travail ; je l'en remercie très respectueusement.

Mes remerciements s'adressent tout particulièrement à André VERBERT, Professeur à l'Université de Lille et à ses collaborateurs René CACAN, Maître-Assistant, et Bernard HÖFLACK, Attaché de Recherches au C.N.R.S., pour l'ambiance chaleureuse dans laquelle ce travail a été réalisé ; consciente du profit que j'ai pu tirer de leur expérience et de leur compétence scientifique, je tiens à les remercier très sincèrement de m'en avoir fait bénéficier et d'avoir su donner à "notre travail" le caractère d'une collaboration ; celle-ci n'aurait pas été complète sans l'aide et l'amitié cordiales de Frédérique GUETTE et Philippe BULET.

L'équipe de Recherches de Bernard FOURNET, Professeur à l'I.U.T. de Lille, m'a fait profiter de son expérience dans le domaine des structures des sucres. Je l'en remercie vivement.

Je veux également associer dans une même pensée d'estime toutes les personnes dont la sympathie et l'aide m'ont été précieuses.

Qu'il me soit permis de remercier Gisèle TINEL qui a participé à la réalisation de ce travail, en effectuant avec compétence la frappe et la mise en page de ce mémoire.

Je ne saurais oublier dans mes remerciements d'évoquer le souvenir de Monsieur le Professeur François JOSSO. En sa qualité de parrain D.G.R.S.T., il s'était intéressé dès le début à ce sujet ; il m'a encouragée dans cette voie, évité les périodes de découragements et favorisé mon entrée à l'I.N.S.E.R.M.

DOYENS HONORAIRES DE L'ANCIENNE FACULTE DES SCIENCES

MM. R. DEFRETIN, H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES DES ANCIENNES FACULTES DE DROIT
ET SCIENCES ECONOMIQUES, DES SCIENCES ET DES LETTRES

MM. ARNOULT, Mme BEAUJEU, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER,
CORSIN, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, GLACET
GONTIER, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET, KOURGANOFF, LAMOTTE,
LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET,
MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SAVARD, SCHILTZ, WATERLOT, WIEMAN,
ZAMANSKI.

PROFESSEUR EMERITE

M. A. LEBRUN.

ANCIENS PRESIDENTS DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET
TECHNIQUES DE LILLE

MM. R. DEFRETIN, M. PARREAU, J. LOMBARD, M. MIGEON.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE

M. J. CORTOIS.

PROFESSEURS - CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. DURCHON Maurice	Biologie expérimentale
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. HEUBEL Joseph	Chimie minérale
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. TRIDOT Gabriel	Chimie appliquée
M. VIVIER Emile	Biologie cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique atomique et moléculaire

PROFESSEURS - 1ère CLASSE

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean Pierre	Chimie physique
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BILLARD Jean	Physique du solide
M. BOILLY Bénoni	Biologie
M. BONNOT Ernest	Biologie végétale

M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie végétale
M. CELET Paul	Géologie générale
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean Pierre	Gestion des entreprises
M. DELATTRE Charles	Géologie générale
M. ESCAIG Bertrand	Physique du solide
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOCT Jacques	Métallurgie
M. FOURET René	Physique du solide
M. GRANELLE Jean Jacques	Sciences économiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. LABLACHE COMBIER Alain	Chimie organique
M. LACOSTE Louis	Biologie végétale
M. LAVEINE Jean Pierre	Paléontologie
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique atomique et moléculaire
M. LHOMME Jean	Chimie organique biologique
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie physique
M. MAILLET Pierre	Sciences économiques
M. PAQUET Jacques	Géologie générale
M. POUZET Pierre	Analyse numérique
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. SALMER Georges	Electronique
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. STANKIEWICZ François	Sciences économiques
M. TILLIEU Jacques	Physique théorique
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS - 2ème CLASSE

M. AL FAKIR Sabah	Algèbre
M. ALLAMANDO Etienne	Electronique et électrotechnique
M. ANCIAN Bernard	Spectrochimie
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie animale
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BELLET Jean	Physique atomique et moléculaire
M. BERZIN Robert	Analyse
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BODARD Marcel	Biologie végétale
M. BOIVIN Jean Claude	Chimie minérale
M. BONNELLE Jean Pierre	Catalyse
M. BOSCO Denis	Probabilités
M. BOUQUELET Stéphane	Biochimie structurale
M. BRASSELET Jean Paul	Géométrie et topologie
M. BREZINSKI Claude	Analyse numérique
M. BRIDOUX Michel	Chimie physique

M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CAPURON Alfred	Biologie animale
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CHAPOTON Alain	Electronique
M. COQUERY Jean Marie	Psychophysiologie
Mme CORSIN Paule	Paléontologie
M. CORTOIS Jean	Physique nucléaire et corpusculaire
M. COUTURIER Daniel	Chimie organique
M. CRAMPON Norbert	Hydrogéologie et environnement
M. CROSNIER Yves	Electronique
Mlle DACHARRY Monique	Géographie
M. DAUCHET Max	Informatique
M. DEBRABANT Pierre	Géologie appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DELORME Pierre	Physiologie animale
M. DEMUNTER Paul	Sociologie
M. DENEL Jacques	Informatique
M. DE PARIS Jean Claude	Analyse
M. DEPREZ Gilbert	Physique du solide et cristallographie
M. DÉRIEUX Jean Claude	Microbiologie
Mlle DESSAUX Odile	Spectroscopie de la réactivité chimique
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie minérale
M. DHAINAUT André	Biologie animale
Mme DHAINAUT Nicole	Biologie animale
M. DORMARD Serge	Sciences économiques
M. DOUKHAN Jean Claude	Physique du solide
M. DUBOIS Henri	Spectroscopie hertzienne
M. DUBRULLE Alain	Spectroscopie hertzienne
M. DUBUS Jean Paul	Spectrométrie des solides
M. DYMENT Arthur	Mécanique
Mme EVRARD Micheline	Chimie appliquée
M. FONTAINE Hubert	Dynamique des cristaux
M. FONTAINE Jacques	Electronique, électrotechnique, automatique
M. FOURNET Bernard	Biochimie structurale
M. FRONTIER Serge	Ecologie numérique
M. GAMBLIN André	Géographie urbaine, industrielle et démographie
M. GERVAIS Michel	Gestion
M. GLORIEUX Pierre	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GREMY Jean Paul	Sociologie
M. GREVET Patrick	Sciences économiques
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie animale
M. HENRY Jean Pierre	Génie mécanique
M. HERMAN Maurice	Physique spatiale
M. HOUDART René	Physique atomique et moléculaire
M. JACOB Gérard	Informatique
M. JACOB Pierre	Probabilités et statistiques
M. JACQUILLAT Bertrand	Gestion
M. JOURNEL Gérard	Spectroscopie hertzienne
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LAURENT François	Automatique
Mme LECLERCQ Ginette	Catalyse
M. LEFEVRE Christian	Pétrologie
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle LEGRAND Solange	Algèbre

Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LEMAIRE Jean	Spectroscopie hertzienne
M. LENTACKER Firmin	Géographie
M. LEROY Jean Marie	Chimie appliquée
M. LEROY Yves	Electronique, électrotechnique, automatique
M. LESENNE Jacques	Electrotechnique
M. LEVASSEUR Michel	Sciences économiques
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique théorique
M. LOSFELD Joseph	Informatique
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MACKE Bruno	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. MAHIEU Jean Marie	Physique atomique et moléculaire.
M. MAIZIERES Christian	Automatique
Mlle MARQUET Simone	Probabilités
M. MESMACQUE Gérard	Génie mécanique
M. MESSELYN Jean	Physique atomique et moléculaire
M. MESSERLIN Patrick	Sciences économiques
M. MIGNOT Fulbert	Analyse numérique
M. MONTEL Marc	Physique du solide
M. MONTUELLE Bernard	Biologie et biochimie appliquées
Mme N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. NICOLE Jacques	Chimie analytique
M. NOTELET Francis	Electronique, électrotechnique, automatique
M. PARSY Fernand	Mécanique
Mlle PAUPARDIN Colette	Biologie physiologie végétales
M. PECQUE Marcel	Chimie organique
M. PERROT Pierre	Chimie appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie animale
M. PETIT Francis	Chimie organique, minérale et analytique
M. PONSOLLE Louis	Chimie physique
M. PORCHET Maurice	Biologie animale
M. POVY Lucien	Automatique
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. RAOULT Jean François	Géologie structurale
M. RICHARD Alain	Biologie animale
M. RIETSCH François	Physique des polymères
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROUSSEAU Jean Paul	Physiologie animale
M. ROY Jean Claude	Psychophysiologie
Mme SCHWARZBACH Yvette	Géométrie
M. SCHAMPS Joël	Spectroscopie moléculaire
M. SIMON Michel	Sociologie
M. SLIWA Henri	Chimie organique
M. SOMME Jean	Géographie
Mlle SPIK Geneviève	Biochimie
M. STERBOUL François	Informatique
M. TAILLIEZ Roger	Génie alimentaire
M. THERY Pierre	Electronique, électrotechnique, automatique
M. TOULOTTE Jean Marc	Automatique
M. TURREL Georges	Spectrochimie Infrarouge et Raman
M. VANDORPE Bernard	Chimie minérale
M. VAST Pierre	Chimie inorganique
M. VERBERT André	Biochimie
M. VERNET Philippe	Génétique
M. VILETTE Michel	Résistance des matériaux
M. WALLART Francis	Spectrochimie Infrarouge et Raman
M. WARTEL Michel	Chimie inorganique

M. WATERLOT Michel
M. WERNER Georges
M. WOSNIAK Michel
Mme ZINN JUSTIN Nicole

Géologie générale
Informatique fondamentale appliquée
Hydrométallurgie
Algèbre

ABREVIATIONS

ACD	Acide citrique-citrate-dextrose
ADP	Adénosine diphosphate
Asn	L-Asparagine
ATP	Adénosine triphosphate
CMP	Cytosine monophosphate
CMP-NeuAc	Cytosine monophosphate lié à l'acide N-acétylneuraminique
Dol	Dolichol
DTE	Dithioérythritol
EDTA	Acide éthylène diamine tétra-acétique (sel disodique)
Fuc	L-Fucose
Gal	D-Galactose
GalNAc	N-Acétyl-D-galactosamine
GDP	Guanosine diphosphate
Glc	D-Glucose
GlcNAc	N-Acétyl-D-glucosamine
Hyl	Hydroxylysine
Hyp	Hydroxyproline
LDH	Lactico-déhydrogénase
Man	D-Mannose
NeuAc	Acide N-acétylneuraminique
PGE1	Prostaglandine E1
PPP	Plasma pauvre en plaquettes
PRP	Plasma riche en plaquettes
SAB	Sérumalbumine bovine
SDS	Sodium dodécylsulfate-lauryl sulfate de sodium
Ser	L-Sérine
Thr	L-Thréonine
Xyl	D-Xylose

INTRODUCTION	P. 1
GENERALITES	4
LES PLAQUETTES	4
1 - LA PHYSIOLOGIE PLAQUETTAIRE	7
I - ROLE DANS L'HEMOSTASE PRIMAIRE	7
A - ADHESION DES PLAQUETTES	7
B - ACTIVATION, AGREGATION	8
1 - L'induction	8
2 - La transmission	8
3 - La réponse	9
a - Changement de forme	9
b - Sécrétion	10
c - Agrégation	10
II - ROLE DANS LA COAGULATION	11
III - ROLE DANS LA THROMBOSE	12
2 - LA MEMBRANE PLAQUETTAIRE	14
I - LES GLYCOCONJUGUES DES SURFACES CELLULAIRES	14
A - LES GLYCOLIPIDES	15
B - LES GLYCOPROTEINES	15
1 - Les N-glycosylprotéines	16
a - Les glycanes de type oligomannosidique	16
b - Les glycanes de type N-acétyllactosa- minique	16
c - Les glycanes de type mixte	18
2 - Les O-glycosylprotéines	19
a - Les glycoprotéines de type collagène ..	19
b - Les glycoprotéines de type mucine	19
c - Les protéoglycanes	20
3 - Les N,O-glycosylprotéines	20

II - LES GLYCOPROTEINES PLAQUETTAIRES	p. 21
A - ETUDE STRUCTURALE DES GLYCOPROTEINES Ib, Iib ET III	22
1 - La glycoprotéine Ib (GPIb)	22
2 - Les glycoprotéines Iib et III (GPIIb et GPIII)	23
B - ROLE DES GLYCOPROTEINES DANS L'ADHESION ET L'AGREGATION PLAQUETTAIRES	24
1 - La glycoprotéine Ib	25
2 - Les glycoprotéines Iib et III	26
3 - Conclusion	28
III - BIOGENESE DE LA MEMBRANE PLAQUETTAIRE	28
3 - BIOSYNTHESE DES GLYCOPROTÉINES ; LES GLYCOSYL- TRANSFERASES PLAQUETTAIRES	30
I - BIOSYNTHESE DES N- ET O-GLYCOSYLPROTEINES	30
A - REACTIONS ENZYMATIQUES	30
1 - Biosynthèse des N-glycosylprotéines	31
2 - Biosynthèse des O-glycosylprotéines	34
3 - Les sialyltransférases cellulaires	36
B - LOCALISATION DES GLYCOSYLTRANSFERASES	39
II - LES GLYCOSYLTRANSFERASES PLAQUETTAIRES	42
A - LA COLLAGENE-GLUCOSYLTRANSFERASE	42
B - LA SIALYLTRANSFERASE	43
C - CONCLUSION	44
4 - CONCLUSIONS GÉNÉRALES	46
TRAVAUX PERSONNELS	48
1 - MISE EN ÉVIDENCE DE L'ACTIVITÉ SIALYLTRANSFÉRA- SIQUE PLAQUETTAIRE	48
I - DETERMINATION DES CONDITIONS OPTIMALES	48
A - CONDITIONS DE LYSE	48
B - EFFET DU TEMPS D'INCUBATION, DES CONCENTRATIONS EN ENZYME ET EN CMP- [¹⁴ C] NeuAc ET DU pH	49

C - IDENTIFICATION DE LA RADIOACTIVITE INCORPOREE ..	p. 51
D - SPECIFICITE DE L'ACCEPTEUR	51
E - EFFET DES IONS	51
F - CONCLUSIONS	53
II - ETUDE DE LA VARIATION D'OSMOLARITE	53
III - CONCLUSIONS	55
2 - DÉMONSTRATION DE L'EXISTENCE D'UNE ACTIVITÉ ECTOSIALYLTRANSFÉRASIQUE À LA SURFACE DE LA PLAQUETTE	56
I - CHOIX DU TAMPON DE PREPARATION DES PLAQUETTES	56
II - ACTIVITE SIALYLTRANSFERASIQUE EXPRIMEE PAR DES PLAQUETTES ENTIERES	58
III - MISE EN EVIDENCE D'UNE ACTIVITE ECTOSIALYLTRANSFE RASIQUE	59
IV - IDENTIFICATION DES ACCEPTEURS ENDOGENES SIALYLES ..	65
A - IDENTIFICATION DES ACCEPTEURS ENDOGENES	65
B - DETERMINATION DU TYPE DE GLYCANNE IMPLIQUE DANS LA SIALYLATION	66
C - CONCLUSION	66
V - DESIALYLATION DES PLAQUETTES	66
VI - CONCLUSIONS	68
3 - DÉTECTION DE DEUX ACTIVITES SIALYLTRANSFÉRASIQUES À OSMOLARITÉ PHYSIOLOGIQUE	70
I - EFFET DES CATIONS DIVALENTS SUR LA SIALYLATION DES ACCEPTEURS ENDOGENES ET EXOGENES	70
II - EFFET DU pH ET DE LA TEMPERATURE D'INCUBATION	74
III - ETUDE DE LA STABILITE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE ...	75
IV - CONCLUSIONS	76
4 - CARACTÉRISATION DES DEUX ACTIVITÉS SIALYLTRANS- FÉRASIQUES MISES EN ÉVIDENCE	77

I - SPECIFICITE DE DIFFERENTS ACCEPTEURS	p. 77
II - EFFET DES CATIONS DIVALENTS SUR LA SIALYLATION DU p-NITROPHENYL- β -D-GALACTOSIDE	79
III - IDENTIFICATION DES DERIVES SIALYLES DU p-NITROPHENYL- β -D-GALACTOSIDE	81
A - PREPARATION DE L'ACCEPTEUR TRITIE ET DES DERIVES TRITIES SIALYLES	81
B - METHYLATION ET ANALYSE DES DERIVES SIALYLES ...	82
C - CONCLUSION	84
IV - DISCRIMINATION ENTRE L'ACTIVITE SIALYL α -2,3 TRANS- FERASIQUE ET L'ACTIVITE SIALYL α -2,6 TRANSFERASIQUE	85
A - EFFET DU pH ET DE LA TEMPERATURE D'INCUBATION	85
B - EFFET DU DITHIOERYTHRITOL	86
C - EFFET DES CATIONS DIVALENTS A FAIBLE OSMO- LARITE	86
D - ETUDES DE LA STABILITE DES ACTIVITES ENZY- MATIQUES	88
E - MODULATION DES ACTIVITES SIALYL α -2,3 TRANS- FERASIQUE ET SIALYL α -2,6 TRANSFERASIQUE PAR LES SUCRES	89
F - CONCLUSION	91
V - CONCLUSIONS	91
 5 - MISE EN ÉVIDENCE ET SÉPARATION DE LA SIALYL α -2,3 TRANSFÉRISE ET DE LA SIALYL α -2,6 TRANS- FERASE	93
I - MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE D'ISOLEMENT	93
A - CHOIX DU MILIEU D'ISOLEMENT	93
B - ETUDE DES CONDITIONS D'EXTRACTION DES ENZYMES PAR LE TRITON X100	95
C - CHROMATOGRAPHIE DE TAMISAGE MOLECULAIRE	97
1 - Matériel et Méthodes	97
2 - Résultats	97
D - CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE	100

II - SEPARATION DES SIALYLTRANSFERASES	p. 101
III - CONCLUSIONS	103
6 - PREMIERS ESSAIS D'APPLICATION À LA PHYSIOLOGIE ET À LA PATHOLOGIE PLAQUETTAIRES	105
I - SIALYLTRANSFERASES ET PHYSIOLOGIE PLAQUETTAIRE	105
II - SIALYLTRANSFERASES ET PATHOLOGIE PLAQUETTAIRE	108
A - DESCRIPTION RAPIDE DU SYNDROME DE TROMBASTHENIE DE GLANZMANN	108
B - RESULTATS	108
III - CONCLUSIONS	111
CONCLUSIONS GENERALES	113
APPENDICE TECHNIQUE	116
1 - PRÉPARATION DES PLAQUETTES	116
I - PLASMA RICHE EN PLAQUETTES (PRP)	116
II - PLAQUETTES ISOLEES	116
III - NUMERATION	117
IV - DOSAGE DE LA LACTICO-DEHYDROGENASE (LDH)	117
2 - DÉSIALYLATION DES PLAQUETTES	118
3 - PRÉPARATION DES ACCEPTEURS	119
I - DESIALYLATION	119
II - ACCEPTEURS INSOLUBILISES	119
III - MARQUAGE AU TRITIUM	120
A - LE p-NITROPHENYL-β-D-GALACTOSIDE	120
B - LES ASIALOGLYCOPROTEINES	120
4 - MESURE DE L'ACTIVITÉ SIALYLTRANSFÉRASIQUE	121
I - INCUBATION	121
II - DÉTERMINATION DE LA RADIOACTIVITÉ LIÉE AUX ACCEPTEURS ENDOGENES ET EXOGENES	121

A - ACCEPTEURS ENDOGENES ET EXOGENES MACROMOLE- CULAIRES	p . 121
B - ACCEPTEURS MICROMOLECULAIRES	122
C - ACCEPTEURS INSOLUBILISES	122
5 - CARACTÉRISATION DES ACCEPTEURS ENDOGÈNES SIALYLES	123
I - DETERMINATION DES ACCEPTEURS ENDOGENES DE L'ACIDE SIALIQUE	123
A - MARQUAGE AU [¹⁴ C] DES ACCEPTEURS ENDOGENES DE LA PLAQUETTE	123
B - MARQUAGE AU [¹²⁵ I] DES PROTEINES DE LA SURFACE PLAQUETTAIRE	123
C - SOLUBILISATION	123
D - ELECTROPHORESE ANALYTIQUE EN GEL DE SODIUM DODECYL SULFATE POLYACRYLAMIDE (SDS-PAGE)	124
E - AUTORADIOGRAPHIE	124
II - DETERMINATION DU TYPE DE GLYCANNE	124
6 - TECHNIQUE DE MÉTHYLATION	125
I - METHYLATION	125
II - ANALYSE DES PRODUITS METHYLES	125
7 - COUPLAGE DE LA CYTOSINE DIPHOSPHATE ETHANOLA- MINYL AU SEPHAROSE 4B	126
BIBLIOGRAPHIE	127

INTRODUCTION

Les plaquettes sanguines jouent un rôle primordial dans l'hémostase et la thrombose (voir les revues générales récentes de CAEN et TOBELEM : 1 ; MUSTARD : 2 ; PACKHAM et MUSTARD : 3 ; WAUTIER et CAEN : 4 ; GORDON : 5). Elles semblent, en outre, être impliquées dans certaines réactions inflammatoires et dans le développement des métastases (ZUCKER : 6 ; WARREN : 7 ; TOBELEM *et al.* : 8).

Les recherches menées depuis les dix dernières années sur les glycoconjugués (glycoprotéines et glycolipides) ont montré l'importance considérable de ces molécules dans la biologie et la physiologie cellulaires. En particulier, des phénomènes comme l'adhésion, la perméabilité, l'antigénicité peuvent être l'expression de l'activité des glycoconjugués membranaires. La connaissance de la biologie moléculaire de la membrane plaquettaire permet aujourd'hui de mieux comprendre les interactions plaquettes-vaisseaux sanguins, responsables de l'adhésion plaquettaire à la paroi vasculaire, et les interactions plaquettes-plaquettes, responsables de l'agrégation plaquettaire. Dans le laboratoire du Professeur CAEN, A.T. NURDEN entreprenait dès 1974 l'inventaire et la caractérisation des glycoprotéines de la surface plaquettaire. C'est ainsi qu'il a pu montrer chez certains malades atteints de troubles fonctionnels de la plaquette, l'existence d'un déficit important en glycoprotéines spécifiques de la membrane plaquettaire : dans le syndrome de BERNARD-SOULIER caractérisé par un défaut majeur de l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium, la glycoprotéine GPIb est absente (NURDEN et CAEN : 9) ; dans la thrombasthénie de GLANZMANN, la relation entre le déficit du complexe glycoprotéique GPIIb/GPIII et l'inaptitude des plaquettes à agréger est aussi démontrée (NURDEN et CAEN : 10, 11). C'est en relation avec ces découvertes que nous avons entrepris d'étudier les caractéristiques et les modulations des activités sialyltransférasiques plaquettaires : la surface de la membrane plaquettaire est riche en acide sialique ; des variations du taux d'acide sialique à la surface de la plaquette (GROTTUM et SOLUM : 12 ; MESTER : 13 ; MESTER *et al.* : 14), ainsi que des variations de l'activité sialyltransférasique (SCIALLA *et al.* : 15 ; WU *et al.* : 16), ont été décrites comme des facteurs d'altération de la fonction plaquettaire.

Nos recherches sur les sialyltransférases de la plaquette ont donc pour objectif principal de répondre aux questions suivantes :

1 - La plaquette est-elle capable de synthétiser ou de réparer ses glycoconjugués membranaires ? En effet, la plaquette, issue du mégacaryocyte, est une cellule anucleée possédant déjà une grande partie de ses composants de structure et il convient de s'interroger sur la capacité des plaquettes à achever leurs glycoconjugués de surface.

2 - Existe-il des sialyltransférases sur la membrane plasmique dont le site actif, dirigé vers le milieu extracellulaire, pourrait reconnaître des structures glycaniques de la membrane d'autres plaquettes ? Ces ectosialyltransférases seraient des candidats de choix dans les phénomènes de reconnaissance plaquettes-plaquettes (SHUR et ROTH : 17).

3 - Comment cette activité sialyltransférasique est-elle régulée pour répondre aux exigences physiologiques ?

4 - Existe-t-il une modification de l'activité sialyltransférasique dans les plaquettes pathologiques, modification qui pourrait expliquer leur déficience en glycoprotéines de surface et leur défaut dans l'agrégation ou l'adhésion ?

Dans la première partie de ce mémoire, nous rappellerons les principaux travaux effectués sur les glycoconjugués de surface et sur les glycoprotéines plaquettaires. Dans la seconde partie, nous exposerons les résultats de nos recherches : celles-ci ont débuté dans le laboratoire du Professeur SALMON en 1978 et ont été poursuivies depuis 1979 dans le laboratoire du Professeur J. MONTREUIL, sous la direction du Professeur VERBERT. L'ensemble de nos travaux ont fait l'objet des publications suivantes :

1 - BAUVOIS B., CARTRON J.P., NURDEN A., CAEN J. : Glycoprotein-sialyltransferase activity of normal, thrombasthenic and Bernard-Soulier platelets. Vox Sanguinis (1980) 40, 71-78.

- 2 - BAUVOIS B., CACAN R., NURDEN A., CAEN J., MONTREUIL J., VERBERT A. :
Membrane glycoprotein IIb is the major endogenous acceptor for human platelet ectosialyltransferase. FEBS-Lett. (1981) 125, 277-281.
- 3 - BAUVOIS B., CACAN R., FOURNET B., CAEN J., MONTREUIL J., VERBERT A. :
Discrimination between activity of α -2,3 sialyltransferase and α -2,6 sialyltransferase in human platelets using p-nitrophenyl- β -D-galactoside as acceptor. Eur. J. Biochem. (1982) 121, 567-572.

Les communications suivantes ont été présentées :

- 1 - BAUVOIS B., CACAN R., NURDEN A., CAEN J., MONTREUIL J., VERBERT A. :
Mise en évidence par leur sensibilité aux cations divalents de deux activités sialyltransférasiques dans les lysats de plaquettes humaines. Congrès d'Automne de la Société de Chimie Biologique, Lille (septembre 1980).
- 2 - BAUVOIS B., CACAN R., FOURNET B., CAEN J., MONTREUIL J., VERBERT A. :
Functional requirements and use of p-nitrophényl- β -D-galactoside as acceptor allow to discriminate α -2,3 and α -2,6 sialyltransferase activities in human platelets. 1st European Symposium on Carbohydrates and Glycoconjugates, Wien (Austria) (14-17 Septembre 1981).

GENERALITES

LES PLAQUETTES

Si on observe au microscope photonique un frottis sanguin, on distingue des globules rouges de forme discoïdale, des globules blancs d'aspect varié et, parfois, quelques fragments granuleux sans caractère particulier : ces plus petits éléments visibles du sang sont les plaquettes.

Les plaquettes sont libérées dans le sang à partir de cellules géantes de la moelle osseuse : les mégacaryocytes (HARKER : 18). On en compte 200.000 à 400.000 par mm^3 de sang. De forme discoïdale avec un diamètre de 1 à 3 μm et avec un volume variant de 5 à 10 μ^3 (BULL et ZUCKER : 19), les plaquettes ne possèdent pas de noyau mais ont cependant une très faible capacité de synthèse protéique car elles contiennent de l'ARN messager et des ribosomes et sont le siège d'un métabolisme actif fournissant l'énergie nécessaire à leurs fonctions.

L'hétérogénéité qui caractérise les plaquettes aussi bien sur le plan morphologique (DETWILER *et al.* : 20) que sur le plan métabolique (STEINER et BALDINI : 21) semble prédéterminée au niveau de la production mégacaryocytaire (PENINGTON *et al.* : 22). Après 7 à 10 jours dans le sang circulant (ABRAHAMSEN : 23), elles sont phagocytées par les macrophages du foie et de la rate (BALDINI : 24 ; HARKER : 25) si elles n'ont pas auparavant participé aux phénomènes d'hémostase et de coagulation.

La microscopie électronique révèle une ultrastructure complexe (Fig. 1) :

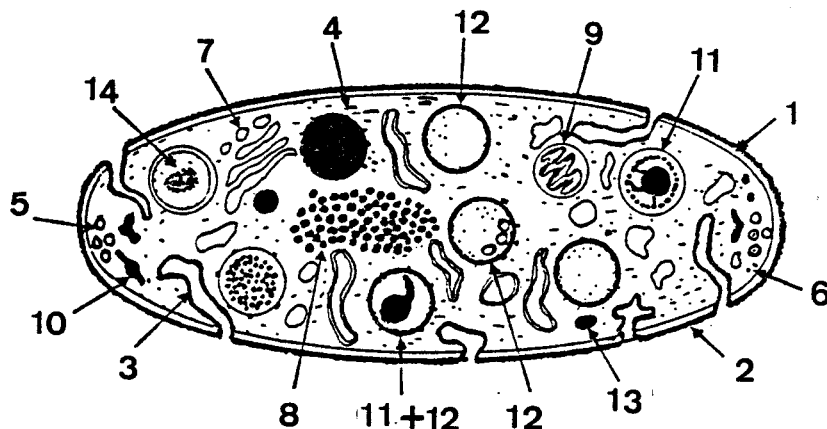


Figure 1 : Représentation schématique d'une plaquette d'après WHITE (26)

La membrane plasmique (1) est semblable à celle des autres cellules, asymétrique et constituée d'une double couche lipidique dans laquelle sont insérées les protéines. Sa surface externe est riche en mucopolysaccharides (BEHNKE : 27) et en glycoprotéines (le glycocalyx) (2) ainsi qu'en protéines plasmatiques adsorbées. Un système canaliculaire ouvert (3) vers l'extérieur et entourant les granules et autres organelles, permet les échanges et les transferts avec le milieu plasmatique (WHITE et KRIVIT : 28 ; HOLMSEN : 29). Dans le cytoplasme, les microfilaments formés d'actine et de myosine (4) (POLLARD *et al.* : 30) et les microtubules composés de tubuline (5) (CASTLE et CRAWFORD : 31) maintiennent la forme discoïdale de la cellule. Disséminés dans le cytoplasme, on observe de rares ribosomes libres (6) et un appareil de Golgi (7). Par contre, les grains de glycogène regroupés abondent (8). Les mitochondries (9), petites, sont représentées par des granules dispersés dans le cytoplasme et entourés par le système tubulaire dense (DTS) (10) ; ce dernier représente le système endoplasmique lisse de la cellule et contient de nombreux enzymes comme la peroxydase ou la

catalase (GERRARD *et al.* : 32). Au contact de celui-ci, différents types de granules sont observables (WERNER et MORGENSTERN : 33) :

- les granules denses (11), les plus lourds, contiennent la sérotonine, des nucléotides adényliques (ADP et ATP) et des ions calcium : ces métabolites stockés ne participent pas à l'activité de la plaquette.
- les granules α (12), plus légers et plus nombreux, hétérogènes, contiennent une grande variété de protéines probablement synthétisées dans le mégacaryocyte : le facteur plaquettaire 4, le facteur de croissance, l'albumine et le fibrinogène (ROSS *et al.* : 34).
- les granules à catalase (13) (BRETON-GORIUS et GUICHARD : 35).
- les granules lysosomiaux (14) ; ceux-ci constitués de plusieurs sous-populations contiennent les hydrolases. (HOLMSEN et DAY : 36 ; BENTFIELD et BAINTON : 37).

1 - LA PHYSIOLOGIE PLAQUETTAIRE

Les plaquettes ont un rôle clef bénéfique en hémostasie et en coagulation. Cependant, leur intervention peut devenir nocive dans le cas de la thrombose.

I - ROLE DANS L'HEMOSTASE PRIMAIRE

L'ensemble des phénomènes qui concoure à l'arrêt du saignement et qui fait intervenir des facteurs plaquettaires, vasculaires et plasmatiques, constitue l'hémostasie primaire (DAY : 38).

Lors de la lésion d'un vaisseau, le collagène sous-endothélial est exposé aux plaquettes circulantes et toute une série de réactions entre alors en jeu :

- l'adhésion des plaquettes à la surface lésée ;
- l'activation plaquettaire ;
- l'agrégation des plaquettes entre elles, pour former le bouchon hémostatique.

A - ADHESION DES PLAQUETTES

Dès qu'il y a une modification de la structure sous-endothéliale, les plaquettes viennent adhérer au collagène (BAUMGARTNER et HAUDENSCHILD : 39 ; FAUVEL *et al.* : 40). Le mécanisme de reconnaissance entre collagène et plaquettes n'est pas encore connu : seul est admis qu'une structure ordonnée des fibres du collagène est indispensable. Deux laboratoires (STEMERMAN *et al.* : 41 ; BIRAMBAULT *et al.* : 42) ont cependant montré qu'une structure sous-endothéliale autre que le collagène est capable d'induire une adhésion plaquettaire : cette structure est constituée par les glycoprotéines fibrillaires du sous-endothélium

(les microfibrilles) ; la présence dans ce cas des facteurs plasmatiques : calcium et facteur WILLEBRAND est alors aussi nécessaire.

B - ACTIVATION, AGREGATION

Une fois qu'elles adhèrent aux surfaces lésées, les plaquettes s'activent : on peut reconnaître dans ce phénomène d'activation les étapes suivantes :

- 1 - l'induction
- 2 - la transmission
- 3 - la réponse

1 - L'induction

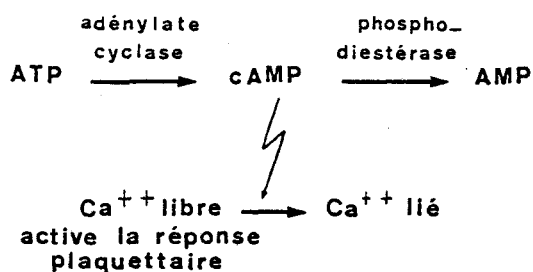
L'induction au niveau de la surface plaquettaire se traduit par un contact de la plaquette avec l'agent stimulant. Outre l'interaction plaquette-collagène, beaucoup d'autres stimuli peuvent réagir avec la membrane plasmique (exemple des enzymes protéolytiques comme la thrombine et de petites molécules comme l'ADP, l'adrénaline ou la sérotonine).

Il est d'ailleurs admis à l'heure actuelle qu'il existe un récepteur spécifique pour chaque inducteur (HOLMSEN et DAY : 43) ; cependant, aucun récepteur n'a encore jusqu'à maintenant été isolé.

2 - La transmission

Une fois la membrane activée, un intermédiaire est libéré dans le cytosol. La présence des ions calcium dans la propagation du stimulus s'est révélée importante (MASSINI : 44).

Pendant l'activation, la dégradation du glycogène est la source principale d'ATP qui rapidement dégradé en AMP dans le cytosol fournit l'énergie nécessaire à la réponse plaquettaire (HOLMSEN : 45) ; l'adénylcyclase plaquettaire transforme l'ATP en AMP cyclique qui est un régulateur des mouvements calciques, selon le schéma :



La diminution du taux basal de l'AMP cyclique a pour conséquence de libérer le calcium dans le cytosol (SALZMAN : 46) ; celui-ci est probablement libéré à partir de sites spécifiques membranaires (STATLAND *et al.* : 47 ; KASER-GLANZMAN *et al.* : 48). La réponse plaquettaire au stimulus va donc dépendre de la concentration en calcium et en ATP disponibles dans la cellule.

3 - La réponse

Les plaquettes changent alors de forme, secrètent le contenu de leurs granules et s'agrègent.

a - Changement de forme

De discoïdes, les plaquettes gonflent et deviennent sphériques, et émettent des pseudopodes ; l'étude ultrastructurale révèle que les microtubules s'organisent à la périphérie, les mitochondries et les granules migrent au centre de la cellule, les membranes de ces derniers fusionnent avec celles du système canaliculaire interne et le matériel granulaire est ainsi excrété.

A ces modifications morphologiques observées, correspond une augmentation importante du métabolisme de la cellule (HOLMSEN : 49) : le calcium libre active, d'une part, les protéines contractiles du cytosol et, d'autre part, la phospholipase A2 : celle-ci permet la libération d'acide arachidonique, précurseur de la synthèse des prostaglandines. Les intermédiaires des prostaglandines : les endoperoxydes cycliques sont synthétisés dans le système tubulaire dense et se comportent comme des ionophores physiologiques (GERRARD *et al.* : 50) : ils transportent

le calcium cytosolique vers les protéines contractiles pour les activer. Les lysophospholipides formés après la libération d'acide arachidonique permettraient l'incorporation de la membrane des granules dans la membrane interne plasmique (GERRARD *et al.* : 51).

Certains produits finals de la synthèse des prostaglandines (comme la prostaglandine E₁) sont capables d'augmenter le taux d'AMP cyclique dans la plaquette (HASLAM : 52) et ainsi de réguler le taux des ions calcium disponibles dans le cytoplasme.

b - Sécrétion

Lors de la réaction de libération, les substances essentiellement sécrétées sont les nucléotides adényliques (ADP, ATP), la sérotonine, l'albumine, des enzymes (collagénase, élastase), différents facteurs plaquettaires (facteur 4, facteur de perméabilité vasculaire, facteur de croissance). Ce phénomène de sécrétion ne signifie pas mort cellulaire, la plaquette pouvant participer ultérieurement à d'autres fonctions.

c - Agrégation

L'ADP libéré à une concentration élevée dans le milieu circulant est un inducteur puissant de l'interaction des plaquettes entre elles, conduisant à la formation d'un agrégat plaquettaire. Renforcées par la présence de fibrine, les plaquettes agrégées forment le bouchon hémostatique.

Le collagène dont l'activité est liée à la libération d'ADP intraplaquettaire est considéré comme un inducteur de l'agrégation ADP-dépendante.

D'autres substances comme la sérotonine, l'adrénaline, les endoperoxydes, l'ADP lui-même, peuvent aussi jouer un rôle d'inducteur de l'agrégation ADP-dépendante. La thrombine, le facteur WILLEBRAND par contre sont des inducteurs de l'agrégation ADP-indépendante car leur effet ne nécessite par l'intervention de l'ADP.

Différentes hypothèses ont été avancées pour tenter d'expliquer le mécanisme exact de l'interaction plaquette-plaquette (GAARDER et LALAND : 53 ; HAMPTON et MITCHELL : 54 ; SALZMAN *et al.* : 55 ; BOOYSE et RAFELSON : 56 ; PACKHAM *et al.* : 57). Cependant, aucune n'a apporté de réponse satisfaisante à l'élucidation du phénomène. Il est apparu récemment (NURDEN et CAEN : 58, 59 ; PHILLIPS *et al.* : 60 ; JENKINS *et al.* : 61) que certaines glycoprotéines de la membrane plaquettaire jouent un rôle fondamental dans les phénomènes de reconnaissance cellulaire. Nous verrons en détail le rôle de ces glycoprotéines au cours d'un chapitre particulier (voir p. 24).

II - ROLE DANS LA COAGULATION

Les plaquettes jouent un rôle essentiel dans la coagulation endogène. Lors de la stimulation des plaquettes et de leur changement de forme, le facteur plaquettaire 3 qui est un phospholipide membranaire, devient accessible à la surface de la plaquette : il constitue le support de différentes réactions biochimiques :

- en accélérant l'interaction des facteurs plasmatiques VIII et IX, il permet l'activation du facteur X (Xa, un enzyme protéolytique capable de dégrader la prothrombine en thrombine) ;

- la formation du complexe Xa, V, calcium, et du phospholipide permet ensuite la libération de thrombine.

Au moment de la sécrétion, sont libérés le facteur 4 qui neutralise l'effet anticoagulant de l'héparine (MOORE *et al.* : 62) et le fibrinogène. La thrombine, outre le fait de renforcer l'agrégation plaquettaire, transforme le fibrinogène en fibrine. Le facteur XIII plaquettaire et d'autres substances libérées qui inhibent à la fois l'activation du plasminogène et l'action de la plasmine, stabilisent la fibrine formée. Le réseau de fibrine auquel viennent se fixer les plaquettes agrégées constitue un complexe qui forme le clou hémostatique et permet ainsi l'arrêt du saignement.

III - ROLE DANS LA THROMBOSE

L'athérosclérose est la cause la plus fréquente des thrombus artériels. Elle est caractérisée par une altération de la surface vasculaire, celle-ci amenant les plaquettes à jouer le rôle fondamental qui leur est assigné. L'évolution ultérieure de la masse solide plaquettes-fibrine qui forme le thrombus est variable :

- il peut y avoir intégration du thrombus à la lésion athéromateuse : le thrombus est dit mural et son devenir est lié à l'importance de son extension ;

- la seconde possibilité est une embolisation du thrombus, dont les conséquences sont l'infarctus du myocarde, les accidents vasculaires cérébraux et l'ischémie aigüe des membres inférieurs.

Un certain nombre d'arguments expérimentaux (DUGUID : 63 ; FRENCH : 64 ; JORGENSEN *et al.* : 65) est venu étayer la responsabilité des plaquettes dans la genèse des lésions artérielles conduisant à l'athérosclérose. Parmi les nombreux constituants libérés au cours de l'activation plaquettaire, plusieurs facteurs ont été reconnus responsables de lésions de la paroi :

- la collagénase, qui entraîne une lésion de l'endothélium (CHESNAY *et al.* : 66) et l'élastase menant à une rupture de la limitante élastique interne (LEGRAND *et al.* : 67) ;

- le facteur de perméabilité, capable de provoquer un oedème du sous-endothélium (NACHMAN *et al.* : 68) ;

- le facteur de croissance, qui permet une prolifération des cellules musculaires lisses (ROSS *et al.* : 69).

Toutes ces modifications peuvent alors conduire à de profonds remaniements de la paroi vasculaire et à des surcharges calcique et lipidique secondaires caractéristiques de l'athérosclérose.

Le rôle des plaquettes en hémostase peut être résumé dans le schéma suivant (Fig.2) :

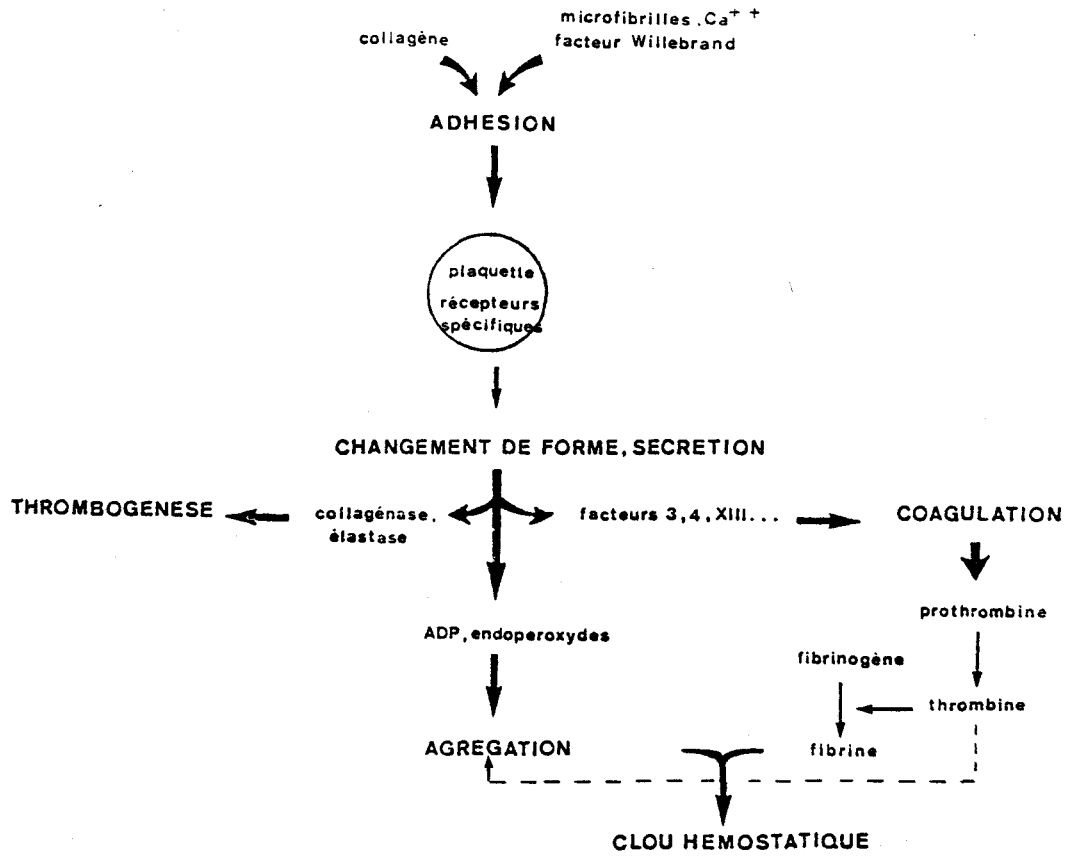


Figure 2 : Rôle des plaquettes en hémostase



2 - LA MEMBRANE PLAQUETTAIRE

La fonction biologique essentielle des plaquettes est leur adhésion à des substrats biologiques comme le collagène, et leur agrégation. Chez des sujets présentant des troubles fonctionnels de la plaquette, il a été montré une déficience grave de certaines glycoprotéines de la surface plaquettaire (DEGOS *et al.* : 70 ; NURDEN et CAEN : 71, 72 ; PHILLIPS et POH-AGIN : 73). Cet exemple souligne bien l'importance de la membrane plasmique qui n'est pas une simple barrière entre la cellule et son environnement, et de l'implication des glycoconjugués de surface dans les mécanismes de reconnaissance et de régulation. L'importance du rôle de ces glycoconjugués a fait l'objet de très nombreuses recherches (voir les revues générales de SHARON : 74 ; HUGUES : 75 ; ROSENBERG et SCHENGRUND : 76).

I - LES GLYCOCONJUGUES DES SURFACES CELLULAIRES

La membrane plasmique se présente comme une mosaïque fluide (SINGER et NICOLSON : 77), constituée par une double couche lipidique dans laquelle sont intégrées diverses protéines. Les glycannes, fraction quantitativement mineure de la membrane, sont présents seulement à sa surface externe, liés de façon covalente à des fractions lipidiques (*glycolipides*) ou à des fraction protéiques (*glycoprotéines*).

Les phénomènes biologiques dans lesquels les glycoconjugués de surface sont impliqués nécessitent une grande spécificité moléculaire (COOK : 78) ; la connaissance de la structure des glycoconjugués est donc essentielle pour une meilleure compréhension de ces phénomènes.

La détermination de la structure de ces composés n'est possible qu'après l'isolement des molécules et l'utilisation de méthodes fines d'exploration de la structure.

A - LES GLYCOLIPIDES

Localisés à la surface de la membrane plasmique, les glycolipides à sphingosine (ou sphingoglycolipides) constituent une sous-classe importante des lipides. Leurs parties apolaires sont identiques à celle de la sphingomyéline, mais un résidu glycanique est substitué à la phosphorylcholine ; le motif de base commun est : β -Gal-(1 \rightarrow 4)- β -Glc-(1 \rightarrow)-Céramide. A partir de ce lactosyl-céramide, se constituent des glycolipides de plus en plus complexes qui peuvent être neutres ou chargés négativement de part la présence de résidus d'acide sialique (gangliosides); (voir la revue générale de HAKOMORI : 79).

B - LES GLYCOPROTEINES

L'étude structurale des glycoprotéines membranaires se révèle difficile car elles portent en général plusieurs glycannes et surtout leur isolement à l'état pur et en quantité suffisante n'est pas aisé.

Les quelques schémas de structure trouvés pour les glycoprotéines ou leurs glycopeptides solubilisés et purifiés se sont révélés pour une grande partie identiques à ceux trouvés pour les glycoprotéines du plasma sanguin, des tissus et des liquides d'excrétion.

Selon le type de liaison entre le glycanne et la protéine, on distingue deux types de glycoprotéines (voir les revues générales récentes de SHARON : 80 ; MONTREUIL : 81, 82, 83 ; HOROWITZ et PIGMAN : 84, 85 ; WALBORG : 86 ; STRECKER et MONTREUIL : 87 ; LENNARZ : 88) :

- les N-glycosylprotéines, où le glycanne est conjugué à un résidu d'asparagine par une liaison N-glycosidique ;

- les O-glycosylprotéines, où le glycanne est conjugué à un hydroxyaminoacide qui peut être la sérine, la thréonine, l'hydroxylysine ou l'hydroxyproline.

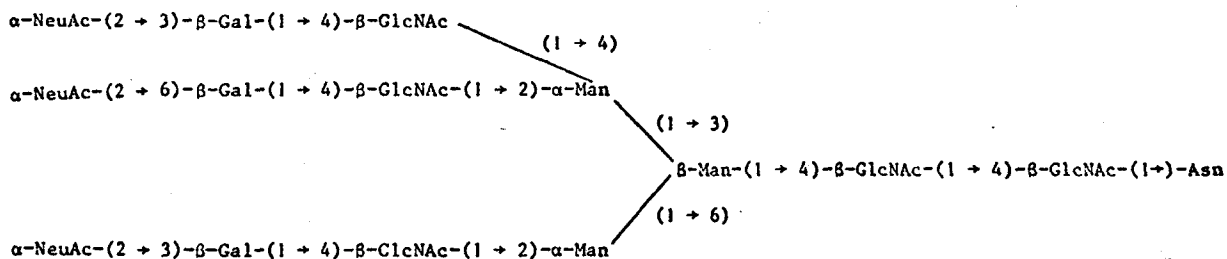


Figure 4 : Structure d'un glycanne triantenné de la fêtuine de Veau
(NILSON et al.: 94)

Récemment, FINNE *et al.* (95) ont montré l'existence possible d'un branchement de l'acide sialique en position C-8 sur un acide sialique préalablement fixé.

Les résidus de mannose 4 et 4' peuvent être substitués par une ou plusieurs branches supplémentaires de N-acétyllactosamine (sialylées et fucosylées ou non), donnant ainsi des structures tri ou (et) tétra antennées (exemple du glycopeptide de la fêtuine cité ci-dessus, Fig. 4).

c - Les glycannes de type mixte

Des structures de type mixte entre les types oligomannosidique et N-acétyllactosaminique ont été également mises en évidence : un résidu N-acétylglucosaminyl peut venir se brancher en position terminale non réductrice sur un mannose du noyau pentasaccharidique (exemple d'un glycopeptide isolé de l'ovalbumine, TAI *et al.* : 96).

2 - Les O-glycosylprotéines

La nature du glycanne et de la partie protéique impliqués dans la liaison O-glycosidique est variable ; plusieurs monosaccharides (Gal, GalNAc, Man, Xyl) et plusieurs acides aminés (Ser, Thr, Hyl, Hyp) interviennent. Selon le type de liaison, nous distinguerons :

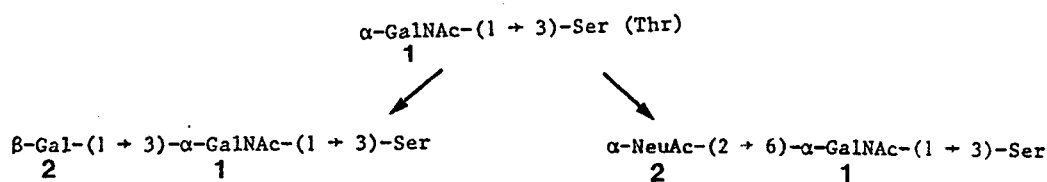
- a - les glycoprotéines de type collagène
- b - les glycoprotéines de type mucine
- c - les protéoglycannes

a - Les glycoprotéines de type collagène

Dans les collagènes des Mammifères, le galactose est conjugué O-glycosidiquement à l'hydroxylysine par la liaison suivante : α -Gal(1 \rightarrow)-Hyl. Les résidus galactosyl peuvent être glucosylés en position C-2 (voir les revues générales de BALASZ : 97 ; SHARON : 98).

b - Les glycoprotéines de type mucine

La liaison glycanique α -GalNAc-(1 \rightarrow)-Ser (ou Thr) est la plus fréquemment rencontrée et que l'on retrouve dans les mucines (GOTTSCHALK *et al.* : 99). Sur ce premier résidu de N-acétyllactosamine se greffe soit un résidu de β -galactose en position C-3 soit un résidu d'acide sialique en position C-6 :



Exemple du glycanne de la mucine sous-maxillaire de Porc (CARLSON et MC GUIRE : 100)

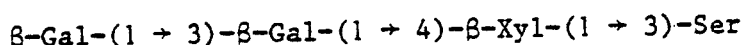
Exemples des glycannes de la mucine sous-maxillaire de Porc (CARLSON et MC GUIRE : 101) et de Mouton (BERTOLINI et PIGMAN : 102)

Sur le résidu de galactose 2 peuvent alors se brancher : un résidu d'acide sialique en position C-3 (exemple de la glycophorine, THOMAS et WINZLER : 103), un résidu fucosyl en position C-2, un résidu de N-acétylgalactosamine en position C-3 (exemple du glycanne de la mucine sous-maxillaire de Porc (CARLSON *et al.* : 104).

Le résidu de N-acétylgalactosamine peut aussi être substitué par des résidus N-acétyllactosaminyl, conférant ainsi au glycanne une structure branchée (exemple d'un glycanne de l'épiglycanine des cellules TA₃, CODINGTON *et al.* : 105).

c - Les protéoglycannes

Une classe particulière des O-glycoprotéines est constituée par les protéoglycannes ou mucopolysaccharides. La séquence d'attache à la partie O-protéique est la suivante :



A partir de ce trisaccharide de base, se forment des polymères à structure répétitive, constitués par de l'acide uronique lié à de la N-acétylgalactosamine (voir la revue générale de RODEN : 106).

3 - Les N,O-glycosylprotéines

Les deux types de glycannes N- et O-glycosidiques ont pu être mis en évidence sur un même glycopeptide (exemples du glycopeptide isolé de l'hépatome AS-30D, SMITH et WALBORG : 107, et du glycopeptide d'hépatocytes en culture, DEBRAY et MONTREUIL : 108) et sur une même protéine (exemples de la glycophorine, WINZLER : 109, et de la fétuine, BAENZIGER et FIETE : 110 ; SPIRO et BHOYROO : 111).

II - LES GLYCOPROTEINES PLAQUETTAIRES

La microscopie électronique associée à des techniques cytochimiques a permis de montrer que la surface externe de la membrane plaquettaire est riche en glycanes (BENHKE : 112). Une faible proportion du contenu en glucides membranaires se trouve associée aux sphingolipides (MARCUS *et al.* : 113) ; le reste se trouve associé aux protéines de surface. L'orientation exclusive de ces glycoprotéines vers l'extérieur (NURDEN et CAEN : 114 ; KUNICKI et ASTER : 115) est identique à celle observée dans les membranes plasmiques d'autres types de cellules (NICOLSON et SINGER : 116).

Jusqu'à ces dernières années, les quelques études réalisées sur des glycopeptides isolés de la membrane plasmique de la plaquette (PEPPER et JAMIESON : 117 ; MULLINGER et MANLEY : 118 ; LOMBART *et al.* : 119) n'avaient pas permis de caractériser une seule structure. PEPPER et JAMIESON (120, 121) avaient cependant montré l'existence des deux types de glycanes N- et O-conjugués aux protéines sur la membrane plaquettaire.

Le développement de techniques sophistiquées pour l'identification des glycoprotéines de la membrane plaquettaire (CLEMETSON *et al.* : 122 ; PHILLIPS et POH-AGIN : 123 ; GEORGE *et al.* : 124 ; ANDERSSON *et al.* : 125) permet de dénombrer actuellement la présence de plus d'une trentaine de glycoprotéines à la surface de la plaquette (SIXMA et SCHIPHORST : 126 ; MC GREGOR *et al.* : 127). Parmi celles-ci, trois glycoprotéines (Ib, IIb et III) sont prédominantes ; en regard du rôle fonctionnel qui leur est assigné depuis peu dans l'adhésion et l'agrégation plaquettaires, un intérêt croissant pour une étude plus approfondie de ces glycoprotéines est en train de se développer.

A - ETUDE STRUCTURALE DES GLYCOPROTEINES Ib, IIb et III

1 - La glycoprotéine Ib (GPIb)

La glycoprotéine Ib est la plus riche en acide sialique de toutes les glycoprotéines identifiées de la membrane plaquettaire. De masse moléculaire apparente 170.000 daltons, elle est constituée de deux sous-unités $Ib\alpha$ et $Ib\beta$, reliées par 1 pont disulfure intermoléculaire et exposé à l'extérieur de la plaquette (PHILLIPS et POH-AGIN : 128). Sous l'action d'une protéase calcium dépendante (CDP) (PHILLIPS et JAKABOVA : 129), la GPIb libère la glycolaline encore appelées GPIs car elle se présente sous forme soluble ; ce fragment hydrolytique, isolé par JAMIESON *et al.* (130) possède 60 % de sucres identifiés comme le galactose, la N-acétylgalactosamine, la N-acétylglucosamine et l'acide sialique. Bien que la structure complète de sa partie glycannique ne soit pas encore connue, l'emploi de lectines a permis de montrer, d'une part, l'existence à l'extrémité non réductrice d'un résidu N-acétylneuraminyl ou d'un résidu β -N-acétylglucosaminyl et , d'autre part, la présence d'une structure β -Gal-(1 \rightarrow 3)- α -GalNAc-(1 \rightarrow)-Ser(Thr). Récemment, CLEMETSON *et al.* (131) ont isolé l'*asialoglycoprotéine Ib* et l'*asialoglycolaline* par chromatographie d'affinité sur *peanut agglutinine* ; ces auteurs montrent que la glycolaline possède au moins un pont disulfure intramoléculaire et ils proposent une représentation schématique de l'agencement de la GPIb dans la membrane (Fig. 5) :

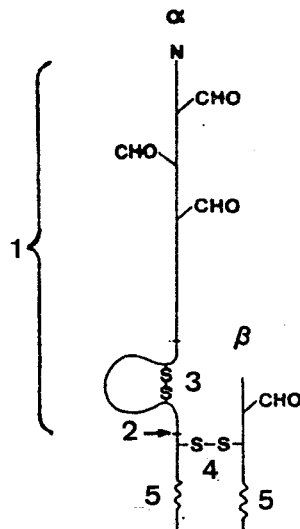


Figure 5 : Représentation schématique de la GPIb dans la membrane plasmique de la plaquette d'après CLEMETSON *et al.* (131). 1, glyco-calicine. 2, point d'hydrolyse de la protéine calcium dépendante (CDP) libérant la glyco-calicine. 3, pont disulfure intramoléculaire de la glyco-calicine. 4, pont disulfure intermoléculaire entre les unités α et β . 5, séquence hydrophobe pénétrant la bicouche lipidique.

2 - Les glycoprotéines IIb et III (GPIIb et GPIII)

Contrairement à la GPIb, les glycoprotéines IIb et III sont beaucoup plus intégrées dans la membrane (PHILLIPS : 132) et l'utilisation de détergents comme le Triton X100 est nécessaire pour les solubiliser totalement. Elles contiennent toutes deux de l'acide sialique (ANDERSSON et GAHMBERG : 133). La glycoprotéine IIb, de masse moléculaire apparente 142.000 daltons (NURDEN et CAEN : 134 ; PHILLIPS : 135) est composée comme la GPIb de deux sous-unités α et β ; la chaîne peut ne pas être glycosylée (PHILLIPS : 136). La GPIII de masse moléculaire apparente de 100.000 daltons (NURDEN et CAEN : 137 ; PHILLIPS : 138) contient une seule chaîne polypeptidique avec au moins deux ponts disulfure intramoléculaires.

Le schéma suivant proposé par PHILLIPS (139) donne une représentation de l'intégration des deux glycoprotéines dans la membrane (Fig. 6) :

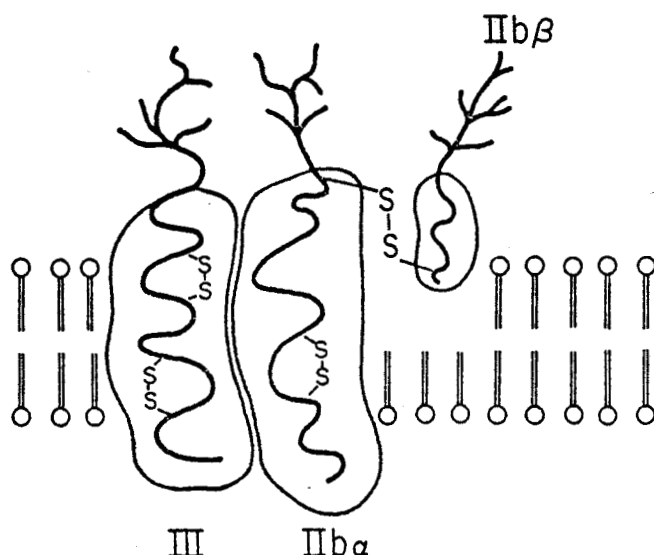


Figure 6 : Orientation de la GPIIb et de la GPIII dans la membrane plasmique de la plaquette, d'après PHILLIPS (139).

Le fait que ces deux glycoprotéines soient très faiblement marquées au tritium par la technique d'oxydation à la galactose oxydase, suivie d'une réduction au borohydrure tritié, suggère un taux faible en glycannes. Elles viennent d'être isolées par LEUNG *et al.* (140). Les cartes peptidiques des deux glycoprotéines IIb et III apparaissent très différentes, mais aucune étude structurale poussée n'a encore été réalisée.

B - RÔLE DES GLYCOPROTEINES DANS L'ADHESION ET L'AGREGATION PLAQUETTAIRES

L'activation des plaquettes par le collagène, la thrombine ou l'ADP d'une part, et l'agrégation des plaquettes entre elles

d'autre part, sont des réactions nécessitant la présence de récepteurs spécifiques à la surface de la plaquette. L'identification des molécules responsables des réactions d'adhésion et d'agrégation a pu être réalisée à partir de cas cliniques caractérisés par des désordres fonctionnels plaquettaires importants : ce sont les maladies de BERNARD-SOULIER et thrombasthénie de GLANZMANN.

1 - La glycoprotéine Ib

Décrit initialement par BERNARD et SOULIER (141), le syndrome de BERNARD-SOULIER est caractérisé par un défaut des plaquettes de ces malades à adhérer au sous-endothélium vasculaire (CAEN *et al.* : 142). En 1975, NURDEN et CAEN (143) montraient que la glycoprotéine Ib est absente dans ces plaquettes dystrophiques. La relation directe entre le déficit moléculaire et le déficit fonctionnel était alors envisagée. Un anticorps antiplaquettaire survenu chez un de ces malades après de nombreuses transfusions de plaquettes normales s'est révélé être dirigé contre l'antigène absent dans le syndrome de BERNARD-SOULIER, c'est-à-dire la GPIb (TOBELEM *et al.* : 144) : cet anticorps est capable de reproduire *in vitro* sur des plaquettes normales le défaut fonctionnel des plaquettes BERNARD-SOULIER, et confirme donc le rôle de la glycoprotéine Ib dans l'interaction plaquettes-vaisseau.

En 1977, la démonstration de l'incapacité du facteur VIII/facteur WILLEBRAND (F VIII/WF) (facteur nécessaire pour l'adhésion aux microfibrilles de la membrane basale du vaisseau lésé) de se fixer aux plaquettes BERNARD-SOULIER (ZUCKER *et al.* : 145) est en faveur du rôle de la GPIb dans l'adhésion en tant que récepteur de FVIII/WF. L'utilisation récente d'un anticorps monoclonal antiglycoprotéine I (anticorps AN51) RUAN *et al.* : 146) a permis de confirmer que la GPI est un site de liaison pour le facteur VIII/facteur WILLEBRAND.

Récemment, JAMIESON et OKUMURA (147) ont montré que l'agrégation des plaquettes BERNARD-SOULIER induite par la thrombine était diminuée. Ces auteurs suggèrent que la GPIb pourrait aussi représenter le récepteur de la thrombine (OKUMURA *et al.* : 148 ; GANGULY : 149 ; JAMIESON et OKUMURA : 150). Cependant, cette hypothèse est controversée (NACHMAN *et al.* : 151 ; TAM et DETWILLER : 152) ; à cet égard, PHILLIPS et POH-AGIN (153) soulignent l'existence d'une autre glycoprotéine de la membrane plasmique : la GPV (BERNDT et PHILLIPS : 154) spécifiquement hydrolysée par la thrombine et qui, associée à la GPIb, interagit avec l'inducteur.

2 - Les glycoprotéines IIb et III

Dans la thrombasthénie de GLANZMANN, la caractéristique essentielle de ces plaquettes pathologiques est leur inaptitude à l'agrégation quel que soit l'agent agrégant utilisé (CAEN *et al.* : 155 ; PHILLIPS *et al.* : 156). NURDEN et CAEN (157), d'une part, et PHILLIPS *et al.* (158), d'autre part, ont observé dans cette maladie une diminution importante ou même une absence totale du complexe glycoprotéique IIb/III. Cette observation était en faveur d'un rôle d'une ou de deux glycoprotéines dans l'agrégation, comme étant des sites d'agrégation à la surface de la plaquette.

Le rôle des glycoprotéines IIb et III dans l'agrégation a pu être également confirmé grâce à l'utilisation d'un anticorps antiplaquettaire d'alloimmunisation provenant d'un malade atteint de thrombasthénie de GLANZMANN, après des transfusions répétées de plaquettes normales : cet anticorps interagit avec GPIIb et GPIII (HAGEN *et al.* : 159) et est capable de reproduire *in vitro* sur des plaquettes normales le défaut fonctionnel des plaquettes thrombasthéniques (DEGOS *et al.* : 160 ; LEVY-TOLEDANO *et al.* : 161).

Dans le but de caractériser la nature de ces interactions, GERRARD *et al.* (162) et JOCKUSCH (613) ont montré que la GPIII pouvait interagir avec les filaments d'actine de la plaquette et pouvait donc être assimilée à de l' α -actinine. Après agrégation induite par la thrombine, seules ces deux glycoprotéines interagissent avec les protéines contractiles de la plaquette (PHILLIPS *et al.* : 164). Ces observations sont cependant en contradiction avec les travaux tout récents de LANGER *et al.* (165) : selon ces auteurs, la GPIII et l' α -actinine sont des protéines différentes.

La présence de fibrinogène plasmatique est nécessaire pour l'agrégation ADP-dépendante (MUSTARD *et al.* : 166) : celle-ci est inhibée par des anticorps anti-fibrinogène (TOLLEFSEN *et al.* : 167). Des récepteurs spécifiques pour le fibrinogène à la surface de la plaquette activée ont été récemment mis en évidence (MARGUERIE *et al.* : 168 ; BENNETT et VALAIRE : 169). Or les plaquettes thrombasthéniques présentent un défaut de fixation du fibrinogène (BENNETT et VILAIRE : 170 ; PEERSCHKE *et al.* : 171) ; en outre, l'anticorps d'alloimmunisation antiglycoprotéine IIb/III est capable d'inhiber la liaison du fibrinogène sur des plaquettes normales (LEE *et al.* : 172). La présence du complexe glycoprotéique IIb/III apparaît donc comme une condition nécessaire à la liaison du fibrinogène plasmatique sur la membrane plasmique de la plaquette activée ; cependant, on ne sait pas encore si le site de fixation du fibrinogène est directement localisé sur le complexe IIb/III.

Il faut noter que le complexe IIb/III supporte l'activité antigénique PLA¹ puisque tous les sujets thrombasthéniques sont PLA¹⁽⁻⁾ (KUNICKI et ASTER : 173).

Le rôle des glycoprotéines Ib, IIb et III de la membrane plaquettaire dans l'interaction plaquettes-vaisseau et plaquettes-plaquettes est résumé dans le schéma suivant proposé par RUAN *et al.* (174) (Fig. 7) :

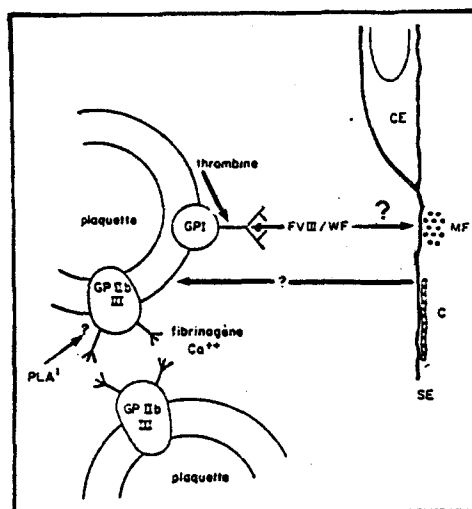


Figure 7 : Rôle des glycoprotéines Ib, IIb, III :

CE, cellules endothéliales. MF, microfibrilles. C, collagène. SE, sous-endothélium. GPI : glycoprotéine I. GPIIb/III, complexe glycoprotéique IIb/III. PLA¹, antigène plaquettaire de groupe PLA¹.

3 - Conclusion

Il ressort de ces études que les glycoprotéines de la membrane plaquettaire jouent un rôle biologique extrêmement important, et nous conduisent donc à nous demander comment ces glycoconjugués sont biosynthétisés et intégrés dans la membrane.

III - BIOGENESE DE LA MEMBRANE PLAQUETTAIRE

Lors de sa maturation, le mégacaryocyte possède une activité synthétique très grande : il y a augmentation de la ploïdie, accroissement du volume cytoplasmique, production d'un grand nombre de granules cytoplasmiques, synthèse de microtubules et de l'actomyosine, et formation

de membranes de démarcation (qui formeront les membranes plasmiques des futures plaquettes). Lors de leur libération dans le sang, les plaquettes issues du mégacaryocyte possèdent donc déjà une grande partie de leurs composants de structure et il est probable que la membrane plasmique de la plaquette représente un vestige du reticulum endoplasmique lisse de mégacaryocyte. Bien qu'étant une cellule anucleée, la plaquette est pourtant le siège d'une synthèse faible des acides gras (MAJERUS *et al.* : 175), des acides nucléiques et des protéines (WARSHAW : 176 ; SCHNEIDER *et al.* : 177).

Bien que rien ne soit connu pour la plaquette, il a été démontré pour des fibroblastes en culture une synthèse et une dégradation constantes des glycoconjugués de la membrane plasmique de ces cellules (WARREN et GLICK : 178). Différentes activités glycosidasiques ont été mises en évidence dans les plaquettes (BOSMANN : 179).

L'ensemble de ces données nous amène à nous poser deux questions :

- les plaquettes possèdent-elles un métabolisme propre, leur permettant d'achever les glycoconjugués de surface lors de leur intégration dans la membrane ?

- sont-elles aptes à réparer et réguler leur taux de résidus monosaccharidiques à leur surface, c'est-à-dire à moduler la quantité de signaux de reconnaissance ?

3 - BIOSYNTHESE DES GLYCOPROTÉINES ;

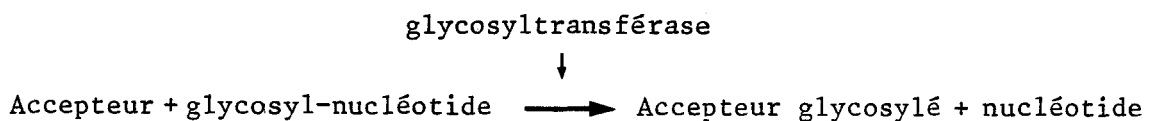
LES GLYCOSYLTRANSFERASES PLAQUETTAIRES

Nous nous proposons dans ce chapitre de rappeler les schémas généraux concernant la biosynthèse des glycoprotéines ; cette biosynthèse se faisant par l'intermédiaire d'enzymes de biosynthèse : *les glycosyltransférases*. Nous examinerons ensuite les résultats déjà obtenus sur les glycosyltransférases plaquettaires.

I - BIOSYNTHESE DES N- ET O-GLYCOSYLPROTEINES

A - REACTIONS ENZYMATIQUES

Les résidus monosaccharidiques sont transférés aux extrémités non réductrices d'oligosaccharides ou de polysaccharides, ou sur des protéines et des lipides par des enzymes spécifiques, les glycosyltransférases, (ROSEMAN : 180 ; SCHACHTER et RODEN : 181) selon le schéma suivant :



Le sucre est activé par liaison à un nucléoside mono ou diphosphate, mais il peut aussi être activé par liaison à un lipide polyisoprénoïde de type rétinol ou dolichol (ce qui est le cas dans les premières étapes de la biosynthèse des N-glycosylprotéines). Les glycosyltransférases sont spécifiques du sucre qu'elles reconnaissent et de la liaison qu'elles forment (ROSEMAN : 182, SCHACHTER et RODEN : 183).

1 - Biosynthèse des N-glycosylprotéines

Le schéma suivant (Fig. 8) résume les connaissances actuelles au sujet de la biosynthèse des N-glycosylprotéines :

- La synthèse du noyau pentasaccharidique substitué par des résidus de mannose et de glucose se fait grâce aux intermédiaires lipidiques (cycle des dolichols) (voir les revues générales de WAECHTER et LENNARZ : 184 ; HEMMING : 185, 186) : *étape 1*

- La seconde étape consiste en un transfert en bloc du glycanne sur un résidu d'asparagine de la protéine (KIELY *et al.* : 187 ; JAMIESON : 188) ; le résidu accepteur asparaginyl est situé dans un "coude β " (AUBERT *et al.* : 189, BEELEY : 190). La présence des résidus glucosyl sur l'oligosaccharide PP-Dol bloque l'action d'une phosphodiesterase capable de couper la liaison pyrophosphate, maintenant un taux intracellulaire en oligosaccharide PP-Dol élevé et favorisant ainsi le transfert de l'oligosaccharide sur la protéine (HOFLACK *et al.* : 191) : *étape 2*

- La maturation ultérieure du glycanne comporte ensuite plusieurs étapes : (étapes 3 à 6) :

- élimination des résidus glucosyl et mannosyl excédentaires par des enzymes spécifiques (ROBBINS *et al.* : 192, TABAS *et al.* : 193 ; CHEN et LENNARZ : 194, 195 ; GRINNA et ROBBINS : 196) : *étape 3*

- branchement d'un résidu N-acétylglucosaminyl par la β -2-N-acétylglucosaminyltransférase I (STANLEY *et al.* : 197) : *étape 4*

- élimination de deux résidus de mannose par une ou plusieurs mannosidases golgiennes (HARPAZ et SCHACHTER : 198) : *étape 5*

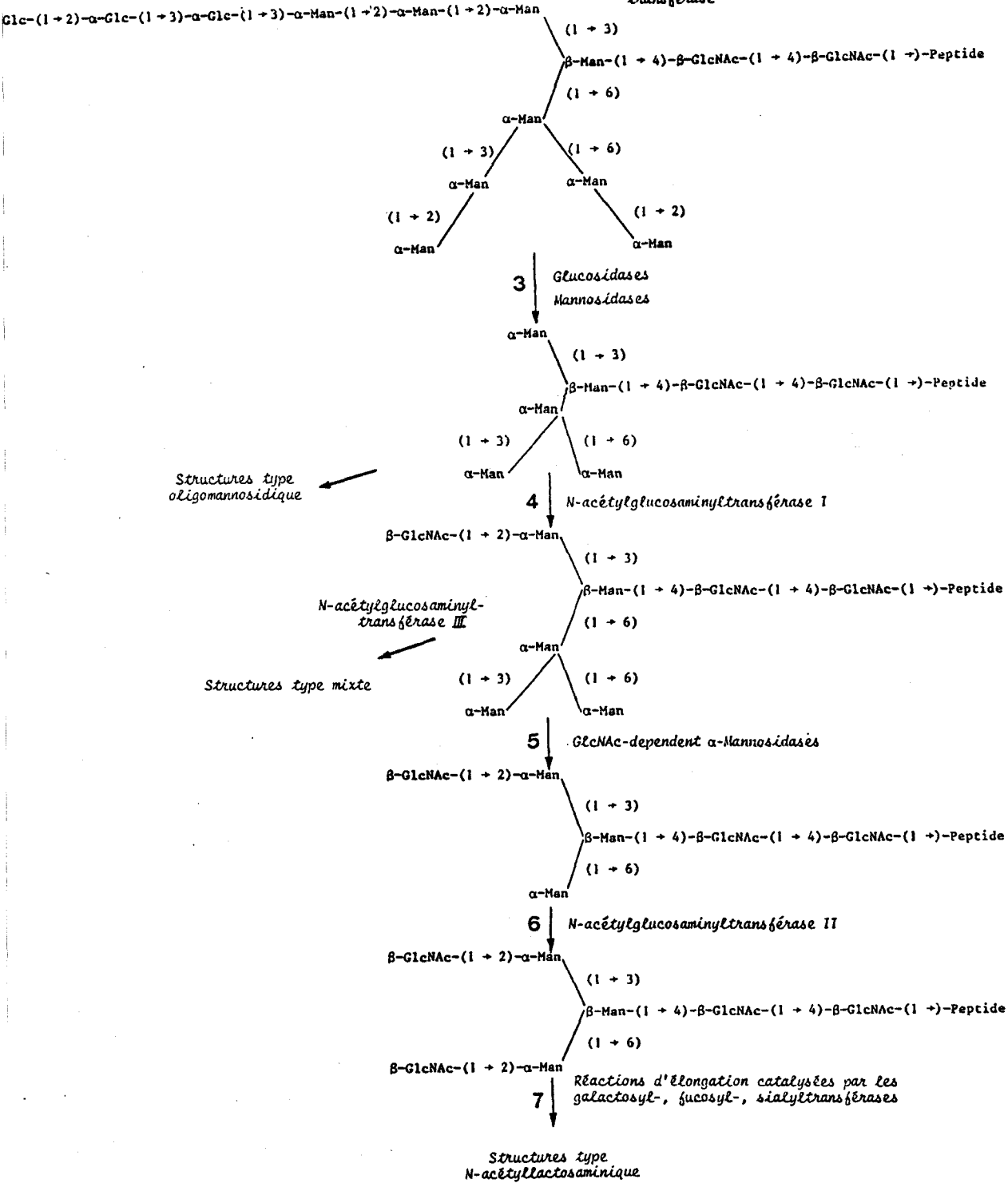
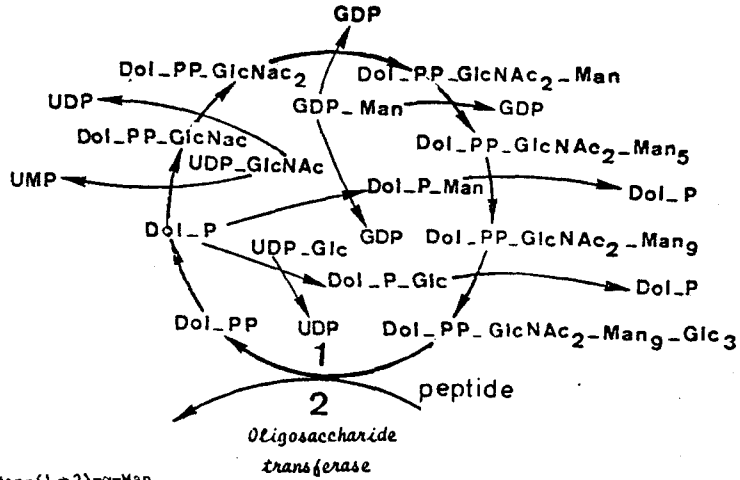


Figure 8 : Schéma de biosynthèse des N-glycosylprotéines

- action de la β -2-N-acétylglucosaminyltransférase II (NARASIMHAM *et al.* : 199), avant ou après branchement du résidu fucosyl en position C-6 sur la N-acétylglucosamine du point d'attache (JABBAL et SCHACHTER : 200 ; WILSON *et al.* : 201) : *étape 6*

-En fin de maturation, les résidus terminaux viennent ensuite allonger le glycanne : *étape 7*

- addition de résidus galactosyl par une β -4-galactosyltransférase (KHATRA *et al.* : 202, SCHACHTER et ROSEMAN : 203)

- addition de résidus fucosyl et sialyl terminaux. L'ordre de ces dernières réactions n'est pas encore totalement connu, mais ces glycosylations obéissent à des lois strictes de substitution : la coexistence d'acide sialique et de fucose sur une même branche n'a pas été décrite. Le branchement du fucose peut se faire, soit en position C-3 sur la N-acétylglucosamine "5" par une α -3-fucosyltransférase (PAULSON *et al.* : 204), soit en position C-3 sur le galactose terminal : dans ce dernier cas, aucun auteur n'a pu montrer jusqu'à maintenant l'existence d'une β -2-fucosyltransférase. Les résidus sialyl sont branchés en position C-3 ou C-6 sur les résidus galactosyl terminaux ; si l'existence d'une α -6-sialyltransférase a pu être démontrée depuis plusieurs années (BARTHOLOMEW *et al.* : 205, PAULSON *et al.* : 206, 207, 208), ce n'est que très récemment qu'une sialyltransférase ajoutant l'acide sialique en position C-3 a été mise en évidence (VAN DEN EIJNDEN et SCHIPHORST : 209) (se reporter au paragraphe suivant page 36, concernant une mise à jour de nos connaissances au sujet des sialyltransférases cellulaires).

En conclusion, ce schéma de biosynthèse des N-glycosylprotéines montre bien l'apparition des structures oligomannosidiques et N-acétyllactosaminiques. Les structures de type mixte pourraient être for-

mées à partir de l'étape 4. Cependant, l'existence de la N-acétylglucosaminyltransférase III conduisant à la formation des structures mixtes n'a encore jamais été montrée. HARPAZ et SCHACHTER (210) la font intervenir car la présence d'un résidu β -N-acétylglucosaminyl en position C-4 bloque l'action de la β -2-N-acétylglucosaminyltransférase II.

2 - Biosynthèse des O-glycosylprotéines

Le schéma de biosynthèse des O-glycosylprotéines que nous pouvons actuellement tracer se dégage des études faites sur les O-glycosylprotéines de type mucine (par les équipes de HILL, d'une part et de SCHACHTER, d'autre part) (Fig. 9). Les intermédiaires lipidiques ne semblent pas impliqués dans la biosynthèse des O-glycosylprotéines. Les différentes étapes sont les suivantes :

- Action d'une β -galactosaminyltransférase qui fixe un résidu β -N-acétylgalactosaminyl sur la sérine ou la thréonine de la protéine (HILL *et al.* : 211) : étape 1

- Cette chaîne est ensuite allongée par le branchement de divers sucres : étapes 2 - 5

- Action d'une α -6-sialyltransférase sur la N-acétylgalactosamine du point d'attache (CARLSON *et al.* : 212 ; BEYER *et al.* : 213 ; SADLER *et al.* : 214), avant (étape 2') ou après (étape 2'') branchement d'un galactose en position C-3 (SCHACHTER *et al.* : 215) (étape 2). Si un résidu N-acétylneuraminyl est d'abord fixé (étape 2'), le branchement ultérieur d'un galactose ne peut alors se faire (BEYER *et al.* : 216).

- Action d'une α -4-fucosyltransférase (BEYER *et al.* : 217) étape 3 ou d'une α -3-sialyltransférase (REARICK *et al.* : 218) : étape 4. Là aussi, il semble bien qu'il existe une exclusion mutuelle entre l'acide sialique et le fucose

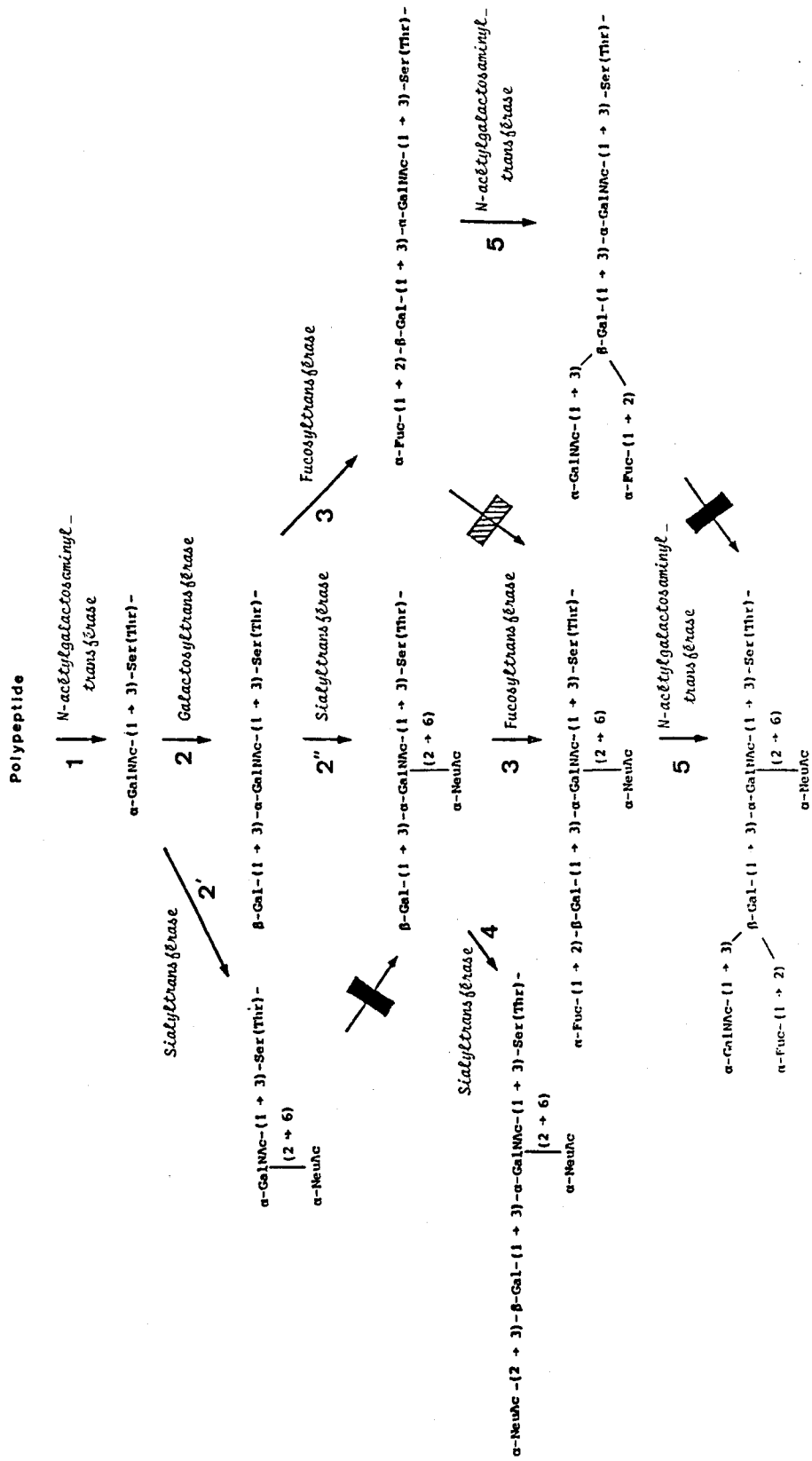


Figure 9 : Schéma de biosynthèse des O-glycosylprotéines

Réaction impossible

Réaction lente



branchés sur un même résidu de galactose ; dans le cas des glandes sous-maxillaires de Porc, les structures trouvées ne sont pas sialylées en position C-3 sur le galactose bien qu'une α -3-sialyltransférase ait été mise en évidence (REARICK *et al.* : 219).

- Transfert d'un résidu α -N-acétylgalactosaminyl terminal (BEYER *et al.* : 220) en position C-3 sur le galactose :
étape 5

3 - Les sialyltransférases cellulaires

Comme nous venons de le voir, le branchement de l'acide sialique en position C-3 ou C-6 sur les résidus glycaniques des protéines constitue la dernière étape de la biosynthèse des glycosylprotéines, mais non la moindre puisque la présence de l'acide sialique à la surface des cellules lui confère un rôle biologique important (voir les revues générales de SCHAUER : 221 ; ROSENBERG et SCHENGRUND : 222). Dans les différents systèmes étudiés, une connaissance approfondie des modalités de transfert de l'acide sialique par les sialyltransférases cellulaires et de la caractérisation de ces dernières s'avère donc nécessaire. Le Tableau suivant résume les différents travaux réalisés jusqu'à maintenant sur les sialyltransférases cellulaires (Tabl. 1) :

TABLEAU I

SIALYLTRANSFERASES CELLULAIRES

Type de cellules	Auteurs et références	Sialylation sur des résidus glycaniques				Enzyme isolé
		N branchés		O branchés		
		liaison en 2,6 sur Gal	liaison en 2,3 sur Gal	liaison en 2,6 sur GalNAc	liaison en 2,3 sur Gal	
Glandes sous-maxillaires de Porc	SADLER <i>et al.</i> 223			+		+
	REARICK <i>et al.</i> 224		-		+	+
Glandes sous-maxillaires de Mouton	CARLSON <i>et al.</i> 225			+		
Foie de Porc	VAN DEN EIJNDEN <i>et al.</i> 226	+	-			
	BERGH <i>et al.</i> 227		-		+	
Foie de Rat	VAN DEN EIJNDEN <i>et al.</i> 228	+				
	VAN DEN EIJNDEN et SCHIPHORST 229	+	-			
Foie de Boeuf	VAN DEN EIJNDEN et SCHIPHORST 230	+	+ ?			
Foie de Veau foetal	VAN DEN EIJDEN et SCHIPHORST 231	+ 50 %	+ 50 %			
Cervelle d'embryon de Poulet	VAN DEN EIJNDEN et SCHIPHORST 232	+ 75 %	+ 25 %			
Placenta humain	VAN DEN EIJNDEN et SCHIPHORST 233	+ 12 %	+ 88 %			
	BERGH <i>et al.</i> 234				+	+

Le signe + indique la mise en évidence de l'activité enzymatique.
Le signe - indique l'absence de l'activité enzymatique.

L'activité sur les glycanes branchés N-glycosidiquement sur la protéine est mesurée sur l'asialoorosomucoïde.

L'activité sur les glycanes branchés O-glycosidiquement sur la protéine est mesurée sur la mucine sous-maxillaire désialylée de Mouton.



Les glycopeptides isolés des glandes sous-maxillaires de Porc ou de Mouton proviennent de O-glycosylprotéines. Deux types de sialyltransférases ont été mis en évidence et isolés par l'équipe de HILL (235, 236) : une α -N-acétylgalactosaminide sialyl α -2,6 transférase et une α -D-galactoside sialyl α -2,3 transférase sialylant spécifiquement la mucine sous-maxillaire désialylée de Mouton (glycoprotéine de type O-glycosylprotéique) ; or ces auteurs montrent que la sialyl α -2,3 transférase isolée est capable de sialyler le lactose : β -Gal-(1 \rightarrow 4)- β -Glc (structure rencontrée dans les N-glycosylprotéines) : ce résultat indique que le branchement d'un acide sialique sur un accepteur micromoléculaire (comme le lactose) par une sialyltransférase ne permet pas de dire si l'enzyme reconnaît une N- ou une O-glycosylprotéine.

Dans tous les autres milieux biologiques étudiés (foie, cerveau, placenta), la présence d'une activité β -D-galactoside sialyl α -2,6 transférasique fixant l'acide sialique sur les N-glycosylprotéines a été observée (VAN DEN EIJNDEN *et al.* : 237 ; BERGH *et al.* : 238 ; VAN DEN EIJNDEN et SCHIPHORST : 239), cependant l'enzyme n'a jamais été isolé. Il est à noter que sa forme soluble a pu être isolée à partir du colostrum de Vache (PAULSON *et al.* : 240 ; JOZIASSE *et al.* : 241) . En 1970, DEN *et al.* (242) rapportaient l'existence d'une activité sialyltransférasique issue de la cerveau d'embryon de Poulet, mesurée sur l'*asialoorosomucoïde* (N-glycosylprotéine), sur la N-acétyllactosamine (β -Gal-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc) et sur le lactose : le produit de sialylation sur le lactose a été identifié comme du sialyl α -2,3 lactose. Ce n'est que très récemment et pour la première fois, que VAN DEN EIJNDEN et SCHIPHORST (243) ont caractérisé une β -D-galactoside sialyl α -2,3 transférase capable de sialyler l'*asialoorosomucoïde*, cependant l'enzyme n'a pas encore été isolé . Si l'on compare les taux de sialylation en 2,6 et en 2,3, il est intéressant de noter que l'activité sialyl α -2,3 transférasique est prédominante dans le placenta Humain (88 %) ; cette activité est diminuée dans le foie de Veau foetal (50 %) et le cerveau d'embryon de Poulet (25 %) ; elle est totalement absente dans le foie de Boeuf : ce dernier résultat est comparable

à ceux trouvés sur le foie de Rat ou le foie de Porc. Les auteurs émettent l'hypothèse selon laquelle l'activité sialyl α -2,3 transférase pourrait être associée aux différentes étapes du développement du foetus et serait perdue chez l'adulte.

Enfin, une activité β -D-galactoside sialyl α -2,3 transférase mesurée sur le glycanne de la mucine sous-maxillaire de Mouton (β -Gal-(1 \rightarrow 3)- α -GalNAc-R) a pu être mise en évidence dans le placenta Humain et le foie de Porc (BERGH *et al.* : 244, 245) ; l'enzyme a d'ailleurs été isolé du placenta.

En conclusion, plusieurs faits se dégagent de ces études :

- une β -D-galactoside sialyl α -2,3 transférase spécifique des O-glycosylprotéines a été isolée des glandes sous-maxillaires de Porc et du placenta Humain (REARICK *et al.* : 246 ; BERGH *et al.* : 247).

- une α -N-acétylgalactosaminide sialyl α -2,6 transférase active sur les O-glycosylprotéines a été mise en évidence dans les glandes sous-maxillaires de Porc et isolée (SADLER *et al.* : 248).

- la sialylation en position C-3 et en position C-6 sur les résidus galactosyl terminaux des N-glycosylprotéines est démontrée (VAN DEN EIJNDEN *et al.* : 249 ; VAN DEN EIJNDEN et SCHIPHORST : 250). Cependant, si la sialyl α -2,6 transférase a pu être isolée du colostrum de Vache (PAULSON *et al.* : 251 ; JOZIASSE *et al.* : 252), aucune des deux sialyltransférases n'a encore jusqu'à maintenant été isolée d'un tissu.

B - LOCALISATION DES GLYCOSYLTRANSFERASES

Chez les Mammifères, les glycosyltransférases sont sous forme soluble dans les milieux circulants ou associées aux cellules. Dans ce cas, elles sont liées aux membranes et sont considérées comme des protéines intrinsèques puisque leur solubilisation nécessite l'emploi de détergents.

Les techniques de fractionnement cellulaire (FLEISCHER *et al.* : 253 ; SCHACHTER *et al.* : 254) et d'autoradiographie après incubation avec des sucres marqués (NEUTRA et LEBLOND : 255 ; BENNETT : 256) sont en faveur d'une localisation de ces glycosyltransférases dans les vésicules golgiennes (FLEISHER *et al.* : 257 ; SCHACHTER *et al.* : 258), dans les membranes du reticulum endoplasmique lisse (COOK *et al.* : 259), dans les membranes mitochondriales (BOSMANN : 260 ; BROQUET *et al.* : 261). De toutes les glycosyltransférases étudiées, seule une sialyltransférase à la surface de cellules leucémiques L 1210 (PORTER et BERNACKI : 262) a été mise en évidence par autoradiographie.

Comment la biosynthèse des glycoconjugués de surface peut-elle se faire grâce à ces enzymes intracellulaires ? La théorie dite du "*membrane flow*" émise dès 1959 par PALADE (263) a été reprise et développée récemment par ROTHMAN et LENARD (264) : le déclenchement de la glycosylation aurait lieu alors que la protéine serait encore fixée sur le ribosome. La maturation et l'élongation de la chaîne s'effectueraient grâce aux glycosyltransférases intracellulaires du reticulum puis de l'appareil de Golgi. L'évagination de celui-ci dans la membrane plasmique permettrait l'apparition et l'intégration de ces glycoconjugués à la surface de la cellule. Lors de l'intégration de ces vésicules golgiennes dans la membrane (NEUTRA et LEBLOND : 265 ; BENNETT : 266 ; MORRE *et al.* : 267) ; il est logique de penser que les transférases golgiennes peuvent être amenées à la surface par ces mêmes vésicules (ROSEMAN : 268). Si aucune preuve n'est venue étayer cette hypothèse, par contre, l'existence de ces glycosyltransférases à la surface des cellules a pu être démontrée dans certains cas : les revues générales de SHUR et ROTH (269) et de PIERCE *et al.* (270) rassemblent les travaux réalisés par différents auteurs, mais il convient de citer les travaux du laboratoire de MONTREUIL : ceux de CACAN *et al.* (271) ; de VERBERT *et al.* (272) ; de HOFACK *et al.* (273). L'hypothèse de l'existence de glycosyltransférases situées sur la membrane plasmique et dont le site actif est dirigé vers l'extérieur de la cellule (ectoglycosyltransférases) est séduisante, en effet : deux étapes peuvent être distinguées dans la réaction de glycosylation à la surface des cellules :

1 - une étape de reconnaissance (*binding*)

2 - une étape de catalyse (*catalysis*)

1 - En présence de l'accepteur approprié, et en absence de l'activateur (nucléotide-sucre), les ectoglycosyltransférases lient la molécules acceptrice : elles jouent alors un rôle de "lectines membranaires".

2 - En présence du sucre donneur, les enzymes catalysent la réaction de transfert d'un sucre sur la molécule acceptrice et il y a ensuite libération de la molécule glycosylée.

Le schéma suivant proposé par PIERCE *et al.* (274) (Fig. 10) illustre les différents types de réactions de glycosylation pouvant intervenir à la surface des cellules :

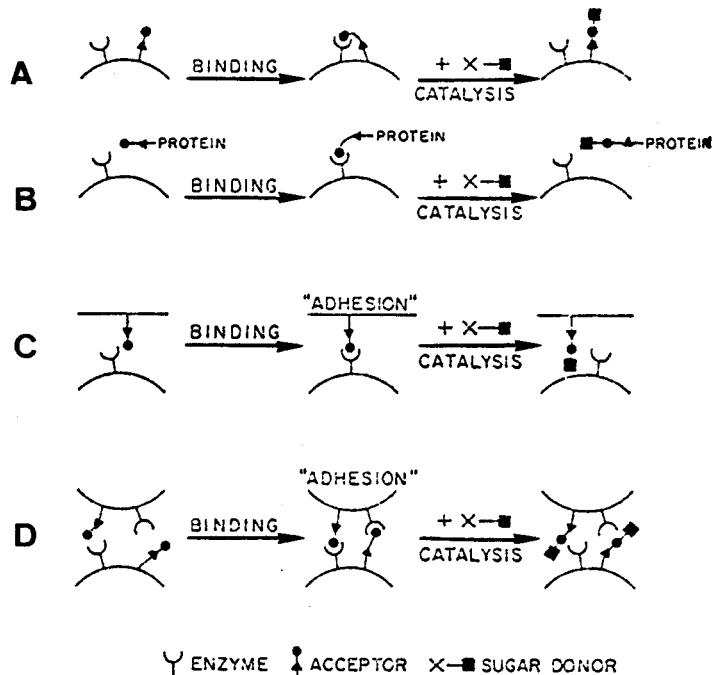


Figure 10 : glycosylation à la surface des cellules d'après PIERCE *et al.* (274)

A - Reconnaissance et transfert à un accepteur endogène :
 cisglycosylation

- B : Reconnaissance et transfert à un accepteur exogène soluble
- C : Reconnaissance (adhésion) et transfert à un accepteur exogène insoluble
- D : Reconnaissance (adhésion) et transfert à un accepteur de surface de cellules adjacentes : transglycosylation.

Ce schéma permet d'expliquer d'une façon satisfaisante le rôle possible de ces ectoglycosyltransférases :

1 - dans la biosynthèse et la réparation des glycoconjugués de surface

2 - dans les interactions cellulaires comme l'adhésion ou l'agrégation (voir les revues générales de SHUR et ROTH : 275 ; PIERCE *et al.* : 276).

II - LES GLYCOSYLTRANSFERASES PLAQUETTAIRES

Deux laboratoires ont rapporté l'existence de glycosyltransférases dans les membranes plaquettaires. Une collagène-glycosyltransférase a été impliquée dans l'adhésion des plaquettes au collagène sous-endothélial (BOSMANN : 277 ; BARBER et JAMIESON : 278, 279 ; JAMIESON *et al.* : 280 ; JAMIESON : 281). Une sialyltransférase de surface a été suggérée jouer un rôle dans l'agrégation des plaquettes entre elles (BOSMANN : 282).

A - LA COLLAGÈNE-GLUCOSYLTRANSFERASE

JAMIESON et ses collaborateurs (283-286) ont montré que parallèlement à l'inhibition de l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium par du collagène soluble et déglucosylé, les plaquettes intactes sont capables de transférer le glucose sur les groupes galactosyl-hydroxylysine

du collagène. Cette activité glucosyltransférasique est retrouvée sur les membranes plasmiques isolées par la technique de lyse au glycérol (BARBER et JAMIESON : 287). Il est à noter que ces membranes isolées possèdent aussi une collagène-galactosyltransférase qui est non mesurable sur les cellules totales (BARBER et JAMIESON : 288). Ces auteurs suggèrent que cette deuxième transférase est enfouie dans la membrane plasmique ou qu'elle est exposée seulement du côté cytoplasmique de la membrane. La glucosyltransférase, au contraire plus exposée à l'extérieur de la membrane plasmique, est capable d'interagir avec les fibres de collagène. La même année, BOSMANN (289) rapporte aussi la présence de deux collagène-glucosyl et -galactosyltransférases sur les membranes plasmiques, ainsi que celle de deux autres : une polypeptide-N-acétylgalactosaminyltransférase et une protéine-galactosyltransférase auxquelles il leur assigne un rôle dans l'adhésion cellulaire en général.

Cependant, PUET *et al.* (290) observent une affinité trop faible des deux collagène-glycosyltransférases vis-à-vis du collagène pour être responsables du phénomène d'adhésion. Si différentes études étaient en faveur de l'importance des chaînes glycaniques du collagène dans l'adhésion (KANG *et al.* : 291 ; BRASS et BENSUSSAN : 292), d'autres travaux (MENASHI *et al.* : 293 ; ANTTINEN *et al.* : 294) ont montré que la triple hélice du collagène n'est pas un substrat pour la glucosyltransférase et celle-ci n'est active que sur le collagène dénaturé. SMITH *et al.* (295) suggèrent que l'enzyme doit interagir aussi bien avec les résidus peptidiques du collagène qu'avec ses résidus glycaniques. Notre laboratoire (FAUVEL *et al.* : 296) a récemment montré que les peptides de collagène isolés, permettant *in vitro* l'adhésion des plaquettes, sont totalement dépourvus de glycannes. L'ensemble de ces arguments est donc en contradiction avec la théorie de JAMIESON.

B - LA SIALYLTRANSFERASE

Une sialyltransférase de surface a été impliquée dans l'agrégation plaquette-plaquette (BOSMANN : 297). L'auteur propose un modèle selon lequel la sialyltransférase pourrait intervenir dans l'adhé-

sion et la désadhésion cellulaires : la sialyltransférase d'une cellule interagirait avec un accepteur glycoprotéique d'une autre cellule pour former un complexe (adhésion) ; l'action d'une neuraminidase plaquettaire en libérant l'acide sialique de surface permettrait l'apparition de nouveaux accepteurs endogènes potentiellement sialylables (désadhésion). 52 % de l'activité sialyltransférasique est retrouvée dans les membranes isolées par lyse au glycérol. Cependant, la pureté de ces membranes n'a pas été mesurée (BOSMANN : 298).

WU et KU (299) ont montré que l'activité sialyltransférasique de la plaquette est stimulée par des inducteurs de l'activation plaquettaire (collagène, ADP + fibrinogène, épinéphrine). Parallèlement, une inhibition de l'activité enzymatique par l'aspirine, connue pour inhiber la réaction de libération plaquettaire et donc de l'agrégation, est observée (BOSMANN : 300 ; OKUMURA et JAMIESON : 301 ; WU et KU : 302). Chez un malade présentant un désordre fonctionnel plaquettaire caractérisé par une déficience de la réaction de libération, l'activité sialyltransférasique est inhibée de 40 % (WU *et al.* : 303). Actuellement, une corrélation directe entre sialylation et adhésion cellulaire reste cependant à établir.

C - CONCLUSION

Les différentes études menées sont en faveur de la présence de glycosyltransférases à la surface de la plaquette, mais leur rôle reste à démontrer. Le rôle des glycanes dans la réaction plaquette-collagène a été évoqué par JAMIESON et son équipe : différents travaux rejettent actuellement cette hypothèse en montrant que les glycanes du collagène ne sont pas impliqués dans le phénomène d'adhésion, un rôle important dans l'interaction plaquette-collagène est donnée aux groupes polaires et à la chaîne peptidique du collagène (WILNER *et al.* : 304 ; KATZMAN *et al.* : 305 ; KANG *et al.* : 306 ; MEYER et WEISMAN : 307). Les sialyltransférases ont été impliquées dans l'interaction plaquette-plaquette (BOSMANN : 308) cependant l'existence d'ectoenzymes n'a jamais

été formellement démontrée, d'une part, et aucune preuve solide n'est venue, d'autre part, appuyer cette spéculation sur le rôle probable de ces enzymes dans l'agrégation. Une démonstration claire du rôle des glycosyltransférases plaquettaires dans l'hémostase nécessite donc des preuves plus directes.

4 - CONCLUSIONS GENERALES

Cette première partie révèle l'importance du rapport entre la structure et la fonction des glycoconjugués membranaires : les glycanes sont des signaux de reconnaissance responsables du rôle biologique que jouent les glycoconjugués.

La biosynthèse des glycanes ainsi que la manière dont ceux-ci sont intégrés dans les glycoconjugués membranaires, dégradés et réparés, reste un problème loin d'être résolu ; cependant, le mécanisme d'assemblage par l'intermédiaire des glycosyltransférases est actuellement bien décrit dans ses grandes lignes. ROSEMAN (309) et ROTH *et al.* (310) ont proposé une hypothèse selon laquelle la formation du complexe enzyme-substrat entre une glycosyltransférase membranaire d'une cellule et un accepteur d'une autre cellule serait responsable des phénomènes de reconnaissance et d'adhésion cellulaires. Selon ce modèle général, en 1972, BOSMAN (311) suggérait que les sialyltransférases plaquettaires pourraient intervenir directement dans l'agrégation des cellules. Cependant, aucune preuve tangible n'est venue depuis étayer cette hypothèse. Le problème qui nous est posé est donc celui-ci : existe-t-il à la surface des plaquettes des sialyltransférases dont le rôle serait de moduler le taux de résidus d'acide sialique de la membrane ? ou bien cette sialylation joue-t-elle un rôle direct dans l'agrégation des plaquettes ?

L'étude des plaquettes pathologiques a montré une relation entre les déficits fonctionnels de celles-ci (agrégation, adhésion) et l'absence spécifique de glycoprotéines de la membrane plasmique (CAEN *et al.* : 312). Ce déficit membranaire reflète-t-il un défaut en glycosyltransférases ? Et l'absence de la sialyltransférase peut-elle expliquer l'anomalie fonctionnelle observée ?

Récemment, deux laboratoires (313-316) ont étudié les mécanismes de régulation au niveau de la terminaison des chaînes N- ou

O-glycosidiques : ils rapportent l'existence de sialyltransférases pouvant brancher l'acide sialique spécifiquement en position C-3 ou C-6 sur des résidus galactosyl ou N-acétylgalactosaminyl. L'exemple de la reconnaissance exclusive par le virus *Sendaï* de la cellule hôte possédant un acide sialique terminal branché en position C-3 du galactose (MARKWELL et PAULSON : 317) souligne l'importance de la liaison de l'acide sialique dans les phénomènes de reconnaissance. Le développement de ce dernier point dans notre étude sur les sialyltransférases plaquettaires est susceptible de constituer un apport aux recherches effectuées sur le rôle possible des sialyltransférases dans l'agrégation plaquettaire.

TRAVAUX PERSONNELS

1 - MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE SIALYLTRANSFERASIQUE PLAQUETTAIRE

L'existence d'une activité sialyltransférasique dans la plaquette a été décrite par BOSMANN (318) dans des conditions de faible osmolarité, c'est-à-dire en Tris/HCl 10 mM pH 7,4. Notre première étude a donc consisté à retrouver l'activité sialyltransférasique dans des conditions d'osmolarité identiques à celles utilisées par cet auteur. Nous présentons, dans ce chapitre, les expériences qui nous ont permis de définir les conditions optimales de fonctionnement de l'activité sialyltransférasique à faible osmolarité.

I - DETERMINATION DES CONDITIONS OPTIMALES

A - CONDITIONS DE LYSE

A partir de ce que l'on sait de la solubilisation d'enzymes membranaires, nous avons le choix entre différents moyens pour lyser les plaquettes (ultrasons, chocs mécaniques, action de détergents). Nous avons utilisé la lyse chimique par un détergent non ionique, le Triton X100, qui permet de donner des résultats reproductibles. Les plaquettes isolées (selon la technique décrite en appendice technique, (p. 116) sont solubilisées dans une concentration finale en Triton X100 0,5 % (v/v) en Tris 10 mM pH 7,4. L'homogénat obtenu (10^{10} cellules/ml) est ensuite congelé avant d'être utilisé pour la suite des expériences.

L'activité enzymatique n'étant pas modifiée par des concentrations croissantes de Triton X100 (mesurées jusqu'à 8 %), l'incubation standard a toujours été réalisée sur un homogénat plaquettaire à la concentration finale de 10^9 cellules/ml avec une concentration en Triton X100 de 0,05 % pour un volume d'incubation de 100 μ l.

B - EFFET DU TEMPS D'INCUBATION, DES CONCENTRATIONS EN ENZYME
ET EN CMP- [¹⁴C] NeuAc, ET DU pH

L'étude cinétique de l'incorporation de [¹⁴C] NeuAc à partir de CMP- [¹⁴C] NeuAc par l'homogénat plaquettaire, et sur l'*asialofétuine* utilisée comme accepteur exogène, montre la présence d'une activité sialyltransférase capable de sialyler aussi bien les accepteurs endogènes que l'*asialofétuine* (Fig. 11) :

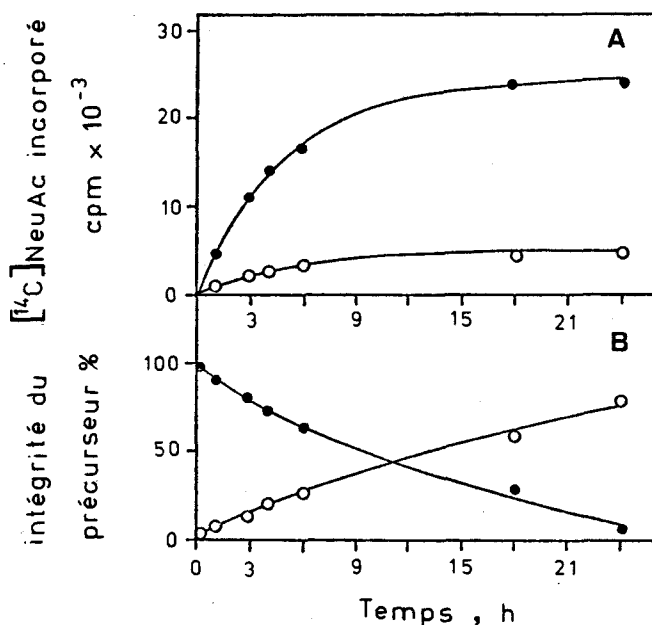


Figure 11 : Cinétiques d'incorporation de [¹⁴C] NeuAc et de dégradation de CMP- [¹⁴C] NeuAc par un homogénat plaquettaire.

Les incubations sont réalisées dans les conditions standard avec 2 μM CMP- [¹⁴C] NeuAc, en Tris/HCl 10 mM pH 7,4.

- A - Incorporation de [¹⁴C] NeuAc sur les accepteurs endogènes
 ○—○ et sur l'*asialofétuine* ●—●
- B - Intégrité du CMP [¹⁴C]-NeuAc ●—● et apparition de [¹⁴C] NeuAc ○—○

L'activité sialyltransférasique mesurée croît linéairement durant les 3 premières heures (Fig. 11-A). La dégradation du CMP- $[^{14}\text{C}]$ NeuAc a été contrôlée, selon la technique décrite par SPIK *et al.* (319) : l'analyse chromatographique du milieu d'incubation révèle une dégradation importante du CMP- $[^{14}\text{C}]$ NeuAc en fonction du temps (Fig. 11-B) (15 % après 3 heures d'incubation et plus de 50 % après 12 heures d'incubation). Différents types de cellules possèdent une activité CMP-NeuAc hydrolasique (KEAN et BIGHOUSE : 320 ; VAN DIJK *et al.* : 321, 322 ; VERBERT *et al.* : 323). Dans nos conditions, la dégradation du CMP-NeuAc est comparable en présence ou en absence d'homogénat, ce qui indique que la dégradation du précurseur est essentiellement due à son hydrolyse chimique ; l'activité CMP-NeuAc hydrolasique, si elle existe dans les plaquettes, n'est pas ici détectable.

L'activité sialyltransférasique est proportionnelle à la quantité d'enzyme ajouté (10 à 350 μg en protéines plaquettaires).

Dans toutes les expériences, nous avons utilisé la concentration de 2 μM en CMP- $[^{14}\text{C}]$ NeuAc ; nous avons montré que l'activité sialyltransférasique est proportionnelle à la quantité de précurseur ajouté (jusqu'à $5 \cdot 10^{-5}$ M, concentration la plus élevée testée).

La Figure 12 montre l'influence du pH sur l'activité sialyltransférasique :

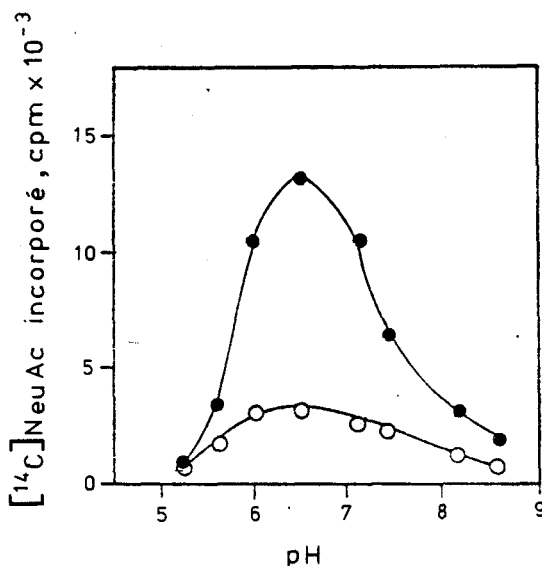


Figure 12 : Effet du pH sur l'incorporation de $[^{14}\text{C}]$ NeuAc par un homogénat plaquettaire.

Les incubations sont réalisées dans les conditions standard avec 2 μM de CMP- $[^{14}\text{C}]$ NeuAc, en Tris/maléate 10 mM ajusté aux différents pH. Incorporation de $[^{14}\text{C}]$ NeuAc sur les accepteurs endogènes \circ — \circ et sur l'asialofétuine \bullet — \bullet

L'activité sialyltransférasique mesurée sur l'*asialofétuine* est optimale pour un pH 6,5. Avec les accepteurs endogènes, le pH optimum d'incubation présente un spectre très large entre 6,00 et 7,00. Les valeurs obtenues sont différentes de celles trouvées par BOSMANN (324) (7-7,5).

C - IDENTIFICATION DE LA RADIOACTIVITE INCORPOREE

La radioactivité incorporée sur les accepteurs endogènes des plaquettes et sur l'*asialofétuine* est libérée par hydrolyse acide (H_2SO_4 0,05 M, 60 min, 80°C). Analysé par chromatographie sur papier (dans les conditions décrites en appendice technique, p. 121), le sucre radioactif libéré migre comme un témoin acide sialique.

D - SPECIFICITE DE L'ACCEPTEUR

Lorsque l'*asialoorosomucoïde* est utilisé, celui-ci se révèle être un aussi bon accepteur que l'*asialofétuine* : la sialylation croît linéairement dans les deux cas jusqu'à 200 µg en accepteur. Au contraire, quelle que soit la concentration testée, l'*asialomucine* sous-maxillaire de Boeuf n'est pas acceptrice de résidus sialyl.

E - EFFET DES IONS

L'addition de Ca^{++} , Mg^{++} , Mn^{++} ou EDTA affecte l'activité sialyltransférasique plaquettaire (Fig. 13-A).

L'activité sialyltransférasique mesurée sur l'*asialofétuine* nécessite la présence de cations divalents : la stimulation est maximale en présence de Mg^{++} 8 mM; on observe également une stimulation avec Mn^{++} , tandis que Ca^{++} stimule faiblement l'activité. L'EDTA à partir de 3mM inhibe la réaction. Des concentrations supérieures en cations divalents (25-50 mM) inhibent totalement l'activité enzymatique. L'incorporation de l'acide sialique sur les accepteurs endogènes présente les mêmes caractéristiques.

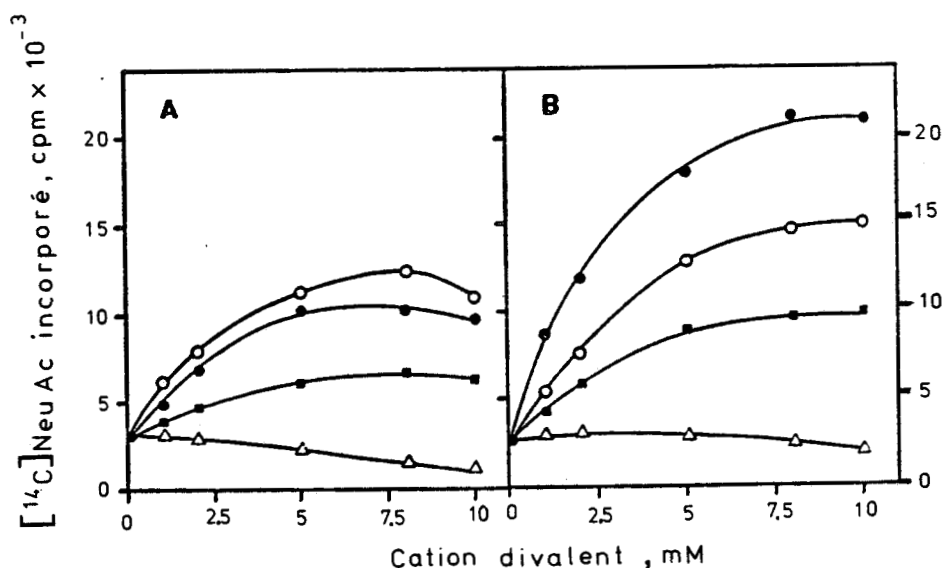


Figure 13 : Effet des ions sur l'incorporation de $[^{14}\text{C}]$ NeuAc sur l'asialofétuine par un homogénat plaquettaire.

Les incubations sont réalisées dans les conditions standard pendant 60 min, avec $2 \mu\text{M}$ de $\text{CMP}-[^{14}\text{C}]$ NeuAc en Tris/HCl 10 mM pH 7,4.

A - sur un homogénat plaquettaire préalablement congelé

B - sur un homogénat plaquettaire non congelé.

Incorporation de $[^{14}\text{C}]$ NeuAc sur l'asialofétuine en présence de MgCl_2 $\circ-\circ$, MnCl_2 $\bullet-\bullet$, CaCl_2 $\blacksquare-\blacksquare$, EDTA $\triangle-\triangle$

Lors de cette étude, nous avons remarqué que l'activité sialyltransférase de l'homogénat frais présente une sensibilité aux cations différente de celle retrouvée sur l'homogénat préalablement congelé (Fig. 13-B) : cette stimulation par les cations ($\text{Mn}^{++} > \text{Mg}^{++} > \text{Ca}^{++}$) est alors identique à celle trouvée par BOSMANN (325).

F - CONCLUSIONS

Les premiers résultats obtenus sur un homogénat plaquettaire montrent qu'il est possible de détecter une activité sialyltransférasique dans les conditions optimales que nous avons déterminées. De plus, l'étude de la stimulation de l'activité enzymatique par les cations divalents nous a conduit à montrer l'existence d'une cause d'erreur non encore suspectée dans la détection de la sialyltransférase. Il s'agit de la sensibilité de l'enzyme à la congélation et décongélation. La suite de notre étude apportera d'ailleurs une explication à ces variations de sensibilité aux cations divalents.

II - ETUDE DE LA VARIATION D'OSMOLARITE

Nous avons mis en évidence une activité sialyltransférasique dans les conditions décrites par BOSMANN (326), c'est-à-dire à faible osmolarité (Tris/HCl 10 mM). La détection d'une activité sialyltransférasique (si elle existe) à la surface de la plaquette nécessite l'utilisation d'un milieu d'incubation isotonique de celui des plaquettes. Nous avons donc mesuré l'activité sialyltransférasique en présence d'une quantité croissante de chlorure de sodium (Fig. 14, p. 54).

En présence de cations divalents, l'activité sialyltransférasique décroît au fur et à mesure que l'osmolarité augmente (Fig. 14-A). Cette chute de radioactivité liée aux accepteurs endogènes et exogènes est aussi observée, lorsque le NaCl est remplacé par le système tampon Tris/HCl pH 7,4. La Figure 14-C montre que ce phénomène d'inhibition n'est pas dû à une hydrolyse accrue du CMP-NeuAc.

Lorsque l'expérience est réalisée en absence d'ions divalents, il est surprenant d'observer que l'incorporation du [^{14}C] NeuAc présente alors un optimum (Fig. 14-B). Même si l'effet du NaCl suggère l'existence d'une inhibition de l'activité sialyltransférasique en fonction de l'osmolarité, dans l'état actuel des choses, il nous est difficile de proposer une interprétation cohérente de ces phénomènes.

Dans les deux cas (absence ou présence de cations divalents), la concentration la plus élevée en NaCl que nous avons mesurée (154 mM) nous montre qu'une activité sialyltransférase est mesurable dans les conditions d'osmolarité physiologiques.

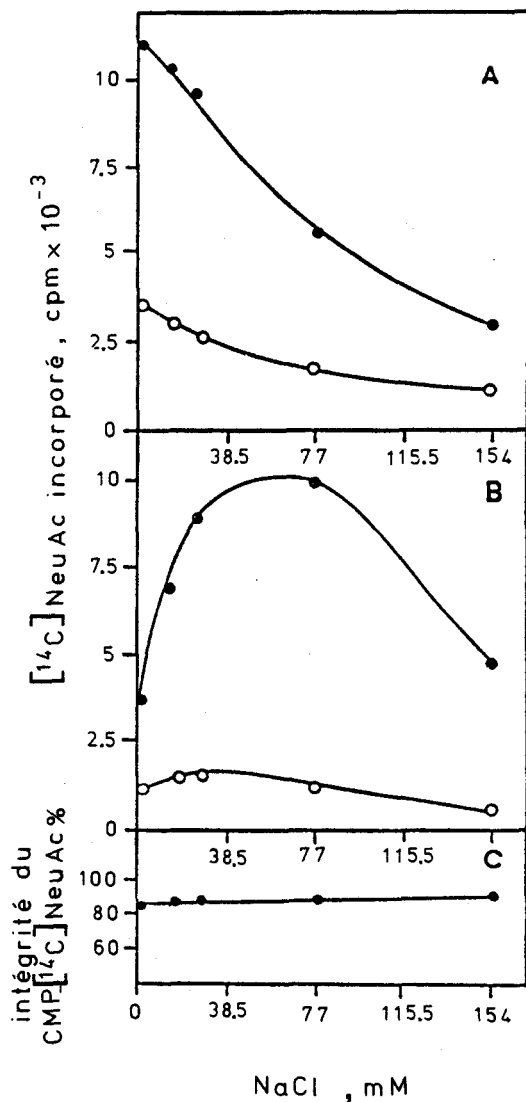


Figure 14 : Effet de l'osmolarité sur l'incorporation de $[^{14}\text{C}]\text{NeuAc}$ par un homogénat plaquettaire.

Les incubations sont réalisées dans les conditions standard pendant 60 min, avec $2 \mu\text{M}$ $\text{CMP}-[^{14}\text{C}]\text{NeuAc}$ en Tris/HCl 10 mM pH 7,4, en présence de NaCl à différentes concentrations.

A - en présence de cation divalent (Mn^{++} ou Mg^{++} ou Ca^{++} 10 mM)

B - en absence de cation divalent. Incorporation de $[^{14}\text{C}]\text{NeuAc}$ sur les accepteurs endogènes $\circ-\circ$ et sur l'asialofétuine $\bullet-\bullet$

C - Intégrité de $\text{CMP}-[^{14}\text{C}]\text{NeuAc}$ $\bullet-\bullet$

III - CONCLUSIONS

L'ensemble de nos résultats préliminaires démontre clairement l'existence d'une activité sialyltransférase plaquettaire et la présence d'accepteurs endogènes sialylables. Le pH, les cations divalents et l'osmolarité peuvent considérablement modifier l'activité enzymatique.

Les facteurs limitants pour aborder l'étude de la sialyltransférase à la surface de la plaquette sont le pH et l'osmolarité. Bien qu'à priori le résultat sur la cellule totale ne soit pas prévisible, il nous est possible de détecter une activité sialyltransférase dans un homogénat dans des conditions physiologiques et à pH 7,4.

Dans ce chapitre, un problème a été soulevé : celui de la stabilité de l'enzyme. Ce point sera réexaminé par la suite.

2 - DEMONSTRATION DE L'EXISTENCE D'UNE ACTIVITE ECTOSIALYL- TRANSFERASIQUE A LA SURFACE DE LA PLAQUETTE

I - CHOIX DU TAMPON DE PREPARATION DES PLAQUETTES

Dans toute suspension cellulaire, il existe inévitablement un faible pourcentage de cellules lysées : ces cellules peuvent relacher dans le milieu des membranes intracellulaires contenant des glycosyltransférases et également les enzymes sous forme soluble. Lors de la mesure de l'activité sialyltransférasique par des plaquettes entières, la libération d'enzymes due à la lyse peut à elle seule expliquer l'incorporation trouvée et fausser le résultat. Nous avons donc été amenée, dans un premier temps, à choisir un tampon de préparation des plaquettes, le critère de choix de celui-ci devant répondre à l'exigence suivante : permettre la moindre lyse cellulaire tout en ne modifiant pas l'activité sialyltransférasique. A cet égard, rappelons qu'il a été montré que le procédé de préparation des plaquettes n'entraînait pas d'effet notable sur les enzymes de la surface plaquettaire et les plaquettes lavées avaient une réaction d'agrégation normale (ROSSI : 327 ; KINLOUGH-RATHBONE *et al.* : 328).

Après la séparation des plaquettes du plasma, celles-ci sont resuspendues dans le tampon Tris/HCl 10 mM pH 7,4, contenant du NaCl 154 mM et de l'EDTA 1 mM. Pour déterminer l'efficacité du tampon, nous avons mesuré le pourcentage de cellules lysées d'après le dosage de la lactico-déhydrogénase (LDH), marqueur cellulaire cytoplasmique (voir appendice technique p. 117).

ROSSI (329) a montré que la présence de sérumalbumine bovine (SAB) protège les plaquettes de la lyse en les "recouvrant" comme le feraient les protéines plasmatiques. Le Tableau II montre l'effet de la SAB ajoutée au tampon de préparation des plaquettes.

TABLEAU II

COMPARAISON DES TAMPONS DE PREPARATION DES PLAQUETTES

% cellules lysées	Tampon Tris/HCl 10 mM pH 7,4, NaCl 154 mM, EDTA 1 mM			
	-	+ SAB 0,35 %	+ SAB 0,35 % + PGE ₁ 100 nM	+ SAB 0,35 % + glucose 5 mM
dans la suspension plaquettaire	3,4	1,9	2,3	1,9
dans la suspension plaquettaire après 60 min à 37 °C	11,2	8	8,8	6

Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules lysées (moyenne de deux expériences). PGE₁ : prostaglandine E₁ ; SAB : sérumalbumine bovine.

Nous observons que la présence de la SAB protège mieux les plaquettes de la lyse, d'une part, au cours des centrifugations pour leur préparation et, d'autre part, après une incubation de 60 minutes à 37°C (correspondant au temps d'incubation pour la mesure de l'activité sialyltransférase) ; l'addition de prostaglandine E₁ (PGE₁), connue pour être un inhibiteur de l'agrégation plaquettaire, n'entraîne aucun effet protecteur sur la lyse induite au cours de l'incubation (Tabl. II). En présence de glucose exogène, les plaquettes utilisent

celui-ci comme substrat énergétique plutôt que de consommer leur propre réserve : dans nos conditions, nous constatons une diminution des cellules lysées lorsque du glucose est ajouté à la suspension plaquettaire (Tabl. II).

Nous avons donc choisi comme tampon de préparation des plaquettes le tampon Tris/HCl 10 mM pH 7,4, contenant du NaCl 154 mM, de l'EDTA 1 mM, du glucose 5 mM et 0,35 % en SAB. Aux concentrations utilisées, la SAB et le glucose ne modifient pas l'activité sialyltransférase mesurée sur un homogénat plaquettaire.

II - ACTIVITE SIALYLTRANSFERASIQUE EXPRIMEE PAR DES PLAQUETTES ENTIERES

Lorsqu'une suspension plaquettaire (10^9 cellules/ml) est incubée à 37°C en présence de $2 \mu\text{M}$ CMP- $[^{14}\text{C}]$ NeuAc et d'un accepteur exogène l'asialofétuine, l'étude cinétique montre une incorporation du $[^{14}\text{C}]$ NeuAc par les cellules et sur l'asialofétuine (Fig. 15) :

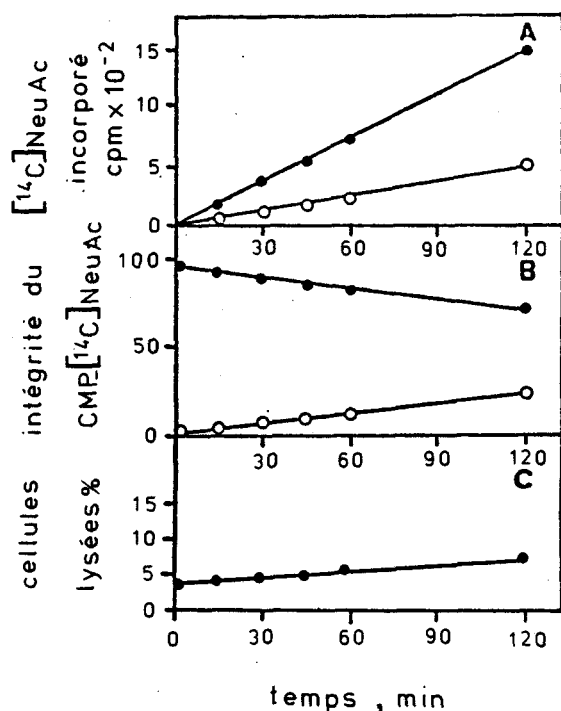


Figure 15 : Cinétiques d'incorporation de $[^{14}\text{C}]$ NeuAc et de dégradation de CMP- $[^{14}\text{C}]$ NeuAc par une suspension de plaquettes entières.

Les incubations sont réalisées dans les conditions standard avec $2 \mu\text{M}$ de CMP- $[^{14}\text{C}]$ NeuAc.

A - Incorporation de $[^{14}\text{C}]$ NeuAc sur les accepteurs endogènes ○—○ et sur l'asialofétuine ●—●

B - Intégrité de CMP- $[^{14}\text{C}]$ NeuAc ●—● et apparition de $[^{14}\text{C}]$ NeuAc ○—○

C - Pourcentage de plaquettes lysées ●—●

Bien qu'une activité CMP-NeuAc hydrolasique soit détectable (Fig. 15-B) (25 % d'acide sialique apparu en 2 heures), l'incorporation croît linéairement pendant 2 heures. Il est à noter que la radioactivité liée aux cellules est proportionnelle jusqu'à 3.10^9 cellules/ml. Cependant, cette technique utilisée est source de nombreuses causes d'erreurs (KEENAN et MORRE : 330) et peut conduire à une interprétation erronée de nos résultats, en effet :

A - La présence d'une ecto CMP-NeuAc hydrolase membranaire peut conduire à la destruction du précurseur CMP-NeuAc ; le sucre radioactif libre [^{14}C] NeuAc peut pénétrer dans la cellule et la radioactivité mesurée sur accepteurs endogènes n'est pas une activité de transfert mais une simple entrée de sucre libre.

B - La cellule peut phagocyter l'accepteur exogène (ici l'*asialofétuine*) et le précurseur, et la sialylation peut alors être catalysée par les sialyltransférases intracellulaires.

C - Il peut y avoir, d'une part, sécrétion de sialyltransférases pendant l'incubation et, d'autre part, il existe toujours dans une suspension cellulaire un faible pourcentage de cellules lysées (Fig. 15-C) : celles-ci peuvent libérer dans le milieu extracellulaire des enzymes (membranaires ou solubles) intracellulaires, capables de sialyler les accepteurs exogènes et endogènes.

Les incorporations que nous avons obtenues sur l'*asialofétuine* et sur les cellules ne nous permettent donc pas de conclure à l'existence d'ectosialyltransférase si certaines précautions ne sont pas prises.

III - MISE EN EVIDENCE D'UNE ACTIVITE ECTOSIALYLTRANSFERASIQUE

Pour pouvoir tirer des conclusions quant à la présence ou non de cet enzyme à la surface de la plaquette, nous avons répondu à ces trois objections (A, B, C) de la manière suivante :

A - L'acide sialique libre peut entrer dans les cellules (HIRSCHBERG *et al.* : 331). L'addition d'un excès d'acide sialique froid (1000 fois) ne réduit pas la radioactivité liée aux plaquettes. Ce résultat montre que la radioactivité associée aux cellules n'est pas due à une simple entrée d'acide sialique.

B - Comme CACAN *et al.* (332) l'ont montré sur le lymphocyte splénique de Rat, l'accepteur lié de façon covalente à un support insoluble 100 fois plus grand que la plaquette permet de répondre à la deuxième objection. Nous avons préparé 3 types d'accepteurs insolubilisés (voir appendice technique p. 119):

- 1° - *asialofétuine* liée à des billes de Sépharose 4B
- 2° - *asialofétuine* liée à des billes d'Ultrogel AcA44
- 3° - *asialofétuine* liée à des billes de Biogel P300.

Le Tableau III montre les résultats obtenus lorsque l'*asialofétuine* insolubilisée est incubée en présence d'une suspension plaquettaire et de 2 μM de CMP- [^{14}C] NeuAc :

TABLEAU III

INCORPORATION DE LA RADIOACTIVITE SUR
L'ASIALO FETUINE INSOLUBILISEE

	Temps d'incubation (min)	[¹⁴ C]NeuAc transféré sur l' <i>asialofétuine</i> insolubilisée (cpm)
A - Essai standard		
+ Sépharose 4B couplé à l' <i>asialofétuine</i>	60	65
+ Ultrogel Aca ₄₄ couplé à l' <i>asialofétuine</i>	60	350
+ Biogel P300 couplé à l' <i>asialofétuine</i>	60	300
B - Essai standard		
+ Ultrogel Aca ₄₄ couplé à l' <i>asialofétuine</i>	0	30
+ Ultrogel Aca ₄₄ non couplé	60	70
- Cellules + Ultrogel Aca ₄₄ couplé à l' <i>asialofétuine</i>	60	50

Les incubations sont réalisées dans les conditions standard avec 2 μ M CMP- [¹⁴C]NeuAc.

A - Incorporation de [¹⁴C]NeuAc sur l'*asialofétuine* couplée aux différents supports.

B - Adsorption non spécifique de la radioactivité sur les supports insolubilisés.

Les supports insolubilisés sont séparés de la suspension plaquettaire par centrifugation dans un gradient de métrizamide 32 % (voir appendice technique p. 122).

L'*asialofétuine* couplée au Sépharose 4B se révèle être un mauvais accepteur (Tabl. III-A). Cependant, l'*asialofétuine* couplée à l'Ultrogel Aca44 ou à du Biogel P300 peut être sialylée (Tabl. III-A). Différents contrôles (Tabl. III-B) ont été effectués afin de déterminer si cette incorporation ne résulte pas d'une adsorption non spécifique du précurseur sur les supports : l'incubation du CMP- [¹⁴C]NeuAc avec, d'une part les billes non couplées et avec les cellules et, d'autre part avec l'*asialofétuine* fixée à l'Ultrogel mais en absence de cellules donne une très faible adsorption de la radioactivité. Ces résultats permettent de répondre au problème posé par la phagocytose des accepteurs exogènes.

C - Pour répondre à la 3^{ème} objection, il nous a fallu déterminer si l'activité sialyltransférasique mesurée sur les accepteurs exogènes insolubilisés (*asialofétuine* branchée sur Ultrogel Aca44) et sur les accepteurs endogènes n'est pas due à des sialyltransférases intracellulaires libérées. Pour cela, nous avons utilisé la technique développée par STRUCK et LENNARZ (333) : nous avons mesuré l'incorporation du [¹⁴C]NeuAc par une suspension de plaquettes entières (dont le pourcentage de cellules cassées est mesuré par la libération de LDH) et de mélanges contenant des proportions connues de cellules entières et de cellules cassées. A condition que les cellules lysées ne libèrent pas de CMP-NeuAc intracellulaire entraînant une dilution isotopique (comme l'ont montré HOFACK *et al.* : 334, sur le lymphocyte de Rat), l'extrapolation de ces valeurs d'incorporation à 0 % de cellules cassées doit permettre de connaître l'activité ectosialyltransférasique.

La méthode par lyse chimique des plaquettes n'étant pas ici applicable, nous avons choisi de casser les cellules par irradiation aux ultrasons. La suspension plaquettaire est soumise aux ultrasons pendant plusieurs périodes de 30 secondes, tout en étant maintenue à 0°C par un bain de glace. Après chaque temps de sonolyse, nous avons mesuré les activités sialyltransférasique et lactico-déhydrogénasique (Fig. 16) :

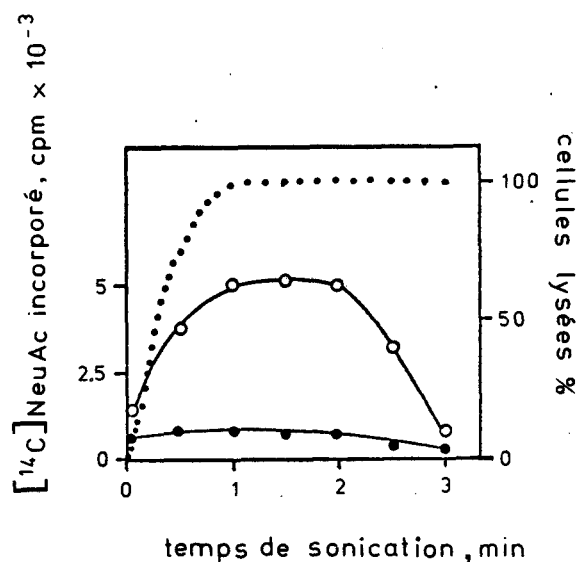


Figure 16 : Effet du temps de sonolyse sur l'incorporation de [¹⁴C]NeuAc par une suspension plaquettaire irradiée.

La sonication est réalisée dans un MSF ultrasonicateur ($\lambda = 14,5 \mu\text{m}$) à 0°C sur une suspension plaquettaire ($10^{10}/\text{ml}$).

Incorporation de [¹⁴C]NeuAc sur les accepteurs endogènes

●—● et sur l'asialofétuine ○—○

Pourcentage de cellules lysées ●●●●

Au bout d'une minute d'irradiation, les plaquettes sont totalement lysées et l'activité sialyltransférase mesurée est maximale. Au-delà de 2 minutes, l'activité enzymatique chute. La mesure de l'incorporation de [¹⁴C]NeuAc par les cellules totales seules et par les mélanges cellules totales-cellules lysées (aux ultrasons, 1 min.) est réalisée en absence ou en présence d'asialofétuine insolubilisée : l'extrapolation à 0 % de cellules cassées montre une incorporation significative par les plaquettes (Fig. 17-A) et sur l'accepteur insolubilisé (Fig. 17-B) :

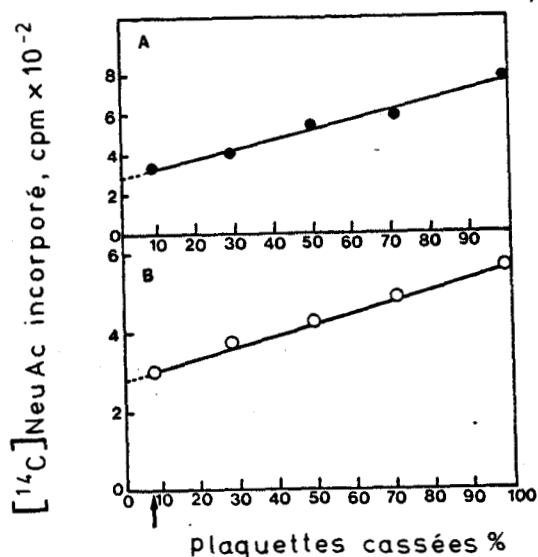


Figure 17 : *Activité sialyltransférasique exprimée par une suspension de plaquettes totales, en fonction du pourcentage de cellules cassées.*

Des mélanges, contenant des proportions connues de suspensions de plaquettes entières et de plaquettes lysées, sont incubés pendant 60 min avec 2 μ M de CMP- [¹⁴C]NeuAc.

Incorporation de [¹⁴C]NeuAc sur les accepteurs endogènes (A) et sur l'asialofétuine couplée à l'Ultrogel ACA₄₄ (B).

La flèche indique le pourcentage de cellules lysées dans la suspension plaquettaire.

L'addition de quantités croissantes de cellules lysées après 3 minutes d'ultrasons, ne modifie pas l'incorporation de [¹⁴C]NeuAc sur les plaquettes : ce résultat signifie que le taux de CMP-NeuAc intracellulaire, s'il existe, n'est pas assez élevé pour entraîner une dilution isotopique. Tenant compte de ce fait, les extrapolations de l'activité sialyltransférasique à 100 % de cellules intactes démontrent clairement qu'il existe une ectosialyltransférase à la surface de la plaquette active sur des accepteurs endogènes et exogènes.

IV - IDENTIFICATION DES ACCEPTEURS ENDOGENES SIALYLES

A - IDENTIFICATION DES ACCEPTEURS ENDOGENES

L'identification des accepteurs endogènes sialylés de la plaquette a pu être déterminée à partir de la technique d'électrophorèse SDS-PAGE (protocole expérimental p. 124) *. La Figure 18 montre les profils radioactifs obtenus quand les plaquettes marquées au $[^{14}\text{C}]$ NeuAc sont analysées :

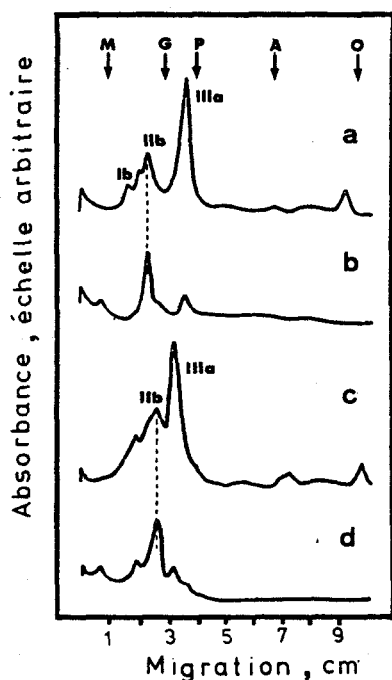


Figure 18 : Identification des accepteurs endogènes sialylés de la membrane plaquettaire.

Les plaquettes sont incubées soit avec du CMP- $[^{14}\text{C}]$ NeuAc dans les conditions standard (b, d) soit marquées au $[^{125}\text{I}]$ selon la réaction catalysée par la lactopéroxydase (a, c).

Les protéines sont séparées par électrophorèse SDS-PAGE avant (a, b) et après (c, d) réduction des ponts disulfure. Ib, IIb, IIIa : glycoprotéines majeures des plaquettes.

M, G, P, A, O : protéines standard ; M : myosine ; G : β -galactosidase ; P : phosphorylase ; A : sérumalbumine bovine ; O : ovalbumine.

* Nous remercions vivement Dominique DUPUIS pour la réalisation des électrophorèses.

L'analyse comparée des profils : b et d avec ceux des protéines membranaires marquées à l'iode 125 : a et c, montre que la radioactivité est essentiellement associée à un accepteur qui migre comme la glycoprotéine IIb ; la GPIIb est une glycoprotéine membranaire orientée à la surface de la plaquette, de masse moléculaire apparente 142.000 daltons. La réduction révèle une sous-unité α de 132.000 daltons et une plus petite β de 23.000 daltons (NURDEN et CAEN : 335).

Comme le montre une extraction de FOLCH (336), moins de 10 % de la radioactivité totale liée à la cellule est associée aux glycolipides.

B - DETERMINATION DU TYPE DE GLYCANNE IMPLIQUÉ DANS LA SIALYLATION

Dans les conditions de coupure sélective des glycannes liés O-glycosidiquement aux protéines (β -élimination), les accepteurs endogènes sialylés restent stables : ce résultat indique que l'acide sialique est branché sur des résidus glycaniques de N-glycosylprotéines.

C - CONCLUSION

Nous montrons *in vitro* que la glycoprotéine IIb est l'accepteur endogène préférentiellement sialylé. Le résultat obtenu par β -élimination s'interprète en admettant la présence de N-glycannes sur la GPIIb.

V - DESIALYLATION DES PLAQUETTES

La surface des plaquettes est riche en acide sialique (MADOFF *et al.* : 337). Il nous a semblé intéressant d'étudier le mode de resialylation des plaquettes traitées à la neuraminidase (protocole expérimental p. 118). Les cinétiques d'incorporation de $[^{14}\text{C}]$ NeuAc par les plaquettes désialylées ou non ont été mesurées (Fig. 19) :

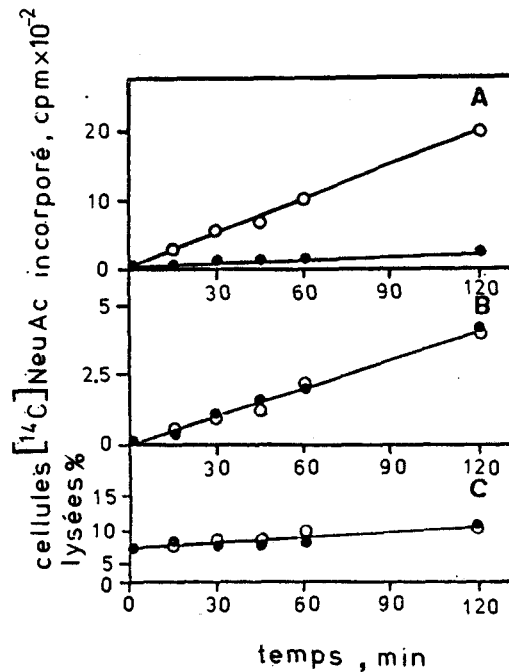


Figure 19 : Cinétiques d'incorporation de $[^{14}\text{C}]$ NeuAc par des suspensions de plaquettes entières non désialylées ou désialylées. Les incubations sont réalisées dans les conditions standard, avec $2 \mu\text{M}$ de CMP $[^{14}\text{C}]$ NeuAc. Les plaquettes sont désialylées par action de la neuraminidase *Vibrio cholerae*.

- A - Incorporation de $[^{14}\text{C}]$ NeuAc sur les accepteurs endogènes de plaquettes non désialylées ●—● et désialylées ○—○
- B - Incorporation de $[^{14}\text{C}]$ NeuAc sur l'asialofétuine par les plaquettes non désialylées ●—● et désialylées ○—○
- C - Pourcentage de cellules lysées dans la suspension plaquettaire non traitée à la neuraminidase ●—● et traitée à la neuraminidase ○—○

Après action de la neuraminidase, l'incorporation de $[^{14}\text{C}]$ NeuAc sur les accepteurs endogènes des plaquettes traitées est stimulée 8 fois (Fig. 19-A) ; cette incorporation augmentée n'est pas due, d'une part, à une libération d'enzymes intracellulaires puisque la via-

bilité cellulaire après désialylation n'est pas affectée (Fig. 19-C), et d'autre part, n'est pas due à une modification de l'activité sialyltransférase (Fig. 19-B).

L'électrophorèse SDS-PAGE des plaquettes resialylées au [¹⁴C] NeuAc montre que la radioactivité se trouve polydispersée au niveau des différentes glycoprotéines membranaires ; de plus, la glycoprotéine Ib qui est la plus riche en acide sialique n'est pas celle qui est préférentiellement resialylée, suggérant ainsi un rôle de réparation in distinct des glycoconjugués par les ectosialyltransférases plaquettaires.

VI - CONCLUSIONS

Dans ce chapitre, nous montrons sans ambiguïté que la plaquette possède une activité ectosialyltransférase. Cette étude a été réalisée avec des cellules entières et en tenant compte de toutes les causes d'erreur possibles (KEENAN et MORRE : 338 ; HOFACK *et al.* : 339). L'électrophorèse SDS-PAGE révèle que l'accepteur endogène de la plaquette préférentiellement sialylé est la glycoprotéine IIb. BOSMANN (340) a été le premier à proposer un rôle fonctionnel pour les ectosialyltransférases durant l'agrégation plaquettaire. Dans la thrombasthénie de GLANZMANN où il existe un désordre fonctionnel des plaquettes se traduisant par une absence d'agrégation, la GPIIb est absente ou très fortement diminuée (NURDEN et CAEN : 341). Existe-t-il une relation entre la GPIIb, accepteur majeur de l'ectosialyltransférase et le défaut d'agrégation dans la thrombasthénie de GLANZMANN ? Dans la suite de notre travail, l'étude des sialyltransférases plaquettaires de ces malades nous apportera un élément de réponse.

D'autres auteurs ont montré la présence d'ectosialyltransférases et d'accepteurs endogènes sur la membrane de lymphocytes (VERBERT *et al.* : 342) et de fibroblastes (PATT et GRIMES : 343).

La mesure d'une activité ectosialyltransférasique et d'accepteurs potentiellement sialylables à la surface de la cellule peut rendre compte pour ces enzymes d'un rôle biologique dans la réparation des glycoconjugués membranaires, avec toutefois la réserve que ce phénomène observé *in vitro* ne se déroule peut-être pas *in vivo*.

3 - DÉTECTION DE DEUX ACTIVITES SIALYLTRANSFÉRASIQUES

À OSMOLARITÉ PHYSIOLOGIQUE

Dans les conditions d'osmolarité physiologique où nous avons mis en évidence une activité ectosialyltransférasique à la surface de la plaquette, nous présentons dans ce chapitre la description de ses paramètres de fonctionnement.

I - EFFET DES CATIONS DIVALENTS SUR LA SIALYLATION DES ACCEPTEURS ENDOGENES ET EXOGENES

La majorité des activités glycosyltransférasiques requiert la présence de cations divalents pour leur activité optimale. Si l'on compare les conditions utilisées pour la mesure de l'activité sialyltransférasique dans les plaquettes par différents auteurs (BOSMANN : 344 ; WU *et al.* : 345), nous observons que la présence de cations divalents n'est pas standardisée et varie d'un auteur à l'autre : ils utilisent le manganèse ou le magnésium dans une gamme de concentration de 0,8 à 10 mM. Nous avons cherché à déterminer les effets des cations divalents Mn^{++} , Mg^{++} et Ca^{++} sur l'activité sialyltransférasique exprimée par les plaquettes (Fig. 20).

Cette étude amène les observations suivantes :

- L'incorporation de $[^{14}C]$ NeuAc sur l'*asialofétuine* (ou sur l'*asialoorosomucoïde*) décroît en présence de concentrations croissantes en cation divalent (Fig. 20-A).

- La sialylation sur les accepteurs endogènes est au contraire optimale pour 3 à 5 mM en cation divalent (Fig. 20-B).

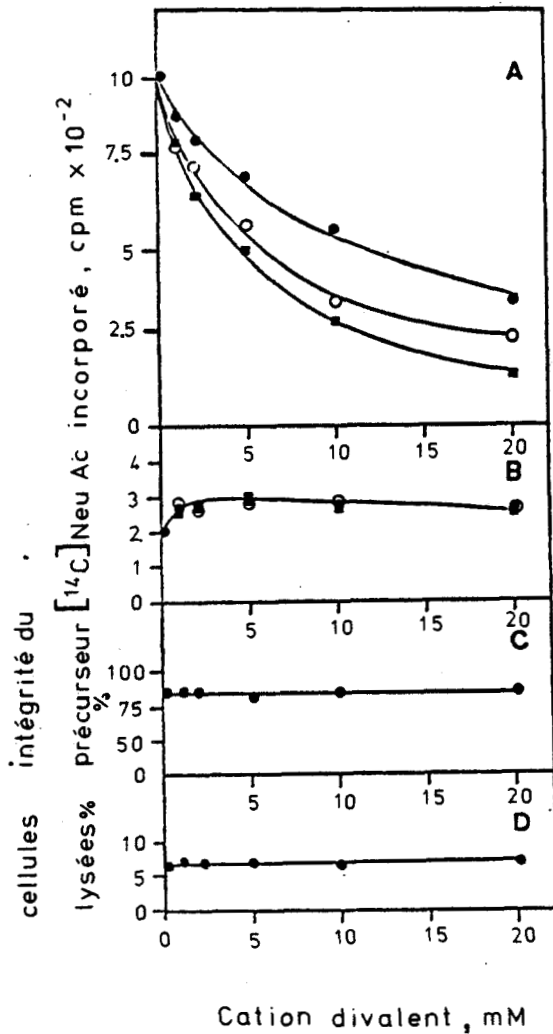


Figure 20 : Effet des cations divalents sur l'incorporation de $[^{14}\text{C}]$ NeuAc par les plaquettes entières.

Les incubations sont réalisées dans les conditions standard pendant 60 min, avec $2\ \mu\text{M}$ de $\text{CMP}-[^{14}\text{C}]$ NeuAc, en présence de concentrations croissantes en CaCl_2 ●—●, MgCl_2 ○—○, MnCl_2 ■—■.

A - Incorporation de $[^{14}\text{C}]$ NeuAc sur l'asialoorosomucoïde

B - Incorporation de $[^{14}\text{C}]$ NeuAc sur les accepteurs endogènes

C - Intégrité du $\text{CMP}-[^{14}\text{C}]$ NeuAc.

D - Pourcentage de cellules lysées dans la suspension plaquettaire

Cette diminution d'incorporation sur l'accepteur exogène n'est pas due à une dégradation du précurseur $\text{CMP}-[^{14}\text{C}]$ NeuAc puisque le taux de $\text{CMP}-\text{NeuAc}$ restant à la fin de la réaction ne varie pas en fonction de la concentration en cation (Fig. 20-C). Certaines activités glycosyltransférasiques de surface requièrent des concentrations en cation plus faibles que ces mêmes activités dans les homogénats (PATT et GRIMES : 346 ; ROTH *et al.* : 347) : dans nos conditions, nous obtenons un résultat identique avec un homogénat plaquettaire (Fig. 21) : on observe une inhibition apparente de l'incorporation de $[^{14}\text{C}]$ NeuAc sur l'accepteur exogène (Fig. 21-A) tandis que la sialylation des accepteurs endogènes est optimale pour une concentration en cation plus faible : 1 à 2 mM (Fig. 21-B) :

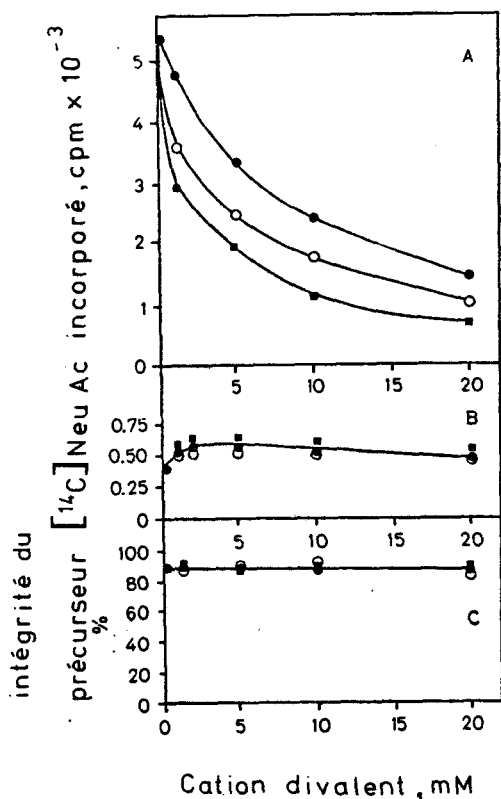


Figure 21 : Effet des cations divalents sur l'incorporation de $[^{14}\text{C}]$ NeuAc par un homogénat plaquettaire.

Les incubations sont réalisées dans les conditions standard pendant 60 min avec $2 \mu\text{M}$ de $\text{CMP}-[^{14}\text{C}]$ NeuAc, en présence de concentrations croissantes en CaCl_2 ●—●, MgCl_2 ○—○, MnCl_2 ■—■.

A - Incorporation de $[^{14}\text{C}]$ NeuAc sur l'asialoorosomucoïde

B - Incorporation de $[^{14}\text{C}]$ NeuAc sur les accepteurs endogènes

C - Intégrité du $\text{CMP}-[^{14}\text{C}]$ NeuAc

Le déplacement de l'optimum vers les concentrations plus faibles s'explique vraisemblablement par le taux de cations intracellulaires présents dans l'homogénat.

Une explication à cette inhibition peut être avancée si l'on suppose que les plaquettes possèdent une activité neuraminidasique stimulée par les cations. BOSMANN (348) a pu mettre en évidence la présence d'une neuraminidase dans les plaquettes. La Figure 22 montre que cet effet n'est pas dû à une neuraminidase plaquettaire :

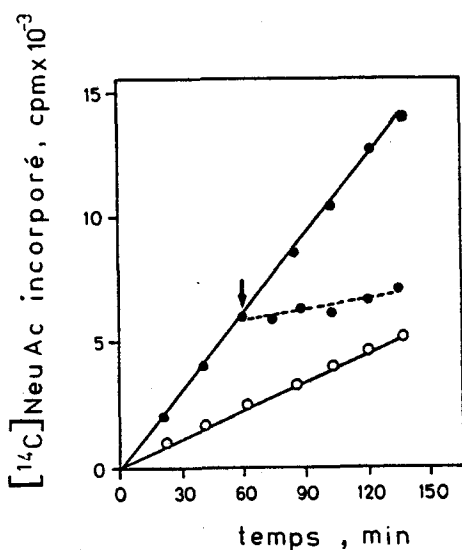


Figure 22 : Effet de l'addition de CaCl_2 sur la sialylation de l'asialoorosomucoïde par un homogénat plaquettaire.

Les incubations sont réalisées dans les conditions standard avec $2 \mu\text{M}$ de $\text{CMP}-[^{14}\text{C}]\text{NeuAc}$ en absence ●—● ou en présence de CaCl_2 10 mM ○—○. Après 60 min, 10 mM de CaCl_2 est ajouté dans l'essai réalisé en absence de CaCl_2 (flèche : →) : l'effet de l'addition de CaCl_2 est suivi durant 90 min.

Après sialylation de l'asialoorosomucoïde durant les 60 premières minutes, l'addition de calcium n'entraîne pas une diminution de la radioactivité due à une perte des résidus $[^{14}\text{C}]$ -sialyl de l'accepteur : au contraire, une inhibition de l'incorporation est observée.

Ce comportement différent des accepteurs endogènes et exogènes vis-à-vis des cations divalents suggère donc que la plaquette possède deux activités sialyltransférasiques. En regard de ce résultat rappelons ceux que nous avons obtenus au tout début de notre travail (chapitre 1, p. 52) : l'activité sialyltransférasique mesurée à faible osmolarité était stimulée différemment par les cations selon que l'homogénat avait été ou non préalablement soumis à la congélation. L'existence de 2 activités sialyltransférasiques implique :

- soit l'existence d'un seul enzyme présentant un comportement différent selon la nature de l'accepteur ;

- soit l'existence de deux enzymes différents ayant leur propre spécificité, selon la nature de l'accepteur et (ou) la liaison formée entre l'acide sialique et la chaîne glycanique de l'accepteur glycoprotéinique.

Contrairement à l'*asialoorosomucoïde* qui est une N-glycosylprotéine, l'*asialofétuine* possède des chaînes glycosidiques N et O sur la protéine. Comme nous l'avons montré pour les accepteurs endogènes de la plaquette (chapitre 2, p. 66), le traitement alcalin de la fétuine resialylée ne libère aucune radioactivité : ce résultat indique que la sialylation sur les accepteurs exogènes (comme sur les accepteurs endogènes) se fait sur les glycanes conjugués à la protéine par une liaison N-glycosidique.

II - EFFET DU pH ET DE LA TEMPERATURE D'INCUBATION

L'effet du pH et de la température sur l'activité sialyltransférase vis-à-vis des accepteurs endogènes et exogènes a été mesurée (Fig. 23) :

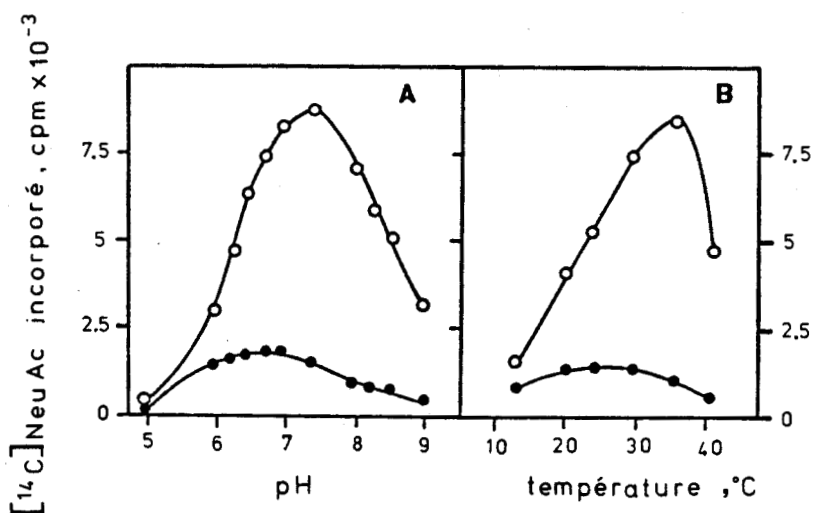


Figure 23 : Effet du pH et de la température sur l'incorporation de $[^{14}\text{C}]$ NeuAc par un homogénat plaquettaire.

Les incubations sont réalisées dans les conditions standard pendant 60 min avec $2 \mu\text{M}$ de $\text{CMP}-[^{14}\text{C}]$ NeuAc.

A - en Tris/maléate 10 mM ajusté aux différents pH, contenant du NaCl 154 mM, EDTA 1 mM, glucose 5 mM, SAB 0,35 %, à 37°C .

B - à différentes températures, à pH 7,4

Incorporation de $[^{14}\text{C}]$ NeuAc sur les accepteurs endogènes ●—●
et sur l'asialofétuine ○—○

L'activité sialyltransférasique est fortement dépendante du pH et de la température : l'optimum d'activité est à pH 6,75 pour l'activité endogène et 7,40 pour l'activité exogène (Fig. 23-A) ; en fonction de la température, les optima d'activités sont obtenus à 30°C pour l'endogène et 37°C pour l'exogène (Fig. 23-B). Ces résultats sont en faveur de l'existence de deux activités sialyltransférasiques différentes dans la plaquette.

III - ETUDE DE LA STABILITE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE

Nous avons complété nos résultats par l'étude de la stabilité enzymatique. Dans le chapitre I, nous avons observé que la stimulation de l'activité sialyltransférasique par les ions variait selon que l'homogénat avait été ou non préalablement congelé. Divers auteurs ont montré la présence d'une activité sialyltransférasique thermolabile dans certains tissus (SCHACHTER *et al.* : 349 ; HICKMAN *et al.* : 350 ; BERNACKI et BOSMANN : 351 ; ALHADEFF *et al.* : 352 ; AGUANNO *et al.* : 353 ; VAN DIJK *et al.* : 354). La Figure 24 montre l'effet de deux congélations successives d'un homogénat plaquettaire sur la sialylation des accepteurs endogènes et exogènes, en présence de concentrations croissantes en CaCl₂ (Fig. 24, p.76).

Une interprétation qualitative de ces résultats permet de dégager deux faits :

- Après la deuxième décongélation, la chute de l'activité sialyltransférasique mesurée sur l'*asialofétuine* est beaucoup plus importante que celle observée sur les accepteurs endogènes (Fig. 24-A et B, en absence de CaCl₂).

- L'activité sialyltransférasique vis-à-vis de l'exogène est alors modulée par les cations (Fig. 24-A), de la même façon que vis-à-vis des accepteurs endogènes (Fig. 24-B).

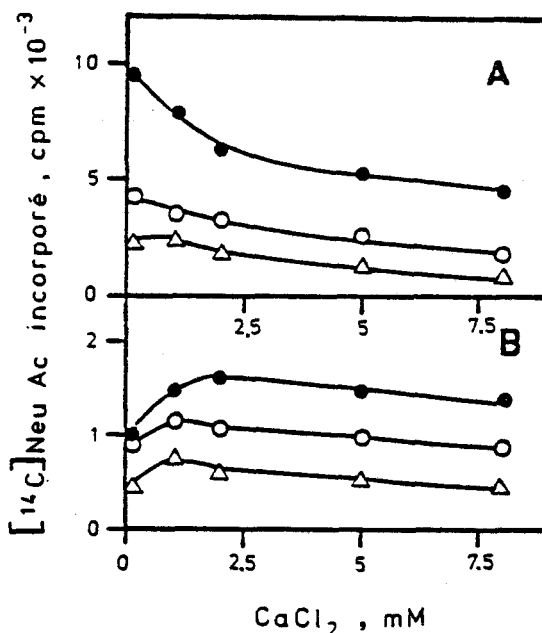


Figure 24 : Effet du calcium sur l'incorporation de [¹⁴C]NeuAc par un homogénat plaquettaire soumis à la congélation et à la décongélation.

Les incubations sont réalisées dans les conditions standard avec un homogénat plaquettaire frais ●—●, décongelé 1 fois ○—○, décongelé 2 fois △—△.

A - Incorporation de [¹⁴C]NeuAc sur l'asialofétuine

B - Incorporation du [¹⁴C]NeuAc sur les accepteurs endogènes

Ce résultat supporte donc d'une façon satisfaisante l'hypothèse selon laquelle deux activités sialyltransférasiques coexistent dans la plaquette.

IV - CONCLUSIONS

L'étude de différents paramètres physicochimiques (cations divalents, pH et température) nous a permis de caractériser deux activités sialyltransférasiques plaquettaires. Les expériences de congélation et de décongélation sont en faveur de l'existence de deux enzymes différents ayant leur propre spécificité. Dans les deux cas, la sialylation se fait exclusivement sur des glycanes N-glycosylprotéiniques.

4 - CARACTERISATION DES DEUX ACTIVITÉS SIALYLTRANSFÉRASIQUES MISES EN ÉVIDENCE

In vivo, deux types de liaison entre l'acide sialique et les résidus galactosyl des chaînes glycaniques des N-glycosylprotéines existent : liaison du type α -2,3 et liaison du type α -2,6. La mise en évidence de deux activités sialyltransférasiques plaquettaires spécifiques des N-glycosylprotéines nous suggère l'existence de deux enzymes différents ayant leur propre spécificité : dans ce chapitre, nous nous sommes attachée à caractériser ces deux activités sialyltransférasiques.

I - SPECIFICITE DE DIFFERENTS ACCEPTEURS

Pour aborder cette étude, deux critères ont déterminé le choix des différents accepteurs testés : ceux-ci devaient

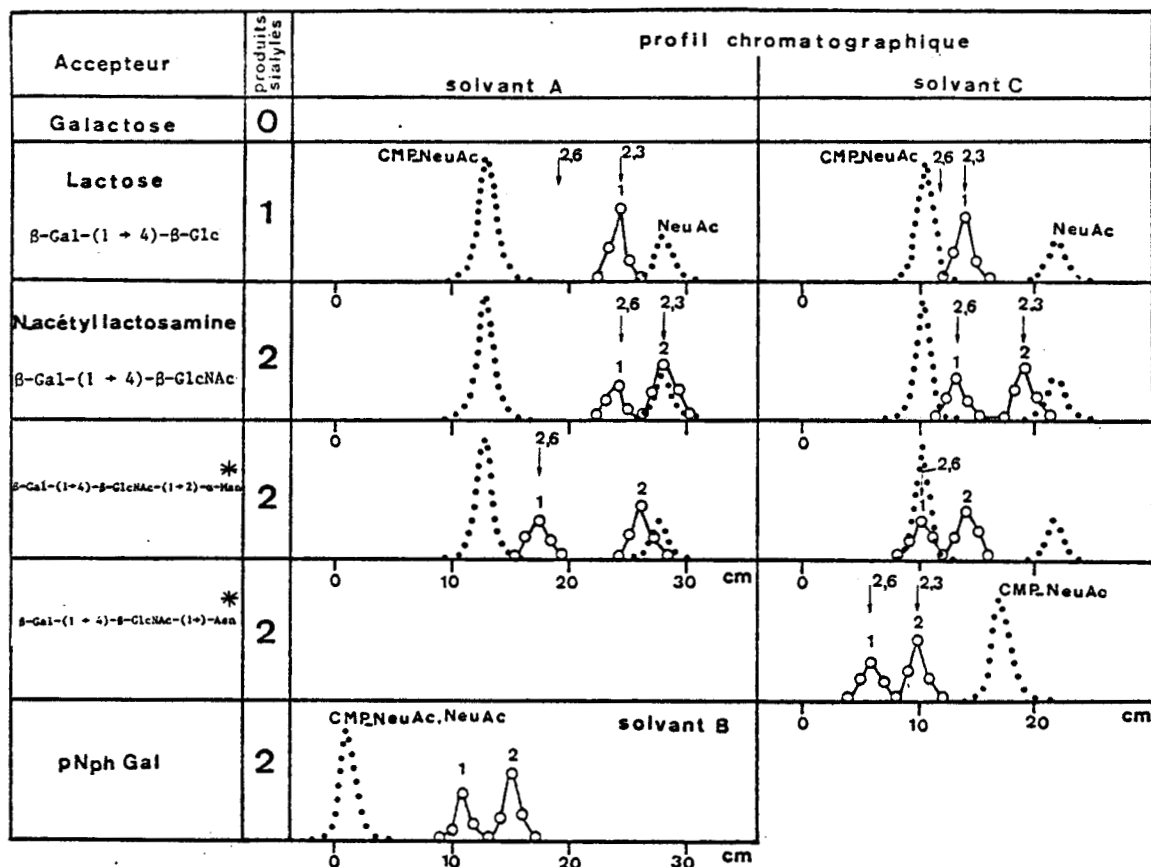
1 - posséder un résidu galactosyl terminal pouvant être sialylé ;

2 - pouvoir être identifiés et isolés après sialylation. L'utilisation d'accepteurs micromoléculaires dont les produits de sialylation sont facilement détectables par la technique de chromatographie sur papier nous a permis de répondre à ce 2ème critère. Le Tableau IV résume les résultats que nous avons obtenus (voir p. 78).

Le galactose libre n'est pas sialylable. L'emploi du lactose permet de détecter un dérivé sialyllactose qui migre comme un témoin α -2,3 sialyllactose ; les autres accepteurs utilisés : la N-acétyllactosamine, le lactosylmannose et le lactosylasparagine donnent chacun deux dérivés sialylés migrant respectivement comme les témoins α -2,3 et α -2,6 sialylés correspondants.

TABLEAU IV

MESURE DE L'INCORPORATION DE $[^{14}\text{C}]$ NeuAc PAR UN HOMOGENAT PLAQUETTAIRE SUR DIFFERENTS ACCEPTEURS MICROMOLECULAIRES UTILISES



Les incubations sont réalisées dans les conditions standard, pendant 60 min avec $2\ \mu\text{M}$ de $\text{CMP-}[^{14}\text{C}]$ NeuAc, en présence du substrat micromoléculaire (10 mg/ml). Après incubation, les produits sialylés sont séparés par chromatographie descendante sur papier Whatman dans les différents solvants :

A - éthanol/acétate d'ammonium 1 M, pH 7,5 (7 : 3 en vol.)

B - acétate d'éthyle/pyridine/eau (10 : 4 : 3 en vol.)

C - pyridine/acétate d'éthyle/acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3 en vol.)

1,2 : oligosaccharides $[^{14}\text{C}]$ -sialylés

↓ 2,6 et ↓ 2,3 : oligosaccharides témoins sialylés

* Nous remercions vivement G. STRECKER, Maître de Recherches au C.N.R.S., pour les oligosaccharides et leurs dérivés sialylés qu'il nous a aimablement fournis.

Ces premiers résultats suggèrent très fortement que la plaquette possède deux activités sialyltransférasiques qui se distinguent par le type de liaison qu'elles forment entre l'acide sialique et un résidu galactosyl terminal. L'application de la technique de méthylation mise au point par VAN DEN EIJNDEN et son équipe (355) doit nous permettre de confirmer la présence de ces deux activités sialyltransférasiques. Pour cela, il nous a fallu choisir un accepteur simplifié qui réponde aux exigences suivantes :

- il doit permettre la formation des deux dérivés sialylés ;
- il doit posséder un seul sucre (galactose), le problème de la nature du sucre où s'effectue le branchement étant ainsi évité ;
- pouvoir être méthylé.

Notre choix s'est porté sur le p-nitrophényl- β -D-galactoside : il donne deux dérivés sialylés (voir le Tableau IV).

II - EFFET DES CATIONS DIVALENTS SUR LA SIALYLATION DU P-NITROPHENYL- β -D-GALACTOSIDE

En absence de CaCl_2 , le p-nitrophényl- β -D-galactoside donne les deux dérivés sialylés 1 et 2 (Fig. 25) :

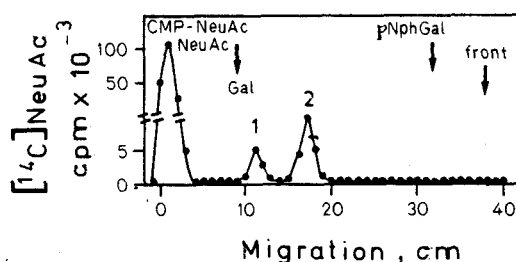


Figure 25 : Chromatographie sur papier des produits sialylés 1 et 2 du p-nitrophényl- β -D-galactoside, dans le système solvant B.

En présence de concentrations croissantes en CaCl_2 , la formation des deux dérivés 1 et 2 est modulée de la façon suivante (Fig. 26) :

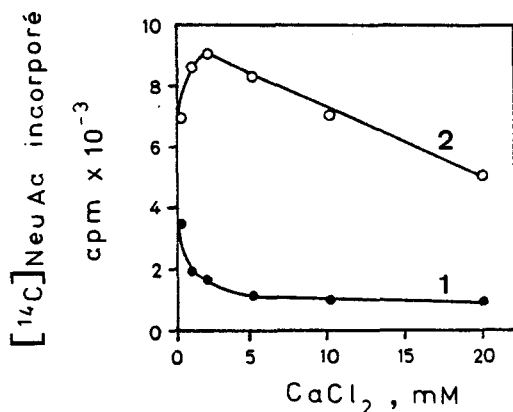


Figure 26 : Effet de CaCl_2 sur l'incorporation de $[^{14}\text{C}]\text{NeuAc}$ par un homogénat plaquettaire sur le p-nitrophényl- β -D-galactoside.

Les incubations sont réalisées dans les conditions standard, pendant 60 min avec $2 \mu\text{M}$ $\text{CMP}-[^{14}\text{C}]\text{NeuAc}$ et avec le pNphGal (10mg/ml), et avec des concentrations croissantes en CaCl_2 . Après incubation, les produits sialylés 1 ●—● et 2 ○—○ sont séparés du $\text{CMP}-[^{14}\text{C}]\text{NeuAc}$ et du $[^{14}\text{C}]\text{NeuAc}$ par chromatographie sur papier dans le système solvant B.

Deux points importants se dégagent de cette Figure :

- la formation du dérivé 1 décroît en présence de concentrations croissantes en Ca^{++} (ou Mn^{++} ou Mg^{++}), comme cela a déjà été observé lors de la sialylation des *asialoglycoprotéines* ;

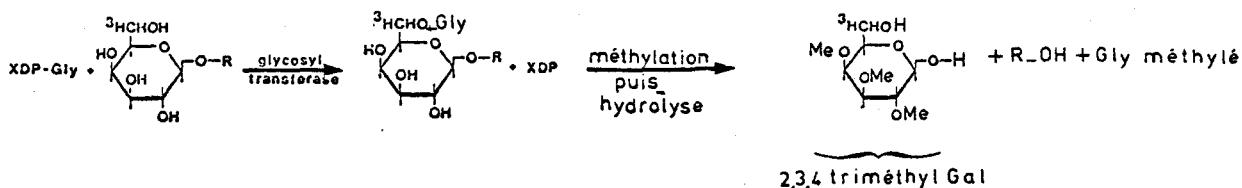
- la formation du dérivé 2 présente la même concentration optimale en cation divalent (2mM) que dans le cas de la sialylation des accepteurs endogènes.

Utilisant du p-nitrophényl- β -D-galactoside, BOSMANN (356) avait montré que les plaquettes possédaient une faible activité β -galactosidasiq ue (moins de 100nmol/h par mg de protéines). Pour la concentration en pNphGal utilisé dans nos conditions (10mg/ml), nous montrons que moins de 1 % de l'accepteur est hydrolysé.

Ce résultat signifie donc que la différence de sialylation observée en présence de cations ne dépend pas de la nature de l'accepteur puisque c'est le même, mais apparaît plutôt liée à la nature des produits sialylés.

III - IDENTIFICATION DES DERIVES SIALYLES DU p-NITROPHENYL-β-D-GALACTOSIDE

La nature de la liaison entre l'acide sialique et le résidu galactosyl est déterminée, en utilisant la méthode développée par VAN DEN EIJNDEN *et al.* (357) et illustrée à titre d'exemple pour une liaison sur le carbone 6 du galactose dans le schéma suivant :



A - PREPARATION DE L'ACCEPTEUR TRITIÉ ET DES DERIVES TRITIÉS SIALYLES

La méthode de VAN DEN EIJNDEN nécessite le marquage du sucre accepteur. Dans notre cas, le galactose du p-nitrophénol est marqué par oxydation à la galactose oxydase suivie par une réduction au borohydrure de sodium tritié (voir en appendice technique le protocole expérimental p. 120). L'hydrolyse acide (ou enzymatique par action d'une β-galactosidase) du produit marqué libère seulement du galactose tritié : cette technique permet donc d'obtenir du pNph [³H] galactose. Les dérivés sialylés 1 et 2 sont synthétisés en incubant l'homogénat plaquettaire en présence du p-nitrophényl-β-D-galactoside (10 mg/ml) et d'un excès de CMP-NeuAc froid* (100 μM), et sont ensuite isolés par chromatographie sur papier (Fig. 27-B) :

* Nous remercions le Professeur SCHAUER pour le CMP-NeuAc froid qu'il nous a aimablement fourni.

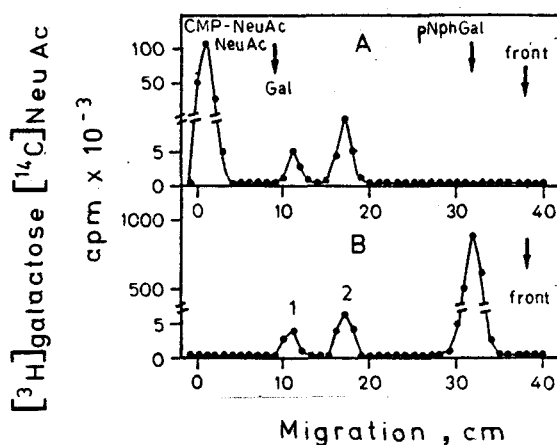


Figure 27 : Chromatographie des dérivés sialylés du p-nitrophényl- β -D-galactoside.

Les incubations sont réalisées pendant 60 min :

A - avec 2 μ M CMP-[¹⁴C]NeuAc et du pNphGal non marqué (10 mg/ml).

B - avec 100 μ M CMP-NeuAc et pNph [³H]Gal (10 mg/ml).

Après incubation, les produits sialylés 1 et 2 sont séparés du CMP-NeuAc, du NeuAc et du pNph [³H]Gal par chromatographie sur papier dans le solvant B.

Le galactose tritié qui peut encore contaminer les produits 1 et 2 après leur élution, est éliminé par passage sur colonne de DOWEX 1 x 2 (200-400 mesh, forme H⁺). Les produits 1 et 2 retenus sur la colonne sont ensuite élués en présence d'acétate de pyridine 2 M.

B - METHYLATION ET ANALYSE DES DERIVES SIALYLES

Après méthylation et hydrolyse des deux isomères (voir en appendice technique le protocole expérimental p. 125). Les fractions 1 et 2 contenant les dérivés du galactose méthylé correspondant respectivement aux produits 1 et 2 sont analysées par chromatographie sur couche mince (Fig. 28) :

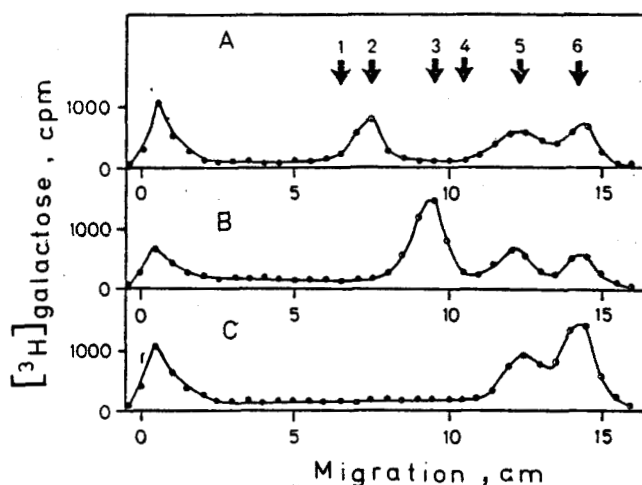


Figure 28 : Analyse par chromatographie sur couche mince des dérivés méthylés du galactose tritié.

Les fractions méthylées sont cochromatographiées sur plaque de Silica Gel 60 avec les standards * :

- 1 - 3,4,6 triméthylgalactose ; 2 - 2,3,4 triméthylgalactose ;
- 3 - 2,4,6 triméthylgalactose ; 4,5 - 2,3,6 triméthylgalactose ;
- 5,6 - perméthylgalactose, dans le système solvant acétone/
NH₄OH 4,5 M (500 : 9 en vol.).

A - Dérivé 1

B - Dérivé 2

C - pNph [³H]Gal témoin.

Le dérivé méthylé 1 comigre avec le témoin 2,3,4 triméthylgalactose (Fig. 28'-A) et le dérivé méthylé 2 avec le 2,4,6 triméthylgalactose (Fig. 28'-B) ; le p-nitrophényl-β-D- [³H]galactoside donne du tétraméthylgalactose (Fig. 28-C). La présence de tétraméthylgalactose dans les essais avec les dérivés sialylés 1 et 2 est probablement due à la désialy-

* Nous remercions vivement Yves LEROY pour les témoins méthylés qu'il nous a si aimablement fournis.

lation partielle lors de la méthylation. A cet égard, nous avons observé que le produit 2 apparaissait plus stable que le produit 1.

L'action de l' α -neuraminidase *Arthrobacter Urefaciens* IIb (Sigma, St Louis, U.S.A.) sur les 2 dérivés $[^{14}\text{C}]$ sialylés du p-nitrophényl- β -D-galactoside libère le $[^{14}\text{C}]$ NeuAc (Fig. 29) :

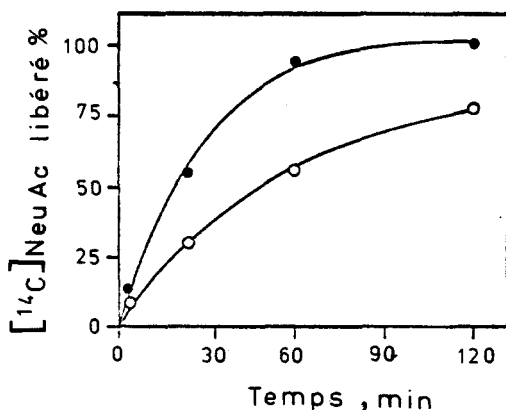


Figure 29 : Hydrolyse enzymatique des dérivés $[^{14}\text{C}]$ sialylés du p-nitrophényl- β -D-galactoside.

L'incubation est réalisée en présence du dérivé $[^{14}\text{C}]$ sialylé du pNphGal (20.000 cpm) avec 0,01 unités de neuraminidase *Arthrobacter Urefaciens* IIb, en CaCl_2 20 mM et en acétate de sodium pH 5.

pNph Gal $[^{14}\text{C}]$ sialylés en C-3 ○—○
et C-6 ●—● .

Ce résultat indique que l'anométrie de l'acide sialique sur le résidu galactosyl est α .

C - CONCLUSION

Nos résultats démontrent que les plaquettes sont capables d'utiliser le p-nitrophényl- β -D-galactoside comme accepteur de sialyltransférase pour donner les dérivés sialyl α -2,3 et α -2,6 galactosides.

L'absence d'une activité neuraminidasique plaquettaire est confirmée dans nos conditions expérimentales puisque les deux isomères $[^{14}\text{C}]$ -sialylés en présence des plaquettes ne sont pas hydrolysés.

IV - DISCRIMINATION ENTRE L'ACTIVITE SIALYL α -2,3 TRANSFERASIQUE ET L'ACTIVITE SIALYL α -2,6 TRANSFERASIQUE

Nous avons comparé les activités sialyl α -2,3 et α -2,6 transférasiques à partir de l'étude de la variation de différents paramètres.

A - EFFET DU pH ET DE LA TEMPERATURE D'INCUBATION

Les activités sialyl α -2,3 et sialyl α -2,6 transférasiques sont optimales à différentes valeurs de pH : pH 6,7 et pH 7,6 respectivement (Fig. 30-A) et à différentes températures : 30°C et 37°C respectivement (Fig. 30-B).

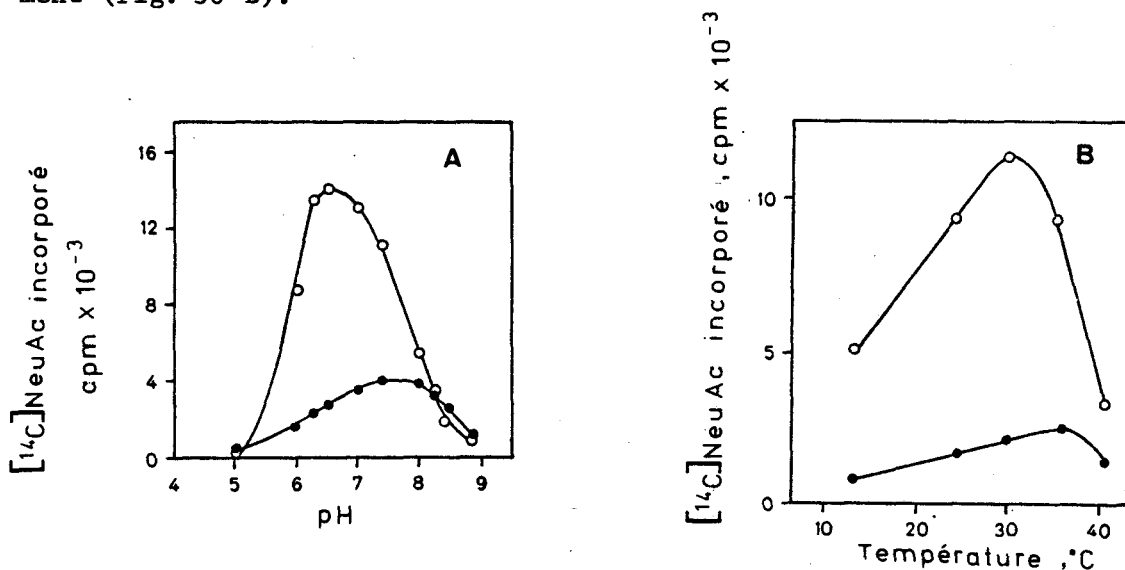


Figure 30 : Effet du pH et de la température sur l'incorporation de $[^{14}\text{C}]$ NeuAc sur le p-nitrophényl- β -D-galactoside par un homogénat plaquettaire.

Les incubations sont réalisées dans les conditions standard, pendant 60 min, avec 2 μM CMP- $[^{14}\text{C}]$ NeuAc et avec le pNphGal (10 mg/ml).

A - en Tris/Maléate 10 mM ajusté à différents pH, contenant du NaCl 154 mM, EDTA 1 mM, SAB 0,35 %, glucose 5 mM, à 37°C

B - à différentes températures, à pH 7,4

$[^{14}\text{C}]$ NeuAc incorporé en position C-3 \circ — \circ et en position C-6 \bullet — \bullet sur le pNphGal

Les valeurs de ces optima sont en bon accord avec celles que nous avons trouvées précédemment sur les accepteurs endogènes et sur l'*asialofétuine*.

B - EFFET DU DITHIOERYTHRITOL

Le dithioérythritol (DTE) est connu pour interagir avec les groupements thiols des protéines. Pour différentes concentrations en DTE, il apparaît que la formation des deux dérivés sialylés est affectée différemment (Fig. 31) : ceci suggère que ces deux activités sont supportées par deux entités protéiques différentes.

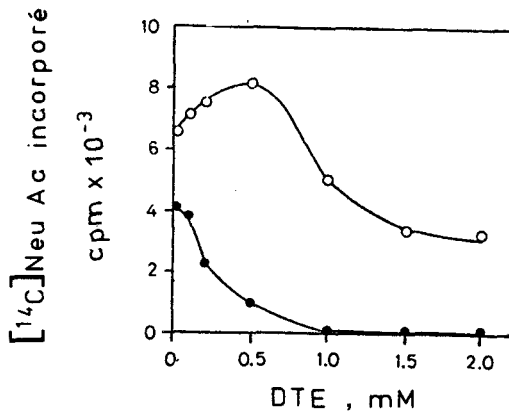


Figure 31 : Effet du dithioérythritol sur l'incorporation de [¹⁴C]NeuAc sur le p-nitrophényl-β-D-galactoside par un homogénat plaquettaire.

Les incubations sont réalisées dans les conditions standard, pendant 60 min. avec 2 μM CMP [¹⁴C]NeuAc et le pNphGal (10 mg/ml) et avec des concentrations croissantes en DTE.

[¹⁴C]NeuAc incorporé en position C-3 ○—○ et en position C-6 ●—● sur le pNphGal

C - EFFET DES CATIONS DIVALENTS A FAIBLE OSMOLARITE

A faible osmolarité, les activités sialyltransférasiques sont toutes deux stimulées (Fig. 32) :

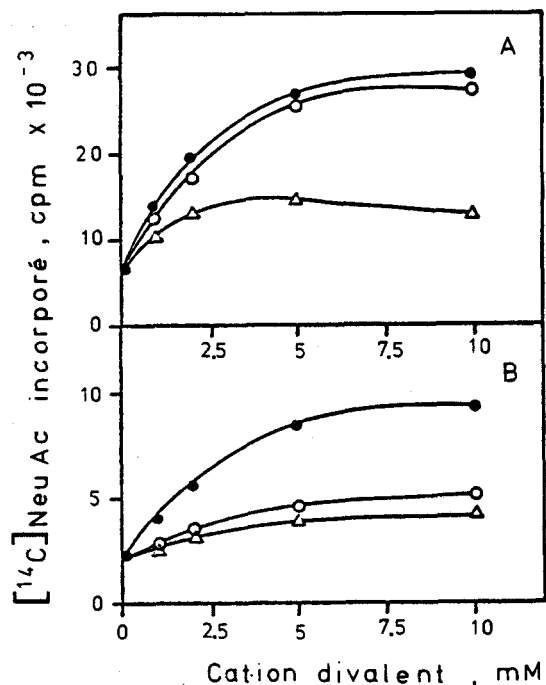


Figure 32 : Effet des cations divalents sur l'incorporation de [¹⁴C]NeuAc sur le p-nitrophényl-β-D-galactoside par un homogénat plaquettaire à faible osmolarité.

Les incubations sont réalisées dans les conditions standard pendant 60 min, avec 2 μM CMP- [¹⁴C]NeuAc et avec pNphGal (10 mg/ml) en Tris/HCl 10 mM pH 7,4, en présence de concentrations croissantes en MnCl₂ ●—●, MgCl₂ ○—○, CaCl₂ △—△.

[¹⁴C]NeuAc incorporé en position C-3 : A et en position C-6 : B sur le pNphGal

La stimulation de l'activité sialyl α-2,3 transférasique par les ions est indépendante de l'osmolarité du milieu d'incubation puisque les mêmes effets sont retrouvés à faible osmolarité (Fig. 32-A). Contrairement à ce qui se passe à osmolarité physiologique, les ions divalents Mn⁺⁺ provoquent une stimulation maximale de l'activité sialyl α-2,6 transférasique, tandis que les ions Ca⁺⁺ ou Mg⁺⁺ stimulent faiblement (Fig. 32-B). Nous avons observé dans le chapitre 1 (p. 52) une stimulation optimale de l'activité sialyltransférasique vis-à-vis de l'asialofétuine différente par Mg⁺⁺ ou Mn⁺⁺ selon que la préparation enzymatique avait été ou non congelée : après congélation, l'activité sialyltransférasique Mn⁺⁺ dépendante chutait. L'ensemble de ces résultats suggère une instabilité plus grande de l'activité sialyl α-2,6 transférasique au cours de la conservation des préparations enzymatiques par rapport à l'activité sialyl α-2,3 transférasique.

D - ETUDES DE LA STABILITE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES

La Figure 33 montre que la congélation d'un homogénat plaquettaire suivie de sa décongélation est néfaste pour les activités sialyl-transférasiques.

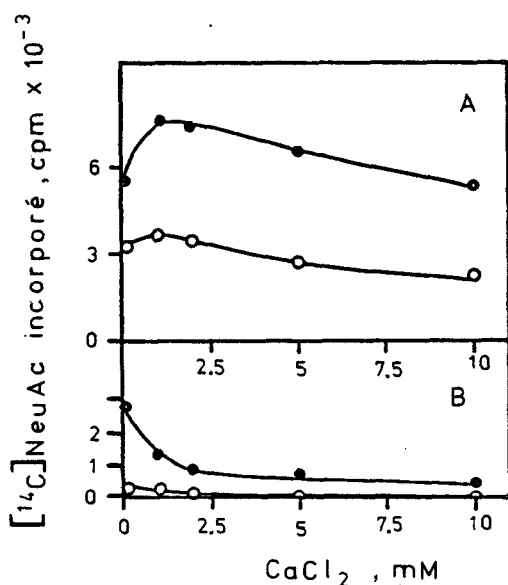


Figure 33 : Effet du calcium sur l'incorporation de [¹⁴C]NeuAc sur le p-nitrophényl-β-D-galactoside par un homogénat plaquettaire soumis à la congélation et à la décongélation.

Les incubations sont réalisées dans les conditions standard pendant 60 min, avec 2 μM de CMP- [¹⁴C]NeuAc, avec le pNphGal (10 mg/ml) et en présence de concentrations croissantes en CaCl₂ et un homogénat plaquettaire frais ●—●, congelé et décongelé ○—○

[¹⁴C]NeuAc incorporé en position C-3 : A, et en position C-6 : B, sur le pNphGal.

Après décongélation, l'activité sialyl α-2,3 transférasique mesurée à son optimum de stimulation chute de 50 % (Fig. 33-A) tandis que seulement 5 % de l'activité sialyl α-2,6 transférasique (mesurée en absence de calcium) subsiste (Fig. 33-B). Lorsque l'homogénat plaquettaire est conservé à 4°C, l'activité sialyl α-2,3 transférasique reste stable pendant au moins 24 h ; au contraire, l'activité sialyl α-2,6 transférasique n'est plus détectable au bout de 3 h (Fig. 34). Ce résultat corrobore nos observations précédentes.

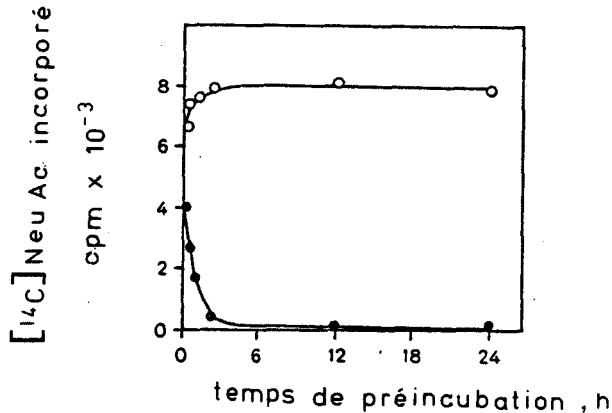


Figure 34 : Effet du temps de pré-incubation d'un homogénat plaquettaire sur l'incorporation de [¹⁴C]NeuAc sur le p-nitrophényl-β-D-galactoside.

L'homogénat plaquettaire est conservé à 4°C avant de mesurer la sialylation sur le pNphGal dans les conditions standard, pendant 60 min avec 2 μM CMP- [¹⁴C]NeuAc.

[¹⁴C]NeuAc incorporé en position C-3 ○—○ et en position C-6 ●—● sur le pNphGal.

Cependant, les plaquettes entières peuvent être congelées 2 ou 3 mois au moins sans qu'il y ait perte d'aucune des deux activités enzymatiques.

E - MODULATION DES ACTIVITES SIALYL α-2,3 TRANSFERASIQUE ET SIALYL α-2,6 TRANSFERASIQUE PAR LES SUCRES

Si l'on revient à l'étude de la spécificité des accepteurs utilisés (p.77), nous avons observé que le lactose, contrairement aux autres microaccepteurs essayés, permettait seulement la formation de sialyl α-2,3 lactose. Cette observation peut s'expliquer par une inhibition de l'activité sialyl α-2,6 transférasique par le lactose. A partir de cette hypothèse, nous avons examiné si les deux activités enzymatiques étaient modulées par la présence de divers sucres (Tableau V) :

TABLEAU V

EFFETS DES SUCRES SUR L'INCORPORATION DE [¹⁴C]NeuAc EN POSITION C-3 OU C-6 SUR LE p-NITROPHENYL-β-D-GALACTOSIDE

Sucre (30 mM)	Activité sialyltransférase			
	α-2,3		α-2,6	
	Stimulée	Inhibée	Stimulée	Inhibée
lactose		+ 50%		
galactose	+ 25%			
glucose			+ 20%	
N-acétyl-galactosamine	+ 40%		+ 10%	
N-acétyl-glucosamine			+ 20%	
mannose			+ 20%	
fucose			+ 40%	

Les incubations sont réalisées dans les conditions standard pendant 60 min avec 2 μM CMP- [¹⁴C]NeuAc, avec le pNphGal (10 mg/ml) et en présence du sucre utilisé.

Le signe + indique la présence d'un effet sur les activités enzymatiques mesurées.



Sauf pour le lactose, tous les autres sucres ne sont pas accepteurs des résidus sialyl ; de plus, aucun n'affecte l'intégrité du précurseur CMP-NeuAc.

La possibilité d'une inhibition de l'activité sialyl α -2,6 transférasique par le lactose est exclue puisque celle-ci n'est pas affectée par la présence du lactose ; le galactose n'a aucun effet, tandis qu'une stimulation est observée en présence de N-acétylgalactosamine (10 %), de glucose, de N-acétylglucosamine et de mannose (20 %) ; la stimulation devient importante en présence de fucose (40 %).

En présence de lactose, l'incorporation de l'acide sialique en position C-3 sur le p-nitrophényl- β -D-galactoside est diminuée de 50 % : ce résultat s'explique aisément puisque le lactose peut aussi être sialylé en position C-3 ; de tous les autres monosaccharides essayés, seuls le galactose et la N-acétylgalactosamine stimulent de façon importante (25 % et 40 % respectivement).

F - CONCLUSION

Les différents paramètres physicochimiques obtenus pour les activités sialyl α -2,3 et α -2,6 transférasiques suggèrent fortement que ces 2 activités enzymatiques sont supportées par deux entités protéiques différentes ou tout au moins que leurs sites actifs ne sont pas les mêmes.

V - CONCLUSIONS

Dans ce chapitre, nous montrons l'existence de deux CMP-NeuAc : galactoside sialyltransférases qui sont capables d'incorporer l'acide sialique en position C-3 et C-6 sur le p-nitrophényl- β -D-galactoside.

Dans les N-glycosylprotéines, l'acide sialique peut être ajouté en position C-6 au galactose terminal par une sialyl α -2,6 transférase (l'enzyme a déjà été isolé et purifié du colostrum de Vache par PAULSON *et al.* : 358). L'addition de l'acide sialique en position C-3 sur le galactose terminal a été récemment montrée (VAN DEN EIJNDEN et SCHIPHORST : 359) mais l'enzyme n'a pas encore été isolé. Dans les O-glycosylprotéines, la sialyl α -2,6 transférase incorpore l'acide sialique en position C-6 sur la N-acétylgalactosamine ; l'enzyme a déjà pu être purifié des glandes sous-maxillaires de Porc (SADLER *et al.* : 360). La sialyl α -2,3 transférase purifiée des mêmes tissus (REARICK *et al.* : 361) incorpore l'acide sialique en position C-3 sur le galactose terminal. Si le choix du p-nitrophényl- β -D-galactoside comme accepteur nous permet de distinguer aisément le transfert de l'acide sialique en position C-3 et C-6 sur le galactose, néanmoins celui-ci ne nous permet pas de savoir si ces activités reflètent une spécificité de transfert en C-3 et C-6 sur les galactoses terminaux des chaînes glycaniques de glycoprotéines N- ou O-glycosyl. On peut cependant noter, d'une part, que nous n'avons pas mis en évidence d'incorporation de l'acide sialique ni sur la mucine sous-maxillaire de Porc (GalNAc-O-Ser) ni sur le p-nitrophényl- β -N-acétylgalactosaminide (pNphGalNAc) ; d'autre part, la sialylation en C-6 du galactose du p-nitrophénol en présence de concentrations croissantes en cation divalent présente une courbe d'inhibition identique à celle observée pour la sialylation d'*asialo* N-glycosylprotéines exogènes ; de même, la sialylation en C-3 du résidu galactosyl du p-nitrophénol présente une courbe de stimulation par les ions analogue à celle obtenue pour les accepteurs endogènes N-glycosylprotéiques. On peut donc penser que ces deux activités mises en évidence grâce au p-nitrophényl- β -D-galactoside interviennent dans le transfert de l'acide sialique sur les galactoses terminaux des N-glycosylprotéines. Cette suggestion est aussi appuyée par le fait que les valeurs des optima du pH et de la température sont trouvées identiques sur le pNphGal sialylé et sur les accepteurs protéiques endogènes et exogènes.

5 - MISE EN ÉVIDENCE ET SÉPARATION DE LA SIALYL α -2,3 TRANSFÉ- RASE ET DE LA SIALYL α -2,6 TRANSFÉ- RASE

Différentes formes de sialyltransférases membranaires ont été décrites. L'isolement et la purification de certaines d'entre elles ont été réalisées (voir p. 36). *In vitro*, les enzymes peuvent être distingués par leur aptitude à sialyler les résidus galactosyl terminaux ou les résidus N-acétylgalactosaminyl en position C-3 et C-6 des N- ou O-glycosylprotéines. Nous avons identifié deux activités sialyltransférasiques plaquettaires grâce à l'utilisation du p-nitrophényl- β -D-galactoside. Dans ce chapitre, nous décrivons l'extraction et la séparation des sialyl α -2,3 et α -2,6 transférases à partir des plaquettes.

I - MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE D'ISOLEMENT

A - CHOIX DU MILIEU D'ISOLEMENT

Dans les conditions expérimentales définies pour la mesure des activités sialyltransférasiques, nous avons observé que la sialyl α -2,3 transférase est très instable. Il nous paraît donc indispensable de choisir un milieu d'isolement permettant de maintenir les enzymes actifs. La Figure 35 montre l'influence de la présence du glycérol dans le tampon d'incubation sur les activités sialyl α -2,3 et α -2,6 transférasi-ques.

La présence de glycérol dans l'homogénat plaquettaire favorise la stabilité des deux enzymes ; à partir de la concentration en glycérol 20 p. 100, l'activité sialyl α -2,6 transférasique est préservée. Un homogénat plaquettaire préincubé à 4°C en présence de glycérol (20 p. 100) conserve les deux activités enzymatiques stables pendant au moins 24 heures (Fig. 36).

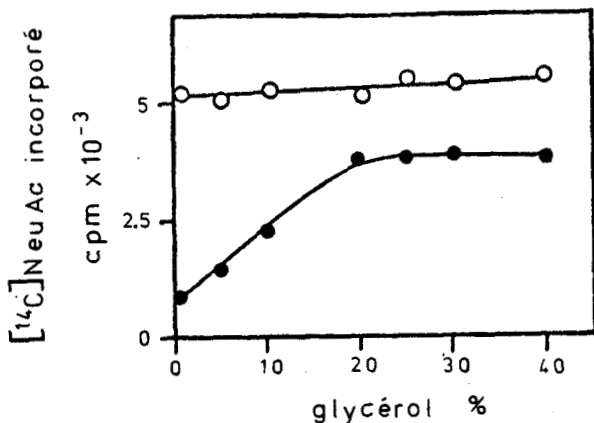


Figure 35 : Influence du glycérol sur la sialylation du p-nitrophényl-β-D-galactoside, par un homogénat plaquettaire.

Les incubations sont réalisées dans les conditions standard, pendant 60 min, avec 2 μM CMP- $[^{14}\text{C}]\text{NeuAc}$ avec le pNphGal (10 mg/ml) en présence de concentrations croissantes en glycérol. Incorporation de $[^{14}\text{C}]\text{NeuAc}$ en position C-3 $\circ-\circ$ et C-6 $\bullet-\bullet$ sur pNphGal.

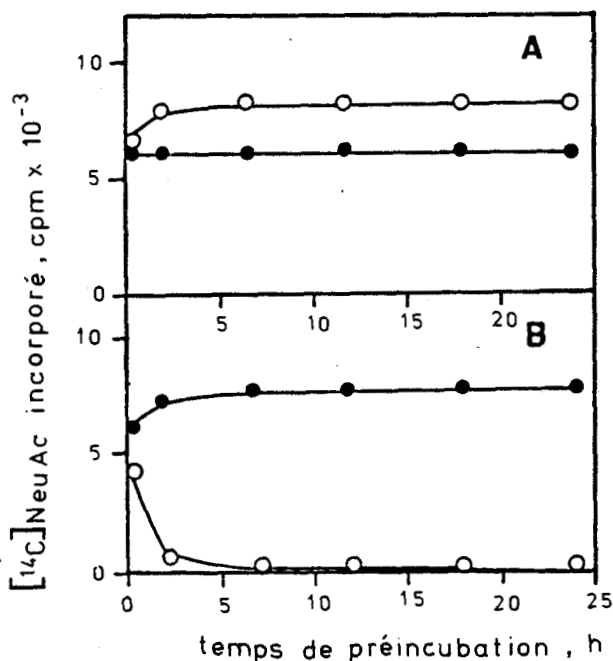


Figure 36 : Effet de la préincubation d'un homogénat plaquettaire à 4°C, en absence ou en présence de glycérol sur la sialylation du p-nitrophényl-β-D-galactoside.

L'homogénat plaquettaire est préincubé à 4°C en absence $\circ-\circ$ ou en présence de glycérol $\bullet-\bullet$. Les incubations sont réalisées dans les conditions standard pendant 60 min avec 2 μM CMP- $[^{14}\text{C}]\text{NeuAc}$ et avec pNphGal (10 mg/ml).

A - Incorporation de $[^{14}\text{C}]\text{NeuAc}$ en position C-3 sur pNphGal.

B - Incorporation de $[^{14}\text{C}]\text{NeuAc}$ en position C-6 sur le pNphGal.

Nous avons donc choisi d'ajouter du glycérol 20 p. 100 dans notre milieu d'isolement.

B - ETUDE DES CONDITIONS D'EXTRACTION DES ENZYMES PAR LE TRITON X 100

D'une façon générale, les glycosyltransférases sont fortement liées aux membranes. Lors de l'isolement des transférases, la première étape nécessite donc une solubilisation des enzymes. La Figure 37 montre la solubilisation des deux sialyltransférases par le Triton X100 utilisé à différentes concentrations :

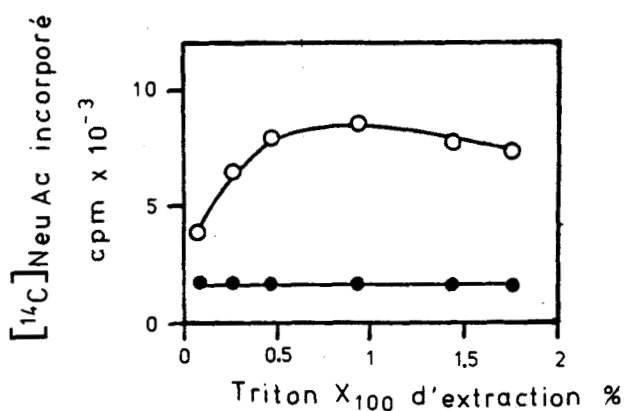


Figure 37 : Extraction des sialyltransférases plaquettaires par le Triton X100.

Des concentrations croissantes en Triton X100 (0,1 % - 1,75 %) sont ajoutées à la suspension plaquettaire (10¹⁰/ml). Après solubilisation et centrifugation, l'activité sialyltransférase du matériel extrait dans le surnageant est testée dans les conditions standard, pendant 60 min avec 2 μ M de CMP- [¹⁴C]NeuAc et avec le pNphGal (10 mg/ml). La concentration finale en Triton X100 dans l'incubation est 0,2 %.

Incorporation de [¹⁴C]NeuAc en position C-3 ○—○ et C-6 ●—● sur pNphGal

A partir de 0,1 p. 100 en Triton X100, le maximum de l'activité sialyl α -2,6 transférasique est atteint, tandis qu'une concentration supérieure en détergent (0,5 p 100) est nécessaire pour obtenir le maximum de l'activité sialyl α -2,3 transférasique. Différents auteurs ont montré que le Triton X100 à forte concentration inhibait l'activité sialyltransférasique (SAITO *et al.* : 362 ; ALHADEFF *et al.* : 363) : nous avons regardé si le Triton X100 utilisé pour l'extraction des deux sialyltransférases affectait ou non l'expression des enzymes ; la Figure 38 montre que le Triton X100 inhibe les deux activités enzymatiques : à 1 p 100 en détergent, celles-ci sont inhibées à 50 %.

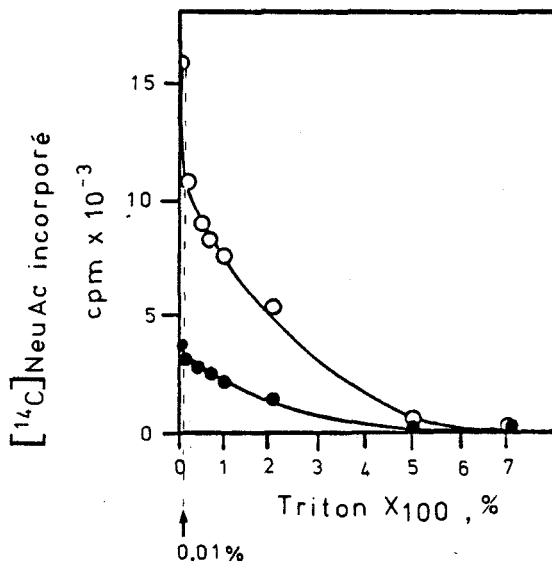


Figure 38 : Effet du Triton X100 sur la sialylation du p-nitrophényl- β -D-galactoside.

Les incubations sont réalisées dans les conditions standard pendant 60 min avec 2 μ M de CMP- [¹⁴C]NeuAc et le pNphGal (10 mg/ml) en présence de concentrations croissantes en Triton X100.

Incorporation du [¹⁴C]NeuAc sur le pNphGal en position C-3 \circ — \circ et en position C-6 \bullet — \bullet .

Nous avons choisi d'utiliser une concentration finale en Triton X100 de 0,5 p 100 qui permet d'extraire le maximum d'activité des deux enzymes tout en n'inhibant pas trop les activités de transfert de l'acide sialique sur l'accepteur exogène.

Le comportement différent des deux activités lors de l'extraction par le Triton X100 suggère une localisation différente des enzymes dans les membranes: la sialyl α -2,6 transférase, plus facilement ex-

traite, serait peu intégrée à la membrane, tandis que la sialyl α -2,3 transférase, enfouie plus profondément dans les couches membranaires, nécessiterait une concentration plus élevée en Triton X100 pour l'extraire. Il est probable que ces concentrations différentes en Triton nécessaires pour la solubilisation des enzymes sont reliées à une masse moléculaire apparente du complexe "enzyme-Triton" différente d'un enzyme à l'autre.

C - CHROMATOGRAPHIE DE TAMISAGE MOLECULAIRE

1 - Matériel et Méthodes

Les tamis moléculaires utilisés (Ultrogel AcA₄₄ : 90 cm x 2 cm et Ultrogel AcA₃₄ : 65 cm x 1 cm) ont été équilibrés dans le tampon Tris/HCl 10 mM pH 7,4, contenant du glycérol 20 p 100 et du Triton X100 0,5 p 100. Les expériences chromatographiques ont été réalisées à 4°C. Pour chaque support utilisé, 50 à 100 mg de protéines d'un homogénat plaquettaire sont injectés (3 ml). Le gel est lavé avec le même tampon. L'activité sialyltransférase est mesurée dans chaque fraction collectée avec un débit de 6 ml/h : 100 μ l de la fraction sont prélevés et incubés dans les conditions standard en présence de 2 μ M de CMP- [¹⁴C]NeuAc, de MnCl₂ 10 mM et avec l'accepteur exogène ; l'application de la technique de VAN DEN EIJNDEN *et al.* (364) a montré que l'homogénat plaquettaire incorpore l'acide sialique sur l'*asialo* [³H]fétuine (ou sur l'*asialo* [³H]orosomucoïde) en position C-3 et C-6 ; les tests d'activités ont donc été effectués en utilisant les *asialoglycoprotéines* et le p-nitrophényl- β -D-galactoside (10 mg/ml).

2 - Résultats

le profil d'éluion obtenu après passage de l'extrait plaquettaire sur Ultrogel AcA₄₄ est représenté sur la Figure 39 :

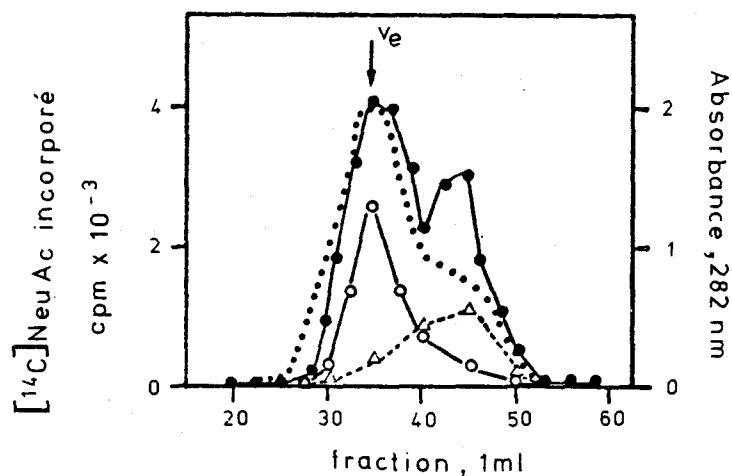


Figure 39 : Profil d'élution d'un homogénat plaquettaire sur Ultrogel ACA44.

Absorbance à 282 nm

Incorporation de [¹⁴C] NeuAc sur l'asialofétuine ●—● ,
sur le pNphGal en position C-3 ○—○ et en position
C-6 Δ----Δ .

ve = volume d'exclusion de la colonne

Deux fractions actives sont éluées :

- Une première fraction éluee (entre le 30^{ème} et le 40^{ème} ml) dans le volume d'exclusion indique une masse moléculaire apparente de l'ordre de 200.000 dans cette fraction ; l'activité sialyl α -2,3 transférasique y est majeure.

- La deuxième fraction active éluee entre le 40^{ème} et le 50^{ème} ml) est enrichie en activité sialyl α -2,6 transférasique.

Pour mieux séparer ces deux fractions actives, nous avons utilisé une colonne d'Ultrogel ACA34 qui permet une meilleure séparation des masses moléculaires plus élevées. Le diagramme d'élution est présenté dans la Figure 40 :

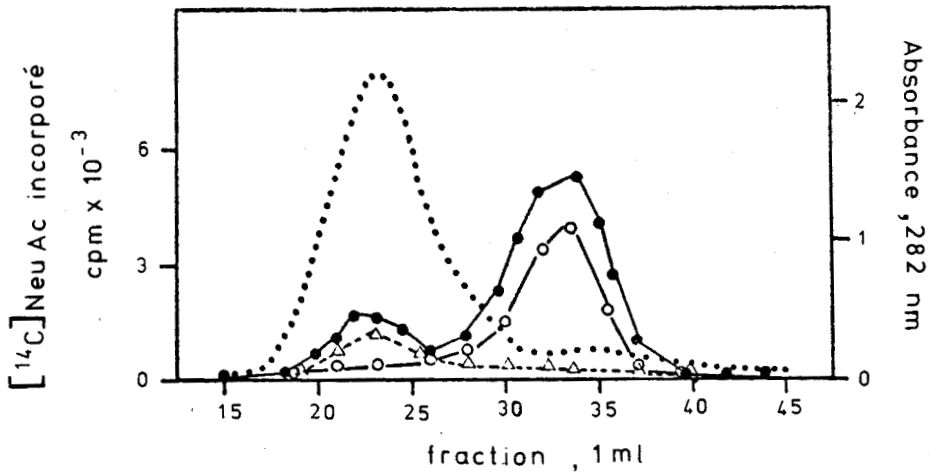


Figure 40 : Profil d'élution d'un homogénat plaquettaire sur Ultrogel ACA₃₄

Asorbance à 282 nm

Incorporation de [¹⁴C]NeuAc sur l'asialofétuine ●—●, sur le pNphGal en position C-3 △---△ et en position C-6 ○—○ .



Deux fractions actives sont identifiées ; seulement 50 % de l'activité enzymatique (mesurée vis-à-vis de l'*asialofétuine*) est récupérée après gel filtration. Cette chute d'activité peut être due à la perte de certains facteurs nécessaires à l'activité sialyltransférase : aucune augmentation de l'activité totale n'est cependant décelée après mélange des différentes fractions éluées.

L'élimination de plus de 75 % des protéines plaquettaires de la deuxième fraction entraîne une augmentation de dix fois de l'activité spécifique de la sialyl α-2,6 transférase. Par contre, l'activité spécifique de la sialyl α-2,3 transférase présente dans la première fraction est nettement inférieure à sa valeur initiale (10 fois plus faible). Cette chute de l'activité sialyl α-2,3 transférase peut s'expliquer par

le fait que l'enzyme comigre avec la presque totalité des protéines plaquettaires : celles-ci peuvent faciliter la dénaturation ou l'inhibition de l'enzyme. Il nous a donc paru indispensable d'éliminer les protéines plaquettaires avant de séparer les deux sialyl transférase sur le support d'Ultrogel Aca₃₄.

D - CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE

Nous avons utilisé une colonne de Sépharose 4B substituée par la cytosine diphosphoéthanolaminyl, comme dans l'isolement de la sialyl α -2,6 transférase des glandes sous-maxillaires de Porc par SADLER *et al.* (364') (la préparation du support est donnée en appendice technique p. 126). Une fraction aliquote (50 mg) est déposée à 20°C sur le support d'affinité (20 cm x 1 cm) préalablement équilibré dans le tampon Tris/HCl 10 mM pH 7,40, contenant du glycérol 20 p 100, du Triton X100 0,5 p 100 et du NaCl 50 mM ; puis le support est lavé par le même tampon afin d'éliminer la fixation aspécifique (jusqu'à ce que l'absorbance à 282 nm soit inférieure à 0,08) (Fig. 41) :

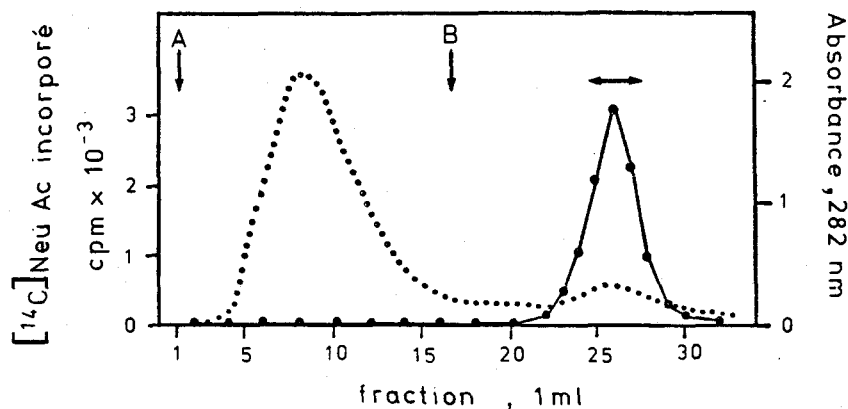


Figure 41 : Profil d'élution d'un homogénat plaquettaire sur Sépharose-cytosine diphosphoéthanolaminyl.

A - Injection

B - Elution par le tampon Tris/HCl 10 mM pH 7,4 contenant du glycérol 20 p 100, du Triton X100 0,5 p 1,00 et du NaCl 1 M.

Absorbance à 282 nm ●●●●●

Incorporation de [¹⁴C]NeuAc sur l'asialofétuine ●—●

Fractions actives rassemblées ←

L'élution par le même tampon en présence de NaCl 1 M libère une fraction active : l'activité spécifique de celle-ci est augmentée d'environ 10 fois par rapport à l'activité de l'extrait plaquettaire avant injection. Le passage sur colonne d'affinité est une étape importante puisqu'elle nous permet d'obtenir une fraction active dépourvue de plus de 95% des protéines contaminantes.

II - SEPARATION DES SIALYLTRANSFERASES

A partir de ces résultats préliminaires, nous avons tenté un procédé de séparation des deux sialyltransférases plaquettaires :

- 1 - Chromatographie d'affinité
- 2 - Gel filtration sur Ultrogel Aca34

Après dépôt de l'extrait plaquettaire sur la Sépharose substituée par la cytosine diphosphoéthanolaminy1, les fractions éluées par le tampon contenant le NaCl 1 M et absorbant à 282 nm sont rassemblées et injectées à 4°C sur le support d'Ultrogel Aca34. A la sortie de la colonne, aucune fraction active n'est détectée (Fig. 42-B) : une explication de ce phénomène peut provenir de la méthode d'isolement, entraînant une dénaturation enzymatique : en effet, la fraction active obtenue après chromatographie d'affinité ne contient plus qu'une faible quantité de protéines et la dilution enzymatique après Ultrogel Aca34 favorise probablement la dénaturation des enzymes. La réponse à cet argument a nécessité la mise au point de la technique de séparation fondée sur la présence de sérumalbumine bovine dans le tampon d'élution. La Figure 42-C montre le diagramme d'élution obtenu en présence de 1 p 1000 de sérumalbumine bovine :

- la fraction 3, éluée avec le volume total de la colonne, qui incorpore l'acide sialique en position C-3 et en position C-6 sur le pNphGal dans des proportions égales ;

Ce résultat s'explique :

- soit en admettant une adsorption des enzymes sur le gel de réticulation lui-même ; celui-ci est constitué par une matrice mixte de polyacrylamide et d'agarose, l'agarose étant un polymère de résidus galactosyl et 3,6 anhydrogalactosyl. Dans le chapitre 4 (p. 89), nous avons montré que la sialyl α -2,3 transférase et la sialyl α -2,6 transférase sont stimulées respectivement par les résidus galactosyl et N-acétylgalactosaminy (pour l' α -2,3) et par les résidus glucosyl et N-acétylglucosaminy (pour l' α -2,6). Il est donc possible que les enzymes s'adsorbent sur le gel, cette adsorption étant favorisée par la sérumalbumine bovine qui maintient ceux-ci dans une conformation adéquate :

- soit en admettant une dissociation des enzymes en une sous-unité protéique de faible masse moléculaire encore active.

III - CONCLUSIONS

La présence d'une activité sialyltransférasique instable dans certains tissus a déjà été démontrée (SCHACHTER *et al.* : 365 ; BERNACKI et BOSMANN : 366 ; ALHADEFF *et al.* : 367). Dans la plaquette, l'activité sialyl α -2,6 transférasique est très thermolabile, l'activité sialyl α -2,3 transférasique est plus stable ; l'addition de glycérol 20 p 100 dans le milieu utilisé pour la séparation des enzymes préserve les deux activités. Après extraction par le Triton X100 0,5 p 100 (concentration qui extrait le maximum des 2 activités enzymatiques sans trop inhiber celles-ci), nous avons séparé les deux activités sialyl α -2,3 et α -2,6 transférasiques par l'association de deux techniques chromatographiques : celles-ci sont la chromatographie d'affinité utilisant la cytosine diphosphoéthanolaminy couplée au Sépharose et la chromatographie par tamisage moléculaire sur Ultrogel AcA34. Nous avons montré que la présence de sérum-

albumine bovine dans le milieu de séparation était aussi nécessaire car celle-ci protège les enzymes contre leur dénaturation. La mise en évidence sur Ultrogel ACA34 de deux fractions caractérisées chacune par leur aptitude à sialyler exclusivement l'accepteur exogène soit en position C-3 soit en position C-6 démontre clairement l'existence dans chacune des deux fractions de deux sialyltransférases différentes ayant leur propre spécificité.

La 3ème fraction que nous mettons en évidence sur ce même support possède les deux activités sialyltransférasiques : il n'est pas impossible que les deux enzymes soient adsorbés sur le gel de réticulation lui-même lors de cette étape ou même qu'ils soient dissociés en une sous-unité protéique active de faible masse moléculaire.

6 - PREMIERS ESSAIS D'APPLICATION À LA PHYSIOLOGIE ET À ET À LA PATHOLOGIE PLAQUETTAIRES

Lorsque nous nous sommes intéressée à l'étude des sialyltransférases plaquettaires, une seule publication était parue sur le sujet (BOSMANN : 368). Depuis, l'établissement d'une corrélation entre l'activité sialyltransférasique plaquettaire et l'adhésion cellulaire a fait l'objet d'un certain nombre de travaux (WU *et al.* : 369 ; WU et KU : 370 ; SCIALLA *et al.* : 371, 372). Ces études ont été abordées selon deux voies distinctes :

- soit par l'étude des sialyltransférases mises en présence d'effecteurs connus pour activer ou inhiber la réaction d'agrégation,

- soit par l'étude de ces enzymes dans des cas cliniques caractérisés par des désordres fonctionnels plaquettaires.

Bien qu'un parallèle soit établi entre les variations de l'activité sialyltransférasique et les altérations de la fonction plaquettaire, un rôle direct des sialyltransférases dans l'adhésion cellulaire n'a cependant pas encore été démontré clairement. Disposant d'un modèle nous permettant de mettre en évidence deux activités sialyl α -2,3 et α -2,6 transférasiques distinctes dans la plaquette, nous avons, d'une part, regardé si ces deux activités enzymatiques étaient modulées en présence d'effecteurs de l'agrégation (ADP, EDTA, aspirine) et, d'autre part, nous avons étudié l'expression de ces activités dans des plaquettes pathologiques caractérisées par un défaut spécifique du complexe glycoprotéique IIb/III (thrombasthénie de GLANZMANN).

I - SIALYLTRANSFERASES ET PHYSIOLOGIE PLAQUETTAIRE

Le Tableau VI résume l'effet de l'adénosine diphosphate (ADP), de l'EDTA et de l'aspirine sur l'incorporation de l'acide sialique sur les accepteurs endogènes de la plaquette et sur le p-nitrophényl- β -D-galactoside :

TABLEAU VI

EFFET DE DIFFERENTS EFFECTEURS SUR L'ACTIVITE SIALYLTRANSFERASIQUE

	Activité sialyltransférasique		
	Endogène	Exogène	
		α -2,3	α -2,6
Plaquettes seules	100	100	100
A - Plaquettes + ADP 1 μ M	100	100	100
+ ADP 10 μ M	100	100	100
B - Plaquettes + EDTA 1 mM	100	100	70
+ EDTA 10 mM	25	25	20
C - Plaquettes + aspirine 10 μ g/ml	100	100	100
+ aspirine 100 μ g/ml	100	100	100

Les plaquettes entières (10^9 /ml) sont incubées dans les conditions standard pendant 60 min avec 2 μ M de CMP - [14 C]NeuAc, en absence ou en présence du p-nitrophényl- β -D-galactoside (10 mg/ml) et de l'effecteur testé ; l'activité sialyltransférasique mesurée en absence d'effecteur est prise comme référence (100 %).



In vivo et *in vitro*, l'ADP est un agent inducteur puissant de l'agrégation plaquettaire ; l'agrégation maximale est obtenue pour une dose physiologique d'ADP de 10 μ M. Dans nos conditions, l'incorporation de l'acide sialique sur les accepteurs endogènes et exogènes n'est pas modifiée en présence d'ADP (1 μ M et 10 μ M) (Tabl. VI-A).

Parmi les inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire, on distingue habituellement les inhibiteurs "extrinsèques" et les inhibiteurs "intrinsèques" :

- les chélateurs comme l'EGTA ou l'EDTA sont considérés comme des inhibiteurs "extrinsèques" : ils inhibent l'agrégation plaquettaire en complexant le calcium extracellulaire. A la concentration en EDTA 1 mM utilisée, seule l'activité sialyl α -2,6 transférasique est inhibée ; à plus forte concentration, l'EDTA affecte aussi l'activité sialyl α -2,3 transférasique et l'incorporation sur les accepteurs endogènes est inhibée à 75 % (Tabl. VI-B) :

- parmi les inhibiteurs "intrinsèques" qui interfèrent à des étapes différentes de l'agrégation, nous avons choisi d'étudier l'effet de l'aspirine connue pour inhiber la réaction de libération des constituants intraplaquettaires lors de l'agrégation ; il semble que le radical acétylé de la molécule inhibe la cyclooxygénase, bloquant la synthèse des endoperoxydes et la sécrétion des granules denses. WU et KU (373) ont observé une inhibition importante de l'activité sialyltransférasique en présence d'aspirine (100 μ g/ml) : 43 à 90 %. Dans leurs conditions expérimentales, ces auteurs utilisent le manganèse à une concentration finale de 2 mM ; or, nous avons montré que l'activité sialyl α -2,6 transférasique est inhibée en présence de cation divalent : il est probable que l'activité enzymatique mesurée par ces auteurs représente l'activité exprimée par la sialyl α -2,3 transférase. Dans notre cas, nous montrons que l'aspirine est sans effet ni sur la sialyl α -2,6 transférase ni sur la sialyl α -2,3 transférase (Tabl. VI-C). Aucune explication à ces résultats contradictoires ne peut être apportée.

II - SIALYLTRANSFERASES ET PATHOLOGIE PLAQUETTAIRE

A - DESCRIPTION RAPIDE DU SYNDROME DE THROMBASTHENIE DE GLANZMANN

La thrombasthénie de GLANZMANN se caractérise par un allongement du temps de saignement malgré un chiffre de plaquettes normal dans la circulation ; les plaquettes ne s'agrègent pas en présence d'ADP et ont une réponse très diminuée à la plupart des autres agents agrégants ; leur adhésion au sous-endothélium est néanmoins normale (CAEN *et al.* : 374). Le déficit de deux glycoprotéines majeures de la membrane plaquettaire (GPIIb et GPIII) a été associé au défaut d'agrégation (NURDEN et CAEN : 375). Dans le chapitre 2, nous avons montré que les accepteurs endogènes des plaquettes préférentiellement sialylés étaient représentés par la GPIIb. Il nous paraît donc intéressant de savoir si :

- l'absence de la GPIIb dans ces plaquettes pathologiques entraîne nécessairement une réduction du nombre d'accepteurs potentiels pour les sialyltransférases de surface,

- les modifications de la membrane des plaquettes thrombasthéniques ont un effet sur l'accessibilité d'autres accepteurs endogènes et sur les enzymes eux-mêmes.

B - RESULTATS

Les incorporations sur les accepteurs endogènes et exogènes (*asialofétuine* et pNphGal) du [^{14}C]NeuAc par les plaquettes d'un sujet thrombasthénique (C.B.) sont présentées dans la Figure 43.

On remarque que l'incorporation de [^{14}C]NeuAc sur les accepteurs endogènes est légèrement diminuée (- 20 %) sur les plaquettes pathologiques (Fig. 42-A); ce résultat concorde avec les résultats préliminaires que nous avons obtenus sur des homogénats plaquettaires, dans les conditions de faible osmolarité (Tabl. VII-A, p. 110).

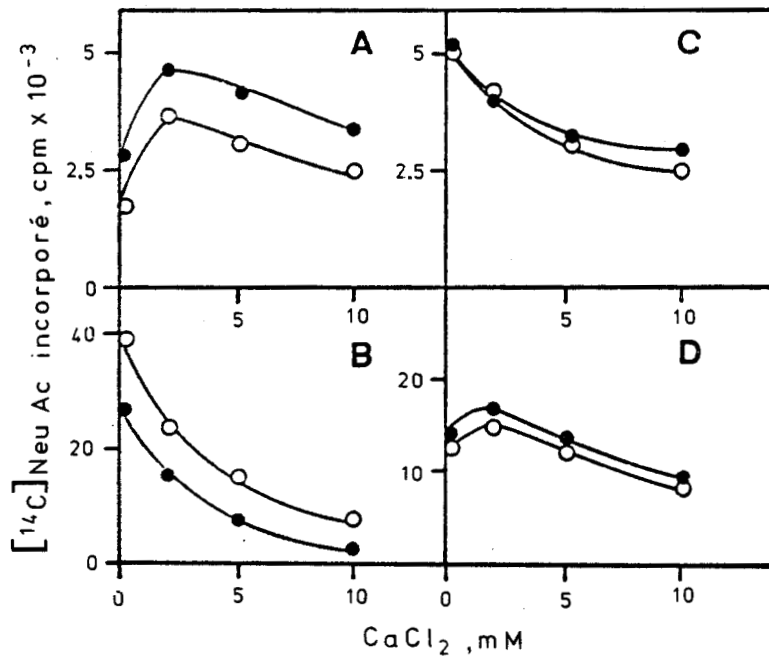


Figure 43 : Effet du calcium sur l'incorporation de [¹⁴C]NeuAc par une suspension de plaquettes entières.

Les incubations sont réalisées dans les conditions standard pendant 60 min, avec 2 μM CMP- [¹⁴C]NeuAc, en présence de concentrations croissantes en CaCl₂ avec une suspension plaquettaire témoin ●—● , pathologique ○—○ .

- A - Incorporation de [¹⁴C]NeuAc sur les accepteurs endogènes
- B - Incorporation de [¹⁴C]NeuAc sur l'asialofétuine
- C - Incorporation de [¹⁴C]NeuAc sur le pNphGal en position C- 6
- D - Incorporation de [¹⁴C]NeuAc sur le pNphGal en position C- 3



TABLEAU VII

ACTIVITE SIALYLTRANSFERASIQUE D'HOMOGENATS
DE PLAQUETTES NORMALES ET THROMBASTHENIQUES

	[¹⁴ C] NeuAc incorporé sur	
	les accepteurs endogènes A	l'asialofétuine B
témoins (6) thrombasthéniques	30 ± 13	79 ± 39
cas 1 (C.B.)	18	64
cas 2 (J.R.)	12	108

Les incubations sont réalisées dans les conditions standard à faible osmolarité pendant 60 min avec 2 µM de CMP-[¹⁴C] NeuAc, en présence d'un homogénat plaquettaire.

L'activité sialyltransférasique est exprimée en pmoles de [¹⁴C] NeuAc incorporé par heure et par mg de protéine.

L'activité sialyltransférasique mesurée vis-à-vis des accepteurs endogènes des plaquettes de deux sujets thrombasthéniques (C.B. et J.R.) est plus faible que celle mesurée sur des plaquettes de sujets sains (Tabl. VII-A).

L'étude comparée du transfert de l'acide sialique sur un accepteur exogène macromoléculaire (*asialofétuine*) par les cellules normales et pathologiques montre que ces dernières resialylerent à un taux plus élevé l'*asialofétuine* (Fig. 43-B) ; cependant, l'incorporation de l'acide sialique sur le p-nitrophényl- β -D-galactoside en position C-6 (Fig. 43-C) et en position C-3 (Fig. 43-D) n'est pas affectée. Ce résultat peut s'interpréter par le fait que l'accessibilité des ectosialyltransférases plaquettaires à l'accepteur exogène macromoléculaire serait plus aisée dans le cas des plaquettes pathologiques de par l'absence des chaînes glycoprotéiques de la GPIIb et de la GPIII : on observerait alors un "démassage" de ces enzymes à la surface de la plaquette. Lorsque l'activité sialyltransférasique est mesurée sur des plaquettes totalement lysées, cette différence n'est plus observée. A faible osmolarité, l'activité enzymatique est identique dans les homogénats plaquettaires témoins et pathologiques (Tabl. VII-B). Nos résultats montrent donc que l'expression des activités sialyl α -2,3 et α -2,6 transférasiques est normale dans les plaquettes thrombasthéniques.

III - CONCLUSIONS

En 1978, WU et KU (376) montraient *in vivo* et *in vitro* une inhibition par l'aspirine de l'activité sialyltransférasique vis-à-vis de l'*asialofétuine* ; en outre, ils observaient que l'ADP stimule l'activité enzymatique seulement lorsque celui-ci est associé au fibrinogène. La mesure de l'incorporation de l'acide sialique sur l'*asialofétuine* ne permettait pas à ces auteurs de distinguer laquelle des 2 activités sialyl α -2,3 et α -2,6 transférasiques était affectée. Utilisant le p-nitrophényl- β -D-galactoside qui nous permet de détecter les deux enzymes, nous ne mettons en évidence aucun effet de l'ADP et de l'aspirine sur les activités sialyltransférasiques ; ce résultat entre donc en contradiction avec les précédents travaux montrant une corrélation entre l'activité sialyltransférasique et l'agrégation plaquettaire. Le mécanisme d'inhibition des 2 sialyltransférases par l'EDTA peut s'expliquer par la complexation des ions présents à la surface de la plaquette et pouvant intervenir dans les fonctions plaquettaires.

Des premiers résultats obtenus sur les plaquettes thrombasthéniques, deux points se dégagent :

- L'absence de la glycoprotéine GPIIb à la surface des plaquettes pathologiques permet d'expliquer la diminution d'incorporation observée sur les accepteurs endogènes.

- Les activités sialyl α -2,3 et α -2,6 transférasiques ne sont pas modifiées. A cet égard, il faut noter que l'activité galactosyltransférasique n'est pas non plus perturbée dans les plaquettes thrombasthéniques (CARTRON et NURDEN : 377). Il semble donc que les défauts glycoprotéiques observés dans ce désordre ne soient pas dus à une glycosylation anormale des protéines (tout au moins en ce qui concerne la sialylation et la galactosylation) ; il est probable que la cause de ces anomalies se situe plus au niveau du mécanisme de régulation de la biosynthèse des protéines.

CONCLUSIONS GENERALES

Notre contribution à l'étude du rôle des plaquettes dans l'hémostase s'est orientée spécialement vers l'étude de leurs activités sialyltransférasiques et, pour cela, nous avons :

- 1 - mis en évidence la présence d'ectosialyltransférases et d'accepteurs endogènes à la surface de la plaquette ;
- 2 - caractérisé deux sialyltransférases plaquettaires, ayant des spécificités différentes : une CMP-NeuAc : galactoside sialyl α -2,3 transférase et une CMP-NeuAc : galactoside sialyl α -2,6 transférase ;
- 3 - montré que ces deux activités sialyltransférasiques sont portées par deux entités protéiques différentes, en utilisant les chromatographies d'affinité et de tamisage moléculaire ;
- 4 - démontré que les activités sialyltransférasiques de plaquettes de sujets thrombasthéniques ne sont pas modifiées.

L'application de la technique de VAN DEN EIJNDEN *et al.* (378) nous a permis de caractériser deux sialyltransférases plaquettaires : ces deux enzymes sont capables de brancher des résidus sialyl en position C-3 ou C-6 sur les résidus galactosyl terminaux des N-glycosylprotéines. *In vitro*, elles se distinguent par plusieurs points : l'activité sialyl α -2,6 transférasique est spécifiquement inhibée par la présence de cations divalents, à osmolarité physiologique. En outre, l'activité mesurée est faible et est probablement reliée à l'instabilité thermique de l'enzyme qui est faiblement associé aux membranes. Au contraire, la sialyl α -2,3 transférase dont l'activité est modulée par les cations divalents, est un enzyme dont la stabilité est associée à une plus forte intégration dans les membranes.

Différentes formes de sialyltransférases ont été décrites mais peu d'enzymes ont été caractérisés en regard de leur spécificité de branchement de l'acide sialique. En ce qui concerne les sialyltransférases spécifiques des N-glycosylprotéines, une sialyl α -2,6 transférase a été

mise en évidence dans les différents types de cellules étudiés (VAN DEN EIJNDEN *et al.* : 379 ; VAN DEN EIJNDEN et SCHIPHORST :380). Toutefois, la présence d'une sialyl α -2,3 transférase n'est pas toujours démontrée (VAN DEN EIJNDEN et SCHIPHORST : 381).

PAULSON *et al.* (382) ont caractérisé, à partir du colostrum de Vache, deux sialyl α -2,6 et α -2,3 transférases actives sur le lactose ; après purification, ces auteurs ne retrouvent que l'activité sialyl α -2,6 transférasique. Dans la plaquette, l'activité de la sialyl α -2,3 transférase est prédominante. Différents facteurs physicochimiques influencent l'expression des activités sialyltransférasiques ; la dépendance de l'activité sialyl α -2,6 transférasique plaquettaire vis-à-vis du glycérol est un bon exemple. L'absence dans certaines cellules d'une activité sialyltransférasique est donc probablement reliée à un problème de stabilité enzymatique. L'utilisation du glycérol et de sérumalbumine bovine nous a ainsi permis de séparer par chromatographie les deux sialyltransférases plaquettaires : la chromatographie d'affinité utilisant la cytosine diphosphoéthanolaminyll comme ligand sépare les transférases de plus de 95 % des protéines plaquettaires et elles sont ensuite séparées l'une de l'autre par tamisage moléculaire sur Ultrogel AcA34.

52 % de l'activité sialyltransférasique plaquettaire est retrouvée dans les membranes isolées (BOSMANN : 383). Utilisant la méthodologie mise au point par KEENAN et MORRE (384) et HOF Lack *et al.* (385), nous démontrons la présence des sialyltransférases ainsi que d'accepteurs d'acide sialique à la surface externe des plaquettes. L'étude comparée de la sialylation des accepteurs exogènes et endogènes indique que les accepteurs exogènes, qu'ils soient macromoléculaires ou micromoléculaires, sont sialylés indistinctement par la sialyl α -2,3 transférase et la sialyl α -2,6 transférase. Au contraire, il semble que, seule, la sialyl α -2,3 transférase soit capable de brancher l'acide sialique sur les accepteurs endogènes de la plaquette. Ceux-ci sont représentés essentiellement par la glycoprotéine IIb. Dans la thrombasthénie de GLANZMANN, NURDEN et CAEN ont montré que le défaut d'agrégation de ces plaquettes pathologiques était asso-

cié à un déficit du complexe glycoprotéique GPIIb/GPIII (386). Les premiers résultats que nous obtenons sur les plaquettes thrombasthéniques montrent que les activités sialyl α -2,3 et α -2,6 transférasiques ne sont pas modifiées. En outre, l'absence de la glycoprotéine IIb n'empêche pas la sialylation de la surface plaquettaire, contrairement à ce que nos précédents résultats laissaient prévoir. L'activité galactosyltransférasique n'est pas non plus modifiée dans ces plaquettes pathologiques (CARTRON et NURDEN : 387). Le déficit des glycoprotéines membranaires semble donc être dû à un défaut structural situé à un stade antérieur à la galactosylation et à la sialylation des glycoconjugués membranaires de la plaquette : soit au niveau de la biosynthèse des chaînes glycaniques de la protéine, soit au niveau de la biosynthèse de la protéine elle-même. Après désialylation des plaquettes totales par la neuraminidase, les résultats que nous obtenons lors de la resialylation (en présence de concentrations croissantes en Ca^{++}) s'interprètent en admettant, là encore, un rôle exclusif de la sialyl α -2,3 transférase vis-à-vis des glycoconjugués membranaires. Cependant, une question reste posée : peut-on relier le mode d'action des 2 sialyltransférases observé *in vitro* à leur rôle éventuel *in vivo* ? L'équipe de recherches du Professeur CAEN dispose d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux spécifiquement dirigés contre une ou plusieurs glycoprotéines de la membrane plaquettaire. L'utilisation de ces anticorps pourrait être un apport déterminant dans la compréhension de la nature des relations existant entre glycosyltransférases et glycoconjugués permettant de prévoir ainsi le rôle biologique de ces enzymes.

APPENDICE TECHNIQUE

I - PRÉPARATION DES PLAQUETTES

I - PLASMA RICHE EN PLAQUETTES (PRP)

Le sang (300 à 400 ml) est prélevé par ponction veineuse, au niveau du pli du coude de donneurs sains, dans des poches en plastique contenant de l'anticoagulant ACD (acide citrique-citrate-dextrose, 56 ml), dont la formule est la suivante :

Acide citrique, 1H ₂ O	:	3,27 g
Citrate de sodium, 2H ₂ O	:	26,3 g
Phosphate monosodique, 1H ₂ O	:	2,22 g
Glucose anhydre	:	23,2 g
		qsp 1000 ml d'eau

Le pH de la solution est 5,5.

Le sang ainsi prélevé est centrifugé à 15°C, 15 minutes, à la vitesse de 90 g. Le surnageant plasmatique riche en plaquettes (PRP) est séparé du culot sanguin contenant les globules rouges et les globules blancs.

II - PLAQUETTES ISOLEES

Le PRP est centrifugé à 15°C, 20 minutes à la vitesse de 2000 g. Le surnageant pauvre en plaquettes est éliminé et le culot plaquettaire est remis délicatement en suspension dans du tampon par aspiration et refoulement de celui-ci à l'aide d'une pipette en plastique.

Le tampon de resuspension est constitué de Tris/HCl 10 mM pH 7,4, contenant du NaCl 154 mM et de l'EDTA 1 mM.. Les plaquettes remises en suspension sont recentrifugées dans les mêmes conditions, en tube conique plastique. Cette opération répétée 3 fois permet ainsi de séparer les plaquettes moins lourdes des érythrocytes résiduels qui sédimentent au fond du tube.

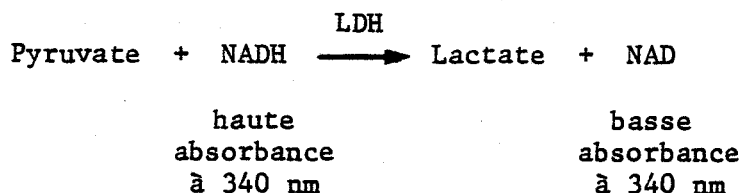
Les plaquettes sont finalement remises en suspension à la concentration de 10^{10} cellules par ml dans le même tampon.

III - NUMERATION

Les plaquettes sont comptées après dilution en Unopette au $1/100^{\text{ème}}$ de la suspension plaquettaire, grâce à une cellule à numération de Malassez.

IV - DOSAGE DE LA LACTICO-DEHYDROGENASE (LDH) SELON WROBLEWSKI ET LADUE (388)

La lactico-déhydrogénase est un enzyme qui réduit le pyruvate en lactate. Cette réduction est couplée avec l'oxydation du nicotinamide adénine dinucléotide NADH, caractérisée par une diminution d'absorption à 340 nm.



Le dosage est effectué par la mesure de la diminution de la densité optique lue à 340 nm, à la température constante de 25°C.

Solutions

$\text{K}_2\text{HPO}_4 / \text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,1 M, pH 7,5

pyruvate de sodium 0,02 M en tampon phosphate pH 7,5

NADH (sous forme réduite) 1 mM préparé extemporanément en tampon.

Dosage

Dans la cuve du spectrophotomètre, on ajoute successivement :

2,50 ml de tampon phosphate

0,30 ml de NADH

0,10 ml d'échantillon

0,10 ml de pyruvate de sodium.

La différence de densité optique (DO) mesurée à 340 nm toutes les 30 secondes ne doit pas excéder 0,02, sous peine d'avoir à diluer l'échantillon en tampon phosphate.

La LDH totale dans la plaquette (100 %) est mesurée sur une suspension plaquettaire solubilisée (par le Triton X100 ou par les ultrasons). Le pourcentage de cellules cassées dans une suspension de plaquettes représente :

$$\frac{\Delta DO \text{ mesuré}}{\Delta DO \text{ 100 \% cellules cassées}} \times 100$$

2 - DÉSIALYLATION DES PLAQUETTES

Les plaquettes, à la concentration de 10^{10} cellules/ml, sont désialylées par traitement à la neuraminidase d'origine commerciale Vibrio Cholerae (Berhingworke, FRG) 10 unités/ml, en CaCl_2 10 mM, à 37°C durant 60 minutes. La suspension plaquettaire est ensuite lavée deux fois par le tampon Tris/HCl 10 mM pH 7,4, contenant du NaCl 154 mM et de l'EDTA 1mM.

3 - PRÉPARATION DES ACCEPTEURS

I - DESIALYLATION

La fétuine est d'origine commerciale (Sigma, St Louis, U.S.A.). L'orosomucoïde*(glycoprotéine acide α_1) est préparé à partir du sérum Humain selon la technique de SCHMID *et al.* (389). La désialylation des glycoprotéines (10 mg/ml) s'effectue par hydrolyse acide ménagée par l'acide trifluoroacétique 0,1 M, à 80°C, durant 35 minutes selon la méthode de ZANETTA et GOMBOS (390). La solution est ensuite dialysée contre de l'eau, puis lyophilisée. Dans ces conditions, la désialylation complète est vérifiée par méthanolyse en phase gazeuse.

II - ACCEPTEURS INSOLUBILISES

L'*asialofétuine* (50 mg) est couplée au Sépharose 4B (10 ml) (Pharmacia, Uppsala, Suède) activé par le bromure de cyanogène, selon la technique de MARCH *et al.* (391).

Le couplage de l'*asialofétuine* (50 mg) sur Ultrogel AcA₄₄ (10 ml) (Industrie Biologique Française, France) et sur Biogel P300 (10 ml) (Biorad, U.S.A.), activés par la glutaraldéhyde, se fait selon la méthode décrite par WESTON et AVRAMEAS (392).

Dans tous les cas, après fixation, les groupements fonctionnels activés et encore libres sont saturés par le glycolle 1 M. Les supports insolubles sont ensuite lavés dans le tampon Tris/HCl 10 mM pH 7,4 contenant du NaCl 154 mM et de l'EDTA 1 mM.

* Nous remercions vivement le Professeur FOURNET pour les échantillons d'orosomucoïde qu'il nous a aimablement fournis.

III - MARQUAGE AU TRITIUM

Le marquage de l'accepteur est réalisé par oxydation à la galactose oxydase, suivie par une réduction grâce au borohydrure de sodium tritié, selon la méthode décrite par MORREL *et al.* (393).

A - LE p-NITROPHENYL- β -D-GALACTOSIDE

Le p-nitrophényl- β -D-galactoside (50 mg) (Sigma, St Louis, U.S.A.) est incubé à 37°C, 4 heures avec 22 unités de galactose oxydase (Sigma, St Louis, U.S.A.). 25 mCi de borohydrure de sodium tritié (NaBH_3T 20 Ci/mmol.) (Commissariat à l'Energie Atomique, Saclay, France) sont ensuite ajoutés. Après 2 heures, à température ambiante, la réduction est poursuivie une nuit en ajoutant un excès de NaBH_4 froid (50 mg). Après acidification avec de la résine échangeuse de cations Dowex 50 x 8 (20-50 mesh, forme H^+) le borate est éliminé sous forme de méthylborate volatile par addition de méthanol suivie d'évaporation ; cette opération est répétée 6 fois.

Le borate et le galactose tritié contaminant résiduels sont séparés du p-nitrophényl- β -D-galactoside par chromatographie descendante sur papier Whatman 3, durant 6 heures dans le système solvant suivant : acétate d'éthyle/pyridine/ H_2O (10 : 4 : 3 en volume). Après élution par de l'eau, le produit est lyophilisé.

B - LES ASIALOGLYCOPROTEINES

La fétuine et l'orosomucoïde désialylés sont marqués selon un protocole identique à celui décrit précédemment. Après élimination du borate, les accepteurs sont repris dans l'eau et chromatographiés sur colonne de Biogel P2. Les fractions radioactives exclues sont recueillies et lyophilisées.

4 - MESURE DE L'ACTIVITÉ SIALYLTRANSFÉRASIQUE

I - INCUBATION

L'incubation standard est réalisée en tampon Tris/HCl 10 mM pH 7,4, contenant du NaCl 154 mM et de l'EDTA 1 mM et 2 μ M de CMP- [¹⁴C] NeuAc (Radiochemical Centre, Amersham, Angleterre, 302 Ci/mol).

Pour un volume d'incubation final de 100 μ l, une suspension de 10⁸ plaquettes (ou un homogénat à même concentration) est ajoutée. L'*asialoglycoprotéine* est utilisée à une concentration finale de 1 mg/ml. Le p-nitrophényl- β -D-galactoside est utilisé à une concentration finale de 10 mg/ml.

Après incubation à 37°C pendant 1 heure, l'intégrité du CMP- [¹⁴C] NeuAc non utilisé est examinée après séparation du sucre libre [¹⁴C] NeuAc du précurseur le CMP- [¹⁴C] NeuAc par chromatographie descendante sur papier Whatman 3 utilisant le système solvant suivant : éthanol/acétate d'ammonium 1 M pH 7,5 (7 : 3 en volume) pendant 24 heures.

II - DETERMINATION DE LA RADIOACTIVITÉ LIÉE AUX ACCEPTEURS ENDOGENES OU EXOGENES

A - ACCEPTEURS ENDOGENES ET EXOGENES MACROMOLECULAIRES

La réaction est arrêtée suivant la méthode décrite par CACAN *et al.* (394), par addition de 1 ml d'acide phosphotungstique 5 % en HCl 2 M. Le matériel acido-précipitable est recueilli sur filtre en fibre de verre (Whatman GFC) et lavé abondamment par de l'acide trichloroacétique 5 % en H₂O, par de l'eau et enfin par de l'éthanol absolu. La radioactivité retenue sur le filtre est déterminée en scintillation liquide. La radioactivité liée spécifiquement aux accepteurs exogènes est déterminée en soustrayant la valeur obtenue quand l'essai est réalisé en l'absence d'accepteur exogène et qui correspond à l'incorporation sur les accepteurs endogènes de la cellule.

B - ACCEPTEURS MICROMOLECULAIRES

Après incubation, l'échantillon est déposé sur papier Whatman 3 et soumis à une chromatographie descendante. Le chromatogramme est ensuite découpé en bandes de 1 x 5 cm et la radioactivité est déterminée en scintillation liquide.

Les systèmes solvants utilisés sont les suivants :

Système solvant A :

éthanol/acétate d'ammonium 1 M pH 7,5 (7 : 3 en volume)

temps de migration : 24 heures

Système solvant B :

acétate d'éthyle/pyridine/eau (10 : 4 : 3 en volume)

temps de migration : 6 heures

Système solvant C :

pyridine/acétate d'éthyle/acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3 en volume)

temps de migration : 20 heures

C - ACCEPTEURS INSOLUBILISES

La séparation entre accepteurs insolubilisés et plaquettes est réalisée en milieu métrizamide (32 %) selon la technique décrite par CACAN *et al.* (395). Après centrifugation à 5000 g pendant 5 minutes, les cellules se retrouvent à la surface du milieu de métrizamide de densité supérieure à celle des cellules, tandis que les accepteurs insolubilisés forment un culot. Les cellules sont reprises, lavées par du NaCl 154 mM, précipitées à l'acide phosphotungstique et lavées comme précédemment sur filtre en fibre de verre.

Les accepteurs insolubilisés sont lavés avec du NaCl 1,54 M, transférés sur filtre en fibre de verre et lavés abondamment par du NaCl 1,54 M, puis avec de l'éthanol absolu. Dans les deux cas, le comptage s'effectue par scintillation liquide.

5 - CARACTÉRISATION DES ACCEPTEURS ENDOGENES SIALYLÉS

I - DETERMINATION DES ACCEPTEURS ENDOGENES DE L'ACIDE SIALIQUE

A - MARQUAGE AU [¹⁴C] DES ACCEPTEURS ENDOGENES DE LA PLAQUETTE

Les plaquettes sont incubées en présence de 10 µM de CMP-
[¹⁴C] NeuAc et en absence d'accepteur exogène, pendant 2 heures à 37°C.
Après incubation, les cellules sont sédimentées et resuspendues à une
concentration de 10⁹ cellules par ml dans le tampon Tris/HCl 10 mM, pH 7,4
contenant du NaCl 154 mM, de l'EDTA 3 mM et de la N-éthylmaléimide 5 mM.

B - MARQUAGE AU [¹²⁵I] DES PROTEINES DE LA SURFACE PLAQUETTAIRE

Les protéines de surface des plaquettes sont marquées selon
la réaction d'iodation catalysée par la lactopéroxydase, ainsi que l'ont
décrit PHILLIPS et POH-AGIN (396). Les plaquettes marquées à l'iode sont
lavées et reprises dans le même tampon que ci-dessus.

C - SOLUBILISATION

Les échantillons de plaquettes marquées au [¹⁴C] ou au
[¹²⁵I] sont solubilisés dans du sodium dodécyl sulfate (SDS) 20 % et
incubés à 100°C durant 5 minutes pour obtenir la solubilisation complète.

Les plaquettes solubilisées en SDS sont ensuite soumises
à la réduction des ponts disulfure par traitement au mercaptoéthanol 5 %
(v/v) 1 heure à 37°C.

D - ELECTROPHORESE ANALYTIQUE EN GEL DE SODIUM DODECYL SULFATE
POLYACRYLAMIDE (SDS-PAGE)

L'électrophorèse analytique en une dimension est réalisée en gel de sodium dodécyl sulfate polyacrylamide selon la technique de LAEMMLI (397), utilisant un gradient exponentiel d'acrylamide de 5 à 12 % dans le gel séparateur. Une proportion constante de N,N'-méthylène bis-acrylamide/acrylamide (2,7 %) est maintenue à travers le gel. Les échantillons réduits et non réduits contenant 2.000 cpm [^{14}C] ou 10.000 cpm [^{125}I] sont déposés sur le gel. L'électrophorèse est réalisée sous un voltage constant de 25 volts durant 20 heures, dans un tampon d'électrolyte dont la composition est la suivante :

0,1 % SDS
0,192 M glycine
0,025 M Tris/HCl pH 8,3

Les protéines sont révélées au Bleu de Coomassie selon la technique décrite par PHILLIPS et POH-AGIN (398). Les déterminations des poids moléculaires sont réalisées à partir de protéines standard Bio Rad (Bio Rad Laboratories, U.S.A.). (M : myosine, MM : 200.000; G : β -galactosidase, MM : 130.000 ; P : phosphorylase, MM : 98.000 ; A : sérumalbumine bovine, MM : 68.000 ; O : ovalbumine, MM : 45.000).

E - AUTORADIOGRAPHIE

Après électrophorèse, les gels sont séchés et appliqués sur film Kodak XOMat MA, durant 1 mois à température ambiante. Le film est ensuite développé et l'intensité de la radioactivité est mesurée à l'aide d'un photomètre intégrateur Vernon, sans filtre, modèle PHI.

II - DETERMINATION DU TYPE DE GLYCANNE

Le type de glycanne lié N- ou O-glycosidiquement à la protéine est déterminé par traitement alcalin : la liaison N-glycosidique est stable, tandis que la liaison O-glycosidique est coupée. Après incubation,

Les plaquettes sont soumises à un traitement alcalin (0,1 M en NaOH, 20 heures, à température ambiante). La radioactivité liée aux accepteurs endogènes est déterminée comme précédemment (précipitation et filtration). Un témoin est réalisé en remplaçant la soude par l'eau dans les mêmes conditions.

6 - TECHNIQUE DE MÉTHYLATION

I - METHYLATION

La méthylation des deux isomères sialylés du p-nitrophényl- β -D-galactoside, ou de [^3H] orosomucoïde sialylé, est effectuée selon la méthode développée par FINNE *et al.* (399). Après méthylation, les échantillons sont extraits par le chloroforme, suivie d'une chromatographie sur colonne de Silica-Gel dans le cas des isomères du p-nitrophényl- β -D-galactoside : dans ce cas, les produits méthylés sont élués par le mélange chloroforme/méthanol (9 : 1 en volume).

II - ANALYSE DES PRODUITS METHYLES

Après hydrolyse acide (HCl, 4 N, 4 heures, 100°C), les dérivés méthylés du galactose sont séparés par chromatographie sur couche mince de Silice (Silica-Gel 60, Merck, Darmstadt) dans le système solvant acétone /NH₄OH 4,5 M (500 : 9 en volume), ainsi que l'on décrit VAN DEN EIJNDEN *et al.* (400). Les dérivés méthylés sont identifiés par rapport à des standards triméthylés et tétraméthylés-galactose cochromatographiés et révélés par pulvérisation à l'acide sulfurique 5 %.

7 - COUPLAGE DE LA CYTOSINE DIPHOSPHATE-ÉTHANOLAMINYL
AU SÉPHAROSE 4B

Le Sépharose 4B (20 ml) (Pharmacia, Uppsala, Suède) activé par le bromure de cyanogène selon la méthode décrite par MARCH *et al.* (401) est couplé au CDP-éthanolaminy1 (100 mg) (Sigma). Afin d'éviter les phénomènes d'échanges d'ions, les groupements fonctionnels activés et encore libres sont bloqués par le glyco-colle 1 M. Le Sépharose substitué est lavé par le tampon Tris/HCl 10 mM pH 7,4, contenant du glycérol 20 % (v/v), du Triton 0,5 % (v/v) et du NaCl 50 mM et est ensuite monté dans une colonne en polyéthylène (20 cm x 1 cm).

BIBLIOGRAPHIE

	<u>Réf.</u>	<u>Page</u>
ABRAHAMSEN, A.F. Scand. J. Haematol. 3 (1968) 1-53	23	4
AGUANNO, J.J., ROLL, D.E., GLEW, R.H. J. Biol. Chem. 253 (1978) 6997-7004	353	75
ALHADEFF, J.A., CIMINO, G., JANOWSKI, A., O'BRIEN, J.S. Biochim. Biophys. Acta, 484 (1977) 307-321	352 363 367	75 96 103
ANDERSSON, L.C., GAHMBERG, C.G. Blood 52 (1978) 57-67	125 133	21 23
ANTTINEN H., TUDERMAN, L., OIKARINEN, A., KIVIRIKKO, K.I. Blood 50 (1977) 29-37	294	43
AUBERT, J.P., BISERTE, G., LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H. Arch. Biochem. Biophys. 175 (1976) 410-418	189	31
BAENZIGER, J.U., FIETE, D. J. Biol. Chem. 254 (1979) 789-795	110	20
BALASZ, E.A. (ed.) in Chemistry and Molecular Biology of the Intracellular Matrix, Chem. Press, New York (1970)	97	19
BALDINI, M. New Engl. J. Med. 274 (1966) 1245-1251	24	4
BARBER, A.J., JAMIESON, G.A. J. Biol. Chem. 245 (1970) 6357-6365	287	43
BARBER, A.J., JAMIESON, G.A. Biochim. Biophys. Acta 252 (1971) 533-545	278 283 288	42 42 43
BARBER, A.J., JAMIESON, G.A. Biochim. Biophys. Acta 252 (1971) 546-552	279 284	42 42
BARTHOLOMEW, B.A., JOURDIAN, G.W., ROSEMAN, S. J. Biol. Chem. 248 (1973) 5752-5762	205	33
BAUMGARTNER, H.D., HAUDENSCHILD, C. Ann. Y. Acad. Sc. 201 (1972) 22-36	39	7
BEELEY, J.G. Biochem. Biophys. Res. Commun. 76 (1977) 1051-1055	190	31
BEHNKE, O. J. Ultrastruct. Res. 24 (1968) 51-69	27 112	5 21
BENNETT, G. J. Cell. Biol. 45 (1970) 668-673	256 266	40 40
BENNETT, J.S., VALAIRE, G. J. Clin. Invest. 64 (1979) 1393-1401	169 170	27 27
BENTFIELD, M.E., BAINTON, D.F. J. Clin. Invest. 56 (1975) 1635-1649	37	6

	<u>Réf.</u>	<u>Page</u>
BERGH, M.L.E., HOOGHWINKEL, G.J.M., VAN DEN EIJNDEN, D.H.	227	37
in Glycoconjugates (Schauer, R., Boer, P., Buddecke, E., Kramer, M.F., Vliegenthart, J.F.G., Wiegandt, H. eds) G. Thieme, Stuttgart (1979) 258-259	238 244 247	38 39 49
BERGH, M.L.E., JOZIASSE, D.H., KOPPEN, P.L., HOOGHWINKEL, G.J.M., VAN DEN EIJNDEN, D.H.	234 245	37 39
in Carbohydrates and Glycoconjugates, 1st European Symposium on Carbohydrates and Glycoconjugates, Wien, Austria (1981)		
BERNACKI, R.J., BOSMANN, H.B.	351	75
Eur. J. Biochem. 33 (1973) 49-58	366	103
BERNARD, J., SOULIER, J.P.	141	25
Sem. Hôp. Paris 24 (1948) 3217-3223		
BERNDT, M.C., PHILLIPS, D.R.	154	26
J. Biol. Chem. 256 (1981) 59-65		
BERTOLINI, M., PIGMAN, W.	102	19
Carbohydr. Res. 14 (1970) 53-60		
BEYER, T.A., REARICK, J.I., PAULSON, J.C., PRIEELS, J.P., SADLER, J.E., HILL, R.L.	213 216 217 220 313	34 34 34 36 46
J. Biol. Chem. 254 (1979) 12531-12541		
BIREMBAUT, P., LEGRAND, Y.J., BARIETY, J., BRETTON, R., FAUVEL, F., BELAIR, M.F., PIGNAUD, G., CAEN, J.P.	42	7
J. Histochem. Cytochem. 30 (1982) 75		
BOOYSE, F.M., RAFELSON, M.E. Jr	56	11
Blood 33 (1969) 100-103		
BOSMANN, H.B.	277	42
Biochem. Biophys. Res. Commun. 43 (1971) 1118-1124	289	43
BOSMANN, H.B.	260	40
Nat. New. Biol. 234 (1971) 54-56		
BOSMANN, H.B.	179	29
Biochim. Biophys. Acta 258 (1972) 265-273	356	80
BOSMANN, H.B.	282	42
Biochim. Biophys. Acta 279 (1972) 456-474	294 297 298 300 308 311 318 324 325 326 340 344 348 368 383	43 43 44 44 44 46 48 51 52 53 68 70 72 105 114

	<u>Réf.</u>	<u>Page</u>
BRASS, L.F., BENSUSAN, H.B. Biochim. Biophys. Acta 444 (1976) 43-52	292	43
BRETON-GORIUS, J., GUICHARD, J. J. Micros. Biol. Cell 23 (1975) 197-202	35	6
BROQUET, P., MORELIS, R., LOUISOT, P. J. Neurochem. 24 (1975) 989-995	261	40
BULL, B.S., ZUCKER, M.B. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 120 (1965) 296-301	19	4
CACAN, R., VERBERT, A., MONTREUIL, J. FEBS-Lett. 63 (1976) 102-106	271 332 394 395	40 60 121 122
CAEN, J., TOBELEM, G. Encycl. Med. Chir., Paris, Sang 6 (1975) 13000 F-10	1	1
CAEN, J.P., NURDEN, A.T., KUNICKI, T.J. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 294 (1981) 281-290	312	46
CAEN, J.P., MICHEL, H., TOBELEM, G., BODEVIN, E., LEVY-TOLEDANO, S. Experientia 33 (1977) 91-93	374	108
CAEN, J.P., CASTALDI, P.A., LECLERC, J.C., INCEMAN, S. LARRIEU, M.J., PROBST, M., BERNARD, J. Amer. J. Med. 41 (1966) 4-26	155	26
CAEN, J.P., NURDEN, A.T., JEANNEAU, C., MICHEL, H., TOBELEM, G., LEVY-TOLEDANO, S., SULTAN, Y., VALENSI, BERNARD, J. J. Lab. Clin. Med. 87 (1976) 586-596	142	25
CARLSON, D.M., Mc GUIRE, E.J., JOURDIAN, G.W., ROSEMAN, S. J. Biol. Chem. 248 (1973) 5763-5773	100 101 104 212 225	19 19 20 34 37
CARTRON, J.P., NURDEN, A.T. Nature, Lond. 282 (1979) 621-622	377 387	112 115
CASTLE, A.G., CRAWFORD, N. Biochim. Biophys. Acta 494 (1977) 76-91	31	5
CHEN, W.W., LENNARZ, W.J. J. Biol. Chem. 253 (1978) 5774-5779	194	31
CHEN, W.W., LENNARZ, W.J. J. Biol. Chem. 253 (1978) 5780-5785	195	31
CHESNEY, C.M., HARPER, E., COLMAN, R.W. J. Clin. Invest. 6 (1974) 1647-1654	66	12

	<u>Réf.</u>	<u>Page</u>
CLEMETSON, K.J., NAIM, H.Y., LUSCHER, E.F. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981) 2712-2716	131	22
CLEMETSON, K.J., PFUELLER, S.L., LUSCHER, E.F., JENKINS, C.S.P. Biochim. Biophys. Acta 464 (1977) 493-508	122	21
CODINGTON, J.F., LINSLEY, K.B., JEANLOZ, R.W. Carbohydr. Res. 40 (1975) 171-182	105	20
COOK, G.M.W. Biol. Rev. 43 (1968) 363-391	78	14
COOK, G.M.W., LAICO, M.T., EYLAR, E.H. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 54 (1965) 247-252	259	40
DAY, H.J. Ser. Haemat. 8 (1976) 23-37	38	7
DEBRAY, H., MONTREUIL, J. Biochimie 60 (1978) 697-704	90 108	16 20
DEGOS, L., DAUTIGNY, A., BROUET, J.C., COLOMBANI, M. ARDAILLOU, M., CAEN, J.P., COLOMBANI, J. J. Clin. Invest. 56 (1975) 236-240	70 160	14 26
DEN, H., KAUFMAN, B., ROSEMAN, S. J. Biol. Chem. 245 (1970) 6607-6615	242	38
DETWILLER, C.T., ODELL, T.T., Mc DONALD, T.P. Amer. J. Physiol. 203 (1962) 107-110	20	4
DUGUID, J.B. J. Pathol. 60 (1948) 57	63	12
FAUVEL, F., LEGRAND, Y.J., CAEN, J.P. Thromb. Res. 12 (1978) 273-285	40 296	7 43
FINNE, J., KRIUSIUS, T., RAUVALA, H. Carbohydr. Res. 80 (1980) 336-339	399	125
FINNE, J., KRUSIUS, T., RAUVALA, H., HEMMINKI, K. Eur. J. Biochem. 77 (1977) 319-323	95	18
FLEISCHER, B., FLEISCHER, S., OZAWA, H. J. Cell. Biol. 43 (1969) 59-79	253 257	40 40
FOLCH, J., LESS, M., SLOANE-STANELY, G.H. J. Biol. Chem. 226 (1957) 497	336	66
FRENCH, J.E. Int. Rev. Exp. Path. 5 (1966) 253	64	12
GAARDER, A., LALAND, S. Nature 202 (1964) 909-910	53	11
GANGULY, P. Br. J. Haematol. 37 (1977) 47-51	149	26

	<u>Réf.</u>	<u>Page</u>
GEORGE, J.N., MORGAN, R.K., LEWIS, P.C. J. Lab. Clin. Med. 92 (1978) 430-446	124	21
GERRARD, J.M., WHITE, J.G., RAO, G.H.R., TOWNSEND, D. Am. J. Path. 83 (1976) 283-298	32	6
GERRARD, J.M., TOWNSEND, D., WITKOP, C.J., WHITE, J.G. Am. J. Pathol. 86 (1977) 99-115	50 51	9 10
GERRARD, J.M., SCHOLLMEYER, J.V., PHILLIPS, D.R., WHITE, J.G. Am. J. Pathol. 94 (1979) 509-523	162	27
GORDON, J.L. ed in Platelets in Biology and Pathology, vol. 1-2, Elsevier-north Holland Biomedical press, Amsterdam, New York, Oxford (1981)	5	1
GOTTSCHALK, A., BHARGAVA, A.S., MURTY, V.L.N. in Glycoproteins , their composition, structure and function . Part B. Gottschalk, A. ed, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, London, New York (1972) 810-829	99	19
GRINNA, L.S., ROBBINS, P.W. J. Biol. Chem. 254 (1979) 8814-8818	196	31
GROTTUM, K.A., SOLUM, N.O. Br. J. Haematol. 16 (1969) 277-290	12	1
HAGEN, I., NURDEN, A., BJERRUM, O.J., SOLUM, N.O., CAEN, J.P. J. Clin. Invest. 65 (1980) 722-731	159	26
HAKOMORI, S.I. Biochim. Biophys. Acta 417 (1975) 55-89	79	15
HAMPTON, J.R., MITCHELL, J.R.A. Br. Med. J. 1 (1966) 1074-1077	54	11
HARKER, L.A. J. Lab. Clin. Med. 77 (1961) 247-253	25	4
HARKER, L.A. J. Clin. Invest. 47 (1968) 458-465	18	4
HARPAZ, N., SCHACHTER, H. J. Biol. Chem. 255 (1980) 4894-4902	198 210	31 34
HASLAM, R.J. In Biochemistry and Pharmacology of Platelets , Ciba Foundation Symposium 35, Elsevier Amsterdam, (1975) 121	52	10
HEMMING, F.W. Biochem. Soc. Trans. 5 (1977) 1223-1231	185	31
HEMMING, F.W. Biochem. Soc. Trans. 5 (1977) 1682-1687	186	31

	<u>Réf.</u>	<u>Page</u>
HICKMAN, J., ASHWELL, G., MORELL, A.G., VAN DEN HAMMER, J.A., SCHEINBERG, I.H. J. Biol. Chem. 245 (1970) 759-766	350	75
HILL, H.D.J., SCHWYZER, H., STEINMAN, H.M., HILL, R.L. J. Biol. Chem. 252 (1977) 3799-3805	211	34
HIRSCHBERG, C.B., GOODMAN, S.R., GREEN, C. Biochemistry 15 (1976) 3591-3599	331	60
HOFLACK, B., CACAN, R., VERBERT, A. Eur. J. Biochem. 88 (1978) 1-6	273 385	40 114
HOFLACK, B., CACAN, R., MONTREUIL, J., VERBERT, A. Biochim. Biophys. Acta 568 (1979) 348-356	334 339	62 68
HOFLACK, B., CACAN, R., MONTREUIL, J., VERBERT, A. Eur. J. Biochem. (1982) accepté pour publication, sous presse	191	31
HOLMSEN, H. in Biochemistry and Pharmacology of Platelets . Ciba Foundation Symposium 35, Elsevier Amsterdam (1975) 175	29 45	5 8
HOLMSEN, H. Tromb. Haemostas. 38 (1977) 1034-1041	49	9
HOLMSEN, H., DAY, H.J. J. Lab. Clin. Med. 75 (1970) 840-855	36 43	6 8
HOROWITZ, H., PIGMAN, W. (eds) The Glycoconjugates, Vol. 1, Acad. Press, New York (1977)	84	15
HOROWITZ, H., PIGMAN, W. (eds) The Glycoconjugates, Vol. 2, Acad. Press, New York (1978)	85	15
HUGHES, R.C. (ed.) in Membrane Glycoproteins, A review Structure and func- tion, Butterworth & Co (Publ.) Ltd (1976)	75	14
ITOS, S., YAMASHITA, K., SPIRO, R.G., KOBATA, A. J. Biochem. (Tokyo) 81 (1977) 1621-1631	91	16
JABBAL, I., SCHACHTER, H. J. Biol. Chem. 246 (1971) 5154-5161	200	33
JAMIESON, G.A. in Biology and Chemistry of Eucaryotic Cell Surfaces (Lee, E.Y.C. and Smith, E.E., eds) Acad. Press, New York (1974) 67-79	281 286	42 42
JAMIESON, J.C. Can. J. Biochem. 55 (1977) 408-414	188	31
JAMIESON, G.A., OKUMURA, T. J. Clin. Invest. 61 (1978) 861-864	147 150	26 26

	<u>Réf.</u>	<u>Page</u>
JAMIESON, G.A., URBAN, C.L., BARBER, A.J. Nat. New. Biol. 234 (1971) 5-7	130 280 285	22 42 42
JENKINS, C.S.P., PHILLIPS, D.R., CLEMETSON, K.J. J. Clin. Invest. 57 (1976) 112-124	61	11
JOCKUSCH, B.M. in Cell Mobility : Molecules and Organization. S. Hatano, H. Ishikawa, and H. Sato, (eds) University Park Press, Baltimore (1979) 189-209	163	27
JORGENSEN, L., ROSWELL, H.C., HOVIG, T., GLYNN, M.M., MUSTARD, J.F. Lab. Invest. 17 (1967) 616-644	65	12
JOZIASSE, D.H., VAN DEN EIJNDEN, D.H., LISMAN, J.J.W., HOOGHWINKEL, G.J.M. in Glycoconjugates, Proc. Fifth Int. Sympos. Kiel. (Schauer, R., Boer, P., Buddecke, E., Kramer, M.F., Vliegenthart, J.F.G., Wiegandt, H., eds) G. Thieme, Stuttgart (1979) 260-261	241 252	38 39
KANG, A.H., BEACHEY, E.W., KATZMAN, R.L. J. Biol. Chem. 249 (1973) 1054-1059	291 306	43 44
KASER-GLANZMANN, R., JAKABOVA, M., GEORGE, J.N., LUSCHER, E.F. Biochim. Biophys. Acta 466 (1977) 429-440	48	9
KATZMAN, R.L., KANG, A.H., BEACHEY, E.J. Science 181 (1973) 670-672	305	44
KEAN, E.L., BIGHOUSE, K.J. J. Biol. Chem. 249 (1974) 7813-7823	320	50
KEENAN, T.W., MORRE, D.J. FEBS-Lett. 55 (1975) 8-13	330 338 384	59 68 114
KHATRA, B.S., HERNIS, D.G., BREW, K. Eur. J. Biochem. 44 (1974) 537-560	202	33
KIELY, M.L., Mc NIGHT, G.S., SCHIMKE, R.T. J. Biol. Chem. 251 (1976) 5490-5495	187	31
KINLOUGH-RATHBONE, R.L., MUSTARD, J.F., PACKHAM M.A., PERRY, D.W., REIMERS, H.J., CASENAVE, J.P. Throm. Haemost. 73 (1977) 291	328	56
KRUSIUS, T., FINNE, J. Eur. J. Biochem. 78 (1977) 369-379	89	16
KUNICKI, J.J., ASTER, R.H. J. Clin. Invest. 61 (1978) 1225-1231	173	27

	<u>Réf.</u>	<u>Page</u>
KUNICKI, J.J., ASTER, R.H. Molec. Immunol. 16 (1979) 353-360	115	21
LAEMMLI, U.K. Nature 227 (1970) 680-685	397	124
LANGER, B.G., LEUNG, L.L.K., GONNELLA, P.A., NACHMIAS, V.T., NACHMAN, R.L., PEPE, F.A. Proc. Natl. Acad. Sci., USA 79 (1982) 432-435	165	27
LEE, H., NURDEN, A.T., THOMAIDIS, A., CAEN, J.P. Brit. J. Haemat. 48 (1981) 47-57	172	27
LEGRAND, Y., PIGNAUD, G., CAEN, J.P. FEBS-Lett. 76 (1977) 294-298	67	12
LENNARZ, W.J. (ed.) The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans, Plenum Press, New York (1980)	88	15
LEUNG, L.L.K., KINOSHITA, T., NACHMAN, R.L. The Journal of Biological Chemistry, 256 (1981) 1994- 1997	140	24
LEVY-TOLEDANO, S., TOBELEM, G., LEGRAND, Y., BREDOUX, R., DEGOS, L., NURDEN, A., CAEN, J.P. Blood 51 (1978) 1065-1071	161	26
LOMBART, C., OKUMURA, T., JAMIESON, G.A. FEBS-Lett. 41 (1974) 30-34	119	21
MADOFF, M.A., ABBE, S., BALDINI, M. J. Clin. Invest. 43 (1964) 870-877	337	66
MAJERUS, P.W., SMITH, M.B., CLAMSON, G.H. J. Clin. Invest. 48 (1969) 156-164	175	29
MARCH S.C., PARIKH, I., CUATRECASAS, P. Anal. Biochem. 60 (1974) 147-152	391 401	119 126
MARCUS, A.J., SAFIER, L.B., ULLMAN, H.L. in Erythrocytes, thrombocytes, leukocytes : recent advances in membranes and metabolic research (eds : E. Gerach, K. Moser, E. Deutsch & W. Wilmans) Publ. G. Thieme, Stuttgart, (1973) 235	113	21
MARGUERIE, G.A., PLOW, E.F., EDGINGTON, T.S. J. Biol. Chem. 254 (1979) 5357-5363	168	27
MARKWELL, M.A.K., PAULSON, J.C. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 5693-5697	317	47
MASSINI, P. in Platelets and thrombosis Proceedings of the Serono Symposia Vol. 10, D.C.B. Mills and Pareti F. (eds) (1978) 33	44	8

	<u>Réf.</u>	<u>Page</u>
Mc GREGOR, J.L., CLEMETSON, K.J., JAMES, E., CAPITANIO, A., GREENLAND, T., LUSCHER, E.F., DECHAVANNE, M. Eur. J. Biochem. 116 (1981) 379-388	127	21
MENASCHI, S., HARWOOD, R., GRANT, M.E. Nature 264 (1976) 670-672	293	43
MESTER, L. In J. Caen (ed.). Platelet Aggregation, Paris : Masson et Cie (1971) 131-135	13	1
MESTER, L., SZABADOS, L., BORN, G.V.R., MICHAEL, F. Nat. New. Biol. 236 (1972) 213-214	14	1
MEYER, F.A., WEISMAN, Z. Thrombos. Res. 12 (1978) 431-446	307	44
MONTREUIL, J. Pure & Appl. Chem. 42 (1975) 431-477	81	15
MONTREUIL, J. Adv. Carbohyd. Chem. Biochem. 37 (1980) 157-223	82	15
MONTREUIL, J. Glycoproteins in A. Neuberger and L.L.M. Van Deenen, Comprehensive Biochemistry 19 B, Part. II (1982)	83	15
MOORE, S., PEPPER, D., CASH, J.D. Biochim. Biophys. Acta 379 (1975) 370-384	62	11
MORELL, A.G., VAN DEN HAMER, C.J.A., SCHEINBERG, I. H., ASHWELL, G. J. Biol. Chem. 241 (1966) 3745-3749	393	120
MORRE, D.J., MOLLENHAUER, H.H., BRACKER, C.E. in Results and Problems in Cell Differentiation (Reinert, J. and Urspring, H. eds), Springer-Verlag, Berlin, Vol. 2 (1970) 82-126	267	40
MULLINGER, R.N., MANLEY, G. Biochim. Biophys. Acta 170 (1968) 282-288	118	21
MUSTARD, J.F. Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc. 87 (1976) 104-127	2	1
MUSTARD, J.F., PACKHAM, M.A., KINLOUGH-RATHBONE, R.L. Blood 52 (1978) 453-456	166	27
NACHMAN, R.L., JAFFE, E.A., WEKSLER, B.B. J. Clin. Invest. 59 (1977) 143-148	151	26
NACHMAN, R.L., WEKSLER, B., FERRIS, B. J. Clin. Invest. 51 (1972) 549-556	68	12
NARASIMHAN, S., STANLEY, P., SCHACHTER, H. J. Biol. Chem. 252 (1977) 3926-3933	199	33

	<u>Réf.</u>	<u>Page</u>
NEUTRA, M., LEBLOND, C.P.	255	40
J. Cell. Biol. 30 (1966) 137-150	265	40
NICOLSON, G.L., SINGER, S.J.	116	21
J. Cell. Biol. 60 (1974) 236-248		
NILSON, B., NORDEN, N.E., SVENSSON, S.	94	18
J. Biol. Chem. 254 (1979) 4545-4553		
NURDEN, A.T., CAEN, J.P.	10	1
Br. J. Haematol. 28 (1974) 233-253	58	11
	71	14
	157	26
	375	108
	386	115
NURDEN, A.T., CAEN, J.P.	59	11
Nature, Lond. 255 (1975) 720-722	72	14
	114	21
	134	23
	137	23
	143	25
	335	66
NURDEN, A.T., CAEN, J.P.	9	1
Semin. Haematol. 16 (1979) 234-250	11	1
	341	68
OKUMURA, T., HASITZ, M., JAMIESON, G.A.	148	26
J. Biol. Chem. 253 (1978) 3435-3443		
OKUMURA, T., JAMIESON, G.A.	301	44
Thromb. Res. 8 (1976) 701-706		
PACKHAM, M.A., GUCCIONE, M.A., PERRY, D.W., MUSTARD, J.F.	57	11
Am. J. Physiol. 227 (1974) 1143-1148		
PACKHAM, M.A., MUSTARD, J.F.	3	1
Blood 50 (1977) 555-573		
PALADE, G.E.		
in Subcellular Particles, ed. T. Hayashi, Ronald,	263	40
New York, (1959) 64		
PATT, L.M., GRIMES, W.J.	343	68
J. Biol. Chem. 249 (1974) 4157-4165	346	71
PAULSON, J.C., BERANEK, W.E., HILL, R.L.	206	33
J. Biol. Chem. 252 (1977) 2356-2362	240	38
	251	39
	358	92
	382	114
PAULSON, J.C., REARICK, J.I., HILL, R.L.	207	33
J. Biol. Chem. 252 (1977) 2363-2371		
PAULSON, J.C., PRIEELS, J.P., GLASGOW, L.R., HILL, R.L.	204	33
J. Biol. Chem. 253 (1978) 5617-5624	208	33

	<u>Réf.</u>	<u>Page</u>
PEERSCHKE, E.I., ZUCKER, M.B., GRANT, R.A., EGAN, J.J., JOHNSON, M.M. Blood 55 (1980) 841-847	171	27
PENINGTON, D.G., LEE, N.Y., ROXBURGH, A.E., Mc CREADY Jr Br. J. Haematol. 34 (1976) 365-376	22	4
PEPPER, D.S., JAMIESON, G.A. Nature 219 (1968) 1252-1253	117	21
PEPPER, D.S., JAMIESON, G.A. Biochemistry 8 (1969) 3362-3369	120	21
PEPPER, D.S., JAMIESON, G.A. Biochemistry 9 (1970) 3706-3713	121	21
PHILLIPS, D.R. Thromb. Haemostas. 42 (1979) 1638-1651	136 139	23 24
PHILLIPS, D.R. Printed from Progress in Hemostasis and Thrombosis, Vol. 5. Edit. T.H. SPAET (1980)	132 135 138	23 23 23
PHILLIPS, D.R., JAKABOVA, M. J. Biol. Chem. 252 (1977) 5602-5605	129	22
PHILLIPS, D.R., POH-AGIN, P. Biochem. Biophys. Res. Commun. 75 (1977) 940-947	153	26
PHILLIPS, D.R., POH-AGIN, P. J. Biol. Chem. 252 (1977) 2121-2126	123 128 396 398	21 22 123 124
PHILLIPS, D.R., POH-AGIN, P. J. Clin. Invest. 60 (1977) 535-545	73	14
PHILLIPS, D.R., JENKINS, C.S.P., LUSCHER, E.F., LARRIEU, M.J. Nature (London) 257 (1975) 599-560	60 156	11 26
PHILLIPS, D.R., JENNINGS, L.K., EDWARDS, H.H. J. Cell. Biol. 86 (1980) 77-86	158 164	26 27
PIERCE, M., TURLEY, E.A., ROTH, S. International Review of Cytology 65 (1980) 1-44	270 274 276	40 41 42
POLLARD, T.D., FUJIWARA, K., HANDIN, R., WEISS, G. Ann. N.Y. Acad. Sci. 283 (1977) 218-236	30	5
PORTER, C.W., BERNACKI, R.J. Nature 256 (1975) 648-650	262	40
PUETT, D., WASSERMAN, B.K., FORD, J.D., CUNNINGHAM, C.W. J. Clin. Invest. 52 (1973) 2495-2506	290	43

	<u>Réf.</u>	<u>Page</u>
REARICK, J. I., SADLER, J.E., PAULSON, J.C., HILL, R.L. J. Biol. Chem. 254 (1979) 4444-4451	218	34
	219	36
	224	37
	235	38
	246	39
	314	46
	361	92
ROBBINS, P.W., HUBBARD, S.C., TURCO, S.J., WIRTH, D.F. Cell 12 (1977) 893-900	192	31
RODEN, L. in The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans W.J. Lennartz (ed.), Plenum Press, New York (1980) 267-371	106	20
ROSEMAN, S. Chem. Phys. Lip. 5 (1970) 270-297	180 182 268 309	30 30 40 46
ROSENBERG, A., SCHENGRUND, C.L. (Eds) Biological Roles of Sialic Acids, Plenum Press, New York (1976)	76 222	14 36
ROSS, R., GLOMSET, J., KARIYA, B., HARKER, L. Proc. Natl. Acad. Sci. 71 (1974) 1207-1210	34 69	6 12
ROSSI, E.E. J. Lab. Clin. Med. 70 (1972) 240-246	327 329	56 56
ROTH, S., Mc GUIRE, E.J., ROSEMAN, S. J. Cell. Biol. 51 (1971) 536-547	310	46
ROTH, S., ROELKE, M., DORSEY, J. in Growth Kinetics and Biochemical Regulation of Normal and Malignant Cells (Drewinko, B., Humphrey, R.M., eds) Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland (1977) 245	347	71
ROTHMAN, J.E., LENARD, J. Science 195 (1977) 743-753	264	40
RUAN, C., KIEFFER, N., TOBELEM, G. Pathologic Biologie 30 (1982) 69-72	174	27
RUAN, C., TOBELEM, M.G., Mc MICHAEL, A.J., DROUET, L., LEGRAND, Y., DEGOS, L., KIEFFER, N., LEE, H., CAEN, J.P. Br. J. Haematol. 49 (1981) 511-519	146	25
SADLER, J.E., REARICK, J.I., HILL, R.L. J. Biol. Chem. 254 (1979) 5934-5941	214 223 236 248 315 360 364	34 37 38 39 46 92 100
SAITO, M., SATOH, H., UKITA, T. Biochim. Biophys. Acta 362 (1974) 549-557	362	96

	<u>Réf.</u>	<u>Page</u>
SALZMAN, E.W. New Engl. J. Med. 286 (1972) 358-363	46	9
SALZMAN, E.W., CHAMBERS, D.A., NERI, L.L. Nature 210 (1966) 167-169	55	11
SCHACHTER, H., RODEN, L. in Metabolic Conjugation and Metabolic Hydrolysis (Fishman, W.H., ed.) Vol. 3, Academic Press, New York (1973) 1-149	181 183	30 30
SCHACHTER, H., ROSEMAN, S. in The Biochemistry of Glycoproteins and Proteogly- cans . W.J. Lennartz (ed.) Plenum Press, New York (1980) 85-160	203	33
SCHACHTER, H., Mc GUIRE, E.J., ROSEMAN, J. J. Biol. Chem. 246 (1971) 5321-5328	215	34
SCHACHTER, H., JABBAL, I., HUDGIN, R., PINTERIC, L., Mc GUIRE, E., ROSEMAN, S. J. Biol. Chem. 245 (1970) 1090-1100	254 258 349 365	40 40 75 103
SCHAUER, R. Angew. Chem. Internat. Edit. 12 (1973) 127-138	221	36
SCHMID, K., MAC NAIR, M.B., BURGI, A.F. J. Biol. Chem. 290 (1978) 853-864	389	19
SCHNEIDER, W., DOENECKE, C., SCHEURLLEN, F.G. in Erythrocytes, thrombocytes, leucocytes (eds : E. erlach, K. Moser, E. Deutsch, W. Wilmanns) G. Thieme, Stuttgart (1972) 333-340	177	29
SCIALLA, S.J., SPECKART, S.F., KIMBALL, D.B. Clin. Res. 26 (1978) 365 A	15 371	1 105
SCIALLA, S.J., SPECKART, S.F., HAUT, M.J., KIMBALL, D.B. Cancer Res. 39 (1979) 2031-2035	372	105
SHARON, N. (Ed.) Complex Carbohydrates, Their Chemistry, Biosynthesis and Functions, Addison-Wesley, Reading (1975)	74 80 98	14 15 19
SHUR, B.D., ROTH, S. Biochim. Biophys. Acta 415 (1975) 473-512	17 269 275	2 40 42
SINGER, S.J., NICOLSON, G.L. Science 175 (1972) 720-731	77	14
SIXMA, J.J., SCHIPHORST, M.E. Biochim. Biophys. Acta 603 (1980) 70-83	126	21
SMITH, D.F., WALBORG, E.F. Cancer Res. 23 (1972) 543-549	107	20

	<u>Réf.</u>	<u>Page</u>
SMITH, D.F., KOSCOW, D.P., WU, C., JAMIESON, G.A. Biochim. Biophys. Acta 483 (1977) 263-278	295	43
SPIK, G., SIX, P., MONTREUIL, J. Biochim. Biophys. Acta 573 (1979) 203-215	319	50
SPIK, G., STRECKER, G., FOURNET, B., BOUQUELET, S., DORLAND, L., Vliegenthart, J.F.G., MONTREUIL, J. Biochim. Biophys. Acta 675 (1981) 293-296	92	17
SPIK, G., VANDERSYPPE, R., FOURNET, B., BAYARD, B., CHARET, P., BOUQUELET, S., STRECKER, G., MONTREUIL, J. Actes Coll. Intern. n° 221, C.N.R.S. Paris (1974) 483-500	93	17
SPIRO, R.G., BHOYROO, V.D. J. Biol. Chem. 249 (1974) 5704-5717	111	20
STANLEY, P., NARASIMHAN, S., SIMINOVITCH, L., SCHACHTER, H. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72 (1975) 3323-3327	197	31
STATLAND, B.E., HEAGEN, B.M., WHITE, J.G. Nature 223 (1969) 521-522	47	9
STEINER, M., BALDINI, M. Blood 33 (1969) 628-633	21	4
STEMERMAN, M.B., BAUMGARTNER, H.R., SPAET, T.H. Lab. Invest. 24 (1971) 179-186	41	7
STRECKER, G., MONTREUIL, J. Biochimie 61 (1979) 1199-1246	87	15
STRUCK, D.K., LENNARZ, W.J. J. Biol. Chem. 251 (1976) 2511-2519	333	62
TABAS, I., SCHLESINGER, S., KORNFELD, S. J. Biol. Chem. 253 (1978) 716-722	193	31
TAI, T., YAMASHITA, K., KOBATA, A. Biochem. Biophys. Res. Commun. 78 (1977) 434-440	96	18
TAM, S.W., DETWILER, T.C. Biochim. Biophys. Acta 543 (1978) 194-201	152	26
THOMAS, D.B., WINZLER, R.J. Biochem. Biophys. Res. Comm. 35 (1969) 811-818	103	20
TOBELEM, G.M., ISRAEL, L., CAEN, J. Path. Biol. 22 (1974) 803-813	8	1
TOBELEM, G., LEVY-TOLEDANO, S., BREDOUX, R., MICHEL, H., NURDEN, A., CAEN, J.P., DEGOS, L. Nature (Lond.) 263 (1976) 427-429	144	25
TOLLEFSEN, D.M., MAJERUS, P.W. J. Clin. Invest. 55 (1975) 1259-1268	167	27

	<u>Réf.</u>	<u>Page</u>
VAN DEN EIJNDEN, D.H., SCHIPHORST, W.E.C.M. J. Biol. Chem. 256 (1981) 3159-3162	209 229 230 231 232 233 239 243 250 316 359 380 381	33 37 37 37 37 37 38 38 39 46 92 114 114
VAN DEN EIJNDEN, D.H., STOFFYN, P., STOFFYN, A., SCHIPHORST, W.E.C.M. Eur. J. Biochem. 81 (1977) 1-7	226 228 237 249 355 357 364 378 379 400	37 37 38 39 79 81 97 113 114 125
VAN DIJK, W., MAIER, H., VAN DEN EIJNDEN, D.H. Biochim. Biophys. Acta 444 (1976) 816-834	321	50
VAN DIJK, W., MAIER, H., VAN DEN EIJNDEN, D.H. Biochim. Biophys. Acta 466 (1977) 187-197	322	50
VAN DIJK, W., LASTHUIS, A.M., VAN DEN EIJNDEN, D.H. Biochim. Biophys. Acta 552 (1979) 129-142	354	75
VERBERT, A., CACAN, R., DEBEIRE, P., MONTREUIL, J. FEBS-Lett. 74 (1977) 234-238	272 323 342	40 50 68
WAECHTER, C.J., LENNARZ, W.J. Ann. Rev. Biochem. 45 (1976) 95-112	184	31
WALBORG, E.F. (ed.) Glycoproteins and Glycolipids in Disease Processes, ACS Symposium n° 80, Amer. Chem. Soc. Publi. Washington (1978)	86	15
WARREN, B.A. Thromb. Diath. Haemorrh. Suppl. 59 (1973) 139-156	7	1
WARREN, L., GLICK, M.C. J. Cell. Biol. 37 (1968) 729-746	178	29
WARSHAW, A.L. J. Biol. Chem. 242 (1967) 2094-2097	176	29
WAUTIER, J.L., CAEN, J.P. Seminars in Thrombosis and Hemostasis Vol. V, n° 4 (1979) 293-315	4	1

	<u>Réf.</u>	<u>Page</u>
WERNER, G., MORGENSTERN, E. Eur. J. Cell. Biol. 20 (1980) 276-282	33	6
WESTON, P.D., AVRAMEAS, S. Biochem. Biophys. Res. Commun. 45 (1971) 1574-1580	392	119
WHITE, J.G. Am. J. Pathol. 83 (1976) 590-632	26	5
WHITE, J.G., KRIVIT, W. J. Lab. Clin. Med. 49 (1967) 60-73	28	5
WILNER, G.D., NOSSEL, H.L., LEROY, E.C. J. Clin. Invest. 47 (1968) 2608-2615	304	44
WILSON, J.R., WILLIAMS, D., SCHACHTER, H. Biochem. Biophys. Res. Comm. 72 (1976) 909-916	201	33
WINZLER, R.J. in Blood in Tissue Antigens (Aminoff D. ed.) Academic Press, New York, London (1970) 117-126	109	20
WROBLEWSKI, F., LA DUE, J.S. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 90 (1955) 210-213	388	117
WU, K.K., KU, C.S.L. Thromb. Res. 13 (1978) 182-192	299 302 370 373 376	44 44 105 107 111
WU, K.K., KU, C.S.L., SMITH, C. Thrombosis and Haemostasis (Abstract) 38 (1977) 8	16 303 345 369	1 44 70 105
ZANETTA, J.P., GOMBOS, G. FEBS-Lett. 47 (1974) 276-278	390	119
ZUCKER, M.B. in Platelets : The Inflammatory Process Vol. 1, New York, Acad Press (1974) 511-543	6	1
ZUCKER, M.B., KIM, S.J., Mc PHERSON, J. Br. J. Haematol. 35 (1977) 535-549	145	25



RÉSUMÉ

La biosynthèse des glycanes est un processus qui se déroule au sein des biomembranes. Elle nécessite des glycosyl-nucléotides comme donneurs et des enzymes : les glycosyltransférases, spécifiques à la fois du sucre transféré et de la nature de la liaison formée. De par sa position terminale dans les glycanes, l'acide N-acétylneuraminique joue un rôle essentiel dans l'activité biologique des glycoconjugués : en particulier en tant que signal de reconnaissance vis-à-vis de diverses molécules solubles ou liées aux membranes, il est impliqué dans les phénomènes de reconnaissance cellulaire.

La plaquette sanguine humaine joue un rôle clef dans le déclenchement de l'hémostase. Elle possède sur sa membrane plasmique des sialoglycoprotéines qui sont impliquées dans les phénomènes d'agrégation et d'adhésion plaquettaire et leur absence provoque de graves troubles de l'hémostase. C'est sur cette cellule que pour la première fois, deux activités sialyltransférasiques ont été caractérisées : une galactoside sialyl α -2,3 transférase et une galactoside sialyl α -2,6 transférase. Ces deux activités capables de brancher un résidu d'acide sialique sur le galactose des N-glycosoprotéines ont été mises en évidence dans des lysats plaquettaires mais également à la surface de la plaquette en tant qu'ectoenzymes capables de sialyler essentiellement une seule glycoprotéine membranaire nommée GPIIb. Ces deux activités ont été dosées en utilisant un accepteur artificiel le protrophényl- β -D-galactoside. La mise au point de ce dosage original a permis la caractérisation des propriétés particulières à chaque activité en particulier leur sensibilité différente aux ions divalents dont on sait l'importance dans la physiologie plaquettaire. Après solubilisation et chromatographie d'affinité, les deux activités sialyltransférasiques ont été séparées confirmant le fait qu'il s'agit de deux entités moléculaires différentes.

La connaissance de ces deux activités sialyltransférasiques et la mise au point de leur dosage a permis d'aborder l'étude du rôle des résidus sialylés dans des cas pathologiques où l'agrégation plaquettaire est perturbée.

Mots clefs : adhésion, agrégation, acide sialique, glycoprotéine, glycosyltransférase, hémostase, plaquettes sanguines, sialyltransférase.