

N° d'ordre : 1084

50376
1983
207

50376
1983
207

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le titre de

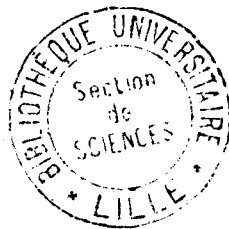
DOCTEUR DE TROISIEME CYCLE

BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES

par

Philippe BULET

**MISE EN EVIDENCE D'UN MARQUEUR BIOCHIMIQUE
DE LA MATURATION DES OVOCYTES CHEZ *Perinereis
cultrifera* (ANNELIDE POLYCHETE) : LA CONVERSION
DU GDP-MANNOSE EN GDP-FUCOSE**



Présentée le 23 septembre 1983 devant la Commission d'Examen

Président

M. DURCHON

Rapporteur

M. PORCHET

Examineurs

A. VERBERT

G. SPIK

J. HOFFMANN

Ce travail a été effectué :

- sous la direction du Professeur André VERBERT
dans le Laboratoire de Chimie Biologique
(Directeur : Professeur Jean MONTREUIL) de
l'Université des Sciences et Techniques de
LILLE (Laboratoire Associé au C. N. R. S.
n° 217 : Relations structure fonction des
constituants membranaires).

- sous la direction du Professeur Maurice PORCHET
dans le laboratoire de Biologie Animale (Directeur :
Professeur Maurice DURCHON) de l'Université des
Sciences et Techniques de LILLE (Laboratoire
Associé au C. N. R. S. n° 148 : Endocrinologie
des invertébrés).

Monsieur Le Professeur Maurice DURCHON, à mon arrivée à Lille en 1979, vous m'avez accueilli et expliqué quels étaient les travaux que votre équipe menait sur le contrôle endocrine de la reproduction des *Nereis*. Immédiatement l'envie m'a pris de faire un bout de chemin avec vos collègues. Je tiens aujourd'hui à vous remercier très sincèrement de m'avoir accepté parmi vous et de m'avoir confié un travail sur le matériel biologique qui vous tient particulièrement à coeur.

A Monsieur Le Professeur Maurice PORCHET qui, en m'accordant toute sa confiance, m'a permis dans les moments de découragement de surmonter les difficultés. C'est grâce à vous que j'ai appris véritablement à connaître tout l'enrichissement que l'on peut trouver dans le travail de recherche. Je vous adresse tous mes remerciements.

Je tiens à exprimer tous mes remerciements à Monsieur Le Professeur André VERBERT, qui en me recevant dans son équipe m'a apporté toutes ses connaissances dans le domaine des glycosyltransférases. Les trois années de collaboration au "laboratoire 005" resteront toujours pour moi synonyme de travail et d'amitié.

Je remercie Monsieur Le Professeur Jean MONTREUIL qui en acceptant durant trois années dans son laboratoire, m'a donné la possibilité de mener à bien ce travail. Vos responsabilités au C.N.R.S. vous ont empêché de participer au Jury de ma thèse, sachez que je le regrette vivement.

Je remercie Mademoiselle SPIK, Professeur, qui en analysant la composition en monosaccharides des ovocytes de *Perinereis cultrifera* a été à l'origine des travaux menés sur les glycoconjugués des Néréidiens. Ses critiques me seront hautement profitables pour la suite de ces travaux.

Je remercie vivement Monsieur Jules HOFFMANN, Directeur de Recherche au C.N.R.S, de l'Université de Strasbourg, d'avoir bien voulu me faire l'honneur de juger ce mémoire.

A Bernard HOFACK Chargé de recherche au C.N.R.S. En guidant mes premiers pas dans le domaine de la recherche, tu as su me faire partager tout l'enthousiasme que l'on peut trouver dans un tel travail. L'intérêt constant que tu as porté à ce travail a fait naître des discussions fructueuses sans lesquelles cette thèse n'aurait jamais pu être édiflée. Je t'en remercie sincèrement.

Mes remerciements s'adressent également à René CACAN, Maître Assistant; à Brigitte BAUVOIS, Chargée de Recherche à l'INSERM; à Frédérique GUETTE et à Roméo CECCELLI qui m'ont permis de réaliser ce travail dans la bonne humeur.

INTRODUCTION

GENERALITES

LES NEREIDIENS

I - <u>ACTIVITE ENDOCRINE CEREBRALE</u>	p.5
II - <u>LA SPERMATOGENESE</u>	p.7
A - <u>SPERMATOGENESE EXPERIMENTALE</u>	p.7
B - <u>L'EVOLUTION NUCLEAIRE</u>	p.7
III - <u>L'OVOGENESE</u>	p.8
A - <u>OVOGENESE NATURELLE</u>	p.8
1 - <u>Stade de prévitellogénèse</u>	p.9
2 - <u>Stade de vitellogénèse</u>	p.9
3 - <u>Stade d'élaboration des granules corticaux</u>	p.9
4 - <u>Stade de maturité</u>	p.10
B - <u>L'EVOLUTION NUCLEAIRE</u>	p.11
<u>CONCLUSION</u>	p.11

IV - LES SYNTHÈSES D'ORIGINE CYTOPLASMIQUE p.12

A - EVOLUTION PHYSIOLOGIQUE DE L'APPAREIL DE GOLGI p.12

B - LES GLYCOCONJUGUES DES ALVEOLES CORTICAUX p.13

CONCLUSION p.15

LES GLYCOCONJUGUES

I - STRUCTURE DES GLYCOCONJUGUES p.17

A - LES GLYCOLIPIDES p.18

1 - Les glycolipides neutres p.18

2 - Les gangliosides p.19

B - LES GLYCOPROTEINES p.19

1 - Les N-glycosyl protéines p.21

a) - Les glycannes de type oligomannosidique p.22

b) - Les glycannes de type N-acétyllactosaminique p.23

c) - Les glycannes mixtes p.24

2 - Les O-glycosylprotéines p.24

a) - Les glycoprotéines de type collagène p.25

b) - Les glycoprotéines de type mucine p.25

- c) - Les glycoprotéines dont le point d'attache
 ++++++ sur la sérine ou la thréonine est autre que
 ++++++ la N-acétylgalactosamine
 ++++++
- 3 - Les mucopolysaccharides acides
 =====

II - BIOSYNTHESE DE LA PARTIE GLYCANNIQUE DES GLYCOPROTEINES p.29

- A - LES GLYCOSYLTRANSFERASES p.29

- B - LOCALISATION SUBCELLULAIRE DE LA SYNTHESE p.33

- C - BIOSYNTHESE DE L'OLIGOSACCHARIDE DES p.35

 O-GLYCOSYLPROTEINES

- D - SYNTHESE DES OLIGOSACCHARIDES LIES PAR UNE p.35

 LIAISON N-GLYCOSYL A L'ASPARAGINE

- 1 - Biosynthèse de l'intermédiaire lipidique p.36
 =====
- 2 - Transfert sur la protéine p.38
 =====
- 3 - Maturation des oligosaccharides des p.38
 =====
 N-glycosylprotéines
 =====
- E - SYNTHESE DES MUCOPOLYSACCHARIDES ACIDES p.39

CONCLUSION p.41

III - LES GLYCOSYL-NUCLEOTIDES

p.44

A - STRUCTURE ET VARIETE DES GLYCOSYL-NUCLEOTIDES

p.45

1 - Type de nucléotide constituant le donneur

p.45

2 - Nombre de phosphates entre le nucléoside

p.47

et le monosaccharide

3 - Type de monosaccharide lié au nucléoside

p.47

phosphate

B - LA BIOSYNTHESE DES GLYCOSYL-NUCLEOTIDES :

p.48

"LES DEUX GRANDES POSSIBILITES"

1 - Synthèse à partir de monosaccharides simples

p.48

2 - Biosynthèse des glycosyl-nucléotides à partir

p.50

d'autres glycosyl-nucléotides

a) - Biosynthèse du nucléotide

p.50

+++++

b) - Biosynthèse du glycosyl-nucléotide

p.50

+++++

- Mécanisme général

p.50

- Interconversions

p.53

. Epimérisation

p.53

. Epimérisation et hydrogénation de
l'alcool primaire

p.53

. Oxydation et décarboxylation du carbone
6 des hexoses

p.55

. Echanges de sucres à partir de sucres-
1-phosphate

p.56

c) - Etude particulière de la conversion du

p.56

+++++

GDP-D-mannose

+++++

- Conversion du GDP-D-mannose en GDP-D-mannuronate p.56
- Formation du GDP-D-rhamnose et du GDP-D-talométhyllose à partir du GDP-D-mannose p.57
- Formation de GDP-L-colitose à partir de GDP-D-mannose p.58
- Formation du GDP-L-fucose à partir de GDP-D-mannose p.58
 - . Formation de GDP-L-fucose à partir du fucose-1-phosphate p.60
 - . Transformation du GDP-D-mannose en GDP-L-fucose p.62

CONCLUSION p.66

TRAVAUX PERSONNELS

CHOIX DU MODELE EXPERIMENTAL p.68

MISE EN EVIDENCE DE LA TRANSFORMATION DU p.70

GDP-MANNOSE EN GDP-FUCOSE PAR LES

OVOCYTES DE PERINEREIS CULTRIFERA

I - MESURE DE L'ACTIVITE MANNOSYLTRANSFERASIQUE p.70

A - EFFET DE LA CONCENTRATION EN GDP-MANNOSE p.70

B - ETUDE CINETIQUE -----	p.73
II - TRANSFORMATION DU GDP-MANNOSE EN GDP-FUCOSE -----	p.74
A - CONTROLE DE LA DEGRADATION DU GDP-MANNOSE -----	p.74
B - PREMIERE APPROCHE DANS LA DETERMINATION ----- DE LA NATURE DU PRODUIT FORME -----	p.76
1 - Effet de l'AMP sur la dégradation du =====	p.78
GDP-mannose =====	
2 - Analyse du comportement chromatographique =====	p.80
du produit 1 =====	
a) - Chromatographie sur papier Whatman 3 dans +++++	p.80
le système solvant A pendant 20 heures +++++	
b) - Chromatographie sur papier Whatman 3 dans +++++	p.80
le système solvant B pendant 30 heures +++++	
C - DETERMINATION DE LA NATURE DU PRODUIT DE -----	p.82
LA TRANSFORMATION DU GDP-MANNOSE -----	
1 - Détermination du spectre d'absorption en =====	p.82
lumière ultraviolette =====	
2 - Détermination de la structure du monosaccharide =====	p.84
lié au GDP et provenant de la transformation =====	
du GDP-mannose =====	

- a) - Analyse du comportement chromatographique p.84
 ++++++
 du monosaccharide libéré après hydrolyse acide
 ++++++
- b) - Analyse du monosaccharide en spectrométrie p.86
 ++++++
 de masse
 ++++++

III - ETUDE DU MECANISME ENZYMATIQUE RESPONSABLE DE LA p.88

 TRANSFORMATION DU GDP-MANNOSE EN GDP-FUCOSE

A - EFFET DE LA CONCENTRATION EN GDP-MANNOSE p.88

 SUR LA SYNTHÈSE DE GDP-FUCOSE

B - ESSAI DE DETERMINATION DE LA NATURE p.91

 DU PRODUIT INTERMEDIAIRE

C - EFFET DU NAD⁺ ET DU NADPH, H⁺ SUR p.94

 L'ACTIVITE ENZYMATIQUE RESPONSABLE DE LA

 TRANSFORMATION DU GDP-MANNOSE EN

 GDP-FUCOSE

1 - Effet du NAD⁺ p.94
 =====

2 - Action du NADPH, H⁺ sur la synthèse du p.96
 =====
 GDP-fucose à partir de GDP-mannose
 =====

a) - Effet de la concentration en NADPH, H⁺ p.96
 ++++++
 sur la formation de GDP-fucose
 ++++++

b) - Effet du NADPH, H⁺ sur la formation de
+++++
GDP-fucose à partir du glycosyl-nucléotide
+++++
intermédiaire préalablement synthétisé
+++++

p.97

IV - PURIFICATION ET EFFET DU NADPH, H⁺ SUR L'ACTIVITE

ENZYMATIQUE RESPONSABLE DE LA TRANSFORMATION DU

GDP-MANNOSE EN GDP-FUCOSE

p.100

A - LOCALISATION SUBCELLULAIRE DE CETTE

ACTIVITE ENZYMATIQUE

p.100

B - PURIFICATION PARTIELLE PAR LE SULFATE

D'AMMONIUM

p.101

C - UTILISATION DE LA PREPARATION PURIFIEE

POUR L'ETUDE DE L'EFFET DU NADPH, H⁺ SUR

LA TRANSFORMATION DU GDP-MANNOSE

p.103

V - EVOLUTION AU COURS DE LA MATURATION OVOCYTAIRE DE

L'ACTIVITE DU COMPLEXE ENZYMATIQUE RESPONSABLE DE

LA CONVERSION DU GDP-MANNOSE EN GDP-FUCOSE

p.105

RESUME ET CONCLUSIONS GENERALES

p.109

APPENDICE TECHNIQUE

LE MATERIEL BIOLOGIQUE

I - PREPARATION DES CELLULES COELOMIQUES DE ----- PERINEREIS CULTRIFERA -----	p.112
A - LES NEREIS -----	p.112
B - ISOLEMENT ET PURIFICATION DES OVOCYTES ----- ET DES COELOMOCYTES DE PERINEREIS CULTRIFERA -----	p.112
1 - Prélèvement du milieu intérieur de l'animal =====	p.112
2 - Séparation des divers types cellulaires =====	p.113
a) - Purification des coelomocytes +==+==+==+==+==+==+==+==+==+	p.113
b) - Purification des ovocytes +==+==+==+==+==+==+==+==+==+	p.114
3 - Homogénéisation des cellules et détermination =====	p.115
de la teneur en protéines =====	

MESURE DE L'ACTIVITE MANNOSYLTRANSFERASIQUE

ET DE LA TRANSFORMATION DU GDP-MANNOSE EN

GDP-FUCOSE

I - INCUBATION -----	p.117
-------------------------	-------

A - REACTION GENERALE DE GLYCOSYLATION -----	p.117
B - CONDITIONS D'INCUBATION POUR LA MANNOSYLTRANSFERASE -----	p.117
II - DETERMINATION DE LA RADIOACTIVITE LIEE AUX ACCEPTEURS ----- ENDOGENES -----	p.118
A - ARRET DES REACTIONS -----	p.118
B - EXTRACTION SEQUENTIELLE DES DIFFERENTS ----- INTERMEDIAIRES LIPIDIQUES MANNOSYLES ET ----- DES PDES PROTEINES OSYLEES -----	p.118
1 - Une phase "chloroforme/méthanol" =====	p.118
2 - Une phase "chloroforme/méthanol/eau" =====	p.119
3 - Un résidu protéique =====	p.119
4 - Une phase aqueuse =====	p.119
III - CONTROLE DE LA DEGRADATION DU PRECURSEUR ----- NUCLEOTIDIQUE : LE GDP-MANNOSE -----	p.119
A - INHIBITION DES REACTIONS DE DEGRADATION ----- DU GDP-MANNOSE -----	p.119
B - CONTROLE CHROMATOGRAPHIQUE DES PRODUITS ----- DE DEGRADATION DU GDP-MANNOSE -----	p.121

IV - CARACTERISATION DES PRODUITS DU METABOLISME DU

p.122

GDP-MANNOSE

A - COMPORTEMENT CHROMATOGRAPHIQUE DES

GLYCOSYL-NUCLEOTIDES

p.122

B - COMPORTEMENT CHROMATOGRAPHIQUE DES SUCRES

LIBERES APRES REDUCTION ET HYDROLYSE

DES DIVERS GLYCOSYL-NUCLEOTIDES

p.123

1 - Les conditions de la réduction
=====

p.123

2 - Les conditions de l'hydrolyse acide
=====

p.124

3 - Comportement chromatographique des sucres
=====

p.124

a) - Chromatographie descendante sur papier
+++++

p.124

Whatman 3

++++

b) - Chromatographie ascendante sur couche mince
+++++

p.125

C - ANALYSE EN SPECTROMETRIE DE MASSE COUPLEE

p.125

A LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE DU

PRODUIT HYDROLYSE OBTENU APRES TRANSFORMATION

DU GDP-MANNOSE

1 - Préparation et purification du GDP-fucose
=====

p.125

a) - Incubation et chromatographie
+++++

p.125

b) - Purification du GDP-fucose
+++++

p.126

2 - Préparation de l'échantillon pour l'analyse
=====

p.126

en spectrométrie de masse
=====

a) - La réduction	p.126
+=+=+=+=+=+=	
b) - L'acétylation	p.127
+=+=+=+=+=+=	
3 - Les conditions de chromatographie et de	p.127
=====	
détermination du spectre de masse	
=====	

V - LOCALISATION SUBCELLULAIRE ET PURIFICATION PARTIELLE

DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE

INTRODUCTION

Le cerveau des Néréidae sécrète une substance hormonale et depuis les travaux de DURCHON en 1948, aucune donnée expérimentale n'a pu prouver l'existence d'une seconde activité endocrine. L'hormone cérébrale des Néréidae contrôle plusieurs processus liés à la croissance et à la maturation génitale. Elle est inhibitrice des transformations hétéronéreidiennes (DURCHON : 1948, 1956 a ; BOILLY-MARER : 1962), inhibitrice de la croissance germinale (DHAINAUT et PORCHET : 1967) et stimulatrice de la régénération (DURCHON : 1956 b). L'activité endocrine cérébrale n'est pas constante, elle diminue tout au long du développement de l'animal contrôlant ainsi le développement harmonieux de chaque individu. (DURCHON : 1960, 1962 ; HAUENSCHILD : 1964 a, b).

Les modalités du contrôle hormonal de la différenciation cellulaire chez les Néréidae ont surtout été étudiés au niveau du cytoplasme notamment au cours de l'ovogénèse. L'appareil de Golgi participe à des synthèses protéiques destinées au *vitellus* sous un taux hormonal élevé (DHAINAUT : 1967 ; DHAINAUT et PORCHET : 1977). La baisse de ce taux hormonal s'accompagne d'un changement dans la nature des composés synthétisés par les dictyosomes. En effet, ceux-ci

s'orientent vers l'élaboration des alvéoles corticaux riches en glycoconjugués (DHAINAUT : 1970 a ; DHAINAUT et PORCHET : 1977 ; PORCHET *et al.* : 1977 ; PORCHET et SPIK : 1978).

L'ensemble de ces résultats suggère que l'hormone cérébrale contrôle directement ou par l'intermédiaire de messagers, les synthèses cytoplasmiques en modulant les activités enzymatiques de l'appareil de Golgi. Cette baisse du taux hormonal s'accompagne en effet d'une synthèse accrue des glycoconjugués dans les ovocytes des Néréidae.

D'abord considérés comme des composés mineurs les glycoconjugués et principalement les glycoprotéines, suscitent depuis quelques années, un intérêt sans cesse croissant. Des rôles très variés ont été attribués aux glycoprotéines, importance qui est due à la copule glucidique. Molécules solubles, les glycoprotéines sont des transporteurs, des hormones. Intégrées aux membranes plasmiques et exposant leur partie glycanique vers le milieu extracellulaire, elles participent aux phénomènes de reconnaissance cellulaire.

Les grandes lignes des mécanismes généraux de

biosynthèse des glycoconjugués et principalement des glycoprotéines commencent à être définies.

Les travaux de LELOIR, HASSID et ROSEMAN dans les années 1950-1960, ont permis de montrer l'importance considérable des glycosyl-nucléotides comme donneurs d'unités monosaccharidiques lors de la synthèse de la partie glycannique des glycoconjugués. Ces composés sont les formes activées des monosaccharides transférés par les glycosyltransférases, les enzymes responsables de l'édification de la copule glucidique des glycoconjugués. La croissance ovocytaire s'accompagne d'une augmentation de la synthèse des glycoconjugués dans les cellules germinales femelles soumises à un taux hormonal faible. Ceci laisse supposer que les glycosyltransférases subissent l'influence de l'hormone cérébrale. Nous avons lors d'études préalables, déterminé l'existence d'activités galactosyl, glucuronyl, sialyl, xylosyl, fucosyl et mannosyltransférases*. Au cours de ces études, un phénomène particulier relatif aux mannosyltransférases est apparu.

Le présent travail concerne les résultats que nous avons acquis sur cette activité enzymatique et sur le phénomène de transformation du GDP-mannose en GDP-fucose, c'est à dire la formation du substrat des fucosyltransférases au détriment de celui des mannosyltransférases.

* BULET P.,
Mesure des activités glycosyltransférisques chez les cellules coelomiques de *Perinereis cultrifera* (Annélide Polychète).
Diplôme d'Etudes Approfondies de Biologie et Physiologie Animales, (1981).

GENERALITES

LES NEREIDIENS

I - ACTIVITE ENDOCRINE CEREBRALE

Chez les Néreidiens, le développement somatique et la gamétogénèse sont contrôlés par un facteur hormonal, provenant des cellules neurosécrétrices du cerveau (DURCHON : 1948 ; DURCHON : 1967 ; HAUENSCHILD : 1956 ; HAUENSCHILD : 1965 ; CLARK et RUSTON : 1963 a ; DHAINAUT - COURTOIS : 1968).

Chez *Perinereis cultrifera*, la maturité génitale est corrélative à de profondes transformations somatiques : c'est l'épitoquie. La *Perinereis cultrifera* ainsi transformée porte le nom d'hétéronéréis. Une décérébration provoque, chez des individus non matures, une épitoquie précoce (DURCHON : 1948 ; DURCHON : 1956 a ; BOILLY - MARER : 1962).

Par ailleurs, l'hormone cérébrale contrôle également la régénération (DURCHON : 1956 b ; CLARK et RUSTON : 1963 b).

Cette activité endocrine cérébrale n'est pas constante mais au contraire décroît tout au long du développement de l'animal pour s'annuler à l'approche de la maturité sexuelle (DURCHON : 1960 ; DURCHON : 1962 ; HAUENSCHILD : 1964 a et b ; DURCHON et PORCHET : 1970 ; DURCHON et PORCHET : 1971).

Cette activité hormonale, dont l'influence s'exerce tout au long de la vie de l'animal, est classée suivant la nomenclature traditionnelle (CSABA : 1977 ; TATA : 1980) comme une hormone morphogénétique.

L'isolement et la purification de la neurohormone d'origine cérébrale des Néréidiens ont été réalisés à partir de cerveaux prélevés sur des *Nereis diversicolor* immatures (CARDON *et al.* : 1981). Sa nature chimique semble déterminée. Le test biologique utilisé pour repérer la substance hormonale lors du fractionnement, est fondé sur l'évolution en culture organotypique des spermatogonies (DURCHON et SCHALLER : 1963 ; DURCHON et SCHALLER : 1964). La neurohormone cérébrale inhibe

la transformation des spermatogonies en spermatozoïdes. La gamétogénèse constitue d'ailleurs un excellent modèle pour étudier les modalités de l'action hormonale, modalités qui sont pourtant très différentes entre la spermatogénèse et l'ovogénèse.

II - LA SPERMATOGENESE

A - SPERMATOGENESE EXPERIMENTALE

Dans la lignée mâle, la prolifération spermatogoniale s'effectue en présence d'un taux hormonal relativement élevé. La chute brutale du taux hormonal déclenche l'entrée en méiose (DURCHON : 1952 ; DHAINAUT : 1964 ; DURCHON *et al.* : 1965 ; BERTOUT : 1976) qui survient peu avant la reproduction. En fait, c'est *in vitro*, qu'il est le plus facile d'étudier la spermatogénèse (DURCHON *et al.* : 1965). En effet, la possibilité de provoquer expérimentalement la méiose au cours de la spermatogénèse, a permis de procéder à l'étude détaillée de l'évolution des constituants nucléaires.

B - L'EVOLUTION NUCLEAIRE

L'étude de la synthèse des acides nucléiques,

la cytochimie et les observations morphologiques ont permis de montrer que la majeure partie des RNA est élaborée pendant l'interphase préméiotique, que la synthèse des RNA d'origine nucléaire cesse dès la fin de l'interphase et surtout que la synthèse des RNA est beaucoup plus intense pendant l'interphase préméiotique que pendant la multiplication mitotique (BERTOUT : 1976 ; CANER : 1981).

Le ralentissement de la synthèse des RNA entraîne un retard dans le déroulement de la méiose ; ce qui laisse supposer que la synthèse préméiotique des RNA est impliquée dans le processus de différenciation de la méiose (BERTOUT : 1981 thèse).

III - L'OVOGENESE

A - OVOGENESE NATURELLE

L'ovogénèse de *Perinereis cultrifera* peut être subdivisée en quatre grandes étapes fondées sur les modifications du métabolisme cytoplasmique (DHAINAUT : 1970 a ; PORCHET : 1974) (Figure 1 - page 14).

1 - Stade de prévitellogénèse

=====

C'est le début de la phase de grand accroissement, caractérisée par une augmentation du volume cellulaire et par la prolifération et le développement des organites cytoplasmiques. Cette phase est contrôlée par un taux hormonal élevé.

2 - Stade de vitellogénèse

=====

Les granules de vitellus et les globules lipidiques apparaissent dans les ovocytes d'un diamètre de 30 à 40 μm .

Les granules vitellins s'accroissent par incorporation de vésicules issues de l'appareil de Golgi, (DHAINAUT : 1967 ; DHAINAUT : 1970 b). Chez *Perinereis cultrifera* jusqu'à 60 μm , on ne trouve que des globules lipidiques. A partir de 60 μm , le vitellus se met en place. La concentration en neurohormone reste importante.

3 - Stade d'élaboration des granules corticaux

=====

A partir de 120 à 130 μm , les synthèses ovocytaires s'orientent grâce à l'appareil de Golgi vers la production de

composés riches en glycoconjugués (DHAINAUT et PORCHET : 1977 a et b ; PORCHET et SPIK : 1978) qui s'accumulent dans les alvéoles corticaux. Ces derniers ne servent pas de réserves pour l'ovocyte. Au moment de la fécondation, il y aura expulsion du contenu de ces granules pour former la gelée protectrice des oeufs, phénomène observé chez tous les Néreidiens (COSTELLO : 1949). La production endocrine du cerveau baisse fortement.

4 - Stade de maturité

=====

Les ovocytes, arrivés à un diamètre de 180 - 200 μm , ne synthétisent plus de matériel cytoplasmique, l'appareil de Golgi involue. Ce stade se caractérise par un remaniement des inclusions cytoplasmiques qui se disposent en couches concentriques autour du noyau. Il y a donc une polarité dans l'ovocyte. Du noyau vers le cortex, on distingue :

- le cytoplasme riche en ribosomes,
- les globules lipidiques,
- les granules vitellins,
- les alvéoles corticaux.

L'animal vit alors dans des conditions anhormonales.

B - L'EVOLUTION NUCLEAIRE

Dans les jeunes ovocytes, c'est à dire au stade de la prévitellogénèse, la synthèse des RNA extranucléolaires (tRNA, rRNA 5 s) est beaucoup plus importante que celle des RNA nucléaires (rRNA 18 et 28 s). Cette prédominance va s'inverser au cours de la vitellogénèse. Dès le début de la formation des alvéoles corticaux, le taux de synthèse des RNA extranucléolaires et nucléolaires ne cesse de décroître jusqu'à la maturité (BERTOUT *et al.* : 1981).

CONCLUSION

L'ensemble de ces observations montre la sensibilité des constituants nucléaires et cytoplasmiques aux variations de l'activité endocrine cérébrale. Ces variations naturelles (et que l'on peut reproduire expérimentalement), se traduisent principalement, au niveau nucléaire par des modifications des synthèses des RNA, au niveau cytoplasmique par des changements dans la nature des molécules synthétisées.

IV - LES SYNTHÈSES D'ORIGINE CYTOPLASMIQUE

Dans les ovocytes soumis à un taux hormonal élevé, l'appareil de Golgi participe à l'élaboration des protéines du vitellus (DHAINAUT : 1967 ; DHAINAUT : 1970 a ; DHAINAUT et PORCHET : 1977 a). Le taux d'hormone diminuant, les dictyosomes s'orientent vers la production des organites corticaux riches en glycoconjugués (DHAINAUT : 1968 ; DHAINAUT : 1970 a ; DHAINAUT et PORCHET : 1977 b ; PORCHET *et al.* : 1977).

A - EVOLUTION PHYSIOLOGIQUE DE L'APPAREIL DE GOLGI

Un des phénomènes biologiques le plus remarquable de la croissance ovocytaire est représenté par l'évolution de l'appareil de Golgi. Nous avons vu que pour des ovocytes jeunes, l'appareil de Golgi est utilisé pour l'élaboration du vitellus protéique jusqu'au stade de 170 à 180 μm .

Au stade de 120 μm , l'ensemble des dictyosomes synthétise en plus, les glycoprotéines sulfatées des granules corticaux (PORCHET et SPIK : 1978). Dans les ovocytes de

180 μm , les dictyosomes synthétisent uniquement le matériel destiné aux granules corticaux (DHAINAUT et PORCHET : 1977 a et b).

B - LES GLYCOCONJUGUES DES ALVEOLES CORTICAUX -----

A partir des ovocytes de 120 μm , les dictyosomes deviennent capables d'incorporer du glucose, du galactose, du mannose, du fucose et des sulfates (DHAINAUT et PORCHET : 1977 a).

Ces divers monosaccharides constitueront les glycanes des glycoprotéines des alvéoles corticaux. Ces glycoconjugués sont riches en acide glucuronique, en xylose, en fucose et en rhamnose. En outre, on observe une très nette évolution de l'incorporation relative de ces différents monosaccharides au cours de la maturation ovocytaire (PORCHET : 1974 ; PORCHET *et al.* : 1977) - (Figure 2 - page 14). Le fait que des dictyosomes puissent participer successivement à l'élaboration de deux produits différents, est peu fréquent (PHILLIPS et SWIFT : 1965 ; BAINTON et FARQUHAR : 1966 ; ANDERSON : 1968 ; SANDOZ : 1970). La question qui se pose est

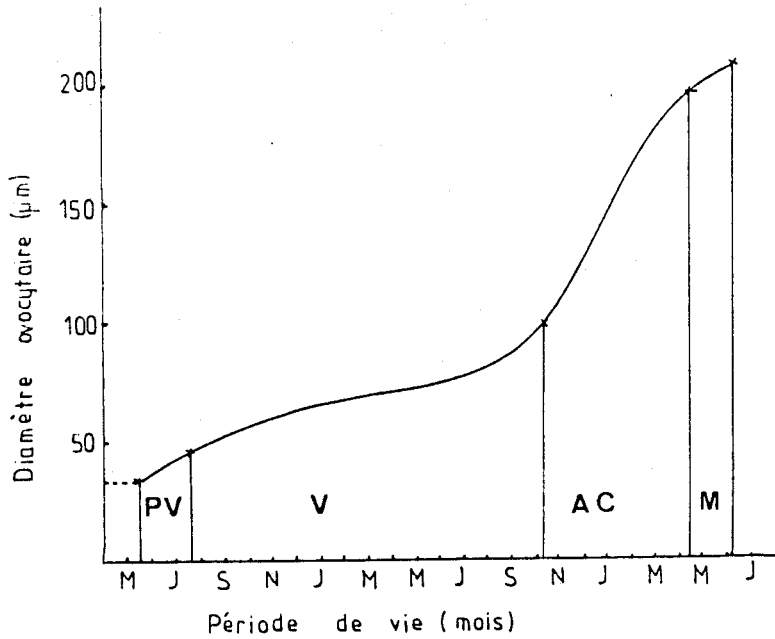


Figure 1 : Evolution cytologique des ovocytes de *Perinereis cultrifera* en fonction de leur courbe de croissance. La phase de grand accroissement ovocytaire débute à la fin de la première année et dure deux années. Prévitellogénèse PV, Vitellogénèse V, Elaboration des alvéoles corticaux AC, Maturité M

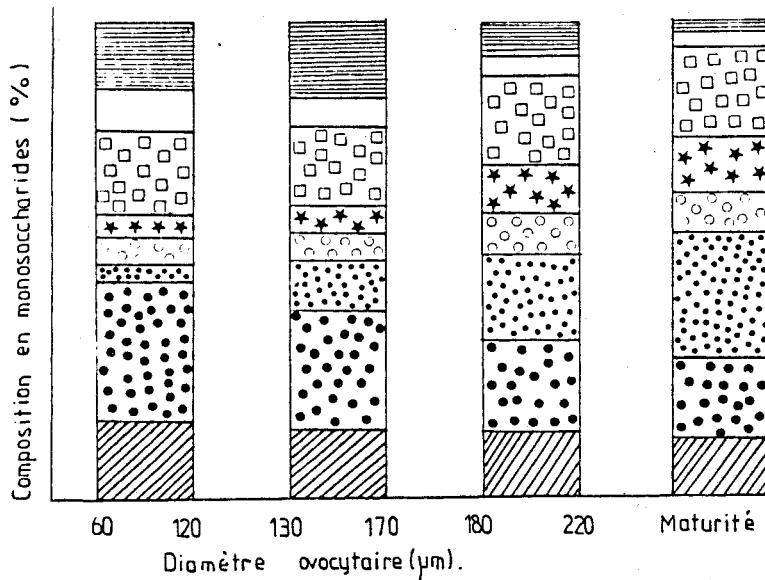


Figure 2 : Représentation schématique des variations quantitatives des monosaccharides des glycoconjugués des ovocytes de *Perinereis cultrifera*. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la totalité des monosaccharides suivant les quatre stades caractéristiques de l'évolution ovocytaire.

Gal : ▨ Rha : ✱ Man : ◼ Xyl : ◼ Fuc : ◻
 GlcUA : ◻ GlcNAc : ▨ GalNAc : ◻



de savoir comment peut s'effectuer la régulation de ces deux types de synthèses ? Quel est le rôle de la neurohormone cérébrale ? On peut penser que l'hormone cérébrale agit en modulant les informations nucléaires (BERTOUT : 1972) qui contrôlent le fonctionnement enzymatique de l'appareil de Golgi, conduisant ainsi ce dernier à des synthèses spécifiques suivant le stade de maturité de l'animal.

CONCLUSION

Du stade de prévitellogénèse au stade de submaturité, le taux des glucides augmente considérablement et ces derniers se répartissent dans deux grandes fractions macromoléculaires :

- des composés riches en N-acétylhexosamines qui augmentent légèrement au cours de la maturation ovocytaire ;
- des glycoconjugués dont la concentration augmente fortement à partir de la submaturité génitale et qui sont très riches, en xylose, en fucose, en rhamnose, en acide glucuronique et en groupements

sulfates.

Il semble, qu'à partir d'une taille ovocytaire de 180 μm , les glycoconjugués synthétisés, ne participent qu'à la constitution des alvéoles corticaux.

Après avoir précisé quelques données biologiques concernant le mode d'action de l'hormone des Néreidiens, principalement au cours du processus de l'ovogénèse, nous ferons brièvement le point sur les connaissances concernant la structure et la biosynthèse des glycoconjugués. Ces molécules semblent être des éléments caractéristiques de la maturation ovocytaire.

LES GLYCOCONJUGUES

Les glycoprotéines forment avec les glycolipides, la classe des glycoconjugués. Ces constituants résultent de l'association d'une copule glucidique ou glycanne avec une protéine ou un lipide. Les glycoconjugués sont largement répandus dans le monde vivant. On les retrouve aussi bien chez les virus, les bactéries, les champignons ainsi que dans le monde végétal et animal. Solubles ou intégrés aux membranes plasmiques ou intracellulaires, (enveloppe nucléaire, réticulum endoplasmique, appareil de Golgi), ils assurent des rôles biologiques variés.

Dans ce chapitre nous résumerons les caractéristiques structurales de ces composés, puis nous passerons brièvement en revue les principales voies de leurs biosynthèses.

I - STRUCTURE DES GLYCOCONJUGUES

A - LES GLYCOLIPIDES

=====

Les glycolipides sont principalement localisés à la surface de la membrane plasmique. De tous les glycolipides, les sphingolipides (glycolipides à sphingosine) représentent la classe la plus importante. Ils sont constitués d'un lipide, le céramide, dont la chaîne d'acide gras est variable (voir figure 3 - page 25). Sur le céramide est fixé une partie glycanique dont le motif de base est généralement le groupement Gal (β 1-4)-Glc (β 1-).

A partir de ce noyau lactosyl-céramide commun, il y a formation de glycolipides plus ou moins complexes par addition de résidus glycosyl. Le lactosyl-céramide est le précurseur d'une série de molécules plus complexes pouvant avoir jusqu'à une cinquantaine de résidus glycosyl, pour les plus grands (voir une revue générale d'HAKOMORI : 1975) (Tableau I - page 20).

On distingue :

1 - Les glycolipides neutres

=====

Ils sont caractérisés par addition de résidus N-acétylglucosaminyl (HAKOMORI *et al.* 1971), N-acétylgalactosaminyl (ANDO *et al.* : 1976), galactosyl et fucosyl (HAKOMORI et JEANLOZ : 1961 ; HAKOMORI et STRYCHARD : 1968). De plus dans les glycolipides neutres, on trouve les glycosphingolipides décrits par HORI et ses collaborateurs. Ce nouveau type de glycolipides contient du mannose, du fucose, du xylose et des résidus de O-méthylxylose et de O-méthyl-N-acétylgalactosamine (HORI *et al.* : 1977 a b ; HORI *et al.* : 1981).

2 - Les gangliosides

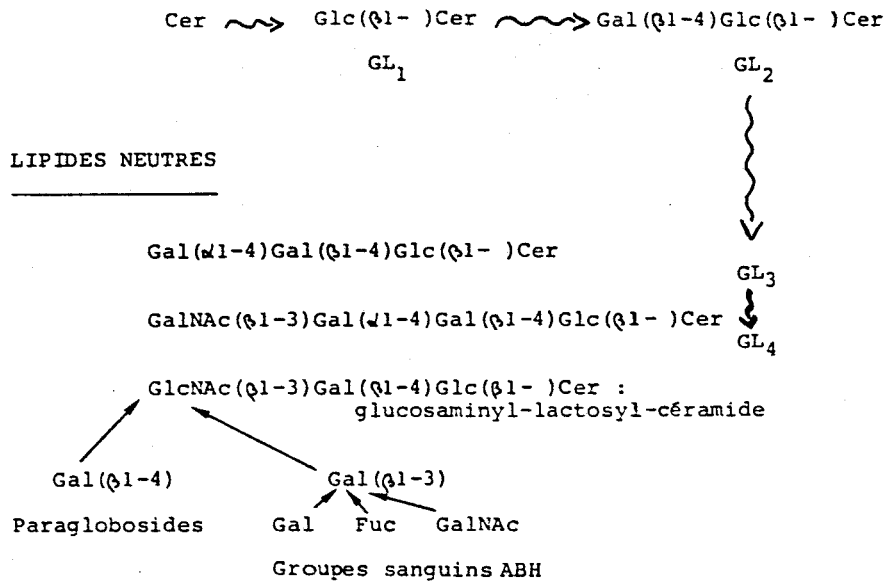
=====

Les glycolipides qui possèdent de l'acide sialique forment la classe des gangliosides. Les gangliosides possèdent outre de l'acide sialique, des N-acétylosamines. Ils sont désignés suivant la nomenclature de SVENNERHOLM par le nombre de résidus sialyl présents dans la molécule (Tableau 1). Ces gangliosides sont abondants dans les tissus nerveux.

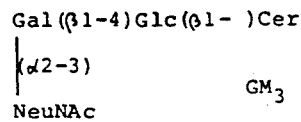
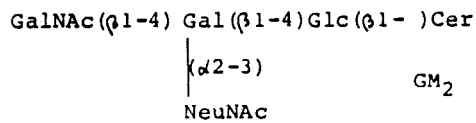
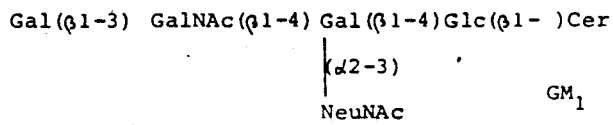
B - LES GLYCOPROTEINES

=====

TABLEAU I : Structure de quelques glycolipides
isolés des membranes plasmiques
de cellules de mammifères



GANGLIOSIDES



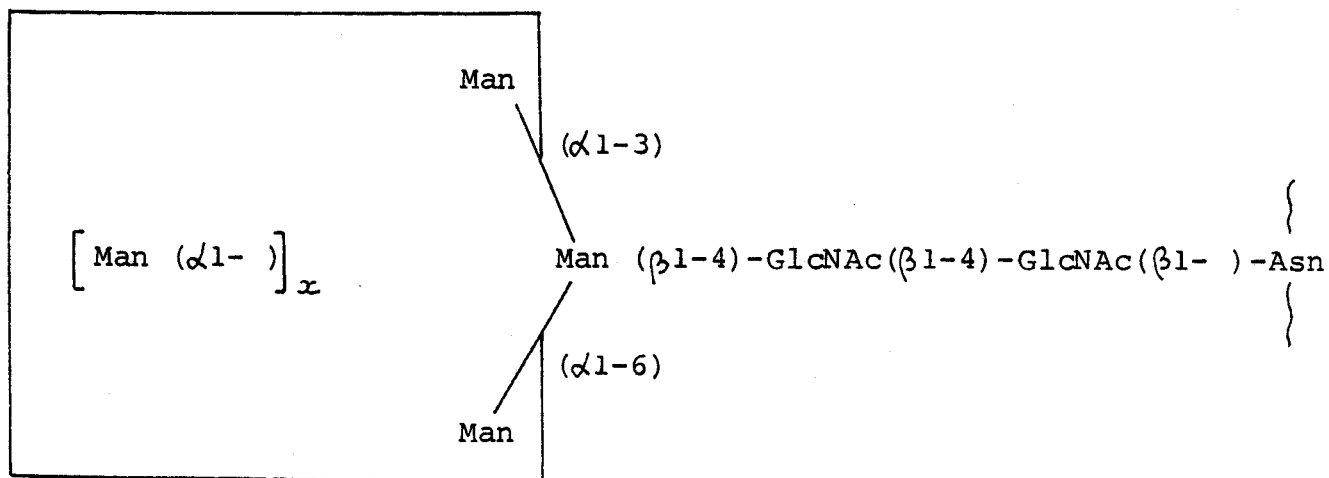
Les glycoprotéines peuvent être définies comme étant composées d'une partie protéique à laquelle est attachée, par une liaison N- ou O-glycosyl, une copule glucidique plus ou moins complexe. Sur la base de la nature de la liaison entre les glycanes et la protéine, on distingue deux grands groupes (voir les revues générales de KORNFELD et KORNFELD : 1980 ; MONTREUIL : 1982) :

- les N-glycosyl protéines dans lesquelles le glycanne est attaché par l'extrémité N-acétylglucosaminyl réductrice à un résidu asparaginyl de la protéine en formant une liaison glycosylaminique . L'acide aminé est toujours inclus dans le "sequon" Asn-X-Thr (GOTTSCHALK : 1972 ; BEELEY : 1977 ; RONIN *et al.* : 1981) ;
- les O-glycosylprotéines, où la partie glycanique se conjugue par une liaison O-glycosidique à un hydroxyaminoacide (Ser, Thr). La liaison ainsi formée est de type osidique .

1 - Les N-glycosyl protéines

=====

Ils sont formés par branchement, sur les mannoses externes, de résidus mannosyl pouvant aller de deux à neuf dans les cellules animales et à un nombre bien supérieur chez les levures.



Dans ce type de glycoprotéines, on ne rencontre outre le di-N-acétylchitobiose du point d'attache, que des résidus de mannose.

b) - Les glycanes de type N-acétyllactosaminique
 ++++++

Des groupements N-acétyllactosaminiques

Gal ((β1-4)-GlcNAc (β1-)- sont branchés sur les mannoses externes pour donner des composés polyantennés. Un exemple de ce type de glycanne est donné par les structures du glycanne de la lactotransferrine.

humaine (SPIK *et al.* : 1982) - (Figure 4 - page 25).

De plus, les résidus N-acétylglucosaminyl des groupements lactosaminyl ainsi que ceux du point d'attache, peuvent être fucosylés, et les galactoses sialylés.

c) - Les glycanes mixtes
 +=+=+=+=+=+=+=+=+=+=

Des structures hybrides entre le type oligomannosidique et N-acétyllactosaminique ont été mis en évidence dans l'ovalbumine (TAI *et al.* : 1977 ; YAMASHITA *et al.* : 1978) - (Figure 5 - page 30).

2 - Les O-glycosylprotéines =====

Dans ces glycoprotéines, dont font partie les mucines, le collagène et les mucopolysaccharides acides, la chaîne oligosaccharidique est attachée par une liaison O-glycosidique. Les monosaccharides impliqués dans ce type de liaison, peuvent être la N-acétylgalactosamine, le galactose, le mannose et le xylose. Pour l'acide aminé, on rencontre la sérine, la thréonine, l'hydroxylysine ou l'hydroxyproline.

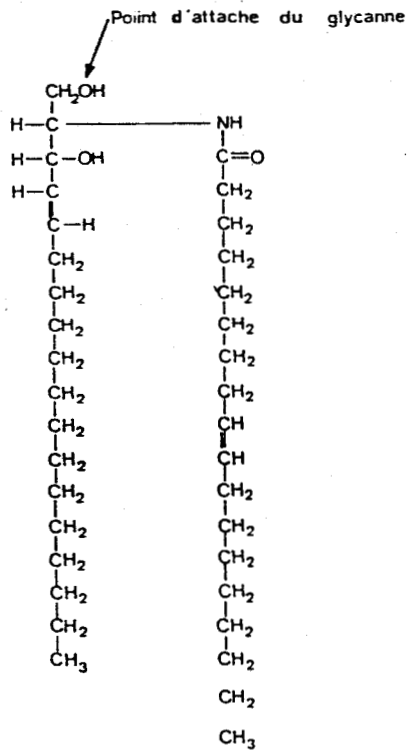


Figure 3 : Structure d'un céramide.

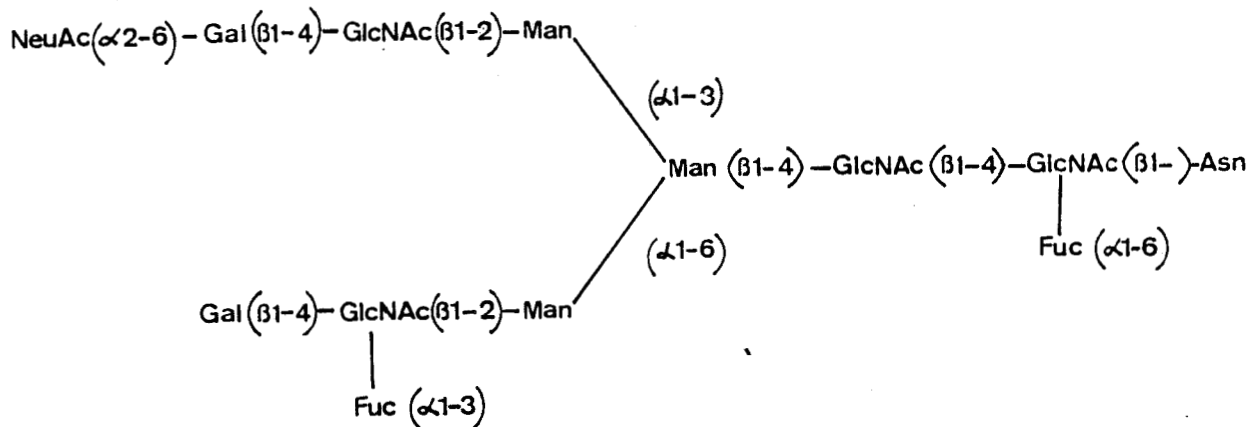


Figure 4 : Structure du glycanne de la lactotransferrine humaine.



Suivant la nature des constituants de la liaison,
on distingue :

- a) - Les glycoprotéines de type collagène
 +=

Le collagène et la membrane basale contiennent des glycoconjugués dans lesquels la liaison glycanne-protéine se fait par le galactose ou par le disaccharide Glc(β 1-2)-Gal sur l'acide aminé hydroxylysine (BUTLER et CUNNINGHAM : 1966). L'hydroxylysine apparaît toujours dans la séquence d'acides aminés :

Gly - X - Hyl - Y - Arg (ISEMURA *et al.* : 1973).

- b) - Les glycoprotéines de type mucines
 +=

La liaison glycanne protéine de type GalNAc(α 1-)Ser (ou Thr) est la plus fréquente et c'est elle que l'on trouve dans les mucines (GOTTSCALK *et al.* : 1972).

Sur ce résidu N-acétylgalactosaminique se greffe

et NORDIN : 1975), du galactose (PAZUR *et al.* : 1971), du xylose (RAIZADA *et al.* : 1975) peuvent être additionnés sur cet oligosaccharide à liaison mannosidique.

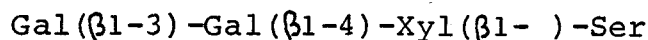
Dans le collagène de la cuticule de *Néreis*, on a trouvé de l'acide glucuronique lié au mannose par une liaison α 1-6 (SPIRO et BHOYROO : 1971).

- Le sucre du point d'attache est le galactose.

Le collagène de la cuticule de *Lumbricus terrestris* possède des glycopeptides de type Gal(α 1-2)-Gal-Ser (ou Thr) (MUIR et LEE : 1970) ainsi que la cuticule de *Néreis* (SPIRO et BHOYROO : 1971).

- Le sucre du point d'attache est le xylose.

C'est la classe particulière des protéoglycannes ou mucopolysaccharides acides. Ici, la séquence du point d'attache est la suivante :



3 - Les mucopolysaccharides acides

=====

A partir de la séquence du point d'attache précédemment décrite, on a formation des divers types de mucopolysaccharides acides par addition répétitive d'unités disaccharidiques comprenant un acide uronique et une N-acétylosamine. Largement répandus chez les vertébrés et les invertébrés, ces composés sont classés en deux grands groupes dépendant de leur point d'attache sur la protéine. L'acide hyaluronique, pour lequel aucune copule protéique n'a été décrite, ne fait pas partie de ces deux classes. Le tableau II page 30 représente les deux grandes classes de mucopolysaccharides acides avec les principales structures trouvées chez les vertébrés.

Sur la figure 6 page 31, se trouve schématisé la classification des glycoprotéines.

II - BIOSYNTHESE DE LA PARTIE GLYCANNIQUE DES GLYCOPROTEINES

A - LES GLYCOSYLTRANSFERASES

=====

Les glycosyltransférases sont les enzymes responsables de la biosynthèse de la partie glycannique des glycoconjugués (N- et O-glycosylprotéines, glycolipides) (voir les

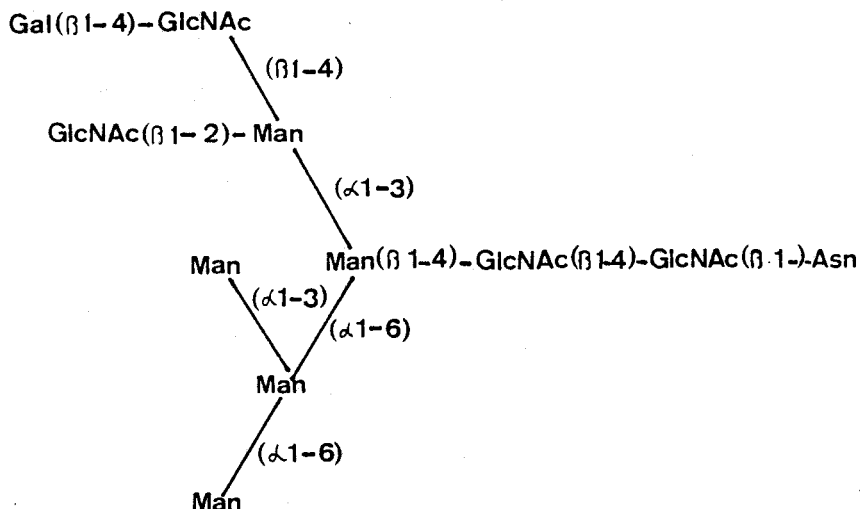
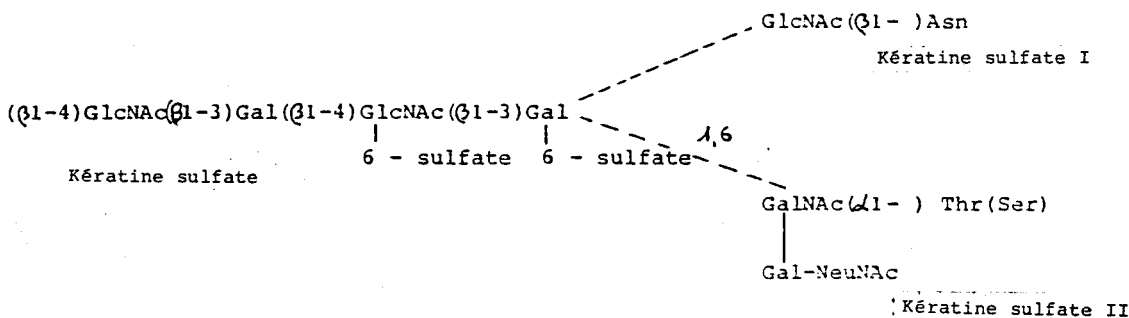
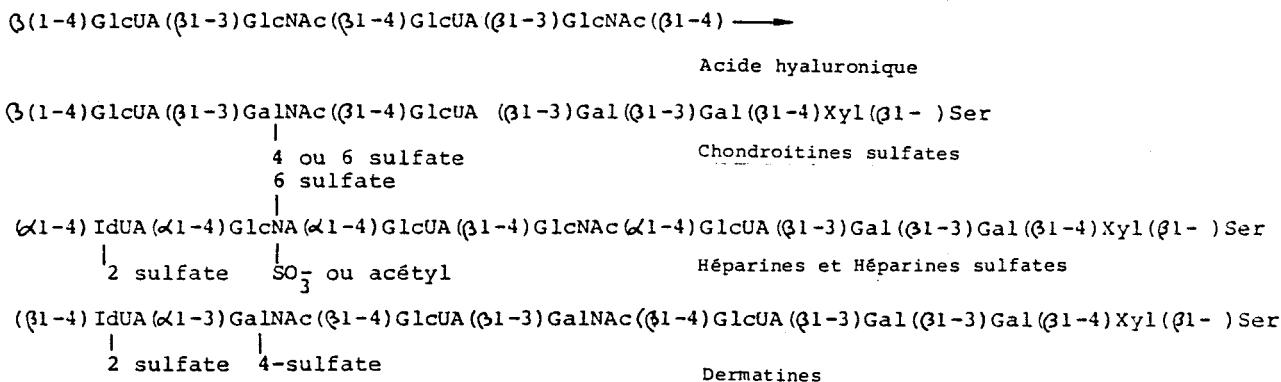
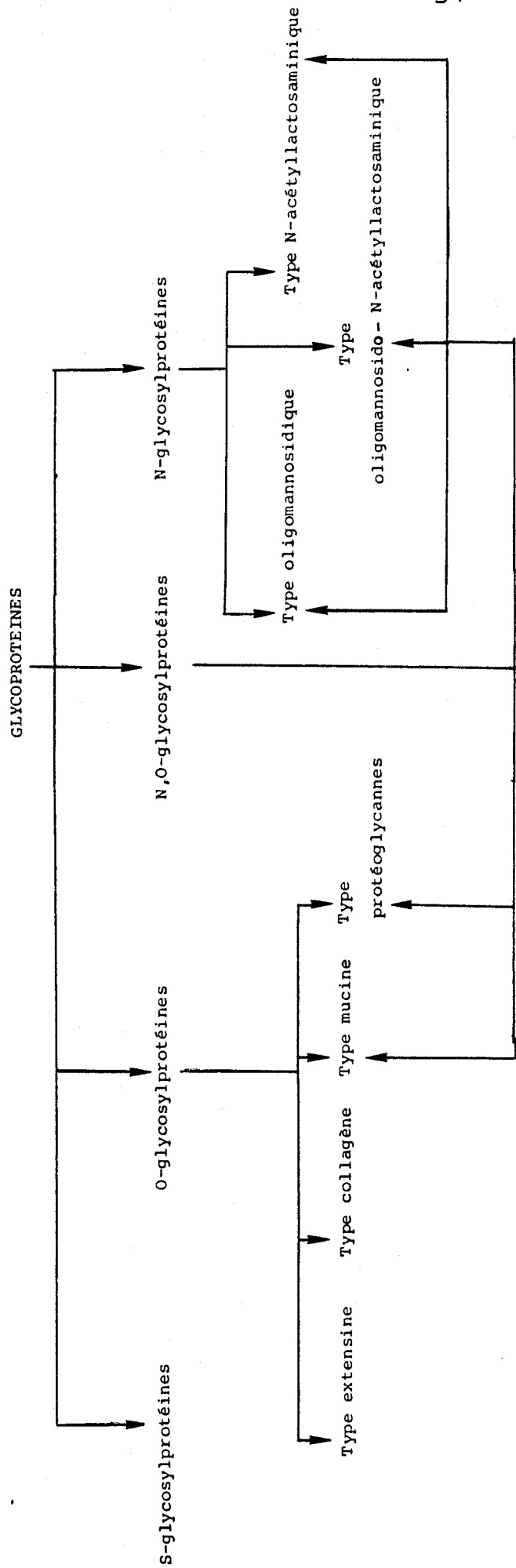


Figure 5 : Structure d'un glycopeptide de l'ovalbumine.

Tableau II : Structure de quelques mucopolysaccharides

 acides trouvés chez les vertébrés.





.....
 Figure 6 : Classification des glycoprotéines fondée sur la
 structure du glycanne et le type de liaison
 glycanne-protéine.



revues générales de SCHACHTER et ROSEMAN : 1980 ; BERGER *et al.* : 1982 ; MONTREUIL : 1982). L'addition séquentielle des monosaccharides se fait par transfert d'un résidu glycosyl à partir d'un substrat donneur, sur l'oligosaccharide accepteur en formation (SCHACHTER et ROSEMAN : 1980). Ce donneur peut être soit un glycosyl-nucléotide, soit un intermédiaire lipidique. En général, les glycosyltransférases cellulaires sont étroitement associées aux membranes et nécessitent pour leur solubilisation, la présence d'un détergent non ionique (le Triton X100 est le plus utilisé).

Les propriétés catalytiques des glycosyltransférases sont caractérisées par leur besoin général en cations bivalents (manganèse et magnésium). Les glycosyltransférases présentent invariablement un haut degré de spécificité vis à vis du donneur, de l'accepteur mais également du type de liaison édifié entre le monosaccharide transféré et l'accepteur.

C'est en se fondant sur cette haute spécificité, à la fois vis à vis du donneur et vis à vis du type de la liaison formée, que l'on a classé les glycosyltransférases.

On peut dire que pour une glycosyltransférase spécifique d'un sucre, il y a formation d'un seul type de liaison sur un accepteur spécifique.

B - LOCALISATION SUBCELLULAIRE DE LA SYNTHÈSE

La synthèse des N- et O-glycosylprotéines est un évènement post-traductionnel qui se fait dans le réticulum endoplasmique et dans l'appareil de Golgi principalement (HUBBARD et IVATT : 1981).

Les relations entre les divers organites intracellulaires qui entrent en jeu dans l'édification des glycoprotéines, sont résumées sur la figure 7 - page 34 . La figure 8 - page 34 rappelle le "cheminement" de la glycoprotéine au cours de la biosynthèse des N-glycosylprotéines.

La partie protéique des glycoprotéines est synthétisée par les polysomes du réticulum endoplasmique granuleux. Durant la biosynthèse, la partie protéique traverse la membrane du réticulum endoplasmique granuleux et c'est dans la lumière

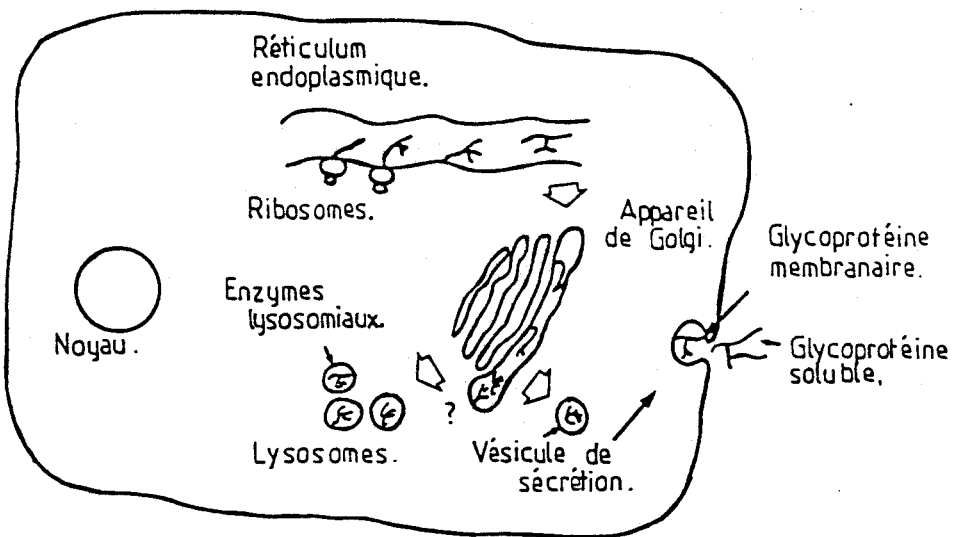


Figure 7 : Localisation subcellulaire de la biosynthèse des oligosaccharides.

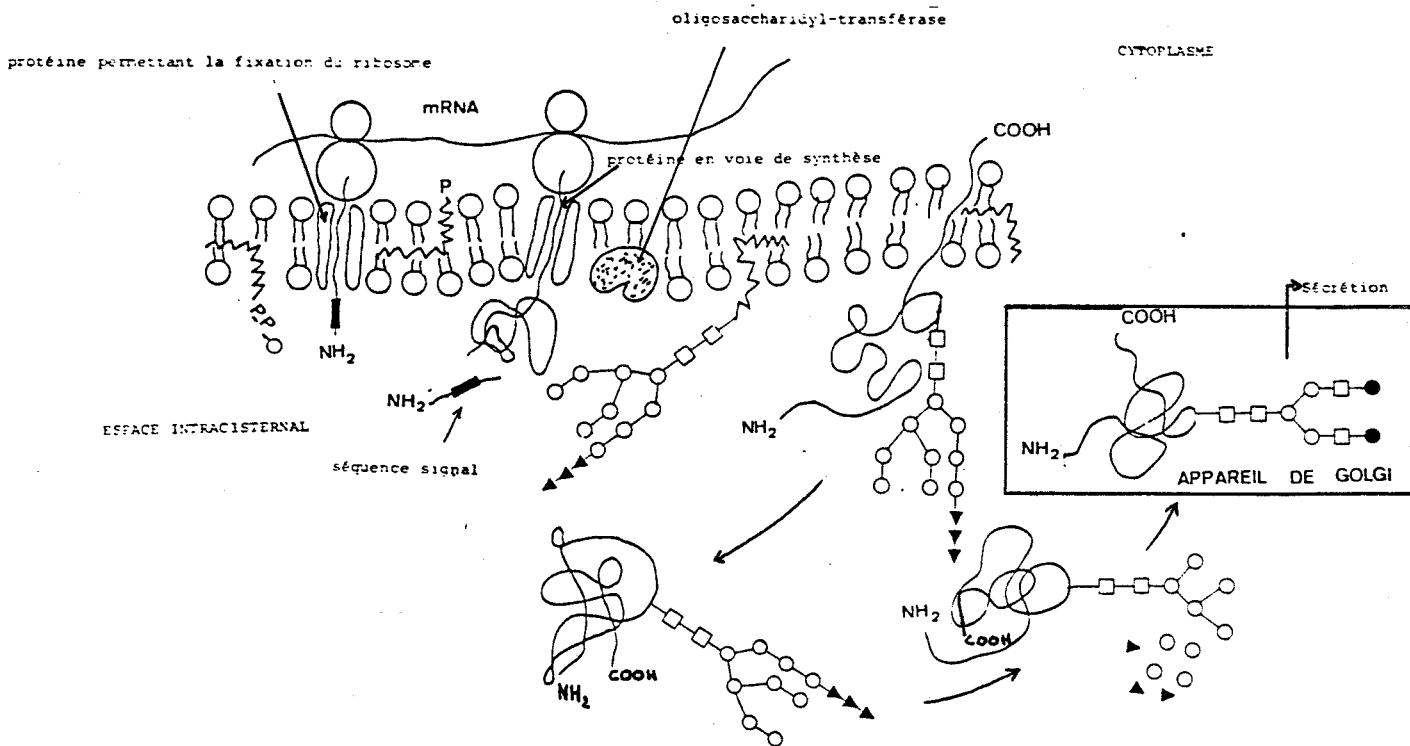


Figure 8 : Transfert d'un oligosaccharide sur une protéine en voie de synthèse et maturation de ces glycoprotéines.

□ GlcNac ; ○ Man ; ● Gal ; ▲ Glc

BUS LILLE

du réticulum endoplasmique granuleux, qu'elle subit une glycosylation initiale (HUBBARD et IVATT : 1981). Ensuite, il y a transport de la glycoprotéine par un système de vésicules jusque dans l'appareil de Golgi (ROTHMAN et FINE : 1980). C'est au niveau des dictyosomes que se terminera la synthèse des glycoprotéines (ROTHMAN : 1981).

C - BIOSYNTHESE DE L'OLIGOSACCHARIDE DES

O-GLYCOSYLPROTEINES

La synthèse des O-glycosylprotéines se fait par branchement séquentiel d'un seul monosaccharide à la fois, dans un ordre bien établi dicté par des règles strictes, et par la spécificité étroite des glycosyltransférases. L'intervention d'intermédiaires lipidiques dans la synthèse de la partie glycanique, n'a jamais été clairement démontrée (HANOVER et al. : 1980). La figure 9 - page 37 résume les différentes étapes de la synthèse des glycannes majeurs de la mucine de glandes submaxillaires de porc (BEYER et al. : 1979).

D - SYNTHÈSE DES OLIGOSACCHARIDES LIÉS PAR UNE

LIAISON N-GLYCOSYL A L'ASPARAGINE

Contrairement au mécanisme de synthèse des O-glycosylprotéines et tenant compte des observations de PARODI *et al.* en 1972, le rôle majeur des intermédiaires lipidiques dans la biosynthèse des N-glycosylprotéines est connu (voir les revues générales de WAECHTER et LENNARZ : 1976 ; PARODI et LELOIR : 1979 ; STRUCK et LENNARZ : 1980 ; HUBBARD et IVATT : 1981).

En effet, on a montré (PARODI *et al.* : 1972) qu'un oligosaccharide glucosylé lié à un lipide, était transféré en bloc sur la protéine native.

1 - Biosynthèse de l'intermédiaire lipidique

L'oligosaccharide précurseur lié au lipide, est synthétisé par addition séquentielle de résidus monosaccharidiques sur la partie lipidique (le dolichol-pyrophosphate : Dol-P-P). Le schéma de cette synthèse qui porte le nom de cycle des dolichols est détaillé figure 10 - page 37 .

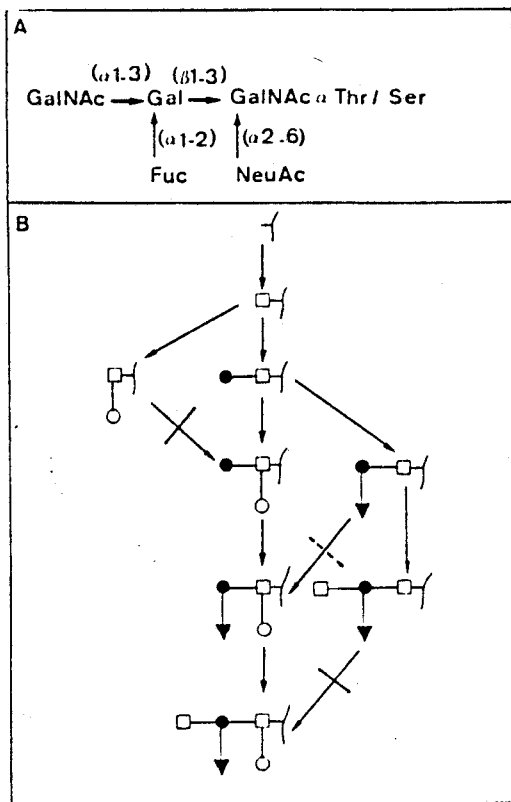


Figure 9 :
.....

Biosynthèse des O-glycannes des mucines des glandes submaxillaires du porc.

Partie A : structure finale du pentasaccharide des mucines des glandes submaxillaires de porc.

Partie B : représentation par symboles de la biosynthèse des différentes structures glycaniques que l'on peut trouver dans les mucines des glandes submaxillaires de porc.

Réaction possible : \longrightarrow ; Réaction impossible \dashrightarrow

□ : GalNAc ; ● : Gal ; ○ : NeuAc ; ▼ : Fuc.

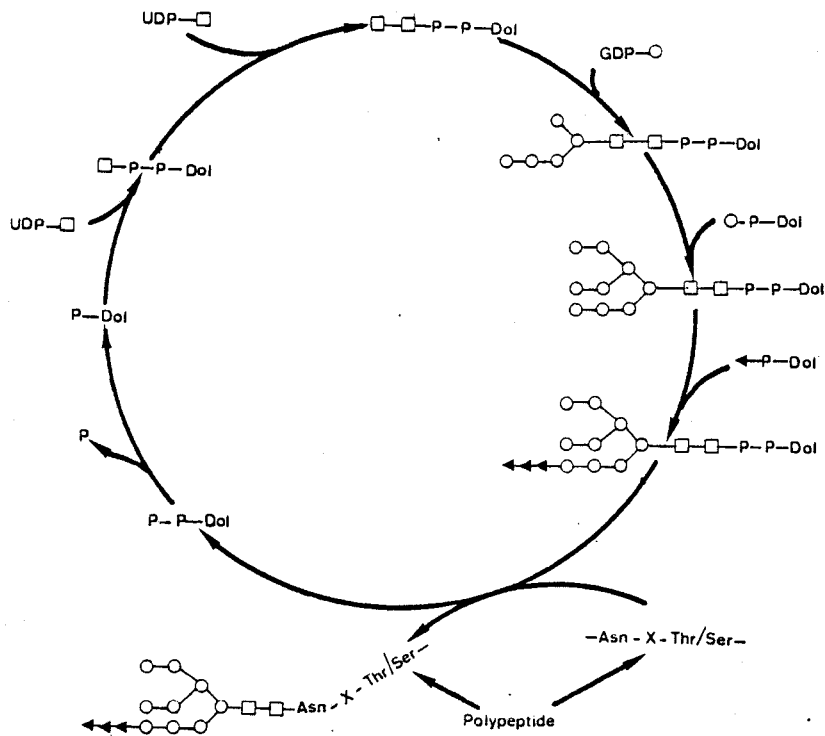


Figure 10 : Cycle des dolichols phosphates : synthèse des N-glycosylprotéines.

Glc NAc □ Man ○ Glc ◀



Après addition des trois résidus de glucose, l'oligosaccharide précurseur lié au dolichol pyrophosphate est transféré en bloc sur la protéine acceptrice.

2 - Transfert sur la protéine

=====

Le transfert sur l'asparagine par la dolicholdi-phosphoryl oligosaccharide: polypeptide oligosaccharidyltransférase, ne peut se faire que lorsque l'acide aminé se trouve dans la séquence Asn-X-Thr/Ser où X peut être n'importe quel autre acide aminé sauf la proline (voir la revue générale de MONTREUIL : 1982). Il faut également que cette séquence se trouve dans une configuration dite coude β ou β turn (AUBERT *et al.* : 1976 ; BEELEY : 1977).

3 - Maturation des oligosaccharides des

=====

N-glycosylprotéines

=====

Après transfert de l'oligosaccharide sur la protéine, des glycosidases spécifiques commencent à dégrader l'oligosaccharide en une structure de taille plus réduite (TABAS *et*

al. : 1978). L'oligosaccharide destiné à devenir un glycanne de type N-acétyllactosaminique va d'abord perdre les trois résidus glucosyl et six des neuf résidus mannosyl. La figure 11 - page 40 montre quelques détails du processus de maturation d'une N-glycosylprotéine. Les relations entre la structure de l'oligosaccharide transféré à partir de l'intermédiaire lipidique et la structure des N-glycosylprotéines de type oligomannosidique et de type N-acétyllactosaminique sont résumées sur la figure 12 - page 46 .

E - SYNTHESE DES MUCOPOLYSACCHARIDES ACIDES

Le mécanisme général de la biosynthèse des mucopolysaccharides acides est le même que celui décrit pour les N- et les O-glycosylprotéines.

Mais une série de modifications spécifiques interviennent lors de la synthèse des mucopolysaccharides acides :

- introduction de groupements sulfates en position 4 ou 6 sur la N-acétylgalactosamine et en position 2 sur la N-acétylglucosamine (voir tableau II - page 30) ;

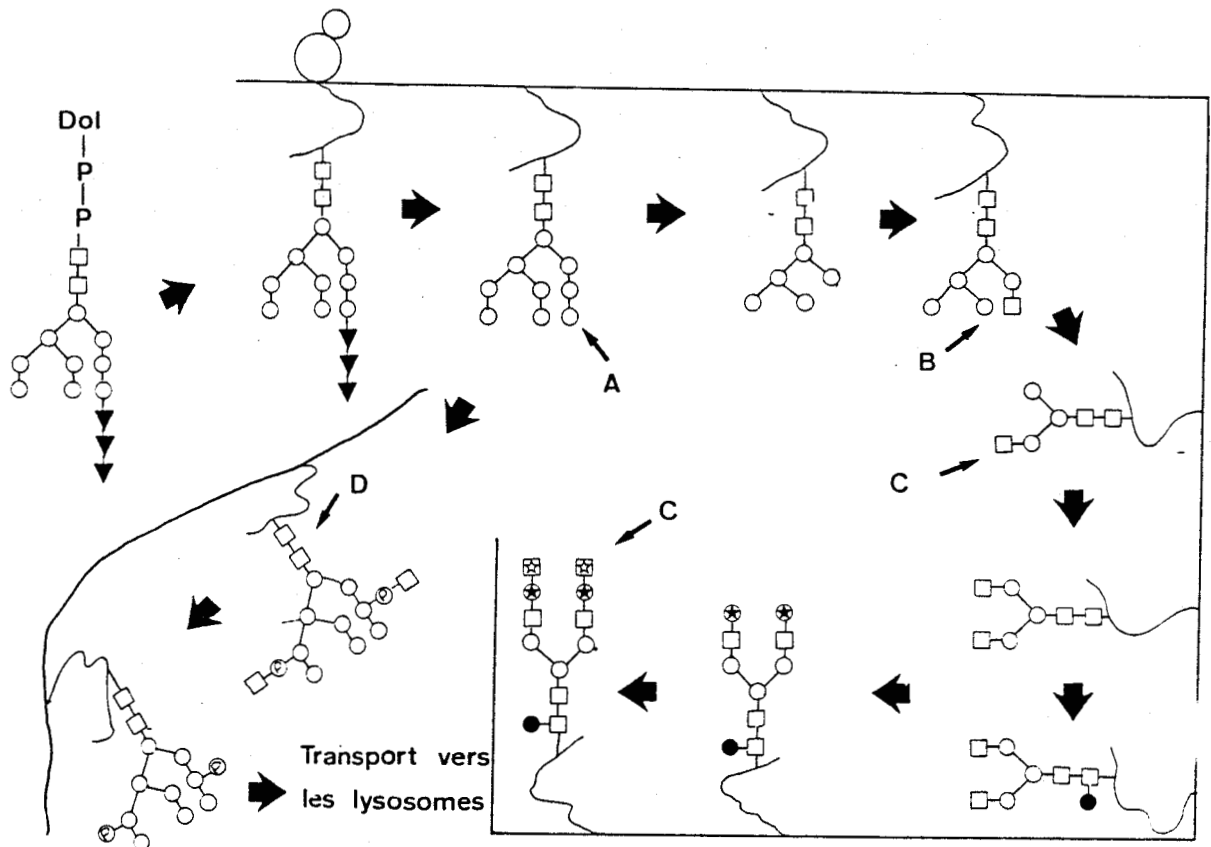


Figure 11 : Maturation et glycosylation finale des

 N-glycosylprotéines.

□ GlcNAc ; ○ Man ; ▼ Glc
 ⊗ Gal ; ● Fuc ; ⊠ NeuAc.

A : Type oligomannosidique

B : Type oligomannosido - N-acétyllactosaminique

C : Type N-acétyllactosaminique

D : Type phosphooligomannosidique

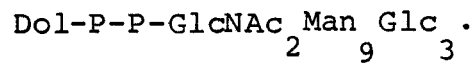
- épimérisation du résidu glucuronyl en résidu iduronyl après la sulfatation et la désacétylation du composé (voir tableau II - page 30).

Bien qu'un dolichol monophosphate xylose ait été trouvé dans l'épiphyse d'embryon de poulet, il semble que celui-ci n'intervienne pas dans l'édification de la liaison xylose-protéine des protéoglycannes (FALTYNEK *et al.* : 1982).

CONCLUSION

Nous avons vu brièvement dans ce chapitre que les glycosyltransférases sont responsables de la synthèse de la partie glycanique de tous les glycoconjugués. La synthèse de l'oligosaccharide se fait par branchement d'un résidu monosaccharidique à partir d'un substrat donneur activé. Les donneurs de monosaccharides sont de deux types :

- les dérivés glycosyl-nucléotidiques
- les glycolipides ou intermédiaires lipidiques, c'est le cas des Dol-P-Man, Dol-P-Glc, Dol-P-P-GlcNac₂,



Nous allons envisager dans les pages suivantes, la biosynthèse des principaux glycosyl-nucléotides dont l'intervention dans la biosynthèse des glycoconjugués représente une étape possible de régulation "en amont" de la glycosylation.

Dans le chapitre précédent, nous avons résumé les grandes voies de biosynthèse des glycoconjugués. Comment peut-on suivre expérimentalement cette biosynthèse des oligosaccharides des glycoprotéines et des glycolipides ?

Il existe plusieurs possibilités. Nous envisagerons dans ce chapitre deux voies fondées toutes les deux sur l'utilisation de monosaccharides radioactifs.

1 - La première nécessite l'emploi de monosaccharides radioactifs libres. On mesure, *in vivo*, l'incorporation de ces monosaccharides par les cellules et leur répartition au niveau des glycoconjugués. Mais les sucres libres ne sont pas les substrats pour les glycosyltransférases. En effet, un monosaccharide ne peut être transféré sur une glycoprotéine ou un glycolipide que par l'intermédiaire, nous l'avons vu, d'un glycosyl-nucléotide. Nous envisagerons dans les pages suivantes, le mode de synthèse des différents glycosyl-nucléotides et les conversions que peut subir un monosaccharide avant son activation sous forme de glycosyl-nucléotide.

2 - La seconde méthode consiste à utiliser, *in vitro*, les formes actives des sucres pour une réaction de glycosylation : les glycosyl-nucléotides.

Ici aussi de nombreuses modifications quant à la structure et à la configuration du monosaccharide peuvent survenir avant le transfert. C'est une de ces modifications qui a fait l'objet de nos travaux personnels, exposés ultérieurement.

III - LES GLYCOSYL-NUCLEOTIDES

Le terme glycosyl-nucléotide caractérise une classe de dérivés monosaccharides, dans laquelle le résidu glycosyl est lié à l'acide phosphorique d'un nucléotide par une liaison ester.

Le premier de ces composés qui a été isolé fut l'UDP-D-glucose (PALADINI et LELOIR : 1952). La structure de

ce composé donneur de glucose, est représentée sur la figure 13 - page 46 . Le rôle de ces glycosyl-nucléotides, comme donneurs de résidus glycosyl lors de la synthèse des glycoconjugués, a été démontré par les équipes de LELOIR, HASSID et ROSEMAN dans les années 60.

Leurs observations ont permis de mieux comprendre les mécanismes d'élaboration des glycoconjugués (voir chapitre précédent).

A - STRUCTURE ET VARIETE DES GLYCOSYL-NUCLEOTIDES

Après la découverte de l'UDP-D-glucose, de nombreux glycosyl-nucléotides ont été isolés à partir des microorganismes des cellules végétales et des cellules animales (voir les revues générales de FEINGOLD et NEUFELD : 1963). La diversité très grande (environ 90 glycosyl-nucléotides ont été trouvés à l'heure actuelle) de ces composés est due au :

1 - Type de nucléotide constituant le donneur

=====

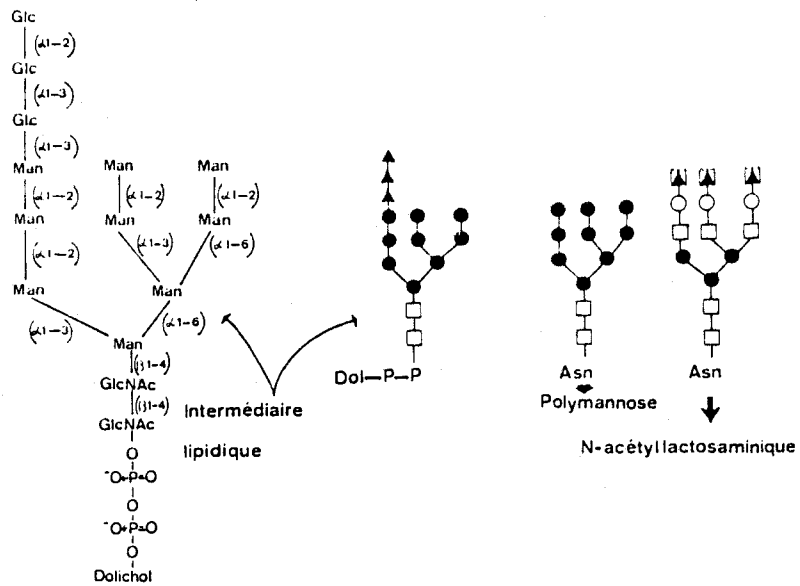


Figure 12 : Relations entre l'intermédiaire lipidique et les N-glycosylprotéines.

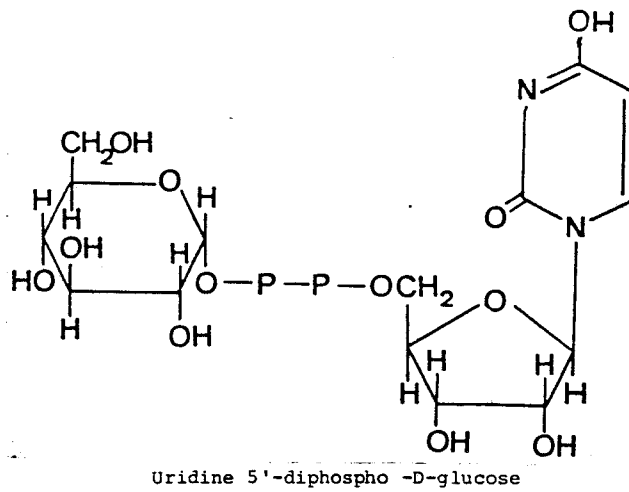


Figure 13 : Structure de l'UDP-D-glucose.

Les bases constituant le nucléotide sont généralement l'uracile, la guanine (CABIB et LELOIR : 1954 ; HEATH : 1960) et la cytosine (STROMINGER *et al.* : 1954 ; STROMINGER : 1959 ; BADDILEL *et al.* : 1956 ; COMB *et al.* : 1959), mais elles peuvent être aussi la thymine (OKAZAKI *et al.* : 1960) et l'adénine (PAZUR et SHADAKSHARASWAMY : 1961).

2 - Nombre de phosphates entre le nucléoside
=====

et le monosaccharide
=====

Dans le cas du donneur d'acide sialique, le nucléoside (la cytosine) est lié à l'acide N-acétylneuraminique par un phosphate (CMP - NeuAC) (COMB *et al.* : 1959 ; WARREN et BLACKLOW : 1962) tandis que pour les autres glycosyl-nucléotides, la liaison entre la base et le monosaccharide se fait par une liaison pyrophosphate.

3 - Type de monosaccharide lié au nucléoside
=====

phosphate
=====

En ce qui concerne le monosaccharide qui sera

transféré à partir du donneur, on a trouvé :

- des aldoses (hexoses, pentoses, desoxyhexoses, acides uroniques, 2 desoxyhexoses) ;
- des cétooses (D-fructose, acide N-acétylneuraminique).

L'anomérisation de la liaison entre le monosaccharide et le phosphate est de type α dans la plupart des cas à l'exception de celle du NeuAc dans le CMP-NeuAc et du Fuc dans le GDP-Fuc qui est de type β .

B - LA BIOSYNTHESE DES GLYCOSYL-NUCLEOTIDES :

"LES DEUX GRANDES POSSIBILITES"

1 - Synthèse à partir de monosaccharides simples

=====

A partir de monosaccharides simples, tels que le glucose, le mannose et le fructose, tous les glycosyl-nucléotides peuvent être synthétisés. Le carrefour métabolique de ces différentes synthèses est le fructose -6-phosphate. A partir

de ce composé, il existe en effet, trois voies réversibles qui permettent une interconversion des monosaccharides non liés à un nucléotide (Figure 14 - page 51).

La première voie conduit à la formation de l'UDP-D-glucose par l'intermédiaire du glucose -6-phosphate puis du glucose -1-phosphate.

Puis à partir de l'UDP-D-glucose, on a formation de nombreux autres glycosyl-nucléotides (UDP-D-xylose, UDP-L-arabinose, UDP-IdUA, UDP-GlcUA).

La deuxième voie conduit aux osamines et aux glycosyl-nucléotides dont le sucre est une osamine (N-acétylglucosamine, N-acétylgalactosamine, acide neuraminique).

La troisième voie, va permettre la synthèse du mannose-1-phosphate qui va lui-même être le point de départ de la synthèse du GDP-D-mannose et des divers glycosyl-nucléotides qui en dérivent.

Toutes ces voies métaboliques sont résumées sur
la figure 14 - page 51

2 - Biosynthèse des glycosyl-nucléotides à partir
=====

d'autres glycosyl-nucléotides
=====

a) - Biosynthèse du nucléotide
+++++

Les organismes vivants produisent à partir des
nucléosides des dérivés phosphorylés : les nucléotides.

Ces composés phosphorylés participent à de nombreux
processus enzymatiques (cofacteurs, acides nucléiques,
glycosyl-nucléotides).

b) - Biosynthèse du glycosyl-nucléotide
+++++

- mécanisme général :

Le mécanisme général de la réaction de synthèse
des glycosyl-nucléotides est illustré par la figure 15 -

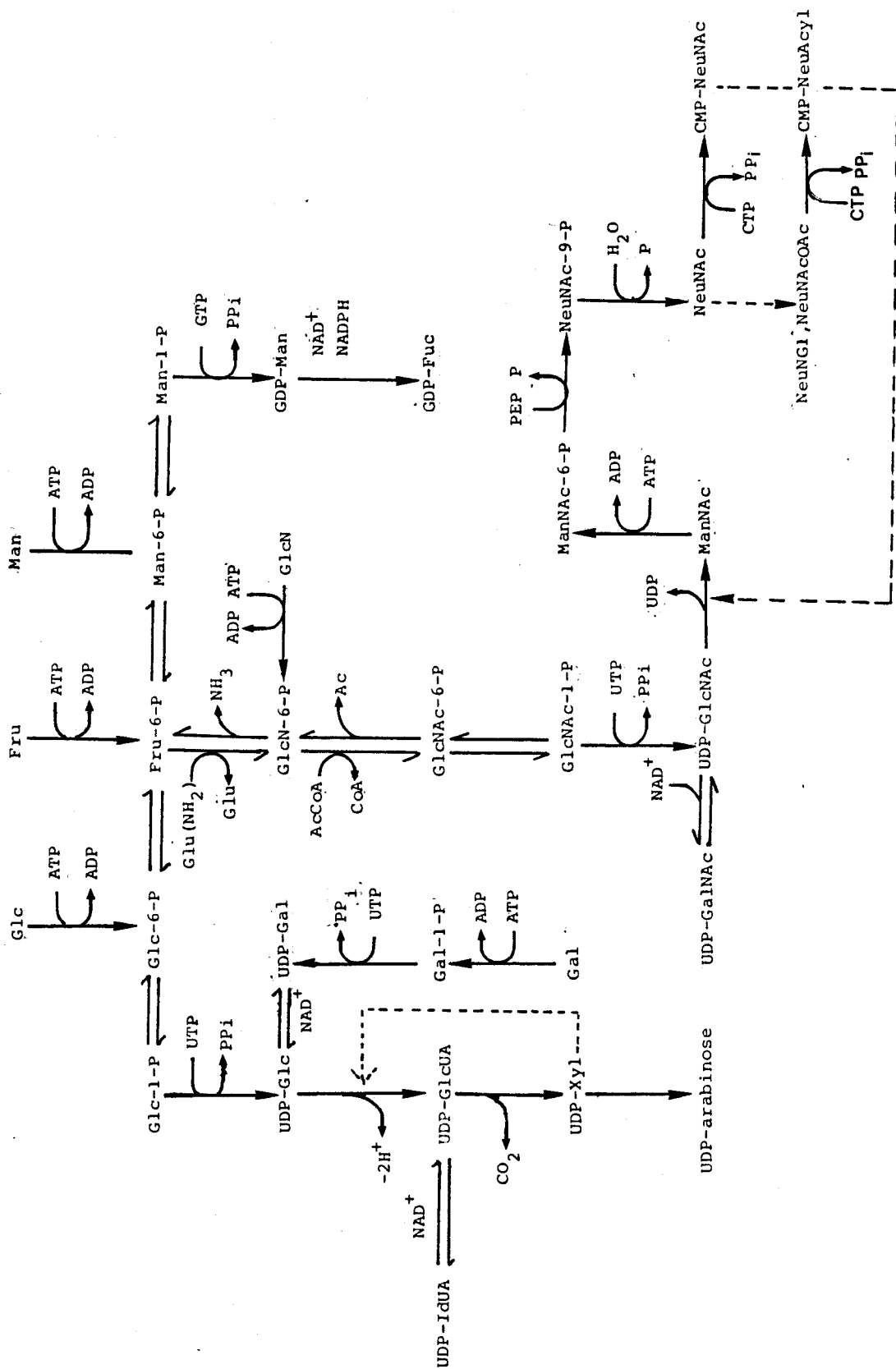


Figure 14 : Représentation schématique des différentes voies de synthèse des glycosyl-nucléotides.



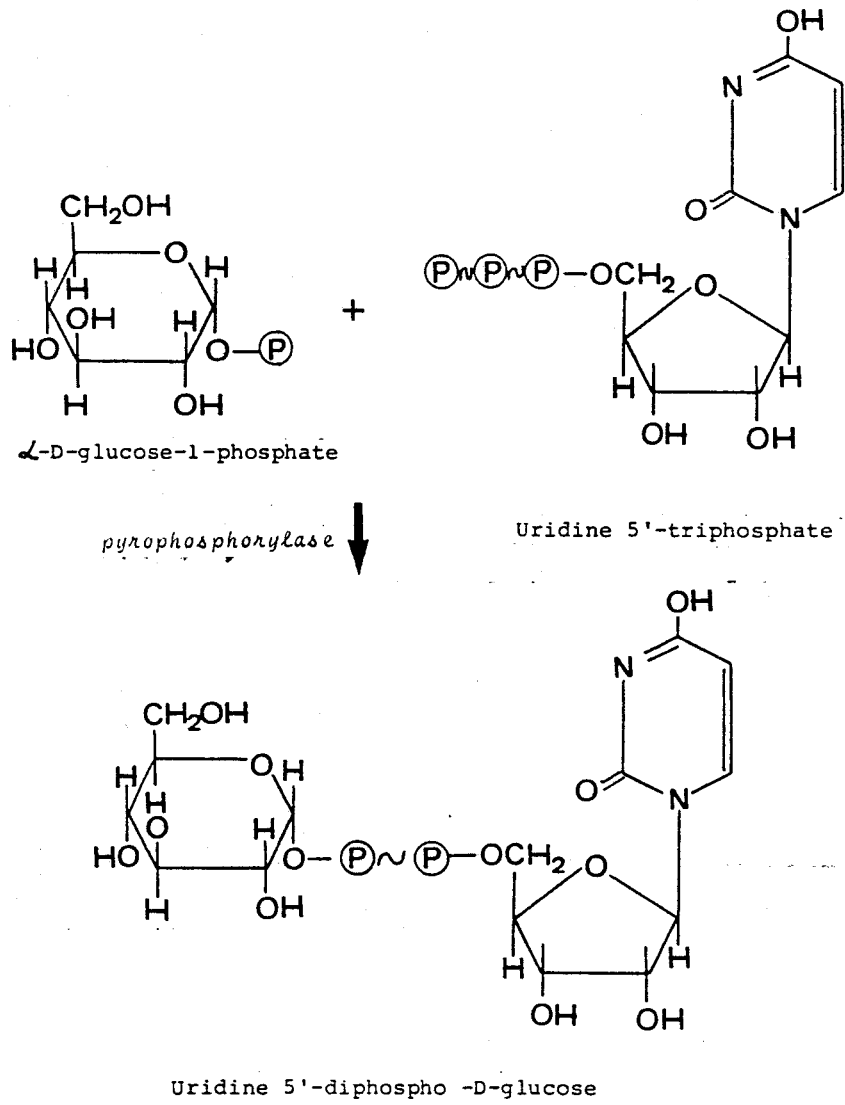


Figure 15 : Représentation de la réaction de formation
 de l'UDP-D-glucose.



page 52 par l'exemple de l'UDP-D-glucose (NEUFELD *et al.* : 1957 ; TURNER et TURNER : 1958 ; GINSBURG : 1958 ; VILLAR-PALASI et LARNER : 1960 ; OLIVER : 1961).

- Interconversions

La partie monosaccharidique des glycosyl-nucléotides peut subir de nombreuses transformations. Sur la figure 14 - page 51 , on a récapitulé les types majeurs de conversions des résidus glycosyl qui ont été décrits jusqu'à présent .

. Epimérisation

Les enzymes de type "épimérase" (MAXWELL et DEROBICHON-SZULMAJSTER : 1960) sont responsables des changements de nature des monosaccharides appartenant aux glycosyl-nucléotides. Le changement de nature affecte les quatre groupes hydroxyl du galactose, du glucose ou du xylose liés à l'uridine 5'-diphosphate. Des exemples d'épimérisations sont donnés sur la figure 16 - page 54 .

. Epimérisation et hydrogénation de l'alcool primaire

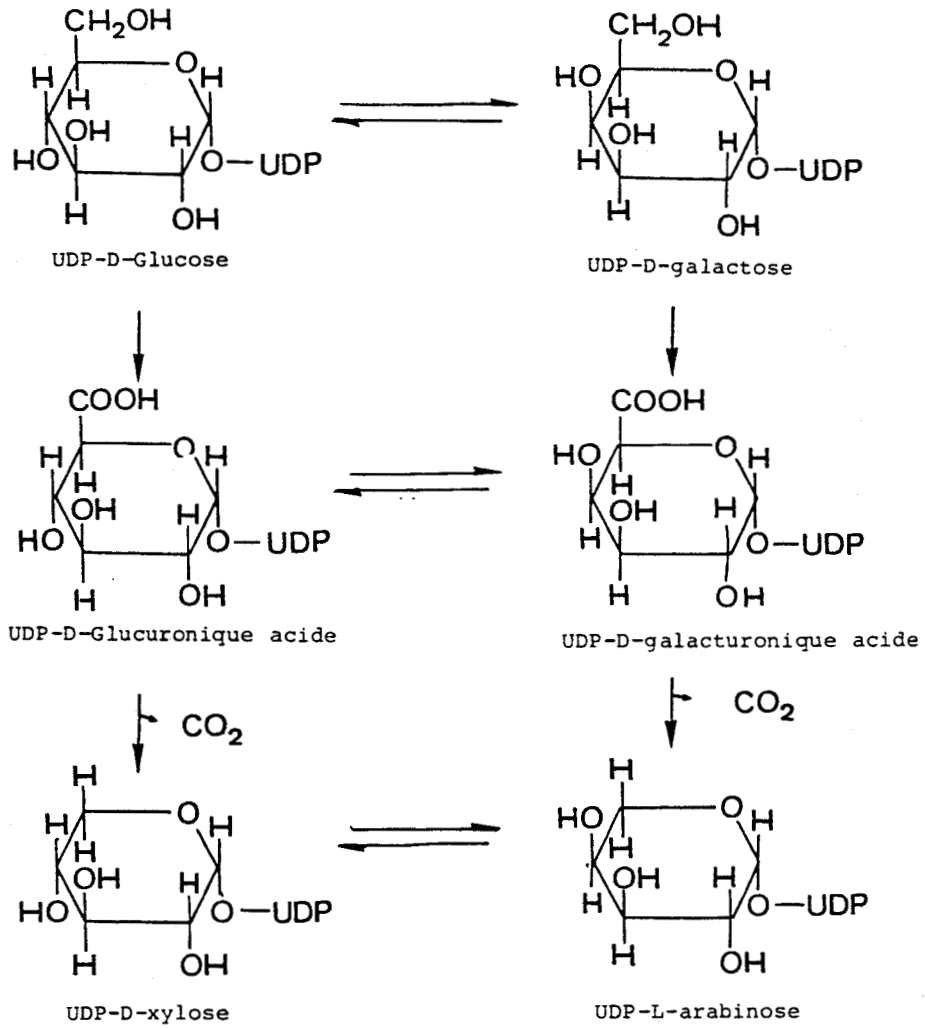


Figure 16 : Transformation de l'UDP-D-glucose.

Ce type de transformation a été décrit dans le cas de la conversion du GDP-D-mannose en GDP-L-fucose (GINSBURG : 1958) et du TDP-D-glucose en TDP-L-rhamnose (PAZUR et SHADAKSHARASWANY : 1961 ; PAZUR et SHUEY : 1961 ; GLASER et KORNFELD : 1961 ; OKAZAKI *et al.* : 1962). Cette réaction est la plus courante pour la formation des méthylpentoses. Le mécanisme de transformation du GDP-D-mannose en GDP-L-fucose sera envisagé plus spécialement dans le paragraphe page 58 .

- . Oxydation et décarboxylation du carbone 6 des hexoses.

Le D-glucose lié à l'uridine diphosphate peut être oxydé (avec la participation de cofacteurs) en acide glucuronique (STROMINGER et MAPSON : 1957). L'action d'une décarboxylase spécifique peut ensuite conduire à la formation de D-xylose (FEINGOLD *et al.* : 1960). Sur la figure 16 - page 54 , on a représenté avec l'épimérisation, ce type de modification.

. Echanges de sucres à partir de
sucres-1-phosphate

Ce type de conversion est très important pour l'entrée du D-galactose dans le métabolisme. Sur la figure 17 - page 59 , on voit les deux chemins possibles pour l'interconversion du D-galactose dans le métabolisme (voies I et II). Le galactose-1-phosphate est un élément commun à ces deux voies. Chez l'homme, la voie II qui est mineure, représente un chemin de remplacement en cas de déficience dans la série de réactions de la voie I.

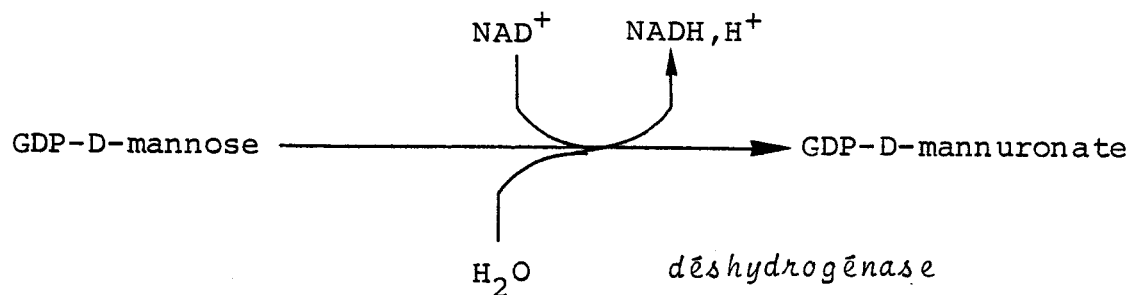
c) - Etude particulière de la conversion du
+++++

GDP-D-mannose
+++++

L'étude de la glycosylation des protéines, qui a débuté peu de temps après la découverte des glycosyl-nucléotides, a montré le rôle important de GDP-D-mannose dans la biosynthèse des glycoprotéines. Le GDP-D-mannose n'est pas seulement un donneur de résidus mannosyl, il est le point de départ après plusieurs modifications d'un certain nombre de monosaccharides.

- Conversion du GDP-D-mannose en GDP-D-mannuronate

Le surnageant d'un homogénat de cellules d'*Anthrobacter* est capable de transformer par une déshydrogénase, le GDP-D-mannose en GDP-D-mannuronate. L'oxydation du GDP-D-mannose nécessite la présence du cofacteur NAD^+ (PREISS et WOOD : 1964). La réaction est la suivante :



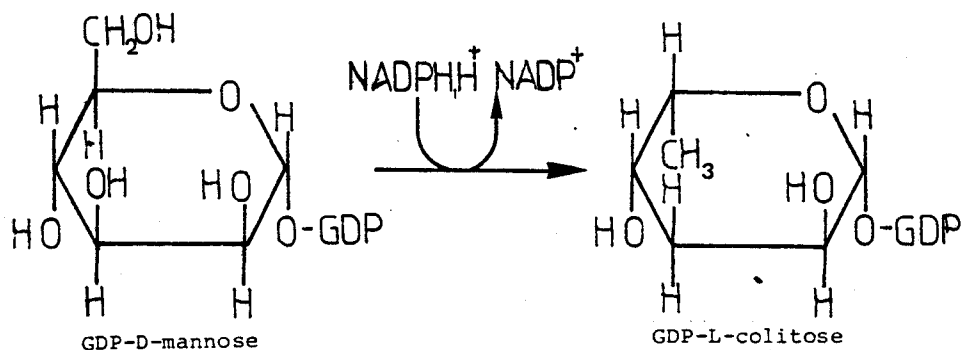
- Formation du GDP-D-rhamnose et du GDP-D-talométhyle à partir de GDP-D-mannose

Une préparation enzymatique qui catalyse la synthèse de GDP-D-rhamnose et de GDP-D-talométhyle à partir

de GDP-D-mannose a été isolée d'une bactérie du sol (MARKOVITZ : 1964). La figure 18 - page 59 , met en évidence que la conversion du GDP-D-mannose en GDP-D-rhamnose et en GDP-D-talométhyllose se fait par la formation d'un intermédiaire le GDP-4-céto-D-rhamnose qui sera ensuite réduit soit par le NADH, H^+ , soit par le NADPH, H^+ .

- Formation de GDP-L-colitose à partir de GDP-D-mannose

Un extrait enzymatique d'un mutant d'*Escherichia coli* déficient en UDP-D-galactose 4 épimérase, peut convertir le GDP-D-mannose en GDP-L-colitose. Cette réaction est fortement stimulée par le NADPH, H^+ (ELBEIN et HEATH : 1965).



- Formation du GDP-L-fucose à partir de GDP-D-mannose

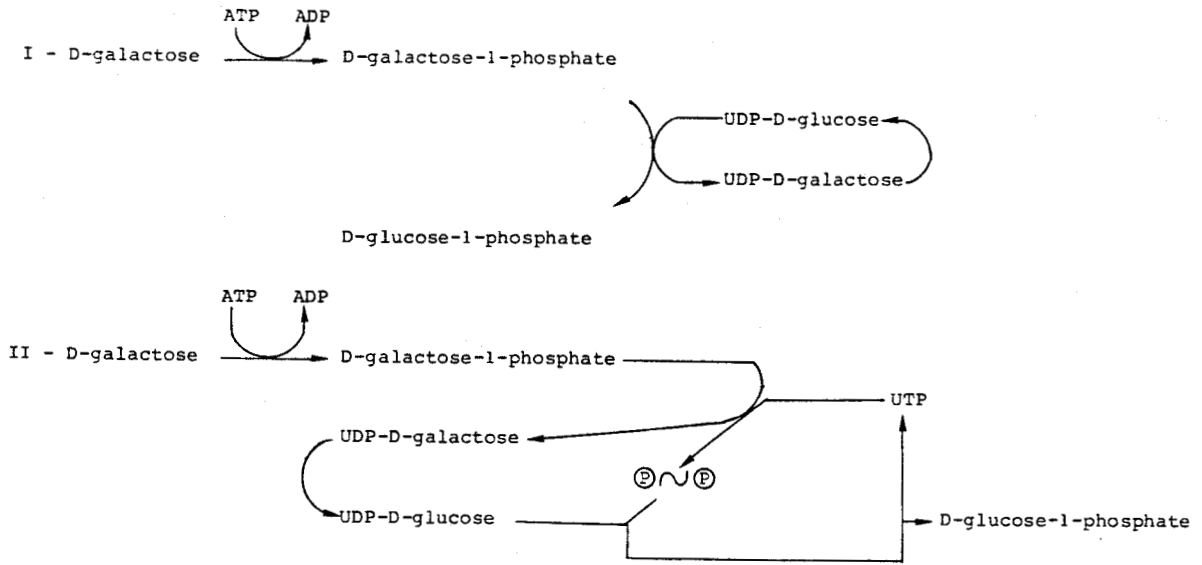


Figure 17 : Interconversion du D-galactose et du D-glucose.
.....

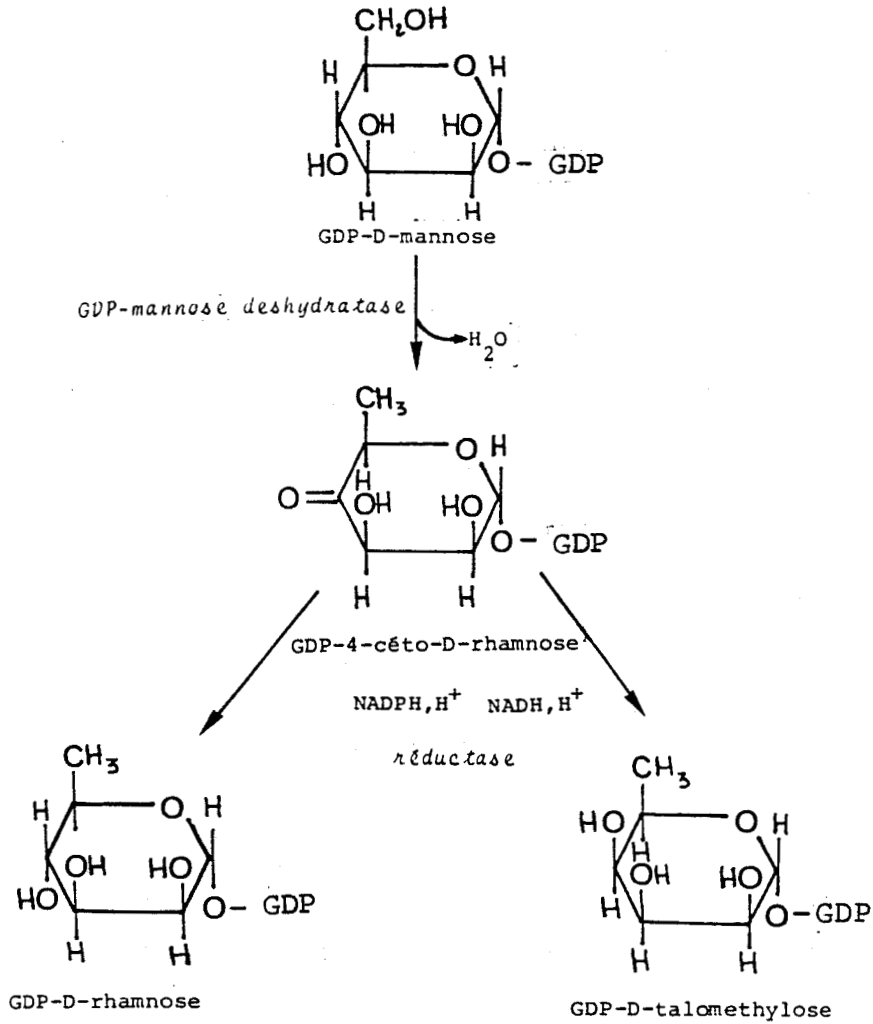


Figure 18 : Formation du GDP-D-rhamnose et du GDP-D-talom\^e
.....
à partir de GDP-D-mannose.

Ce cas particulier sera envisagé avec plus de détail, car il a fait l'objet de nos travaux personnels sur les ovocytes de *Perinereis cultrifera*.

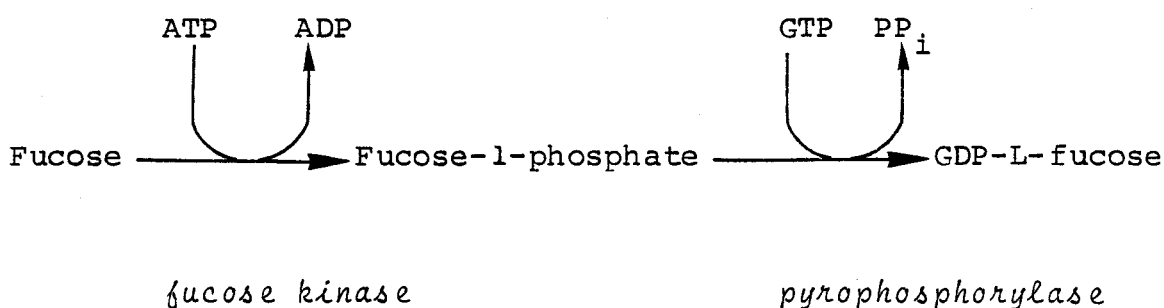
Le L-fucose (6-desoxy-L-galactose) est un monosaccharide que l'on trouve dans un grand nombre de glycoprotéines (GOTTSCHALK *et al.* : 1972) et de glycolipides (KOSCIELAK *et al.* : 1973 ; SLOMIANY *et al.* : 1974). Le résidu fucosyl est transféré sur ces glycoconjugués par des fucosyltransférases à partir du donneur, le GDP-L-fucose (BOSMAN *et al.* : 1968 ; CHESTER et WATKINS : 1969 ; SHEN *et al.* : 1968).

Deux voies de biosynthèse du GDP-L-fucose sont connues à l'heure actuelle (GINSBURG : 1966) :

- formation à partir de fucose-1-phosphate ;
- transformation du GDP-D-mannose en GDP-L-fucose.

. Formation de GDP-L-fucose à partir
de fucose-1-phosphate

SCHACHTER et ses collaborateurs utilisent un extrait enzymatique de foie de porc pour synthétiser du GDP-L-fucose à partir de fucose-1-phosphate. Le rendement de la réaction est d'environ 24 % (SCHACHTER *et al.* : 1972). Dans les glandes submaxillaires de porc, tissu qui produit une grande quantité de glycoprotéines riches en fucose (CARLSON : 1968), la synthèse du GDP-L-fucose se fait par la voie du fucose-1-phosphate (PROHASKA et SCHENKEL - BRUNNER : 1975).



Dans un extrait enzymatique de ces glandes, on a trouvé une haute activité fucose kinase et GDP-L-fucose pyrophosphorylase. De plus, l'absence totale dans les glandes submaxillaires de porc d'enzymes qui peuvent

métaboliser le fucose, le fucose-1-phosphate et le GDP-L-fucose, explique pourquoi le rendement des réactions de synthèse du GDP-L-fucose est de 100 %. Souvent, cette voie de biosynthèse du GDP-L-fucose est utilisée comme voie de sauvegarde en cas de non fonctionnement du système enzymatique capable de convertir le GDP-D-mannose en GDP-L-fucose. Ceci a été démontré récemment dans les lignées cellulaires de lymphomes de souris résistantes à la lectine de pois (REITMAN *et al.* : 1980).

. Transformation du GDP-D-mannose en
GDP-L-fucose

Le mécanisme de conversion du GDP-D-mannose en GDP-L-fucose a été examiné abondamment chez les bactéries (GINSBURG : 1960 ; GINSBURG : 1961). Cette voie métabolique a également été montrée dans divers tissus :

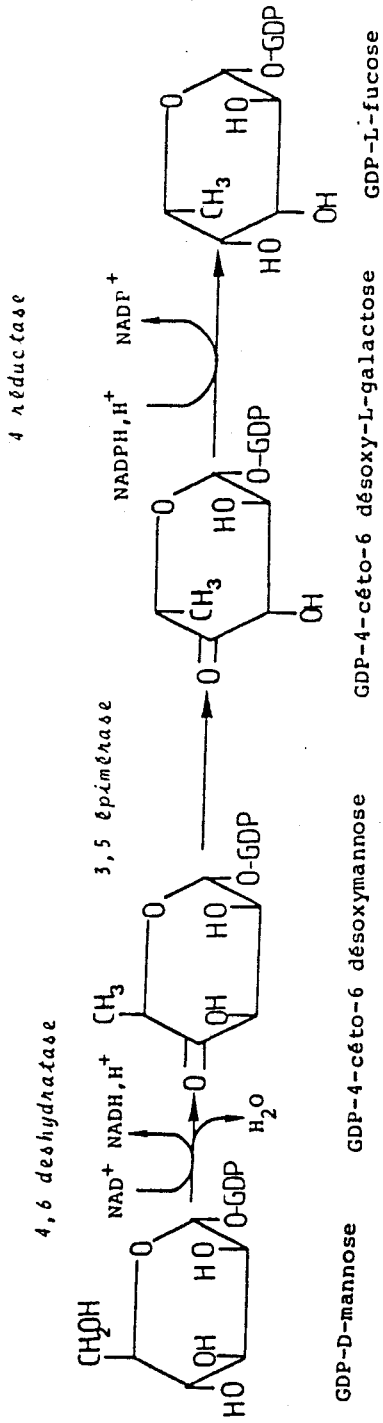
- dans certains tissus de lapins
(FOSTER et GINSBURG : 1961) ;
- dans le lait de brebis ;

- dans des cellules transformées (cellules de lymphomes de souris) (REITMAN *et al.* 1980).

De plus cette voie semble être présente dans tous les tissus et lignées cellulaires qui incorporent du fucose radioactif après incubation avec du mannose radioactif.

La série de réactions présumées, pour la transformation du GDP-D-mannose en GDP-L-fucose, a été décrite par GINSBURG (GINSBURG : 1961). Ces réactions sont représentées sur la figure 19 - page 64 . GINSBURG utilise un extrait enzymatique d'*Aerobacter aerogenes* pour convertir le GDP-D-mannose en GDP-L-fucose. Le taux de transformation ne dépasse pas 20 à 30 %.

L'ensemble de ces réactions est dépendant de deux cofacteurs : le NAD^+ et le NADPH, H^+ . Les travaux réalisés par KORNFELD, (KORNFELD et GINSBURG : 1966) sur divers



.....
 Figure 19 : Schéma des réactions présumées intervenant dans
 la formation du GDP-L-fucose à partir du GDP-D-mannose.



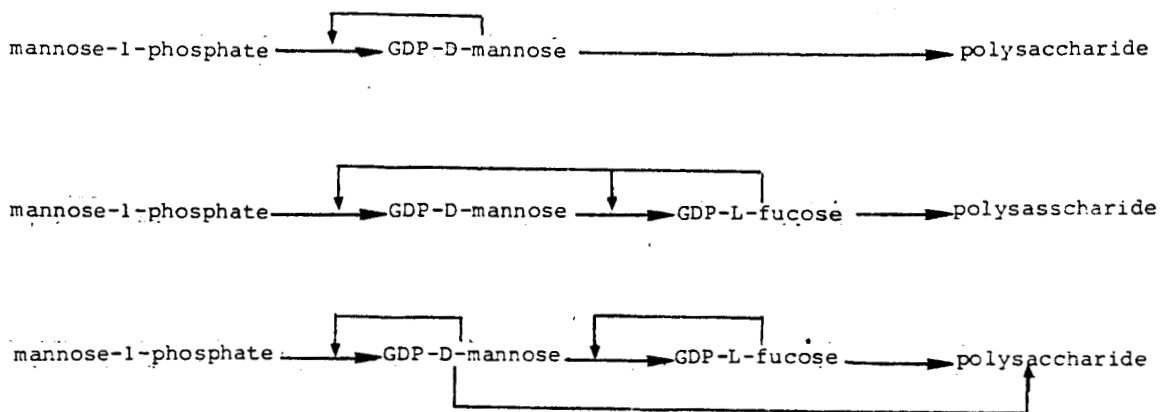
types de bactéries, montrent les divers points de contrôle de la biosynthèse du GDP-D-mannose et du GDP-L-fucose :

- chez les bactéries dont les polysaccharides contiennent du L-fucose mais pas de D-mannose, le GDP-L-fucose inhibe la GDP-D-mannose phosphorylase et la GDP-D-mannose hydrolyase ;
- chez les bactéries qui ont du D-mannose mais pas de L-fucose dans leurs polysaccharides, le GDP-D-mannose inhibe la GDP-D-mannose pyrophosphorylase ;
- chez les bactéries dont les polysaccharides contiennent du D-mannose et du L-fucose, le GDP-L-fucose inhibe le GDP-D-mannose hydrolyase et le GDP-D-mannose inhibe le GDP-D-mannose pyrophosphorylase.

Ces variations qui apparaissent comme des

contrôles par effet "feedback", permettent aux divers types de bactéries de réguler le taux de synthèse des glycosyl-nucléotides qui seront utilisés comme donneurs de monosaccharides durant la synthèse des polysaccharides.

Les trois types de régulations par effet "feedback" sont schématisés de la façon suivante :



CONCLUSION

A travers ces exemples, nous pouvons constater que lorsque nous suivons une réaction de transfert d'un

résidu glycosyl à partir d'un glycosyl-nucléotide, il faut toujours s'assurer de la nature du sucre qui est transféré. C'est au cours de l'un de ces contrôles, que nous avons mis en évidence la transformation du GDP-D-mannose par les ovocytes de *Perinereis cultrifera*. Cette étude nous a permis de montrer l'importance de ce système enzymatique dans le déclenchement du processus de fucosylation observé lors de la maturation ovocytaire.

TRAVAUX PERSONNELS

CHOIX DU MODELE EXPERIMENTAL

Nous avons vu que les ovocytes subissent, au cours de leur croissance, de profondes modifications. Ces modifications se traduisent surtout au niveau de la nature des glycoconjugués synthétisés et accumulés par les cellules reproductrices femelles (PORCHET *et al.* : 1977). Sous une influence hormonale faible ainsi que dans des conditions an hormonales, les glycoprotéines s'enrichissent en mannose et surtout en fucose et en xylose (PORCHET et SPIK : 1977). L'ovocyte apparaît donc comme un excellent modèle pour l'étude des activités glycosyltransférasiques et du contrôle éventuel de ces activités enzymatiques par l'hormone cérébrale. En effet, la différenciation cellulaire est caractérisée par l'apparition de glycoconjugués de type nouveau dans le cytoplasme, et par la modulation de leur taux au cours du temps. Presque tous les monosaccharides sont présents à chaque stade ovocytaire. Ce qui change au cours de l'ovogénèse, ce sont les quantités relatives de ces différents monosaccharides. Pour des ovocytes dont la taille dépasse 130 μm , le taux de méthyl pentoses (fucose) va augmenter dans de fortes proportions. Alors que lorsque la taille atteint 170 μm , les taux de tous les monosaccharides et de groupements sulfates augmentent considérablement. Ainsi durant la submaturité, il est observé le doublement du taux de monosaccharides neutres conjugués, d'acide glucuronique et de groupements sulfates. Dans le même temps, le taux d'hexosamines diminue de moitié. La présence de l'hormone cérébrale

semble être nécessaire à la synthèse du mannose et des hexosamines. L'incorporation des autres monosaccharides neutres, de l'acide glucuronique, ainsi que des groupements sulfates, se fait en absence d'hormone. Donc, le diamètre des ovocytes exprime parfaitement le degré de différenciation de l'ovocyte et par là même, il permet de connaître rapidement à quel taux d'hormone circulante est soumis l'animal.

MISE EN EVIDENCE DE LA TRANSFORMATION DU

GDP-MANNOSE EN GDP-FUCOSE PAR LES OVOCYTES

DE *PERINEREIS CULTRIFERA*

I - MESURE DE L'ACTIVITE MANNOSYLTRANSFERASIQUE

L'existence d'une activité mannosyltransférasique dans les ovocytes de *Perinereis cultrifera* a été montrée dans les conditions suivantes : une osmolarité de 300 milliosmoles en tampon cacodylate de sodium 0,1 M pH7,4 NaCl 0,154 M à des concentrations en ions bivalents $MnCl_2$ 2mM et $MgCl_2$ 5mM.

Dans ce chapitre, nous présentons les expériences qui nous ont permis de définir les conditions optimales de fonctionnement de la mannosyltransférase dans ces conditions standards d'incubation à 30°C. C'est à partir de ces expériences, et principalement lors du contrôle de l'intégrité du précurseur nucléotidique, que le phénomène de transformation du GDP-mannose a été mis en évidence.

A - EFFET DE LA CONCENTRATION EN GDP-MANNOSE

Le transfert de $[^{14}C]$ mannose à partir de GDP- $[^{14}C]$ -mannose sur les accepteurs endogènes a été mesuré avec un homogénat ovocytaire pendant 60 minutes à 30°C, dans les conditions standards et à différentes concentrations en GDP-mannose. Le taux de transfert est représenté sur la figure 20 page 71 . Dans tous les systèmes eucaryotes étudiés, on

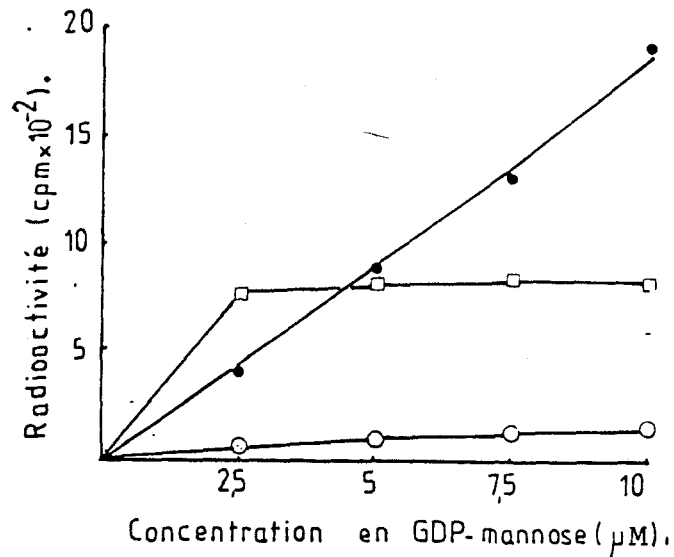


Figure 20 : Effet de la concentration en GDP-mannose sur le transfert de [¹⁴C] mannose par un homogénat ovocytaire de *Perinereis cultrifera*. Les incubations se font dans les conditions standards : 300 milliosmoles en tampon cacodylate de sodium 100 mM pH7,4, NaCl 154 mM, à des concentrations en ions bivalents MnCl₂ 2mM et MgCl₂ 5mM à 30°C pendant 60 minutes. L'incorporation de la radioactivité est mesurée dans les différentes phases obtenues après extraction séquentielle des intermédiaires lipidiques (voir appendice technique).
Incorporation mesurée sur les protéines ●—● ; dans la phase "chloroforme/méthanol" □—□ ; dans la phase "chloroforme/méthanol/eau" ○—○.

retrouve dans la phase "chloroforme/méthanol", les intermédiaires lipidiques tels que les Man-P-Dol, les Glc-P-Dol et les N, N' diacétychitobiose-P-P-Dol. La phase "chloroforme/méthanol/eau" contient les oligosaccharides-P-P-Dol. Lorsque l'on fait un marquage à partir de GDP- $[^{14}\text{C}]$ mannose, on visualise ainsi la formation de $[^{14}\text{C}]$ Man-P-Dol dans la phase "chloroforme/méthanol" et des oligosaccharides-P-P-Dol marqués au $[^{14}\text{C}]$ Man dans la phase "chloroforme/méthanol/eau".

Dans notre cas à partir d'une concentration de 2,5 μM en GDP- $[^{14}\text{C}]$ mannose, l'incorporation de $[^{14}\text{C}]$ mannose dans les produits extraits dans la phase "chloroforme/méthanol" reste constante. Alors que l'incorporation de $[^{14}\text{C}]$ mannose dans les protéines et la phase "chloroforme/méthanol/eau" continue à croître quelle que soit la concentration en GDP-mannose. En se fondant sur une analogie avec le système eucaryote, cette stabilisation de l'incorporation dans la phase "chloroforme/méthanol" à partir de 2,5 μM peut être expliquée de la façon suivante. Les produits extraits sont en perpétuel renouvellement et par ce mécanisme de "Turn Over", ils sont métabolisés et retrouvés dans la phase "chloroforme/méthanol/eau", puis dans les protéines. Ceci peut être confirmé par l'augmentation d'incorporation mesurée sur les protéines et dans la phase "chloroforme/méthanol/eau".

Dans les expériences suivantes, nous utiliserons une concentration en GDP-mannose de 10 μM .

B - ETUDE CINÉTIQUE

L'étude cinétique de l'incorporation de mannose à partir de GDP-mannose sur les accepteurs endogènes a été mesurée sur un homogénat d'ovocytes à 30°C dans les conditions standards. La figure 21 page 75 représente cette incorporation de $[^{14}\text{C}]$ mannose en fonction du temps d'incubation. Le taux de transfert mesuré sur les protéines croît linéairement entre 30 minutes et 60 minutes d'incubation. La courbe d'incorporation de $[^{14}\text{C}]$ mannose dans les protéines présente une allure biphasique.

Aucune explication n'a pu être donnée à ce phénomène. La stabilité de l'incorporation dans la phase "chloroforme/méthanol/eau" quel que soit le temps d'incubation peut s'expliquer par le fait que les produits contenus dans cette phase sont en continuel renouvellement.

Dans le cas des ovocytes de *Perinereis cultrifera*, un marquage à partir de GDP- $[^{14}\text{C}]$ mannose conduit à des produits radioactifs extraits dans les phases "chloroforme/méthanol", "chloroforme/méthanol/eau" et incorporés dans les protéines.

A quoi correspond cette radioactivité ? Sommes-nous en présence du même type d'intermédiaires lipidiques que ceux que l'on rencontre lors de la synthèse des N-glycosylprotéines de la plupart des cellules eucaryotes étudiées ?

Quelque soit la nature des produits retrouvés dans les ovocytes de *Perinereis cultrifera*, il serait intéressant de les caractériser afin de replacer la biosynthèse des N-glycosylprotéines des Néreïs dans un contexte évolutif.

II - TRANSFORMATION DU GDP-MANNOSE EN GDP-FUCOSE

A - CONTROLE DE LA DEGRADATION DU GDP-MANNOSE

La mesure correcte des réactions des glycosyltransférases nécessite de vérifier que l'on a toujours suffisamment de substrat. Or par le jeu des pyrophosphatases et des phosphatases (SPIK *et al.* : 1978), les glycosyl-nucléotides peuvent être dégradés au cours de l'incubation.

Il convient ici de vérifier l'intégrité du GDP-mannose par analyse chromatographique des produits libérés dans la phase aqueuse au cours de l'extraction des accepteurs endogènes.

La dégradation du GDP-mannose est suivie selon la technique décrite dans l'appendice technique.

Le profil chromatographique des produits extraits dans les phases aqueuses obtenues lors de l'extraction séquentielle des intermédiaires lipidiques et après les différents temps d'incubation fournit des résultats difficiles à analyser.

La figure 22 - page 75 représente le profil chromatographique des produits obtenus après extraction de la phase aqueuse d'une incubation de 90 minutes à 30°C d'un homogénat ovocytaire. Au préalable, nous avons vérifié que dans ce milieu d'incubation le GDP-mannose ne subit aucune dégradation chimique.

Après chromatographie, des produits mineurs identiques aux témoins GDP- $[^{14}\text{C}]$ mannose, au mannose-1-phosphate, au mannose, sont retrouvés. Mais l'essentiel de la radioactivité se retrouve dans trois produits ne migrant avec aucun des témoins utilisés pour la chromatographie.

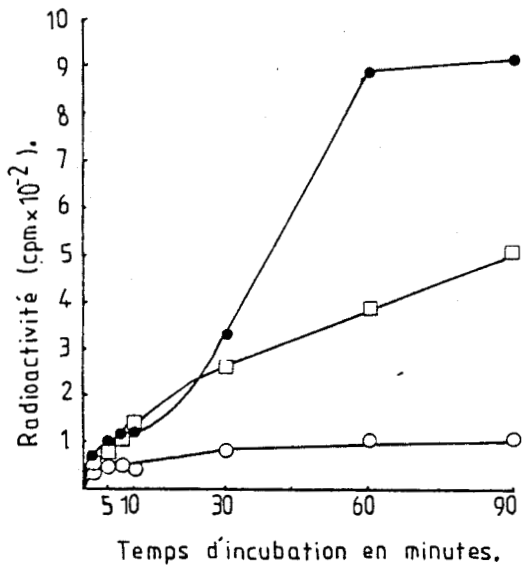


Figure 21 :

.....

Etude cinétique de l'incorporation de $[^{14}\text{C}]$ mannose à partir de GDP- $[^{14}\text{C}]$ mannose dans les protéines ●—●; dans les produits extraits dans la phase "chloroforme/méthanol" □—□; dans les produits de la phase "chloroforme/méthanol/eau" ○—○. Les incubations sont réalisées dans les conditions standards à 30°C en présence de tampon cacodylate de sodium 100 mM pH7,4 ; NaCl 154 mM, en ions bivalents MnCl_2 2mM et MgCl_2 5 mM pour une concentration en GDP-mannose de 10 μM .

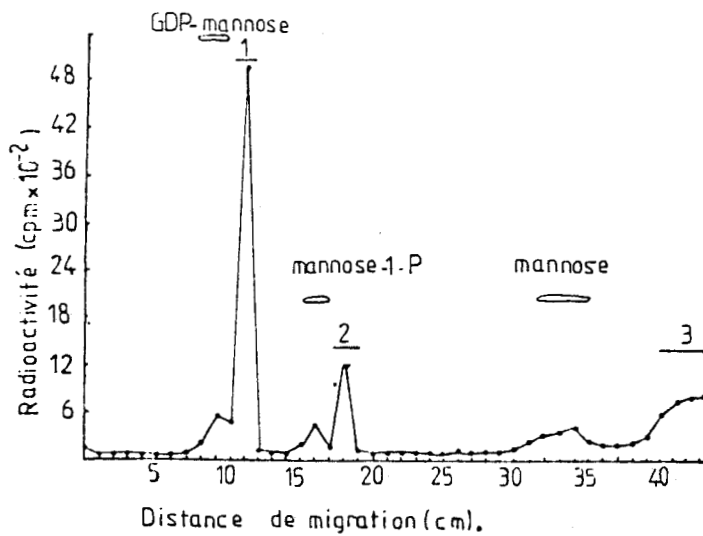


Figure 22 :

.....

Comportement chromatographique des produits contenus dans la phase aqueuse, sur papier Whatman 3 dans le système solvant A : pyridine/ acétate d'éthyle/acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3). La phase aqueuse est obtenue dans les premières étapes de l'extraction séquentielle des intermédiaires lipidiques (voir appendice technique). Le précurseur utilisé est le GDP-mannose et est à une concentration de 10 μM dans le milieu d'incubation standard.

Quelle est la nature de ces composés notés 1, 2 et 3 sur la figure 22 ?

Les résultats exprimés sur la figure 23 page 77 nous permettent de répondre partiellement à la question posée.

Lors du contrôle de la dégradation du GDP-mannose aux différents temps d'incubation en présence d'un homogénat oocytaire, nous nous apercevons que plus le temps d'incubation est long plus on retrouve de la radioactivité liée au produit 1 (voir figure 22 et figure 23 page 75-77). Après 10 minutes d'incubation, on ne détecte plus que 8 % de GDP-mannose dans la phase aqueuse. Comment peut-on expliquer une telle disparition du précurseur qui est par ailleurs concomitante à l'apparition du produit 1 ?

- le produit 1 n'est pas un produit de dégradation du GDP-mannose car il migre moins vite que le mannose-1-phosphate et le mannose.
- ce n'est pas non plus une macromolécule car dans ce système solvant, les macromolécules ne migrent pas.

La suite de nos travaux aura pour but : l'analyse de ce nouveau produit formé au détriment du GDP-mannose.

B - PREMIERE APPROCHE DANS LA DETERMINATION DE LA

 NATURE DU PRODUIT FORME

Après 90 minutes d'incubation, le GDP-mannose est légèrement dégradé en mannose-1-phosphate et en mannose (Figure 22). Dans un premier temps, nous allons essayer de bloquer la dégradation du précurseur nucléotidique en sucre-1-

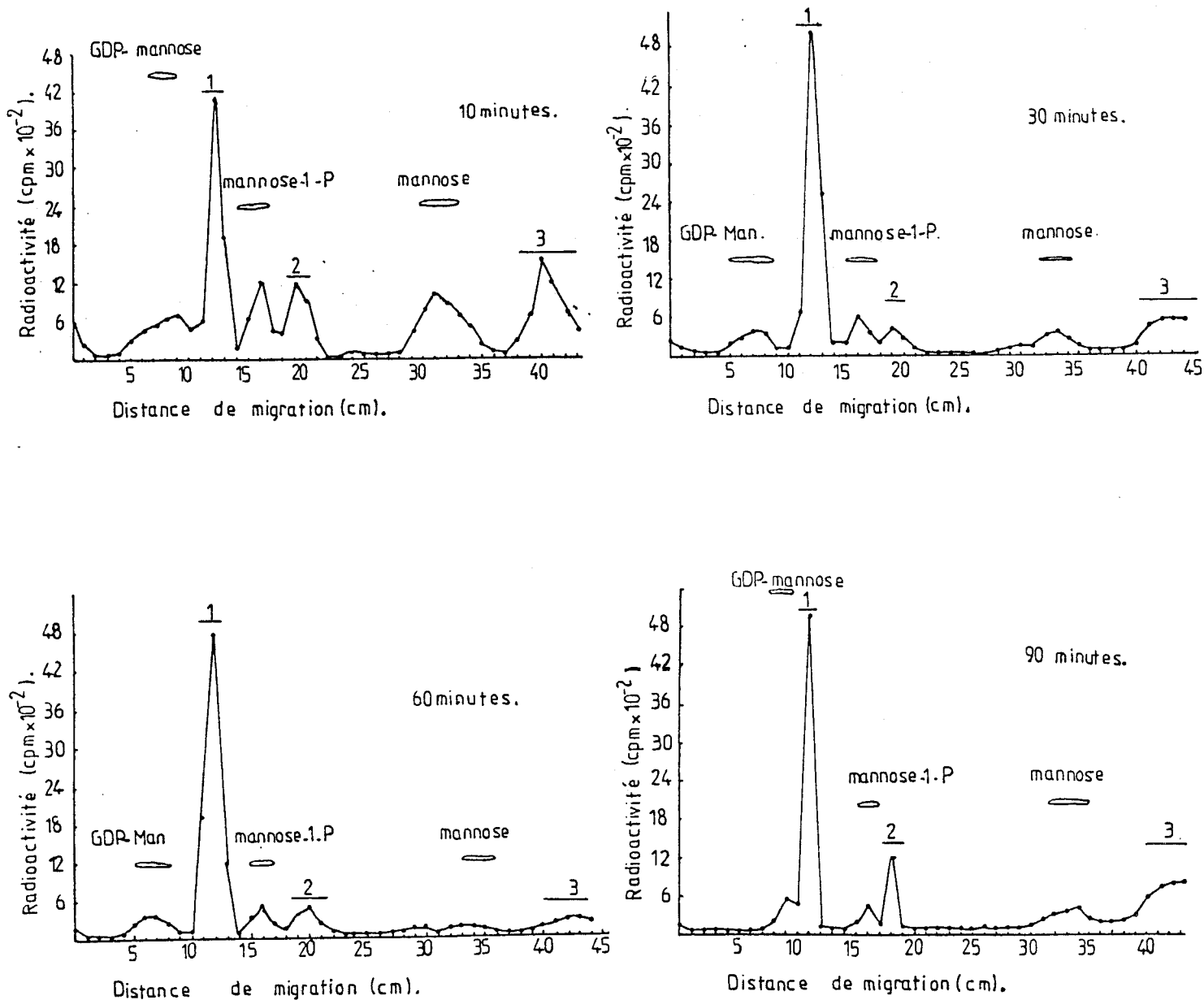


Figure 23 : Comportement chromatographique des produits retrouvés dans la phase aqueuse après 10, 30, 60 et 90 minutes d'incubation dans les conditions standards à 30°C en présence d'un homogénat ovocytaire. La concentration en GDP-mannose présente dans les incubations est de 10 μ M. La chromatographie a lieu sur papier Whatman 3 dans le système solvant A : pyridine/acétate d'éthyle/acide acétique/eau (5 ; 5 : 1 : 3).



phosphate et en sucre libre, au moyen de l'adénosine monophosphate ou AMP.

1 - Effet de l'AMP sur la dégradation du GDP-mannose
 =====

La figure 24 page 79 représente l'effet de l'AMP 10 mM sur la dégradation du GDP-mannose. Les incubations sont réalisées dans les conditions standards 90 minutes à 30°C. A une concentration en AMP de 10 mM (Figure 24 B), par rapport à un témoin sans AMP (Figure 24 A), il ne se forme pratiquement plus ni mannose-1-phosphate, ni mannose. Cela signifie que l'action des phosphatases et des pyrophosphatases est bloquée en présence de 10 mM d'AMP.

Il faut signaler également que l'AMP à 10 mM est sans effet sur les mannosyltransférases et qu'il y a toujours disparition du GDP-mannose et apparition du produit 1. Par contre en présence d'AMP 10 mM, les produits 2 et 3 ont disparu. Ceci suggère qu'il s'agit de produits de dégradation du produit 1, dégradation provoquée par les phosphatases et les pyrophosphatases. Dans les expériences suivantes, les conditions d'incubation seront les conditions standards auxquelles on ajoutera de l'AMP 10 mM afin de bloquer la dégradation du glycosyl-nucléotide.

A partir de l'étude de la dégradation du GDP-mannose en fonction du temps d'incubation, nous avons mis en évidence un produit nouveau provenant certainement d'une transformation du GDP-mannose.

Ce produit migrant dans la "zone" des glycosyl-nucléotides, il était donc envisageable de considérer que ce

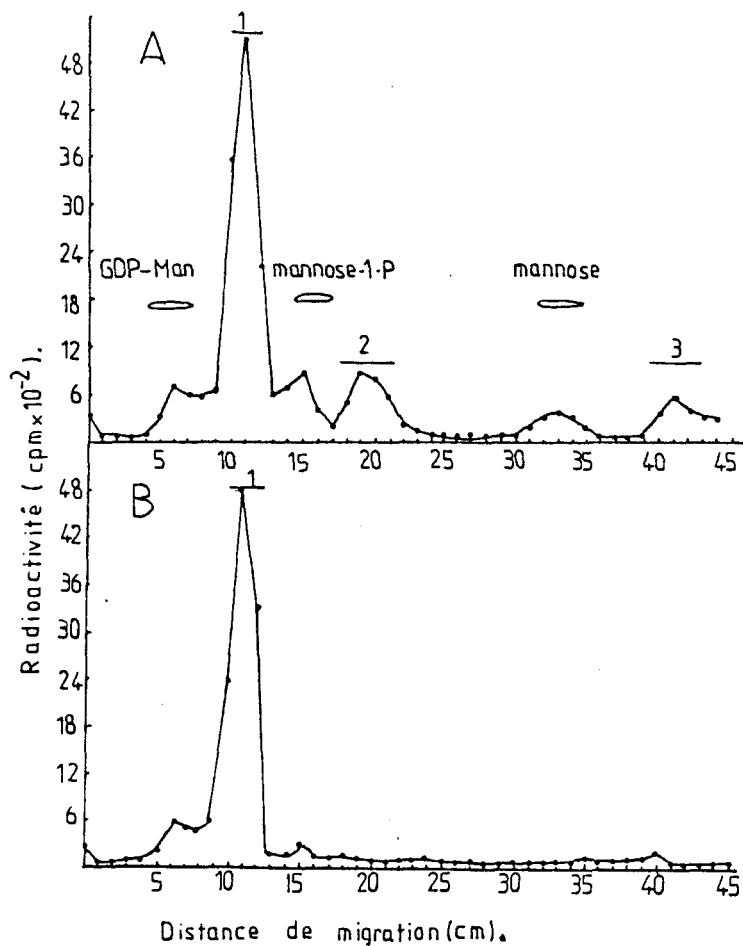


Figure 24 : Comportement chromatographique des produits extraits dans la phase aqueuse après un marquage à partir de GDP- [¹⁴C] mannose, dans des milieux d'incubation standards contenant ou non 10 mM d'AMP. La chromatographie a lieu sur papier Whatman 3 dans le système solvant A : pyridine/acétate d'éthyle/acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3).

A - Les incubations sont réalisées dans les conditions standards pendant 90 minutes sans AMP.

B - Les incubations se font en présence de 10 mM d'AMP pendant 90 minutes.



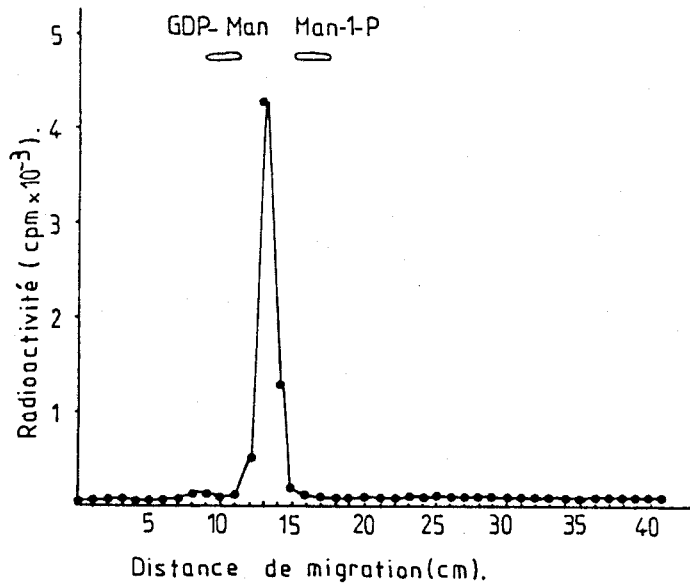


Figure 25 : Comportement chromatographique sur papier Whatman 3 dans le système solvant A : pyridine/acétate d'éthyle / acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3) après 20 heures de migration des produits extraits dans la phase aqueuse obtenue après extraction séquentielle des intermédiaires lipidiques. Les incubations se font à 30°C pendant 60' minutes, elles sont réalisées en tampon cacodylate de sodium 100 mM pH 7,4 ; NaCl 154 mM, MnCl₂ 2 mM, MgCl₂ 5mM, AMP 10 mM, GDP-mannose 10 μM.

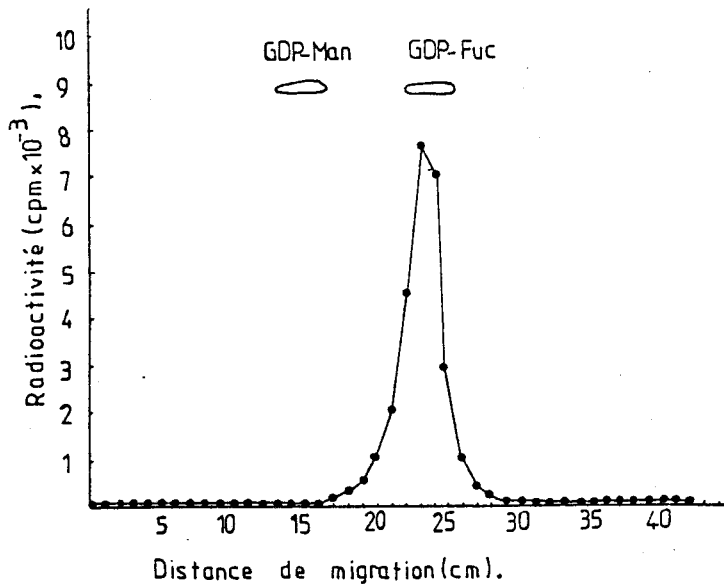


Figure 26 : Comportement chromatographique des produits du métabolisme du GDP-mannose retrouvés dans les phases aqueuses obtenues après extraction séquentielle des intermédiaires lipidiques. La chromatographie est effectuée sur papier Whatman 3 dans le système solvant B : acide isobutyrique/ammoniaque 1 N (5 : 3). Le milieu d'incubation est celui décrit dans la légende de la figure 25.

Dans ces conditions de chromatographie, le produit 1 migre une fois et demie plus rapidement que le GDP-mannose. Ce système solvant sera désormais utilisé pour leur séparation.

C - DETERMINATION DE LA NATURE DU PRODUIT DE LA

 TRANSFORMATION DU GDP-MANNOSE

Dans l'appendice technique, nous avons résumé les différentes étapes qui permettent de préparer en quantité suffisante le produit 1 pour en étudier sa structure.

En bref, après incubation, le produit est purifié par chromatographie sur papier dans le système solvant B décrit précédemment et par chromatographie d'adsorption sur charbon activé.

1 - Détermination du spectre d'absorption en lumière
 =====
 ultraviolette
 =====

La figure 27 page 83 représente le spectre d'absorption du composé provenant de la transformation du GDP-mannose. On remarque qu'il est semblable au spectre d'absorption du témoin GDP-mannose et qu'il possède les caractéristiques d'un composé contenant un résidu guanidyl (maximum égal à 256 nm et épaulement à 276 nm). Le tableau III page 83 représente les valeurs théoriques et expérimentales des différents rapports de longueurs d'ondes caractéristiques du GDP. Ainsi au cours de la transformation du GDP-mannose par un homogénat ovocytaire, la partie nucléotidique ne semble pas subir de modification et reste donc GDP. Seule la partie monosaccharidique semble avoir été modifiée. Il reste à déterminer la nature de cette nouvelle partie glucidique.

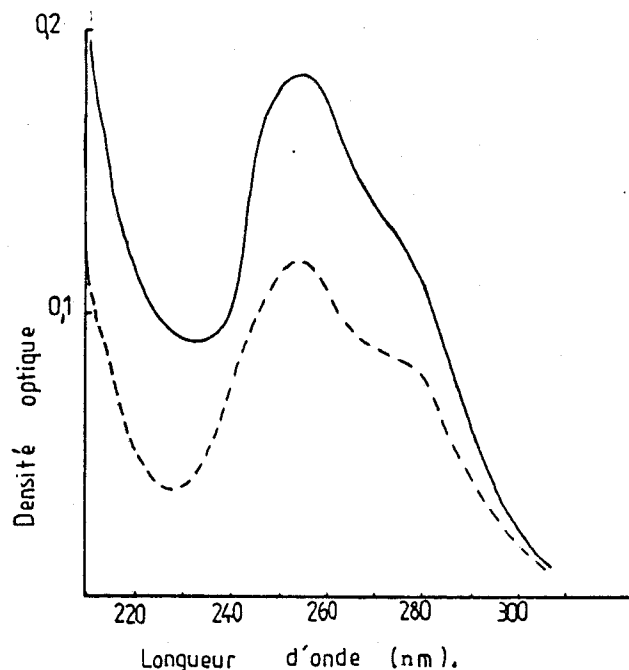


Figure 27 : Spectre d'absorption en lumière ultraviolette
 du témoin GDP-mannose {----} et du produit du métabolisme du GDP-mannose obtenu après incubation dans un milieu réactionnel standard en présence d'une solution enzymatique partiellement purifiée (—). Le produit à analyser a été purifié suivant la technique décrite dans l'appendice technique.

Tableau III : Comparaisons des rapports des densités optiques à différentes longueurs d'onde : du GDP témoin (Théo) et du composé provenant de la conversion du GDP-mannose. Conversion qui a lieu en présence d'une source enzymatique partiellement purifiée et dans des incubations standards (Exp).

	Théo	Exp
DO $\frac{250}{260}$	1,15	1,16
DO $\frac{280}{260}$	0,67	0,6
DO $\frac{290}{260}$	0,275	0,26



2 - Détermination de la structure du monosaccharide
=====

lié au GDP et provenant de la transformation du
=====

GDP-mannose
=====

a) - Analyse du comportement chromatographique du
+++++

monosaccharide libéré par hydrolyse acide
+++++

La première méthode que nous avons utilisé pour déterminer la nature du monosaccharide libéré après hydrolyse acide du produit 1, a consisté à analyser son comportement chromatographique.

Les systèmes de chromatographie utilisés sont les suivants :

- chromatographie descendante sur papier Whatman 3 dans le système solvant A.
- chromatographie ascendante sur couche mince dans le système solvant D (les conditions de chromatographie sont expliquées dans l'appendice technique).

Après 60 minutes d'incubation à 30°C dans les conditions standards, la réaction est arrêtée et la phase aqueuse extraite est chromatographiée après hydrolyse acide.

Les deux profils chromatographiques sont représentés sur la figure 28 A page 85 pour la chromatographie sur papier Whatman 3 et sur la figure 28 B page 85 pour la chromatographie sur couche mince.

Trois produits sont séparés et migrent respectivement comme les témoins mannose, fucose et rhamnose. La présence du

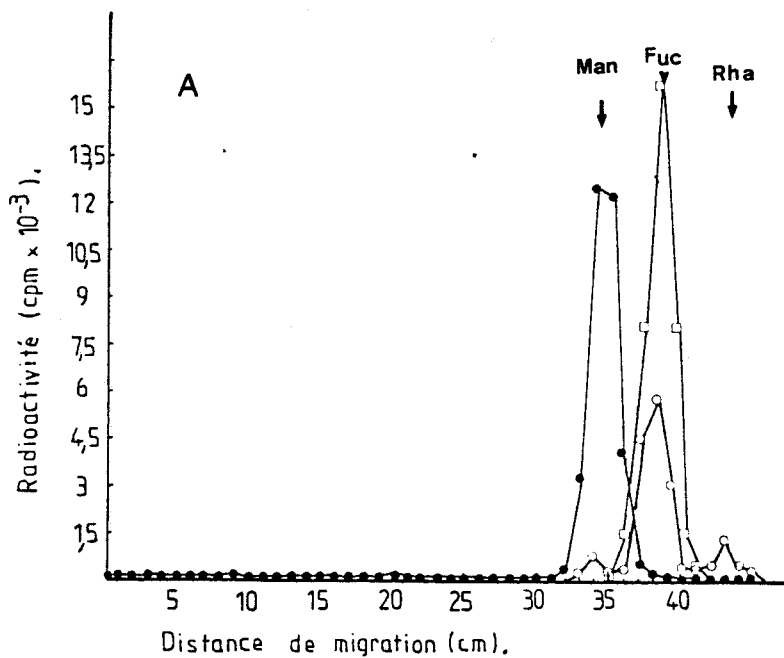
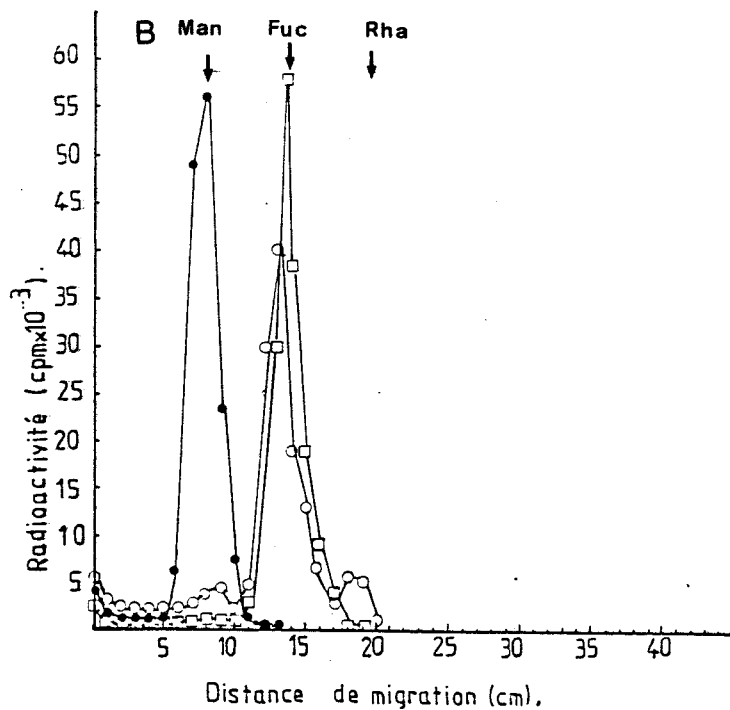


Figure 28

Comportement chromatographique des monosaccharides libérés après hydrolyse acide des produits provenant du métabolisme du GDP-mannose en présence d'un homogénat ovocytaire. Les incubations sont réalisées dans les conditions standards, c'est à dire en tampon cacodylate de sodium 100 mM pH 7,4, NaCl 154 mM, $MnCl_2$ 2mM, $MgCl_2$ 5mM, AMP 10 mM, GDP-mannose 10 μ M à 30°C pendant 60 minutes. Comportement chromatographique : du $[^{14}C]$ mannose libéré après hydrolyse acide de GDP- $[^{14}C]$ mannose témoin ●—● ; du $[^{14}C]$ fucose libéré après hydrolyse acide du GDP- $[^{14}C]$ fucose témoin □—□ ; des monosaccharides libérés après hydrolyse acide des produits résultant de la conversion du GDP- $[^{14}C]$ mannose en présence d'un homogénat ovocytaire ○—○.



A - Comportement chromatographique sur papier Whatman 3 dans le système solvant A : pyridine/acétate d'éthyle/acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3) pendant 8 heures.

B - Comportement chromatographique sur couche mince dans le système solvant D : butanol/acétone/eau (4 : 5 : 1) pendant 3 heures.



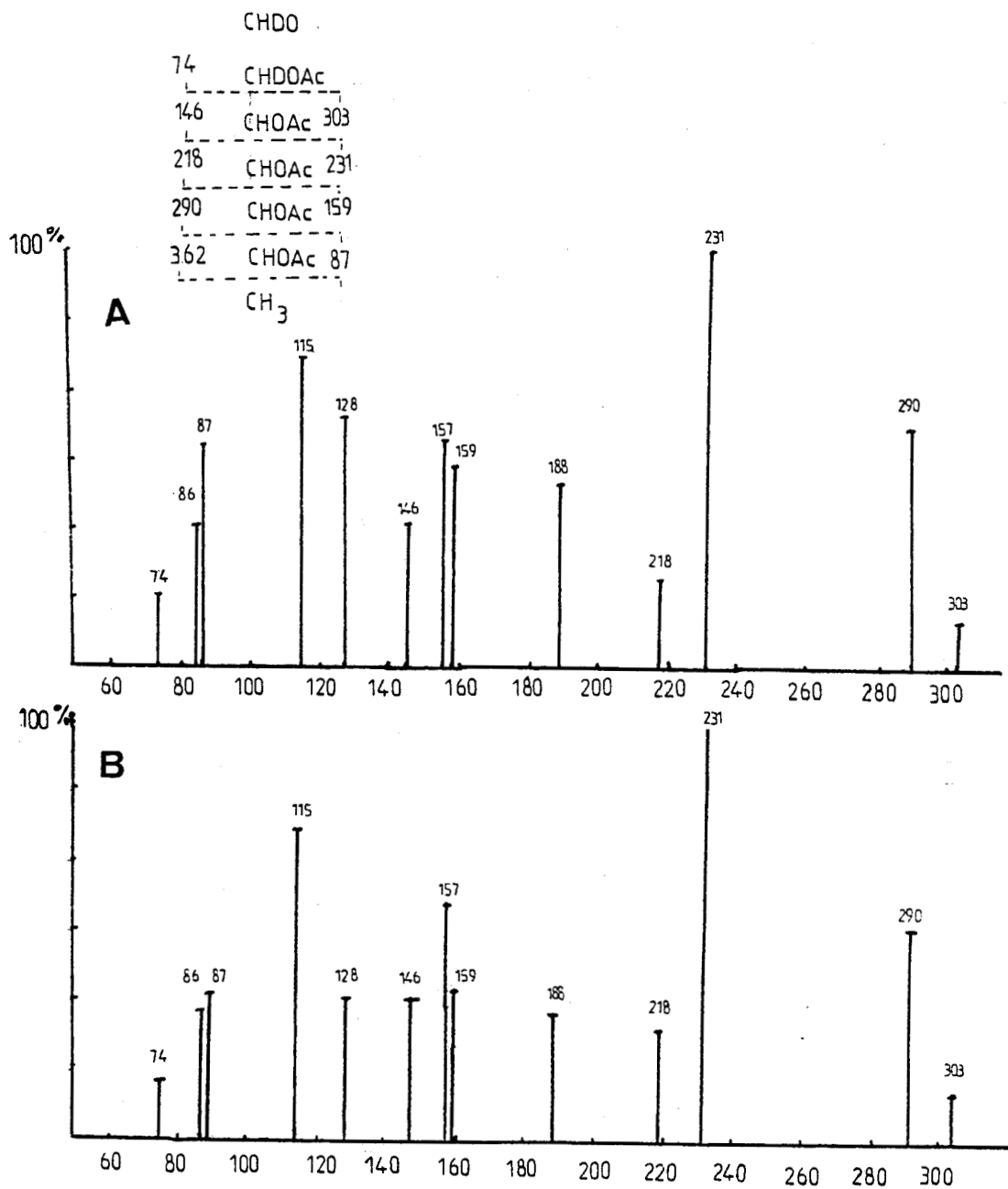


Figure 29 : Analyse en spectrométrie de masse :

A - du dérivé péricétylé du fucitol témoin.

B - du dérivé obtenu après réduction chimique au BD_4K et hydrolyse acide du produit de la conversion du GDP-mannose lors d'incubations standards en présence d'une solution enzymatique partiellement purifiée.



* Nous remercions particulièrement Monsieur Gérard STRECKER et Monsieur Jean-Claude MICHALSKI qui nous ont aidé à réaliser cette étude et ont interprété les spectres obtenus.

d'affirmer que le produit 1 provenant de la transformation du GDP-mannose est bien le GDP-fucose.

III - ETUDE DU MECANISME ENZYMATIQUE RESPONSABLE DE LA ----- TRANSFORMATION DU GDP-MANNOSE EN GDP-FUCOSE -----

Nous avons montré qu'un homogénat ovocytaire de *Perinereis cultrifera* renferme tous les enzymes capables de synthétiser le GDP-fucose à partir de GDP-mannose. Il est nécessaire de connaître en détail les différentes étapes de cette synthèse afin de déterminer les systèmes régulateurs possibles de cette transformation du GDP-mannose en GDP-fucose. Y a t-il une modulation de ces activités enzymatiques au cours de la maturation des ovocytes ? Nous avons essayé de répondre à ces diverses questions.

A - EFFET DE LA CONCENTRATION EN GDP-MANNOSE SUR LA ----- SYNTHÈSE DE GDP-FUCOSE -----

Des milieux réactionnels standards contenant différentes concentrations de GDP-mannose de 5 à 200 μM sont incubés 30 minutes à 30°C en présence d'un homogénat ovocytaire. Après arrêt de la réaction, les phases aqueuses extraites ont été chromatographiées dans le système solvant B.

Les profils chromatographiques obtenus sont représentés sur la figure 30 page 89 . Pour une concentration en GDP-mannose de 5 μM , la totalité du précurseur a été métabolisée en GDP-fucose.

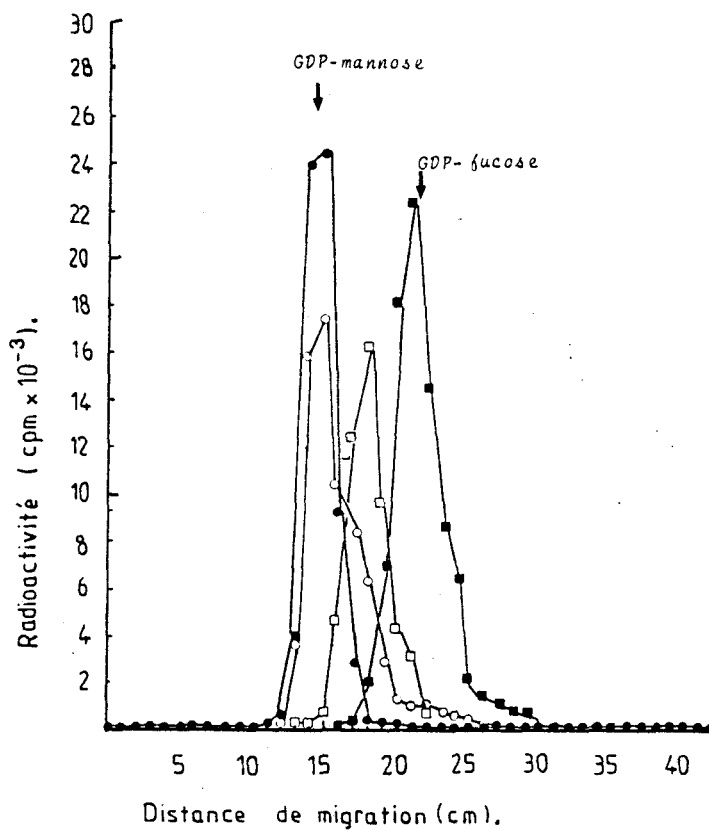


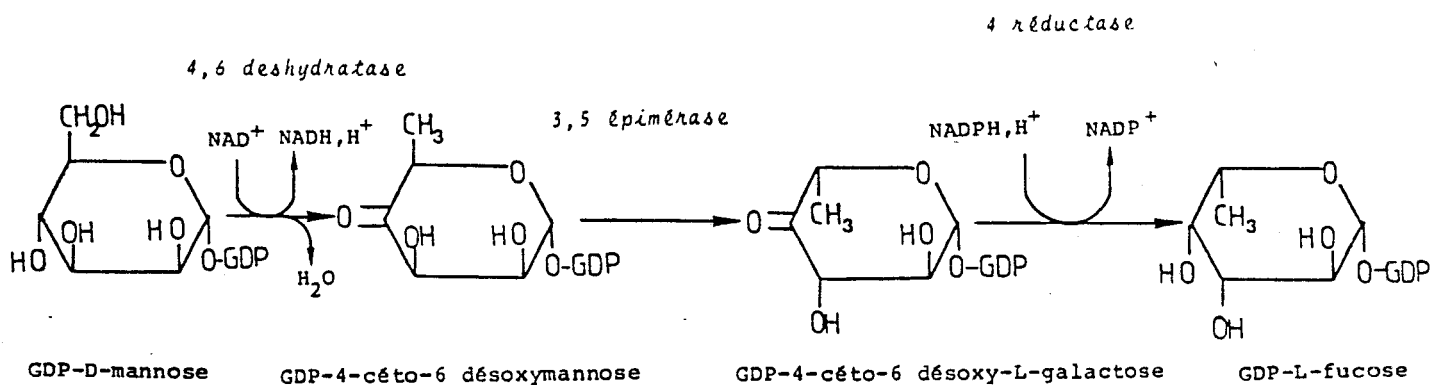
Figure 30 : Comportement chromatographique sur papier

 Whatman 3 dans le système solvant B : acide
 isobutyrique/ammoniaque 1 N (5 : 3) pendant
 30 heures. Les produits obtenus après trans-
 formation du GDP-mannose lors d'incubations
 standards en présence d'un homogénat ovocytaire
 après 30 minutes à 30°C et à différentes
 concentrations en GDP-mannose.
 Les incubations ont lieu en présence de :

- 5 μM de GDP-mannose ■—■
- 50 μM de GDP-mannose □—□
- 100 μM de GDP-mannose ○—○
- 200 μM de GDP-mannose ●—●



Lorsque la concentration en GDP-mannose augmente de 50 à 200 μM , il faut noter, qu'il reste du GDP-mannose non transformé d'une part mais plus important, qu'il apparaît un "intermédiaire" migrant entre le GDP-mannose et le GDP-fucose. C'est à la concentration de 50 μM en GDP-mannose que ce produit est formé en majorité. A cette concentration, le taux de GDP-mannose restant est négligeable. Ce nouveau composé se comporte dans le système utilisé, comme un glycosyl-nucléotide (il migre entre le GDP-mannose et le GDP-fucose). Comment peut-on expliquer un tel phénomène ? La transformation du GDP-mannose en GDP-fucose semble, d'après les travaux de GINSBURG (GINSBURG : 1961), se faire en plusieurs étapes et fait donc intervenir un ou deux produits intermédiaires. Le schéma suivant rappelle les différentes étapes hypothétiques que GINSBURG décrit chez *Aerobacter aerogenes*.



Si un tel chemin réactionnel existe aussi dans le cas de la conversion du GDP-mannose en GDP-fucose dans les ovocytes de *Perinereis cultrifera*, il s'avère nécessaire de caractériser les intermédiaires intervenant dans la synthèse du GDP-fucose à partir du GDP-mannose. Ce qui nous permettra de mieux comprendre

le mécanisme enzymatique qui régit cette conversion. Connaissant les mécanismes réactionnels qui sont mis en jeu lors de la transformation du GDP-mannose, il faudra étudier les cofacteurs intervenant dans les activités enzymatiques impliquées dans cette conversion.

B - ESSAI DE DETERMINATION DE LA NATURE DU

PRODUIT INTERMEDIAIRE

Ce composé intermédiaire s'est révélé très instable et nous n'avons pas pu déterminer la nature de ce glycosyl-nucléotide par les méthodes utilisées pour l'analyse structurale du GDP-fucose.

Il est tout à fait vraisemblable que seule la partie glycosyl est modifiée par rapport au GDP-mannose. Dans le chemin réactionnel hypothétique décrit par GINSBURG, le ou les intermédiaires possèdent une fonction cétonique. Partant d'une telle hypothèse, nous avons réalisé une analyse chromatographique des produits obtenus après réduction chimique suivie d'une hydrolyse acide de ce produit intermédiaire.

Le résultat de cette chromatographie réalisée dans le système solvant C est représenté sur la figure 31 page 92 . Trois produits sont obtenus. Deux migrent respectivement comme le mannose, le fucose et le troisième migre comme le rhamnose. Le mannose provient vraisemblablement d'une faible contamination par du GDP-mannose. Le taux de fucose élevé s'explique par le fait qu'il provient d'une part de la transformation du GDP-mannose en GDP-fucose et d'autre part de la réduction et de l'hydrolyse acide du produit intermédiaire (GDP-X) comme il est résumé ci-après.

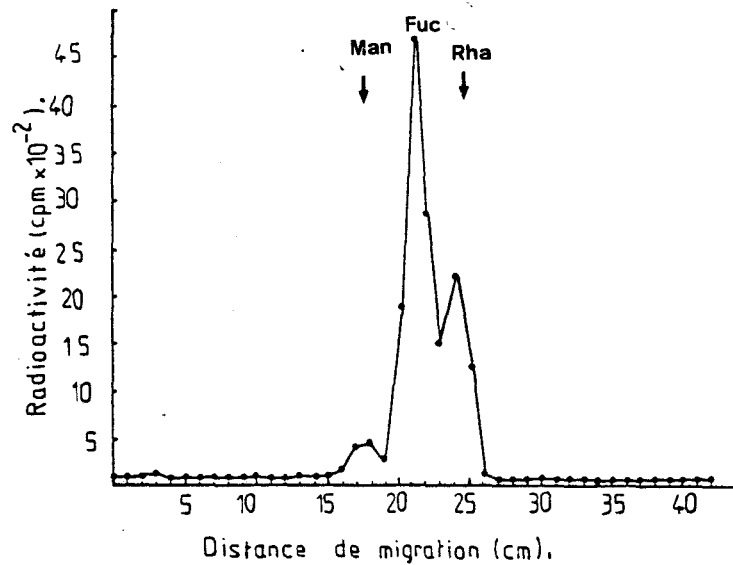
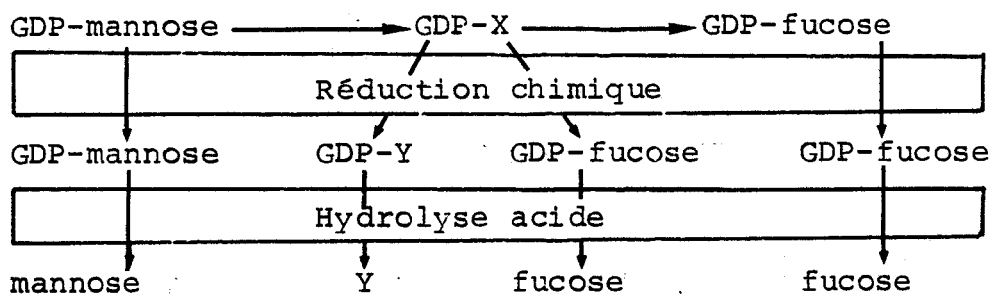


Figure 31 : Comportement chromatographique des monosaccharides obtenus après réduction chimique et hydrolyse acide du glycosyl-nucléotide intermédiaire formé lors de la conversion du GDP-mannose dans un homogénat ovocytaire. Le milieu réactionnel contient 50 μ M GDP-mannose. Après 30 minutes d'incubation à 30°C ; la phase aqueuse extraite est soumise à une réduction chimique et à une hydrolyse acide. Les produits obtenus sont chromatographiés dans le système solvant C : butanol/acide acétique/eau (4 : 1 : 5) pendant 36 heures.



Le produit migrant comme le rhamnose également décrit par GINSBURG n'a pas pu être identifié, il s'agit en fait d'un deuxième isomère dans la réduction de la cétone, nous avons déjà signalé ce produit lors de l'étude des produits obtenus après hydrolyse acide du milieu réactionnel (p. 84).

En conclusion, nous pouvons dire que les monosaccharides libérés après réduction chimique et hydrolyse acide du glycosyl-nucléotide intermédiaire sont au nombre de deux en proportions égales : l'un est le fucose et l'autre est un monosaccharide que nous n'avons pas pu identifier mais migrant comme le rhamnose.

Le nucléotide constituant le produit intermédiaire formé lors de la synthèse de GDP-fucose à partir de GDP-mannose est vraisemblablement du GDP. La partie glycosidique est un 6 desoxy sucre car après réduction chimique et hydrolyse acide, il y a formation de fucose. De plus ce monosaccharide doit posséder une fonction cétonique car la réduction chimique conduit à la formation de deux monosaccharides dans des proportions identiques. La nature exacte de ce monosaccharide reste indéterminée et nécessiterait d'être définie.

Si l'on considère que la transformation du GDP-mannose en GDP-fucose se fait par la formation d'un intermédiaire à

fonction cétonique, les réactions mises en jeu sont des oxydo-réduction et nous avons examiné le rôle de deux cofacteurs (le NAD^+ et le NADPH, H^+) qui interviennent le plus souvent dans ce type de réactions. GINSBURG en 1961 a montré que dans le cas de la conversion du GDP-mannose en GDP-fucose par l'*Aerobacter aerogenes*, il y avait intervention sur la première réaction du NAD^+ et sur la dernière réaction pour former le GDP-fucose, du NADPH, H^+ (voir généralités page 64).

C - EFFET DU NAD^+ ET DU NADPH, H^+ SUR L'ACTIVITE

 ENZYMATIQUE RESPONSABLE DE LA TRANSFORMATION DU

 GDP-MANNOSE EN GDP-FUCOSE

1 - Effet du NAD^+
 =====

La mesure de l'effet du NAD^+ sur la synthèse de GDP-fucose à partir de GDP-mannose a été réalisée sur des incubations standards après 30 minutes à 30°C , avec des concentrations en GDP-mannose de $100 \mu\text{M}$ et de $200 \mu\text{M}$. La figure 32 AB représente respectivement le taux global de transformation du GDP-mannose en glycosyl-nucléotide intermédiaire et en GDP-fucose, en fonction de la concentration en NAD^+ . (fig.32 , page 95).

Quelle que soit la concentration en NAD^+ introduit dans le milieu d'incubation, le taux de transformation de GDP-mannose reste constant pour des concentrations en GDP-mannose de $100 \mu\text{M}$ et $200 \mu\text{M}$. Contrairement à ce qui a été décrit par GINSBURG, nous n'avons pas observé d'effet du NAD^+ sur la première réaction de transformation du GDP-mannose, ni d'ailleurs sur la deuxième réaction. Ceci est peut-être dû au fait qu'il y a suffisamment de NAD^+ endogène pour assurer le bon fonctionnement de la première

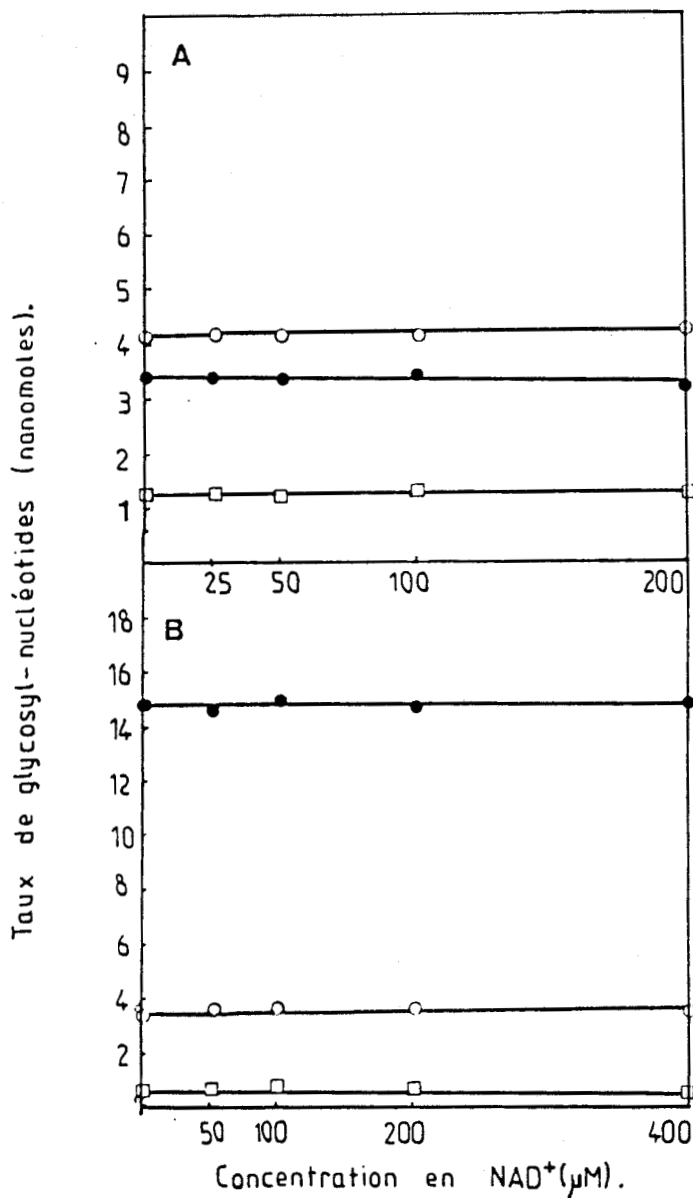


Figure 32 : Influence du NAD⁺ sur le taux global de transformation du GDP-mannose en glycosyl-nucléotide intermédiaire ○—○ et en GDP-fucose □—□. Nous avons également représenté le taux de GDP-mannose restant ●—● après 30 minutes d'incubation à 30°C dans les conditions standards pour une concentration en GDP-mannose de 100 μM (A), de 200 μM (B).



GDP-mannose est converti en GDP-fucose ? Ceci est peut-être dû à un phénomène de rétroinhibition par un excès de GDP-fucose, rétroinhibition dont la cible serait la première réaction car en présence de NADPH, H^+ seulement 10 à 20 % du GDP-mannose est métabolisé en GDP-fucose sans glycosyl-nucléotide intermédiaire. KORNFIELD et GINSBURG en 1966 en étudiant le contrôle de la synthèse du GDP-fucose à partir du GDP-mannose dans diverses classes de bactéries, ont montré que le GDP-fucose avait un pouvoir de rétroinhibition sur la première réaction qui a lieu lors de la conversion du GDP-mannose. Dans le cas des ovocytes de *Perinereis cultrifera*, nous ne pouvons pas encore affirmer avec exactitude cet effet du GDP-fucose, ceci sera d'ailleurs confirmé ultérieurement.

Il semble après cette première analyse de l'effet du NADPH, H^+ , sur la conversion du GDP-mannose, que ce cofacteur agit principalement sur la réaction qui conduit à la formation du produit final, le GDP-fucose, seul produit dont le taux augmente.

b) - Effet du NADPH, H^+ sur la formation de GDP-fucose
 ++++++
 à partir de glycosyl-nucléotide intermédiaire
 ++++++
 préalablement synthétisé
 ++++++

La première étape de cette expérience consiste à former le glycosyl-nucléotide intermédiaire de façon optimale. Pour cela, nous avons réalisé l'incubation suivante. Des milieux réactionnels standards sont incubés à 30°C pendant 30 minutes avec un homogénat ovocytaire et une concentration en GDP-mannose de 50 μM . Après 30 minutes dans ces conditions le GDP-mannose est transformé en

glycosyl-nucléotide intermédiaire.

Le NADPH, H^+ est alors additionné à une concentration finale de $100 \mu\text{M}$. Les réactions sont alors arrêtées après différents temps d'incubation. Les résultats sont exprimés sur la figure 34 page 99 .

Dès que le NADPH, H^+ est ajouté le glycosyl-nucléotide intermédiaire est transformé en GDP-fucose. En deux minutes, 50 % du glycosyl-nucléotide accumulé dans l'incubation est réduit enzymatiquement en GDP-fucose grâce au NADPH, H^+ exogène. Après 30 minutes d'incubation en présence de NADPH, H^+ , tout le glycosyl-nucléotide est transformé en GDP-fucose. Par cette expérience, nous constatons que la réaction qui aboutit à la formation du GDP-fucose à partir du glycosyl-nucléotide intermédiaire est fortement stimulée par l'apport de NADPH, H^+ exogène. Il semble donc que la teneur en NADPH, H^+ endogène ne permet pas la transformation complète du GDP-mannose si la concentration dépasse $50 \mu\text{M}$. Par contre, l'apport de $100 \mu\text{M}$ de NADPH, H^+ exogène permet cette transformation. Le NADPH, H^+ est donc contrairement à ce que nous avons observé pour le NAD^+ , un facteur limitant pour la réaction qui conduit à la synthèse de GDP-fucose à partir du glycosyl-nucléotide intermédiaire. Autre point important révélé par cette expérience, c'est la quantité de GDP-fucose formé. En effet, à la fin des 30 minutes d'incubation en présence de NADPH, H^+ $100 \mu\text{M}$, les $50 \mu\text{M}$ de glycosyl-nucléotide ont été transformés en GDP-fucose.

Nous pouvons donc dire que si le GDP-fucose à un effet rétroinhibiteur, la réaction cible est la première réaction qui

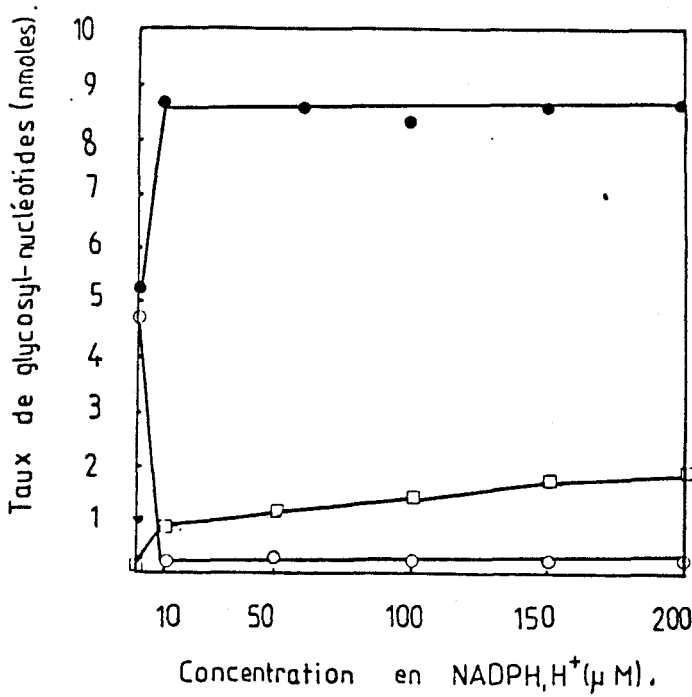
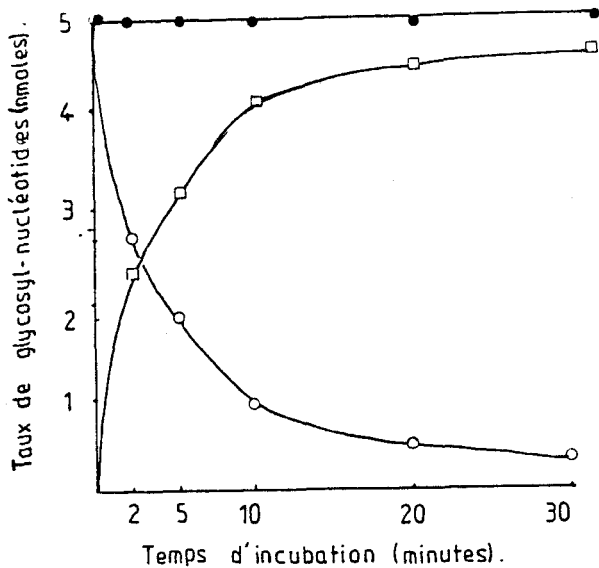


Figure 33. :

.....
 Evolution du taux de transformation du GDP-mannose en glycosyl-nucléotide intermédiaire (○—○) et en GDP-fucose (□—□) en fonction de la concentration en NADPH, H⁺ présente dans le milieu réactionnel standard. Les incubations sont menées à 30°C pendant 30 minutes pour une concentration en GDP-mannose de 50 μM. Le taux de GDP-mannose restant à la fin de chaque incubation est également représenté (●—●).



Figure 34 :



.....
 Effet du NADPH, H⁺ sur la formation de GDP-fucose à partir du glycosyl-nucléotide intermédiaire. Les incubations sont réalisées dans les conditions standards pendant 30 minutes à 30°C avec 50 μM de GDP-mannose. Après 30 minutes, 100 μM de NADPH, H⁺ sont introduits dans le milieu réactionnel. La transformation du glycosyl-nucléotide intermédiaire en GDP-fucose est suivie pendant 30'. Taux de transformation du glycosyl-nucléotide intermédiaire ○—○; taux de GDP-fucose formé □—□; taux de glycosyl-nucléotide formé après 30' d'incubation sans NADPH, H⁺ ●—●.

aboutit à la synthèse du glycosyl-nucléotide intermédiaire.

Nous connaissons les cofacteurs qui contrôlent la conversion du GDP-mannose en GDP-fucose, il nous a semblé intéressant de localiser l'activité enzymatique responsable de cette biosynthèse de GDP-fucose et de procéder à une purification partielle de ce système enzymatique.

IV - PURIFICATION ET EFFET DU NADPH, H^+ SUR L'ACTIVITE ENZYMATIQUE ----- RESPONSABLE DE LA TRANSFORMATION DU GDP-MANNOSE EN GDP-FUCOSE -----

A - LOCALISATION SUBCELLULAIRE DE CETTE ACTIVITE ----- ENZYMATIQUE -----

Nous avons vu, dans les généralités sur les glycosyl-transférases, que ces enzymes sont pour la plupart liés aux membranes cellulaires et nécessitent pour leur purification l'adjonction d'un détergent. Pour la localisation de l'activité enzymatique responsable de la conversion du GDP-mannose en GDP-fucose par les ovocytes de *Perinereis cultrifera*, nous avons après homogénéisation des ovocytes, séparé par ultracentrifugation, la fraction cytosolique de la fraction membranaire. Les conditions techniques sont décrites dans l'appendice technique page 127. Nous avons alors mesuré le taux de transformation de GDP-mannose en GDP-fucose dans chaque fraction. Le milieu d'incubation standard est incubé 10 ou 60 minutes à 30°C avec du NADPH, H^+ 200 μM pour une concentration en GDP-mannose de 100 μM . Le tableau IV page 102 représente ce taux de transformation.

Seule la fraction cytosolique contient les activités enzymatiques capables de synthétiser du GDP-fucose à partir de

GDP-mannose. Ceci est en parfait accord avec la notion assez générale d'une synthèse des glycosyl-nucléotides dans la fraction soluble du cytoplasme des cellules (COATES *et al.* : 1980). Comme exception nous pouvons citer le CMP-NeuAc pour lequel la synthèse semble être réalisée au niveau du noyau des cellules.

B - PURIFICATION PARTIELLE PAR LE SULFATE D'AMMONIUM

Dans ce chapitre, nous avons tenté de réaliser une première étape de purification des enzymes en utilisant la méthode de relargage par le sulfate d'ammonium pour une concentration en sulfate d'ammonium de 65 % de saturation soit 430g par litre.

En effet, après incubation de la fraction non précipitable dans les conditions nécessaires à la conversion du GDP-mannose en GDP-fucose, aucune activité enzymatique n'a été retrouvée. Par cette méthode, nous avons obtenu une solution enzymatique partiellement purifiée (la méthode de purification est décrite dans l'appendice technique). Le tableau V page 102 représente l'évolution de l'activité spécifique du complexe enzymatique qui transforme le GDP-mannose en GDP-fucose au cours des diverses étapes nécessaires à la purification partielle de ces activités. La source enzymatique obtenue après précipitation au sulfate d'ammonium à 65 % de saturation possède une activité spécifique augmentée d'environ 8 fois. Le but de ces expériences étant d'obtenir une activité enzymatique capable de transformer une grande quantité de GDP-mannose en GDP-fucose, il ne nous a pas semblé nécessaire d'obtenir une purification plus poussée des enzymes impliqués dans la biosynthèse du GDP-fucose à partir du

Tableau IV :

Comparaison du taux de GDP-mannose restant et de GDP-fucose formé après incubation avec un milieu réactionnel standard contenant 100 μ M de GDP-mannose, d'un homogénat ovocytaire (H) de la fraction cytosolique (S) et du culot membranaire (C) obtenu après centrifugation à 150 000g pendant une heure à 4°C de l'homogénat ovocytaire. Ces valeurs sont obtenues après 10 minutes et 60 minutes d'incubation à 30°C et sont exprimées en nanomoles.

10'	H	S	C
GDP-Man	8,9	8,2	9,9
GDP-FUC	1,1	1,7	0
60'			
GDP-Man	5,5	2	9,8
GDP-FUC	4,3	7,8	0

Tableau V :

Evolution de l'activité enzymatique au cours des différentes étapes de purification des enzymes responsables de la conversion du GDP-mannose. Les résultats sont exprimés en nanomoles de glycosyl-nucléotide par milligrammes de protéines ovocytaires et par heure d'incubation.

	HOMOGENAT	FRACTION CYTOSOLIQUE	PRECIPITE AU SULFATE D'AMMONIUM
GDP-mannose transformé	3	3,8	25
GDP-mannose restant	4,5	5,5	6
GDP-fucose formé	1,8	3,5	23

GDP-mannose. De plus, il faut noter la bonne stabilité du complexe au cours des diverses étapes que requiert la purification partielle.

C - UTILISATION DE LA PREPARATION PURIFIEE POUR L'ETUDE

 DE L'EFFET DU NADPH, H^+ SUR LA TRANSFORMATION DU

 GDP-MANNOSE

Le taux de transformation du GDP-mannose en GDP-fucose avec ou sans NADPH, H^+ a été mesuré à différentes concentrations en GDP-mannose après 90 minutes d'incubation à 30°C dans les conditions standards en présence d'une source enzymatique partiellement purifiée. Les figures 35 A et 35 B page 104 représentent respectivement le taux de transformation de GDP-mannose sans NADPH, H^+ et avec NADPH, H^+ en fonction de la quantité de GDP-mannose introduit dans le milieu réactionnel. Lorsque nous comparons les deux types de profils obtenus, deux points importants sont à noter. Le premier est relatif au taux de transformation des GDP-mannose avec et sans NADPH, H^+ . Lorsque les incubations sont réalisées sans NADPH, H^+ , la quantité de GDP-mannose transformée est nettement supérieure au taux de GDP-mannose métabolisé en présence de NADPH, H^+ . Nous retrouvons ici les résultats observés précédemment. Le GDP-fucose formé en présence de NADPH, H^+ semble ainsi, à une certaine concentration, bloquer la transformation du GDP-mannose. Il y a vraisemblablement retroinhibition sur la première réaction.

Le second point intéressant concerne les différences observées entre le taux de transformation du GDP-mannose mesuré et la quantité des produits formés.

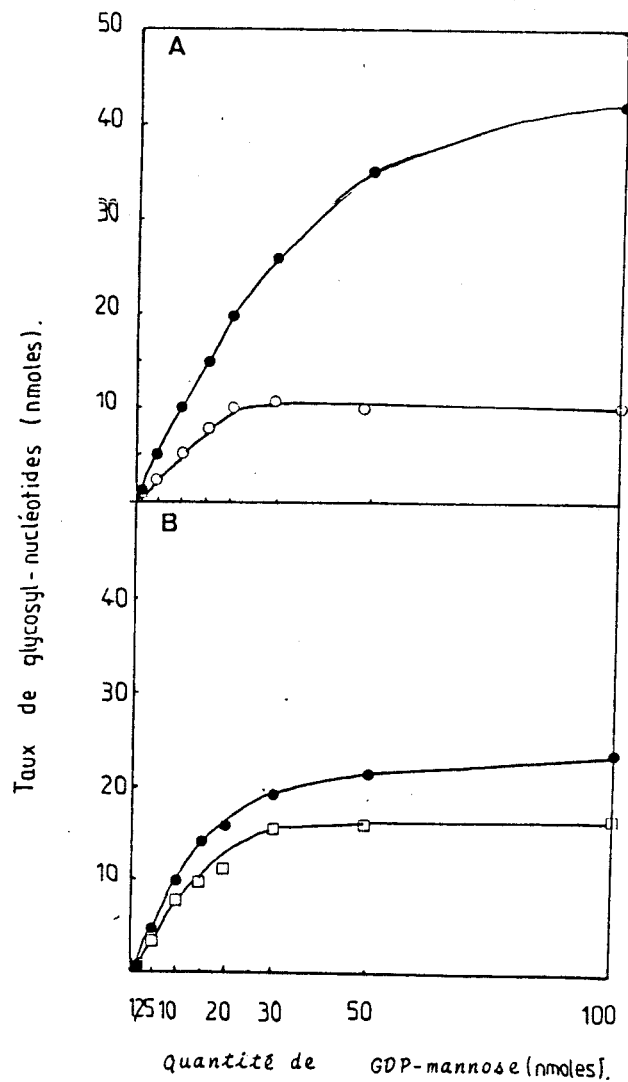


Figure 35 : Influence de la concentration en GDP-mannose sur le taux de transformation de ce glycosyl-nucléotide. Après 90 minutes d'incubation dans les conditions standards à 30°C.

A - sans NADPH, H⁺ : variation du taux de transformation du GDP-mannose ●—●, taux de formation du glycosyl-nucléotide intermédiaire ○—○.

B - avec du NADPH, H⁺ à des concentrations doubles de celles du GDP-mannose : variation du taux de transformation du -GDP-mannose ●—●, taux de formation du GDP-fucose □—□.



Dans le cas d'incubation sans NADPH, H⁺ environ 45 nmoles de GDP-mannose sont métabolisées en glycosyl-nucléotide intermédiaire mais nous n'obtenons à la fin de la réaction que 15 nmoles de ce produit.

Ceci semble confirmer les observations précédentes : le glycosyl-nucléotide intermédiaire est très instable dans les conditions d'incubation et de chromatographie utilisées.

V - EVOLUTION AU COURS DE LA MATURATION OVOCYTAIRE DE L'ACTIVITE

 DU COMPLEXE ENZYMATIQUE RESPONSABLE DE LA CONVERSION DU

 GDP-MANNOSE EN GDP-FUCOSE

PORCHET et SPIK ont montré qu'au cours de la maturation ovocytaire, le taux de mannose présent dans les ovocytes va rester quasi constant alors que la quantité de fucose va augmenter fortement. Il était de ce fait intéressant d'étudier le comportement des activités enzymatiques responsables de la conversion du GDP-mannose en GDP-fucose en fonction du stade de maturité des ovocytes donc en fonction de la taille ovocytaire.

Nos études antérieures avaient montré que le GDP-fucose peut provoquer une rétroinhibition de la réaction, il est donc plus simple pour évaluer le taux d'activités du système de transformation du GDP-mannose en GDP-fucose, de mesurer uniquement la première réaction qui conduit à la formation du glycosyl-nucléotide intermédiaire. La figure 36 page 106 représente la quantité de glycosyl-nucléotide intermédiaire formé après 90 minutes d'incubation à 30°C d'un milieu réactionnel standard sans NADPH, H⁺ à 400 µM en GDP-mannose.

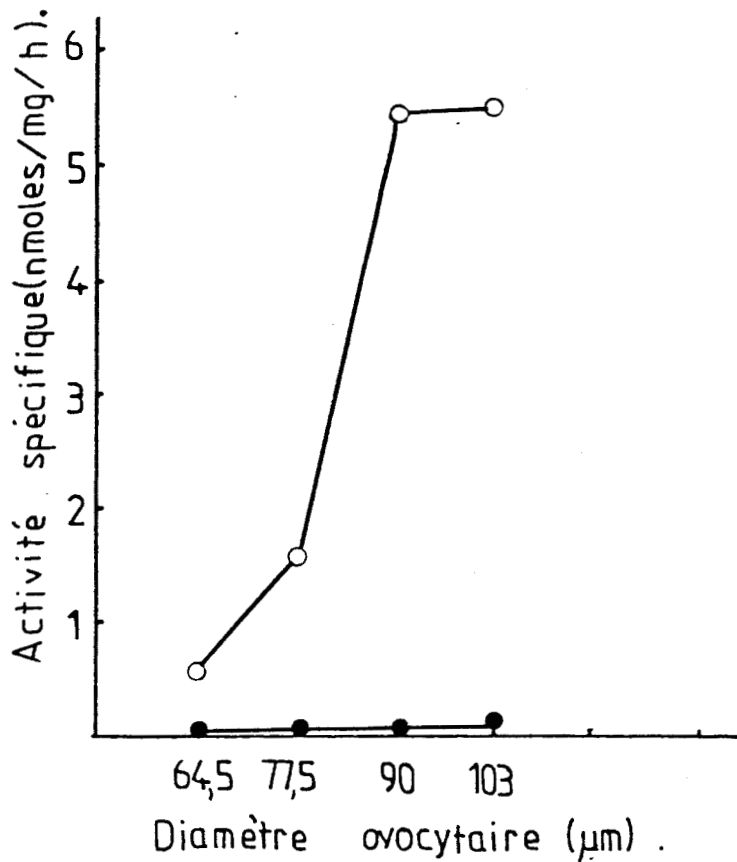


Figure 36 : Evolution du taux de transformation du GDP-mannose en glycosyl-nucléotide intermédiaire au cours de la maturation des ovocytes de Perinereis cultrifera. Les incubations sont réalisées en tampon cacodylate de sodium 100 mM pH7,4, NaCl 154 mM, MnCl₂ 2 mM, MgCl₂ 5mM, AMP 10 mM, GDP-mannose 400 µM, avec un homogénat ovocyttaire pendant 90 minutes à 30°C. Les mesures ont été faites sur les ovocytes ○—○ et sur les coelomocytes ●—● provenant du même animal.

L'allure sigmoïdale de la courbe indique clairement que le système de synthèse du GDP-fucose à partir de GDP-mannose n'est "mis en place" que dans des ovocytes de plus de 80 μm . En effet, la conversion du GDP-mannose en glycosyl-nucléotide intermédiaire n'est pas observée lorsque l'on utilise une source enzymatique provenant d'un homogénat d'ovocytes de taille inférieure à 77,5 μm . Il est tout à fait remarquable de noter que :

- d'une part, c'est dans les ovocytes dont la taille est supérieure à 60-80 μm que le taux de fucose est fortement augmenté (PORCHET *et al.* : 1977). Dans les ovocytes dont la taille est inférieure à 60 μm , il y a peu de fucose.
- d'autre part, c'est à partir d'une taille ovocytaire de 70 à 90 μm que l'inhibition hormonale devient faible. Les ovocytes commencent alors à évoluer sous un taux hormonal réduit.

Enfin, il convient de noter que le système enzymatique qui synthétise le GDP-fucose à partir du GDP-mannose dans les ovocytes, a une très faible activité dans les coelomocytes, et que cette activité n'évolue pas en fonction du stade de maturité.

Cette activité enzymatique est un excellent marqueur du stade de maturité de l'ovocyte. Si l'ovocyte peut être qualifié de cellule cible pour l'hormone cérébrale, on peut dire que le complexe enzymatique responsable de la conversion du GDP-mannose en GDP-fucose est une cible de cette activité hormonale.

De nombreuses questions restent sans réponses :

Comment ce système enzymatique est "mis en place" au cours de l'évolution ? A t-on une action directe de l'hormone à ce niveau ? Si oui comment se fait la régulation compte tenu de ce que l'on sait dans le système des vertébrés.

L'impact hormonal peut se faire selon plusieurs modes d'actions :

- par activation génique (cas des stéroïdes),
- par activation du système enzymatique lui-même avec ou non l'intervention d'un deuxième messenger (AMP_c, GMP_c, Calcium),
- par la régulation d'autres effecteurs des réactions enzymatiques (NAD⁺, NADPH, H⁺...).

Aucune réponse ne peut être donnée à ce stade de nos recherches.

RESUME ET CONCLUSIONS GENERALES

Les études que nous avons menées sur les mannosyl-transférases, en utilisant comme modèle expérimental les ovocytes de *Perinereis cultrifera*, nous ont permis de démontrer les points suivants :

1 - Un homogénat ovocytaire est capable d'exprimer des activités mannosyltransférasiques. Lorsque l'on fait un marquage à partir de GDP- $[^{14}\text{C}]$ mannose, des produits marqués sont retrouvés dans les différentes phases obtenues après extraction séquentielle d'intermédiaires lipidiques. Cette technique est celle qui est utilisée lors de l'étude de la biosynthèse des N-glycosylprotéines chez les cellules eucaryotes.

2 - En présence d'un homogénat ovocytaire, le GDP-mannose est transformé en un glycosyl-nucléotide dont la partie glycosyl a seule été modifiée. La technique de spectrométrie de masse couplée à une chromatographie en phase gazeuse a permis d'identifier ce nouveau monosaccharide comme étant le fucose.

Les ovocytes de *Perinereis cultrifera* renferment donc les activités enzymatiques capables de transformer le GDP-mannose en GDP-fucose.

3 - Nous avons montré que cette activité enzymatique responsable de la conversion du GDP-mannose en GDP-fucose était un excellent marqueur de l'évolution ovocytaire chez *Perinereis cultrifera*. En effet, ce n'est que dans les ovocytes dont la taille est supérieure à 77,5 μm que l'on retrouve une telle activité enzymatique. Des travaux antérieurs (PORCHET et SPIK : 1978) ont montré que c'est à partir de ce stade de maturité que les ovocytes s'enrichissent en fucose.

4 - Une étude plus complète de ce phénomène de conversion du GDP-mannose en GDP-fucose a permis de définir avec plus de précision le mécanisme réactionnel mis en jeu :

- la transformation du GDP-mannose en GDP-fucose se fait par plusieurs réactions et nécessite la formation d'un glycosyl-nucléotide intermédiaire dont le monosaccharide serait un méthyl pentose portant une fonction cétonique.
- la formation du GDP-fucose à partir des glycosyl-nucléotides intermédiaires requiert la présence du cofacteur NADPH, H^+ .
- le GDP-fucose formé contrôle le taux de sa propre formation en inhibant la première réaction qui aboutit à la formation du glycosyl-nucléotide intermédiaire.
- l'activité enzymatique responsable de la biosynthèse du GDP-fucose à partir du GDP-mannose a été retrouvée dans la fraction cytosolique des ovocytes. Cette fraction enzymatique a été enrichie huit fois par la méthode de relargage au sulfate d'ammonium.

De nombreux points restent encore à élucider tels que :

1 - La nature exacte du produit intermédiaire formé au cours de la première étape de la transformation du GDP-mannose en GDP-fucose.

2 - Comment le GDP-fucose peut inhiber sa propre formation ? A quel taux exact de GDP-fucose cette inhibition a lieu ?

3 - Quelle est la nature des produits radioactifs retrouvés dans les différentes phases obtenus après extraction

séquentielle des intermédiaires lipidiques, sachant que le marquage a été fait à partir de GDP- [^{14}C] mannose et que ce GDP-mannose est rapidement métabolisé en GDP-fucose.

4 - Cette activité enzymatique représentant un bon marqueur de l'évolution ovocytaire, il est primordial de connaître le mécanisme qui contrôle cette mise en activité des enzymes responsables de la conversion du GDP-mannose. Y a-t-il intervention directe de l'hormone cérébrale ou ce contrôle se fait-il par le biais de messagers secondaires ?

5 - Au cours de la maturation ovocytaire, les ovocytes se mettent à synthétiser une quantité très importante de glycoconjugués. Il serait également intéressant de connaître les mécanismes de la biosynthèse de ces glycoconjugués et tout particulièrement des glycoprotéines de type N sachant que dans les cellules eucaryotes cette synthèse se fait grâce à des intermédiaires lipidiques principalement de type dolichol.

APPENDICE TECHNIQUE

LE MATERIEL BIOLOGIQUE

I - PREPARATION DES CELLULES COELOMIQUES DE *PERINEREIS CULTRIFERA*

A - LES NEREIS

Les *Perinereis cultrifera* ont été récoltées à la station biologique de LUC-SUR-MER dans le CALVADOS (FRANCE). Au laboratoire, les animaux sont isolés, à une température moyenne de 10°C, dans des flacons d'élevage contenant un morceau de papier filtre et de l'eau de mer filtrée. Tous les 3 à 4 jours, l'eau de mer est renouvelée.

Deux jours après la récolte, l'état génital des animaux est déterminé par observation, au microscope photonique, d'une goutte de contenu coelomique. Pour les femelles l'état génital est déterminé par calcul du diamètre moyen des ovocytes observés à travers un oculaire micrométrique. Pour les mâles, le stade de spermatogénèse est défini par simple observation de la morphologie des cellules germinales.

B - ISOLEMENT ET PURIFICATION DES OVOCYTES ET DES

COELOMOCYTES DE *PERINEREIS CULTRIFERA*

1 - Prélèvement du milieu intérieur de l'animal

=====

Le contenu coelomique est prélevé à l'aide d'une pipette pasteur effilée puis il est placé dans un récipient maintenu à 4°C. Le contenu coelomique est ensuite centrifugé à 2000g pendant 5', afin de séparer les éléments cellulaires (ovocytes et coelomocytes) du liquide coelomique. Le liquide coelomique est prélevé puis congelé à -20°C. La conservation se fait dans l'azote liquide.

2 - Séparation des divers types cellulaires

=====

Le culot de cellules est mis en suspension dans 5 ml d'eau de mer filtrée et stérile. Cette suspension cellulaire est agitée légèrement dans le but de séparer les amas de cellules formés lors de la ponction et de la centrifugation. La suspension cellulaire contient deux grandes classes de cellules :

- les ovocytes dont la taille peut varier de 40 μm à 280 μm suivant le stade de maturité des animaux.
- les coelomocytes qui sont des cellules de petite taille 10 à 15 μm . De plus, la taille de ces cellules reste relativement constante tout au long de la croissance ovocytaire.

Pour séparer ces deux types cellulaires et obtenir des préparations cellulaires pures, nous avons mis au point une technique simple et rapide (BULET *et al.* : 1982). Deux conditions sont absolument nécessaires pour mener à bien des études biochimiques :

- les cellules doivent être viables et ne pas avoir subi d'altérations lors de la préparation ;
- chaque type cellulaire ne doit pas être contaminé par l'autre.

Pour obtenir de telles préparations, deux étapes s'imposent :

- a) - Purification des coelomocytes
- +++++

Le mélange ovocytes coelomocytes est filtré à travers un tamis en nylon (le diamètre des pores est de 20 μm). Les

coelomocytes passent à travers le tamis, alors que les ovocytes, dont le diamètre est supérieur à 20 μm , ne passent pas. La suspension de coelomocytes ainsi obtenue est lavée deux fois par de l'eau de mer filtrée et stérile puis lavée deux fois par le tampon qui sera utilisé lors de nos études ultérieures. Un contrôle en microscopie photonique permet de s'assurer de la parfaite pureté des coelomocytes.

b) - Purification des ovocytes
 +=+=+=+=+=+=+=+=+=+=+=+=

Deux cas différents sont à considérer :

- les ovocytes ont une taille inférieure à 130 μm ;
- les ovocytes ont un diamètre supérieur à 130 μm .

- Les ovocytes ont un diamètre inférieur à 130 μm

Ces ovocytes après tamisage, sont repris dans un tampon phosphate 0,1 M pH7,4 contenant du NaCl 0,35 M (osmolarité environ 800 milliosmoles). Ce tampon permet la dissociation des derniers agrégats de coelomocytes restés avec les ovocytes. Après avoir bien repris les ovocytes plusieurs fois avec le tampon, la suspension est déposée sur un coussin de ficoll 2,5 % (P : V) préparé dans le même tampon phosphate 0,1 M pH7,4 NaCl 0,35 M. Cinq à dix minutes plus tard les ovocytes ont sédimenté, alors que les coelomocytes sont restés en surface.

- Les ovocytes ont un diamètre supérieur à 130 μm

Dans ce cas, les ovocytes sont remis en suspension dans de l'eau de mer filtrée et stérile. Ainsi remis en suspension, les ovocytes sont déposés sur un coussin de ficoll 5 % (P : V) préparé dans de l'eau de mer filtrée et stérile. Après cinq à dix minutes, les ovocytes ont sédimenté alors que les coelomocytes sont restés dans la partie supérieure du coussin de ficoll 5 %.

Dans les deux cas, les ovocytes sont repris à l'aide d'une pipette pasteur. Ensuite, ils sont lavés deux fois dans le tampon qui a servi à préparer la solution de ficoll. En dernier lieu, les ovocytes sont lavés dans le tampon cacodylate de sodium 0,1 M pH7,4 NaCl 0,154 M qui est le tampon utilisé dans les études ultérieures.

Remarque : Les solutions de ficoll 5 % et 2,5 % sont

conservées à 4°C sans jamais excéder une semaine. Sur la figure 37 page 116, on a résumé les diverses étapes nécessaires pour l'obtention :

- d'ovocytes totalement exempts de coelomocytes ;
- de coelomocytes exempts d'ovocytes.

3 - Homogénéisation des cellules et détermination de la
=====
teneur en protéines
=====

Les cellules ainsi préparées sont homogénéisées dans le tampon cacodylate de sodium 0,1 M pH7,4 NaCl 0,154 M dans les proportions, un volume de cellules pour un volume de tampon. L'homogénéisation se fait à 4°C grâce à un homogénéiseur de Potter (1200 tours/minute ; 10 aller -et- retours).

Le dosage de protéines est réalisé à partir de 1 µl de cet homogénat.

Les méthodes utilisées sont celles de LOWRY modifiée MARKWELL (MARKWELL : 1973) et celle de GEIGER et BEESMAN modifiée quant à la concentration en Folin-ciocalteus (GEIGER et BEESMAN : 1972).

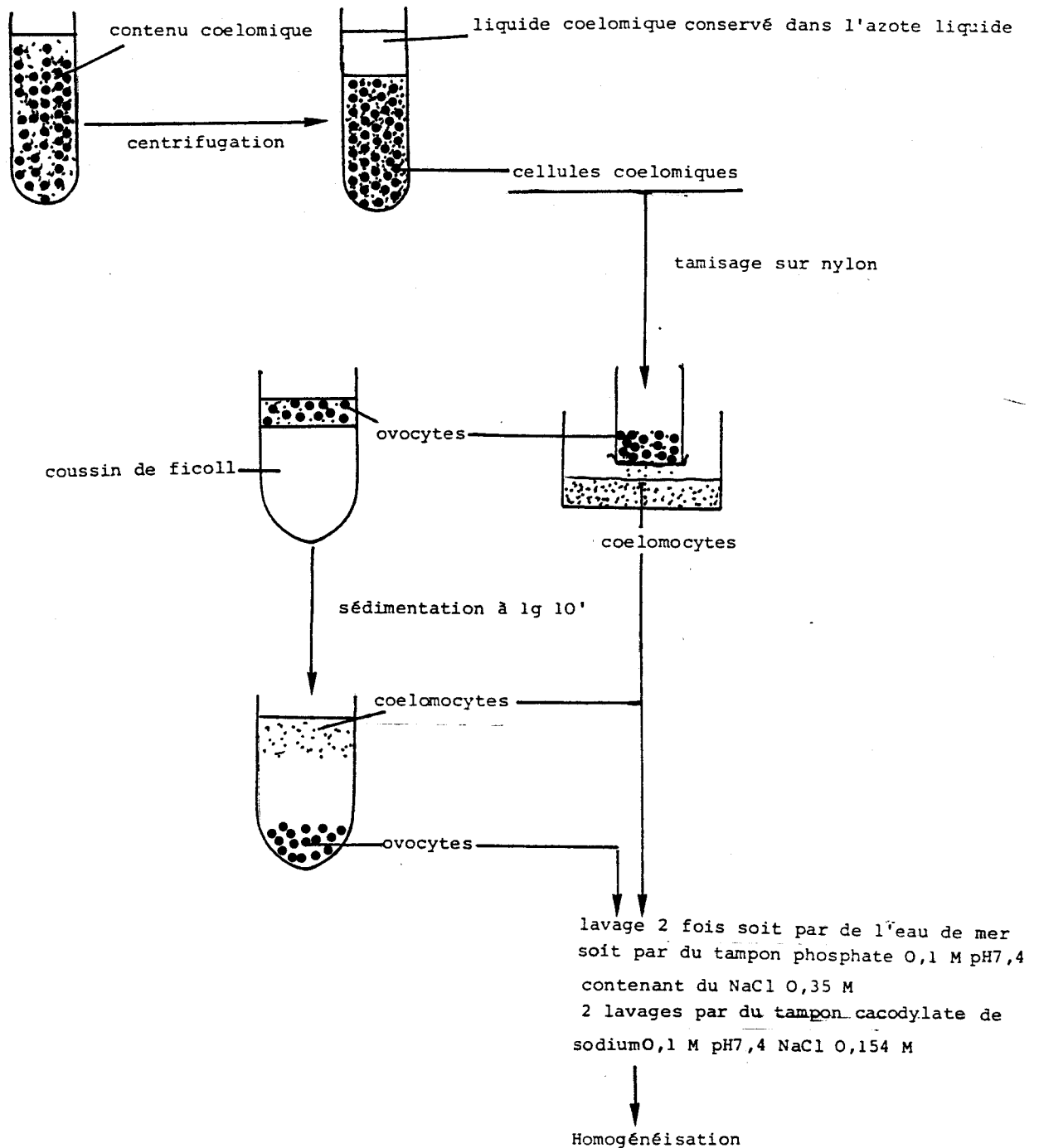


Figure 37 : Représentation schématique des différentes

 étapes nécessaires à la purification des
 ovocytes et des coelomocytes de Perinereis
cultrifera à partir du contenu coelomique.

Simple procedure to isolate coelomocyte - free oocytes from coelomic fluid of *Perinereis cultrifera* Grube (Annelida; Polychaeta)

P. Bulet, B. Hoflack, A. Verbert and M. Porchet¹

Laboratoire de Biologie Animale, Laboratoire Associé au CNRS No. 148, and Laboratoire de Chimie Biologique, Laboratoire Associé au CNRS No. 217, Université des Sciences et Techniques de Lille I, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex (France), June 6, 1982

Summary. Based on a 1-g sedimentation through a Ficoll cushion, a simple and rapid method is described to obtain the complete separation of oocytes and coelomocytes from the coelomic fluid of *Perinereis cultrifera*. Light and electron microscope observations have shown that the 2 cell populations are obtained without any cross-contamination and are perfectly suitable for further biological and biochemical investigations.

In the study of oogenesis in Nereids, the functional relationships between coelomocytes and oocytes contained in the coelomic fluid have become an important issue.

Biochemical approaches to this problem require the separation of well-defined, pure populations of cells. Up to now, the common method to separate coelomocytes from oocytes was based on differential low-speed centrifugation. This approach never leads to a complete separation of the 2 cell types and the oocyte pellet always contains a small percentage of coelomocytes. Although this contamination does not bring large error in determining chemical composition of cellular material^{2,3}, it may become critical in screening the enzymatic properties of each cell population. This is particularly important to determine enzymatic markers related to the various cell types.

In the present work, we describe a simple and rapid method to isolate large quantities of oocytes completely devoid of coelomocytes from the coelomic fluid of *Perinereis cultrifera*.

Materials and methods. *Perinereis cultrifera* was collected from the beaches of 'Luc-sur-Mer' (Calvados, France) and the animals were kept in the laboratory in sea-water at 12°C. The diameter of oocytes from each animals was determined by measuring several oocytes obtained by coelomic puncture⁴. Ficoll solution (Ficoll-400 Pharmacia Fine Chemicals, Sweden) was freshly prepared or kept at 4°C for no longer than 2 weeks. Electron-microscopic observations were carried out as previously described⁵.

Results. The method is based on a 1-g sedimentation of the coelomic contents through a cushion of Ficoll solution (see fig. 1) at 20°C. The oocytes sediment while coelomocytes do not.

For oocytes larger than 130 µm in diameter, the procedure is as follows: the coelomic fluid from 1 animal is collected by puncture, diluted to 2 ml with filtered sea water and then layered above 5 ml of a 5% (w/v) Ficoll solution in sea

water, in a conical tube (2 cm by 8 cm). The oocytes are allowed to settle for 5-10 min; the coelomocytes stay at the top.

In the case of smaller oocytes (less than 130 µm in diameter), the same procedure is applied but 0.1 M sodium phosphate pH 7.4 buffer containing 0.35 M NaCl is used instead of sea water. This phosphate buffer allows dissociation of the coelomocytes which aggregate when the coelomic fluid is taken out of the animal. The concentration of the Ficoll solution is 2.5% (w/v) in phosphate buffer.

After separation, the coelomocyte-containing supernatant (2 ml) is removed with a pasteur-pipette and the remaining medium is discarded, leaving the coelomocyte-free oocyte pellet. Ficoll is removed from the cell suspensions by low-speed centrifugation washings in sea water or phosphate buffer for large and small oocytes, respectively. Figure 2, a shows the content of the coelomic fluid after puncture. As revealed on figure 2, b and c, the 2 cell populations obtained after separation are devoid of contaminants.

Discussion and conclusion. The above described procedure provides a simple and rapid preparation of coelomocytes and oocytes from the coelomic fluid of *Perinereis cultrifera*.

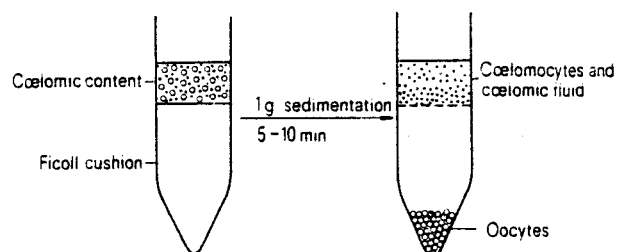


Figure 1. Schematic description of the procedure.

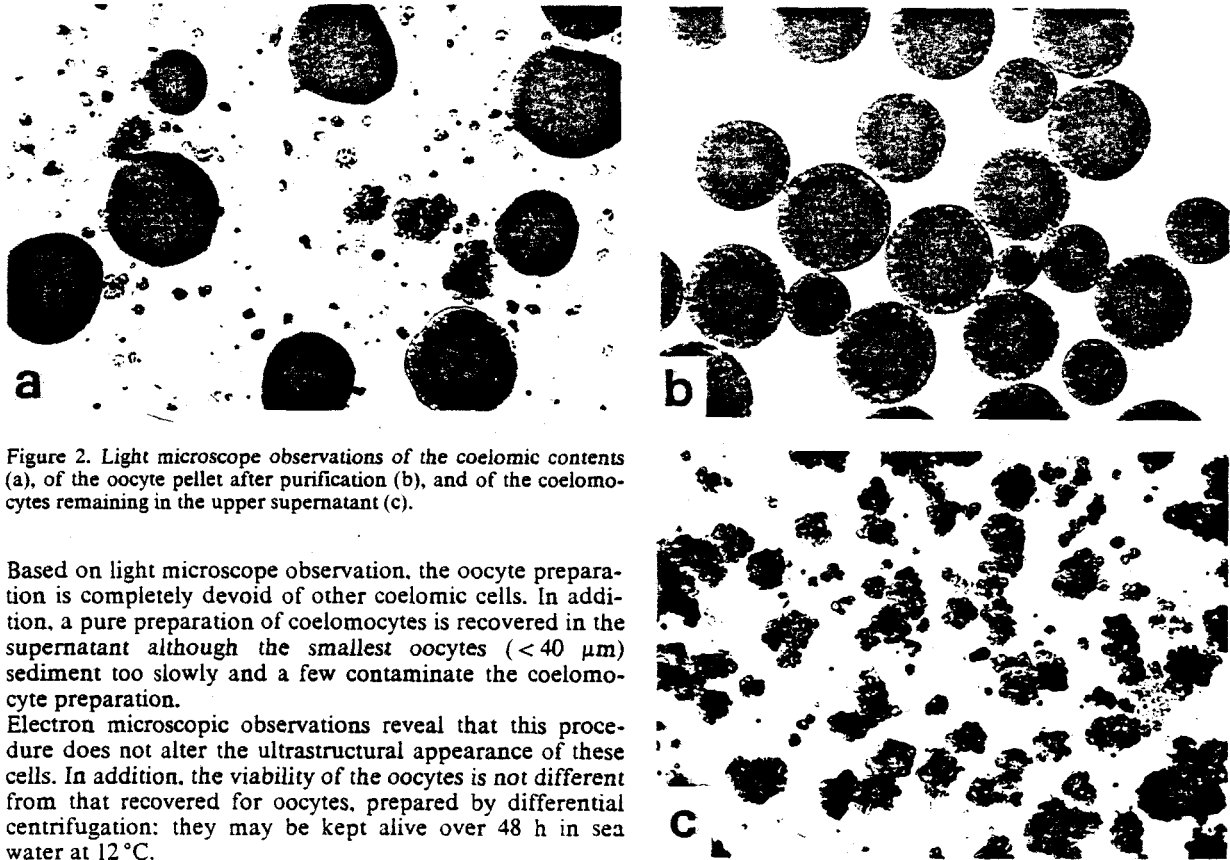


Figure 2. Light microscope observations of the coelomic contents (a), of the oocyte pellet after purification (b), and of the coelomocytes remaining in the upper supernatant (c).

Based on light microscope observation, the oocyte preparation is completely devoid of other coelomic cells. In addition, a pure preparation of coelomocytes is recovered in the supernatant although the smallest oocytes ($< 40 \mu\text{m}$) sediment too slowly and a few contaminate the coelomocyte preparation.

Electron microscopic observations reveal that this procedure does not alter the ultrastructural appearance of these cells. In addition, the viability of the oocytes is not different from that recovered for oocytes, prepared by differential centrifugation: they may be kept alive over 48 h in sea water at 12°C .

The described method leads to the recovery of pure oocyte and coelomocyte preparations. This is the first absolute requirement to investigate the proper enzymatic equipment of each cell types and to undertake a clear approach to uncover the biological relationships between each cell of the coelomic contents.

1 Reprint requests to M.P., Service de Biologie Animale, Université des Sciences et Techniques de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex (France).

- 2 Porchet, M. and Spik, G., *Comp. Biochem. Physiol.* 59b (1978) 175.
- 3 Porchet M., Spik, G., and Dhainaut, A., *Biol. Cell* 28 (1977) 225.
- 4 Durchon, M., *Annls Sci. nat.* 14 (1952) 119.
- 5 Dhainaut, A., and Porchet, M., *Biol. Cell* 28 (1977) 233.

0014-4754/83/040436-02\$1.50 + 0.20/0
© Birkhäuser Verlag Basel, 1983



MESURE DE L'ACTIVITE MANNOSYLTRANSFERASIQUE

 ET DE LA TRANSFORMATION DU GDP-MANNOSE EN

 GDP-FUCOSE

I - INCUBATION

A - REACTION GENERALE DE GLYCOSYLATION

La réaction de glycosylation peut être schématisée de la façon suivante :

Glycosyltransférase

Glycosyl-nucléotide + accepteur \longrightarrow accepteur-glycosylé + nucléotide

L'activité enzymatique se mesure par transfert d'un sucre radioactif sur les accepteurs endogènes ou exogènes. Comme toute réaction enzymatique, elle est sous la dépendance d'un certain nombre d'effecteurs (pH, température, force ionique, présence d'ions, etc...). On se placera toujours dans les conditions adéquates pour mesurer une vitesse initiale.

B - CONDITIONS D'INCUBATION POUR LA MANNOSYLTRANSFERASE

La réaction de mannosylation est la suivante :

Mannosyltransférase

GDP- $[^{14}\text{C}]$ Man + accepteurs endogènes \longrightarrow accepteurs- $[^{14}\text{C}]$ Man + GDP

L'incubation standard est réalisée en tampon cacodylate de sodium 0,1 M pH7,4, NaCl 0,154 M, MnCl₂ 2mM, MgCl₂ 5 mM, AMP 10 mM et GDP- $[^{14}\text{C}]$ Man (Amersham UK) 203 à 307 mCi/mmol).

Pour un volume d'incubation final de 100 μ l, un homogénat cellulaire (3 mg de protéines) est ajouté. L'incubation se fait à 30°C.

II - DETERMINATION DE LA RADIOACTIVITE LIEE AUX ACCEPTEURS ENDOGENES

A - ARRET DES REACTIONS

Les 100 μ l d'incubation sont dilués par 0,4 ml de "mélange d'arrêt" composé de tampon cacodylate de sodium 100 mM pH7,4, de NaCl 154 mM, de MgCl₂ 4mM et d'1 mg d'immunoglobulines G (comme agent dispersant). La solution est mélangée avec 0,8 ml de méthanol redistillé et 1,2 ml de chloroforme (RONIN et BOUCHILLOUX : 1976). Après centrifugation, l'extraction séquentielle des différents accepteurs mannosylés est effectuée suivant la méthode d'OLIVER et HEMMING (OLIVER et HEMMING : 1975) modifiée selon celle de BEHRENS (BEHRENS *et al.* : 1973).

B - EXTRACTION SEQUENTIELLE DES DIFFERENTS

INTERMEDIAIRES LIPIDIQUES MANNOSYLES ET DES

PROTEINES MANNOSYLES

Les différentes étapes de la méthode sont représentées sur la figure 38 page 120.

Par cette méthode, quatre phases peuvent être obtenues.

1 - Une phase "chloroforme/méthanol" :

contenant les intermédiaires lipidiques de type dolichol avec un ou deux résidus glycosyl. En utilisant des cellules de mammifères et un marquage au GDP- [¹⁴C] Man, on obtient dans cette phase des Dol-P- [¹⁴C] Man. La mesure de la radioactivité se fait

en scintillation liquide (Aqualite).

2 - Une phase "chloroforme/méthanol/eau" :
=====

Cette phase contient classiquement les dolichols pyrophosphates oligosaccharides marqués au $[^{14}\text{C}]$ Man. La mesure de la radioactivité se fait en scintillation liquide (Aqualite).

3 - Un résidu protéique :
=====

qui contient les protéines nouvellement mannosylées. Le taux de mannosylation est mesuré en scintillation liquide (Aqualite) après hydrolyse acide 10' à 100°C.

4 - Une phase aqueuse :
=====

Cette phase contient le GDP- $[^{14}\text{C}]$ Man non utilisé par les mannosyltransférases ainsi que ses produits de dégradation ($[^{14}\text{C}]$ Man et $[^{14}\text{C}]$ Man-1-phosphate). De plus, on y trouve les phosphooligosaccharides provenant de la dégradation des Dol-P-P-oligosaccharides (CACAN *et al.* : 1980 ; HOFACK *et al.* : 1981). Dans notre cas, les produits venant de la transformation du GDP-D-mannose se retrouvent également dans cette phase.

III - CONTROLE DE LA DEGRADATION DU PRECURSEUR NUCLEOTIDIQUE :

LE GDP-MANNOSE

A - INHIBITION DES REACTIONS DE DEGRADATION DU

GDP-MANNOSE

La première précaution à prendre lorsque l'on travaille sur des activités enzymatiques, est de vérifier si du précurseur,

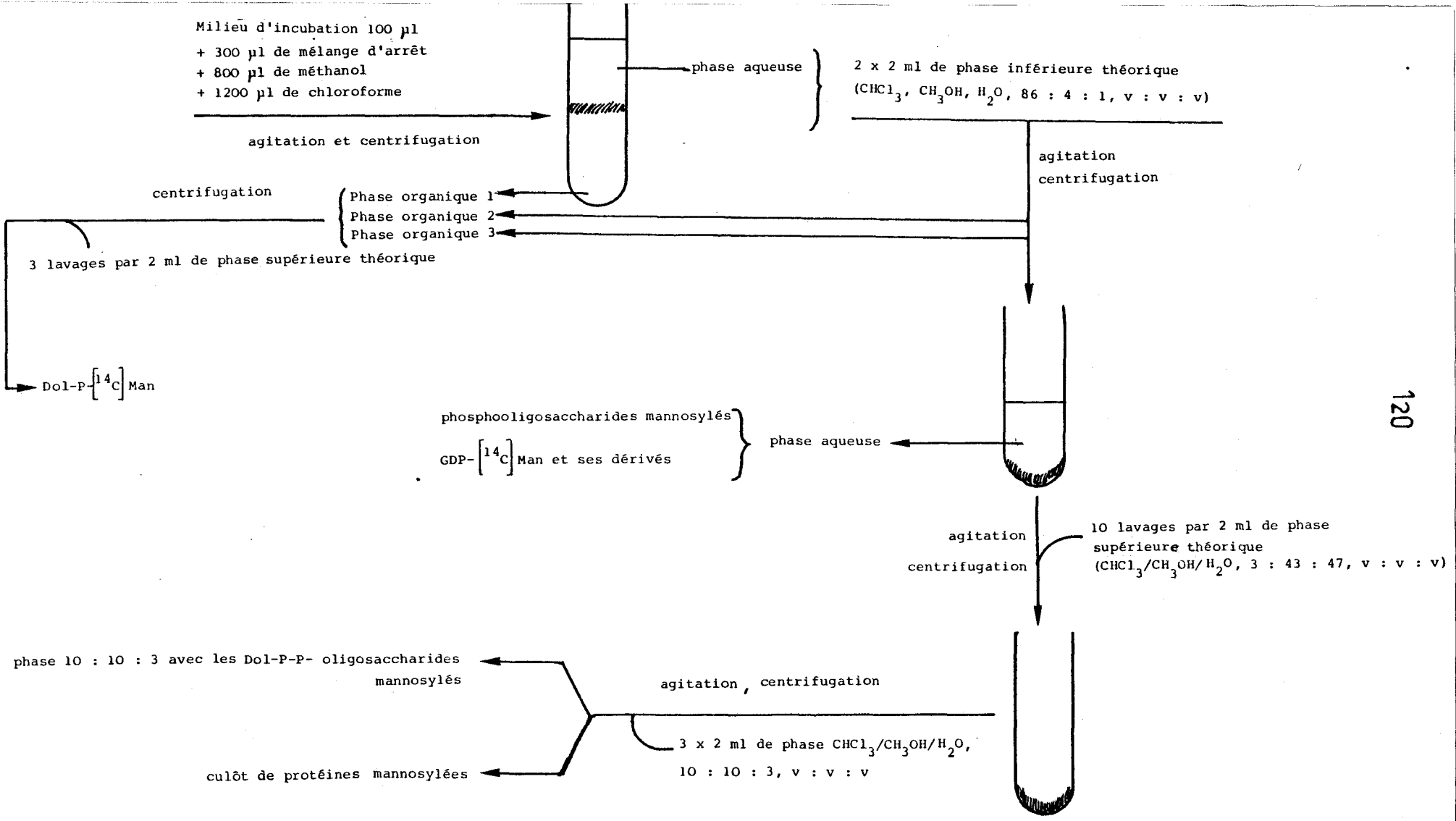
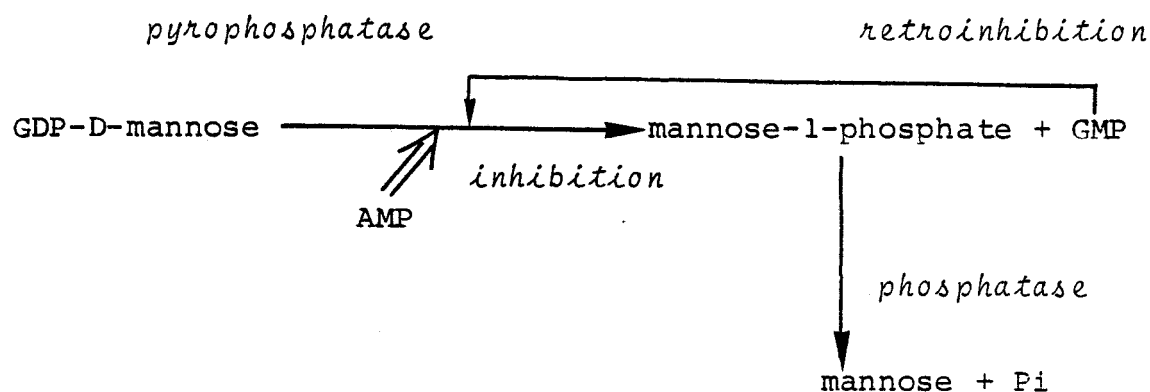


Figure 38 : Extraction séquentielle des intermédiaires lipidiques.



en l'occurrence le GDP-mannose, est encore présent en fin de réaction, ce qui signifie que la réaction n'a pas été ralentie par défaut de substrat. Dans la cellule et à la surface cellulaire, il existe des pyrophosphatases et des phosphatases capables de dégrader les glycosyl-nucléotides.

Le schéma suivant représente les dégradations que peut subir le GDP-mannose :



Il faut bloquer cette voie de dégradation. La méthode la plus simple consiste à retroinhiber les pyrophosphatases par un des produits de la réaction, le GMP. Cependant, nous utiliserons l'AMP qui inhibe également les enzymes sans interférer sur les réactions de glycosylation. Dans notre cas, 10 mM d'AMP dans le milieu d'incubation sont nécessaires pour bloquer l'action des pyrophosphatases et des phosphatases.

B - CONTROLE CHROMATOGRAPHIQUE DES PRODUITS DE

 DEGRADATION DU GDP-MANNOSE

La dégradation est suivie en chromatographie descendante sur papier Whatman 3, huit heures dans le solvant A : acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau dans les proportions, volume pour volume de 5 : 5 : 1 : 3 (SPIK *et al.* : 1979). Les sucres et

les sucres-1-phosphate témoins, sont révélés par pulvérisation d'oxalate d'aniline et chauffage 5' à 120°C.

Après chromatographie et révélation des témoins, des bandes de 5 cm x 1 cm sont découpées le long du chemin chromatographique et la radioactivité est déterminée en scintillation liquide (Lipofluor).

IV - CARACTERISATION DES PRODUITS DU METABOLISME DU GDP-MANNOSE

Différents tests permettent de caractériser les produits formés à partir du GDP-mannose :

- comportement chromatographique des glycosyl-nucléotides.
- comportement chromatographique des sucres libérés après réduction et hydrolyse.
- analyse en spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase gazeuse du fucose.

A - COMPORTEMENT CHROMATOGRAPHIQUE DES GLYCOSYL- ----- NUCLEOTIDES -----

La séparation des différents glycosyl-nucléotides a été réalisée par chromatographie descendante sur papier Whatman 3 dans les systèmes solvants suivants :

- solvant A :

Acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau dont les proportions respectives sont de 5 : 5 : 1 : 3 (v : v : v : v). Le temps de migration est ici de vingt heures. Les témoins de migration sont le GDP- $[^{14}\text{C}]$ Man et le GDP- $[^{14}\text{C}]$ Fuc.

Les Rf sont déterminés par rapport au mannose-1-phosphate témoin :

Rf GDP-Man = 0,58

Rf GDP-Fuc = 0,82

- Solvant B :

Acide isobutyrique/ammoniaque 1N dans les proportions de 5 : 3 (v : v). Le temps de migration est de trente heures. Les témoins utilisés sont le GDP- $[^{14}\text{C}]$ Man, le GDP- $[^{14}\text{C}]$ Fuc et le mannose libre (révélé à l'oxalate d'aniline après vaporisation du papier chromatographique et chauffage 5' à 120°C).

Les Rf approximatifs sont calculés par rapport au mannose :

Rf GDP-Man = 0,34

Rf GDP-Fuc = 0,55

Rf glycosyl-nucléotide intermédiaire = 0,45

B - COMPORTEMENT CHROMATOGRAPHIQUE DES SUCRES LIBERES

 APRES REDUCTION ET HYDROLYSE DES DIVERS GLYCOSYL-

 NUCLEOTIDES

1 - Les conditions de la réduction
 =====

La phase aqueuse après évaporation sous azote est reprise par 500 µl d'une solution d'ammoniaque 1 N, contenant du BH_4K 1mM. Le mélange qui est à pH alcalin, est laissé à température ambiante pendant vingt heures.

L'excès de borohydrure de potassium est détruit par addition de quelques gouttes d'acide acétique.

Les borates sont éliminés sous forme de méthyl-borates par une série d'évaporations en présence de méthanol.

Après séchage, le résidu est hydrolysé.

2 - Les conditions de l'hydrolyse acide

=====

L'échantillon réduit ou non, est séché sous azote puis repris dans 1ml d'une solution d'acide trifluoroacétique 1 N.

Le mélange est ensuite placé pendant deux heures à 100°C. L'échantillon ainsi hydrolysé est séché sous évaporation rotative et repris dans 100 µl d'eau. L'échantillon est dessalé sur une colonne de Dowex 50 x 8 (forme H⁺) et de Dowex 1 x 8 (forme formiate).

3 - Comportement chromatographique des sucres libres

=====

a) - Chromatographie descendante sur papier Whatman 3

+ = + = + = + = + = + = + = + = + = + = + = + = + = + = + = + = + = + = + =

Le système solvant C utilisé est composé de n butanol, d'acide acétique et d'eau dans les proportions respectives de 4 : 1 : 5 (v : v : v). Ce système solvant est biphasique. La phase supérieure, organique, va servir de phase mobile alors que la phase inférieure, aqueuse, va être utilisée pour saturer la cuve. Les témoins de migration sont le mannose, le fucose, le rhamnose, le glucose et le galactose. Le temps de migration est de trente six heures, après chromatographie, les témoins sont révélés par pulvérisation d'oxalate d'aniline et chauffage 5' à 120°C.

Le système solvant A est également utilisé, le temps de migration est ici de huit heures.

Après chromatographie dans tous ces systèmes solvants des bandes de 5 cm x 1 cm sont découpées le long du chemin

chromatographique correspondant au GDP-fucose est découpé et le GDP-fucose est élué une nuit par de l'eau. L'éluat est filtré et évaporé sous vide.

b) - Purification du GDP-fucose

+++++

Le GDP-fucose ainsi préparé est purifié par adsorption sur du charbon activé (2 fois 60 mg). Après deux lavages par de l'eau, le GDP-fucose est élué par quatre fois 4 ml de mélange éthanol 30 %/ammoniaque 0,3 %. Le rendement de cette purification est d'environ 90 %.

2 - Préparation de l'échantillon pour l'analyse en

=====

spectrométrie de masse

=====

La préparation de l'échantillon nécessite deux étapes :

a) - La réduction

+++++

Après lyophilisation, le produit à analyser est repris par 1 ml de soude 0,05 M. On ajoute du BD_4Na en excès (environ 3M). Le mélange qui est à pH alcalin est laissé une nuit à température ambiante. La réaction est arrêtée en acidifiant le milieu réactionnel à l'aide de Dowex 50 x 8 (25 - 50 mesh, forme H^+). Après décantation et filtration, les borates restant sont éliminés sous la forme de méthylborates par une série d'évaporations sous vide en présence de méthanol. Le but de la réduction est double :

- stabiliser le produit en le décyclisant ;
- marquer au deutérium la fonction aldéhydique lors de la fragmentation et permettre de distinguer le carbone qui constitue la liaison osidique.

b) - L'acétylation
 +=+=+=+=+=

Après réduction, l'échantillon est séché et repris par 100 µl de pyridine et par 100 µl d'anhydride acétique. L'acétylation se fait comme la réduction à température ambiante pendant une nuit. Les réactifs sont retirés par séchage sous azote. Les produits séchés sont repris par du méthanol et injectés en spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase gazeuse.

3 - Les conditions de chromatographie et de détermination
 =====
 du spectre de masse
 =====

Environ 1 µg de produit est injecté dans une colonne capillaire de type CP Scl 5 CB (0,32 cm x 25 m), la séparation s'effectue avec un gradient de température de 130°C à 230°C à raison de 10°C par minute. Après passage en chromatographie phase gazeuse, l'analyse se fait par spectrométrie de masse sous une énergie de 70eV et un courant ionisant de 0,2 mA (le type de l'appareil est Riber - Mag 10-b, Rueil-Malmaison, FRANCE).

V - LOCALISATION SUBCELLULAIRE ET PURIFICATION PARTIELLE DE

 L'ACTIVITE ENZYMATIQUE

Après homogénéisation des ovocytes de *Perinereis cultrifera* dans les conditions décrites précédemment, l'homogénat est centrifugé à 150 000 g pendant une heure à 4°C. Le surnageant est repris et l'activité enzymatique contenue dans ce surnageant est concentrée par précipitation au sulfate d'ammonium 65 % pendant une heure à 4°C (cette précipitation se fait sous agitation lente). Après centrifugation à 15 000 g pendant 30' à 4°C, le cûlot

renfermant l'activité enzymatique, est solubilisé dans un volume minimum par du tampon cacodylate de sodium 0,1 M pH7,4, NaCl 0,154 M. Cette solution est ensuite dialysée deux heures à 4°C contre 2 x 1 litre de ce même tampon. La source enzymatique ainsi purifiée est conservée dans l'azote liquide durant une période n'excédant pas quinze jours.

BIBLIOGRAPHIE

AUBERT J. P., BISERTE G., LOUCHEUX-LEFEBURE M. M.,
Carbohydrate - peptide linkage in glycoproteins.
Arch. Biochem. Biophys., 175, 410-414 (1976).

ANDERSON E.,
Cortical alveoli formation and vitellogenesis during
oocyte differentiation in the pipefish *Syngnathus fuscus*
and the killifish *Fundulus heteroclitus*.
J. Morph., 125, 23-60 (1968).

ANDO S., KON K., ISOBE M., NAGAI Y., YAMAKAWA T.,
Existence of glucosaminyl lactosyl ceramide
(amino CTH - 1) in human erythrocyte membranes as
a possible precursor of blood group-active glycolipids.
J. Biochem., 79, 625-632 (1976).

BADDILEL J., BUCHANAN J. G., CARSS B., MATHIAS A. P.,
SANDERSON A. R.,
The isolation of cytidine diphosphate glycerol, cytidine
diphosphate ribitol and mannitol-1-phosphate from
Lactobacillus arabinosus.
Biochem. J., 64, 599-603 (1956).

BAINTON D. F. et FARQUHAR M. G.,
Origin of granules in polymorphonuclear leucocytes.
Two types derived from : opposite faces of the Golgi
complex in developing granulocytes.
J. Cell-Biol., 28, 277-301 (1966).

BEELEY J. F.,
Peptide chain conformation and the glycosylation of
glycoproteins.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 76, 1051-1055 (1977).

BEHRENS N. H., CARMINATTI H., STANELONI R. J.,
LELOIR L. F., CANTARELLA A. I.,
Formation of lipid-bound oligosaccharides containing
mannose. Their role in glycoprotein synthesis.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 70, 3390-3394 (1973).

BERGER E. G., BUDECKE E., KAMERLING J. P., KOBATA A.,
PAULSON D. C., VLIAGENTHART J. F. G.,
Structure, biosynthesis and functions of glycoprotein
glycans.
Revue générale dans *Experientia.*, 38, 1129-1258 (1982).

BERTOUT M.,
Relations entre l'évolution du nucléole et l'activité
endocrine cérébrale au cours de l'ovogénèse de *Nereis
diversicolor* O. F. Müller (annelide polychete) dans les
conditions naturelles et expérimentales.
Withelm Roux' Archiv., 173, 183-207 (1972).

BERTOUT M.,
Spermatogénèse de *Nereis diversicolor* O. F. Müller
(annelide polychete). 1. Evolution du cytoplasme et
élaboration de l'acrosome.
J. Microscopie Biol-Cell., 25, 87-94 (1976).

BERTOUT M.,
L'évolution du noyau au cours de la gamétogénèse et son
contrôle par l'hormone cérébrale chez les Nereidae.
Thèse présentée pour obtenir le grade de docteur es
sciences naturelles. Université des Sciences et Techniques
de LILLE I., (1981).

BERTOUT M., CANER F., DHAINAUT A., KREMBEL J.,
Development of the nuclear structure and metabolism during
oogenesis of *Perinereis cultrifera* (annelide polychete).
J. Invert. Reprod., 3, 121-132 (1981).

BEYER T. A., REARICK J. I., PAULSON J. C., PRIEELS J. P.,
SADLER J. I., HILL R. L.,
Biosynthesis of mammalian glycoproteins.
J. Biol. Chem., 254, 12531-12541 (1979).

BOILLY-MARER Y.,
Inhibition des transformations hétéronéreidiennes par le
cerveau d'espèces sans épitoquie (Néreidiens).
C. R. Acad. Sci., 254, 2830-2832 (1962).

BOSMAN H. B., HAGOPIAN A., EYLAR E. M.,
Glycoprotein biosynthesis : the characterization of two
glycoprotein : fucosyltransferases in Hela cells.
Arch. Biochem. Biophys., 128, 470-481 (1968).

BULET P., HOFACK B., VERBERT A., PORCHET M.,
Simple procedure to isolate coelomocyte-free oocytes
from coelomic fluid of *Perinereis cultrifera* Grube
(annelida polychaeta).
Experientia., 39, 436-437 (1983).

BUTLER W. T., CUNNINGHAM L. W.,
Evidence for the linkage of a disaccharide to hydroxylisine
in tropocollagen.
J. Biol. Chem., 241, 3882-3883 (1966).

CABIB E., LELOIR L. F.,
Guanosine diphosphate mannose.
J. Biol. Chem., 206, 779-790 (1954).

CACAN R., HOFACK B., VERBERT A.,
Fate of oligosaccharide-lipid intermediates synthesized by
resting rat-spleen lymphocytes.
Eur. J. Biochem., 106, 473-479 (1980).

CANER F.,
Contribution à l'étude biochimique de l'ovogénèse de
Perinereis cultrifera (Annélide Polychète).
Thèse de 3ème Cycle. Université des Sciences et Techniques
de Lille I, (1981).

CARDON C., DURCHON M., PORCHET M.,
Purification par chromatographie liquide de haute pression
(H. P. L. C.) de l'hormone cérébrale chez *Nereis diversicolor*
et *Perinereis cultrifera* (annelides polychetes).
Reprod. Nutr. Develop., 21, 383-390 (1981).

CARLSON D. M.,
Structures and immunochemical properties of oligosaccharides
isolated from pig submaxillary mucins.
J. Biol. Chem., 243, 616-626 (1968).

CHESTER M. A., WATKINS W. M.,
 α -L-fucosyltransferases in human submaxillary gland and
stomach tissues associated with the H, Le^a and Le^b blood-
group characters and ABH secretor status.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 34, 835-842 (1969).

CLARK R. B., RUSTON R. J. G.,
The influence of brain extirpation on oogenesis in the
polychete *Nereis diversicolor*.
Gen. Comp. Endocr., 3, 529-541 (1963) a.

CLARK R. B. et RUSTON R. J. G.,
Time of release and action of a hormone influencing
regeneration in the polychete *Nereis diversicolor*.
Gen. Comp. Endocrinol., 3, 542-553 (1963) b.

COATES S. W., GURNEY T., SOMMERS L. W., YEH M.,
HIRSCHBERG C. R.,
Subcellular localization of sugar nucleotide synthetases.
J. Biol. Chem., 255, 9225-9229 (1980).

COMB D. G., SHIMIZU F., ROSEMAN S.,
Isolation of cytidine -5'- monophospho-N-acetylneuraminic
acid.
J. Am. Chem. Soc., 81, 5513 (1959).

COSTELLO D. P.,
The relations of the plasma membrane vitelline membrane
and jelly in the eggs of *Nereis lumbata*.
J. Gen. Physiol., 32, 351-366 (1949).

CSABA G.,
Hormonal regulation morphogenetic and adaptative systems.
Biol. Rev., 52, 295-303 (1977).

DE VRIES A. L., VANDENHEEDE J., FEENEY R. E.,
Primary structure of freezing-point depressing glycoproteins.
J. Biol. Chem., 246, 305-308 (1971).

DE VRIES A. L.,
Biological antifreezes and survival in freezing environments
in animals and environmental fitness.
R. Cells. ed. P., (1980).

DHAINAUT A.,
Etude en culture organotypique de l'influence de l'hormone
cérébrale des Néréidiens sur la synthèse de DNA au cours
de la spermatogénèse.
C. R. acad. Sci., 259, 461-464 (1964).

DHAINAUT A.,
Etude de la vitellogénèse chez *Nereis diversicolor* of Müller (annelide polychète) par autoradiographie à haute résolution.
C. R. Acad. Sci., 265, 434-436 (1967).

DHAINAUT A.,
Etude par autoradiographie à haute résolution de l'élaboration des mucopolysaccharides acides au cours de l'ovogénèse de *Nereis pelagica* (annelide polychète).
J. Microscopie., 7, 1075-1080 (1968).

DHAINAUT A.,
Contribution à l'étude de la gamétogénèse des Néreidiens (annelides polychètes) dans les conditions naturelles et en l'absence d'hormone cérébrale.
Thèse présentée pour obtenir le grade de docteur es sciences naturelles. Université des Sciences et Techniques de LILLE I., (1970) a.

DHAINAUT A.,
Etude en microscopie électronique et par autoradiographie à haute résolution des extrusions nucléaires au cours de l'ovogénèse de *Nereis pelagica* (annelide polychète).
J. Microscopie., 9, 99-118 (1970) b.

DHAINAUT A. - COURTOIS N.,
Etude histologique et ultrastructurale des cellules nerveuses du ganglion cérébral de *Nereis pelagica* (annelide polychète). Comparaison entre les types cellulaires 1-VL et ceux décrits antérieurement chez les Néreidae.
Gen. Comp. Endocr., 11, 414-443 (1968).

DHAINAUT A. et PORCHET M.,
Evolution des constituants glucidiques de l'ovocyte de *Perinereis cultrifera* (annelide polychète) dans les conditions naturelles.
III - Etude autoradiographique des ovocytes submatures.
Biol. Cell., 28, 241-250 (1977) a.

DHAINAUT A. et PORCHET M.,
Evolution des constituants glucidiques de l'ovocyte de *Perinereis cultrifera* (annelide polychète) dans les conditions naturelles.
II - Etude autoradiographique des ovocytes jeunes.
Biol. Cell., 28, 233-240 (1977) b.

DURCHON M.,
Épitoque expérimentale chez deux polychètes :
Perinereis cultrifera et *Nereis irrorata*.
C. R. Acad. Sci., 225, 157-158 (1948).

DURCHON M.,
Recherches expérimentales sur deux aspects de la reproduction
chez les annélides polychètes : épitoque et stolonisation.
Ann. Sci. Nat., 14, 119-206 (1952).

DURCHON M.,
Rôle du cerveau dans la maturation génitale et le déclenchement
de l'épitoque chez les Néreidiens.
Ann. Sci. Nat. Zool. Biol. Anim., 18, 269-273 (1956) a.

DURCHON M.,
Influence du cerveau sur les processus de régénération
caudale chez les Néreidiens.
Arch. Zool. Exp. Gen., 94, 1-9 (1956) b.

DURCHON M.,
L'endocrinologie chez les annélides polychètes.
Bull. Soc. Zool. Fr., 85, 275-301 (1960).

DURCHON M.,
Induction et inhibition expérimentale de l'épitoque
par homogreffes chez les Néreidiens.
Bull. Soc. Zool. Fr., 87, 575-582 (1962).

DURCHON M.,
L'endocrinologie des vers et des mollusques.
Masson et Cie ed. PARIS., (1967).

DURCHON M. et PORCHET M.,
Dosage de l'activité endocrine cérébrale au cours du
cycle génital femelle chez *Nereis diversicolor*.
C. R. Acad. Sci., 170, 1689-1691 (1970).

DURCHON M. et PORCHET M.,
Premières données quantitatives sur l'activité endocrine
du cerveau des Néreidiens au cours de leur cycle sexuel.
Gen. Comp. Endocr., 16, 555-565 (1971).

DURCHON M., SCHALLER F.,
Application de la méthode de culture organotypique aux
recherches endocrinologiques chez les annelides polychètes
C. R. Acad. Sci., 256, 5616-5617 (1963).

DURCHON M., SCHALLER F.,
Recherches endocrinologiques en culture organotypique chez
les annelides polychètes.
Gen. Comp. Endocr., 4, 427-432 (1964).

DURCHON M., BOILLY B., DHAINAUT A.,
Recherches en culture organotypique sur l'action de l'hormone
cérébrale des Néreidiens.
C. R. Ac. Soc. Biol., 159, 106-113 (1965).

ELBEIN A. D., HEATH E. C.,
The biosynthesis of cell wall lipopolysaccharide in
Escherichia coli.
J. Biol. Chem., 240, 1919-1925 (1965).

FALTYNEK C. R., SILBERT J. E., HOF L.,
Xylosylphosphoryldolichol synthesized by chick embryo
epiphyses.
J. Biol. Chem., 257, 5490-5495 (1982).

FEINGOLD D. S., NEUFELD E. F., HASSID W. Z.,
The 4-epimerization and decarboxylation of uridine
diphosphate D-glucuronic acid by extracts from *Phaseolus*
aureus seedlings.
J. Biol. Chem., 235, 910-913 (1960).

FEINGOLD D. S., NEUFELD E. F., HASSID W. Z.,
Preparation of UDP-D-xylose and UDP-L-arabinose.
Methods in enzymology., 6, 782-787 (1963).

FOSTER D. W., GINSBURG V.,
Biosynthesis of L-fucose by mammalian tissue.
Biochem. Biophys. Acta., 54, 376-379 (1961).

GEIGER P. J., BESSMAN S. P.,
Protein determination by Lowry's method in the presence
of sulfhydryl reagents.
Analy. Biochem., 49, 467-473 (1972).

GINSBURG V.,
Purification of uridine diphosphate glucose pyrophosphorylase
from mung bean seedlings.
J. Biol. Chem., 232, 55-61 (1958).

GINSBURG V.,
Formation of guanosine diphosphate L-fucose from guanosine
diphosphate D-mannose.
J. Biol. Chem., 235, 2196-2201 (1960).

GINSBURG V.,
Studies on the biosynthesis of guanosine diphosphate
L-fucose.
J. Biol. Chem., 236, 2389-2393 (1961).

GINSBURG V.,
Formation of GDP-L-fucose from GDP-D-mannose.
In methods in enzymology (NEUFELD E. F. and GINSBURG V.,
eds). Vol 8, 293-295, Academic Press, NEW YORK., (1966).

GLASER L., KORNFELD S.,
The enzymatic synthesis of thymidine-linked sugars.
J. Biol. Chem., 236, 1791-1799 (1961).

GOTTSCHALK A.,
Glycoproteins, their composition, structure and function.
Ed. GOTTSCHALK Elsevier AMSTERDAM., (1972).

GOTTSCHALK A., BHARGAVA A. S., MURTY V. L. M.,
In glycoproteins, their composition, structure and function.
Part B. GOTTSCHALK A. Ed. Elsevier. Publishing company,
AMSTERDAM, LONDON, NEW YORK., 810-829 (1972).

HAKOMORI S. I.,
Structures and organization of cell surface glycolipids
depending on cell growth and malignant transformation.
Biochim. Biophys. Acta., 417, 55-89 (1975).

HAKOMORI S. I., JEANLOZ R. W.,
Isolation and characterisation of glycolipids from erythrocytes
of human blood A (plus) and B (plus).
J. Biol. Chem., 236, 2827-2833 (1961).

HAKOMORI S. I., STRYCHARD C. D.,
Investigations on cellular blood groups substances.
I - Isolation and chemical composition of blood group ABH
and Le. Isoantigens of sphingolipids nature.
Biochemistry., 7, 1279-1286 (1968).

HAKOMORI S. I., SIDDIQUI B., LI. Y. T., LI. S. C.,
HELLERQUIEST L. G.,
Anomeric structures of globoside and ceramide trihexoside
of human erythrocytes and hamster fibroblasts.
J. Biol. Chem., 246, 2271-2277 (1971).

HANOVER J. A., LENNARZ W. J., YOUNG J. D.,
Synthesis of N- and O-linked glycopeptides in oviduct
membrane preparation.
J. Biol. Chem., 255, 6713-6716 (1980).

HAUENSCHILD C.,
Hormonal hemmung der geschlechtsreife und metamorphose
bei dem polychaeten *Platynereis dumerilii*.
Naturforsch, 11b., 125-132 (1956).

HAUENSCHILD C.,
Postembryonale entwicklungsteriereing durch an gehen
hormon bei *Platinereis dumerilii*.
Ann. Endocr., 25, 49-56 (1964) a.

HAUENSCHILD C.,
L'influence de l'hormone du cerveau sur le développement
postembryonnaire de *Platinereis dumerilii*.
Ann. Endocr., 71, 511-544 (1964) b.

HAUENSCHILD C.,
Hormon bei nereiden und anderen neideren wirbellosen.
Zool. Jb. Ab. Allg. Zoo. Physiol. Tiere. Stach., 71, 511-544
(1965).

HEATH E. C.,
The isolation of guanosine diphosphate colitose from
Escherichia coli.
Biochem. Biophys. Acta., 39, 377-378 (1960).

HOFACK B., CACAN R., VERBERT A.,
Dolichol pathway in lymphocytes from rat spleen.
Eur. J. Biochem., 117, 285-290 (1981).

HORI T., SUGITA M., KANBAYASHI J., ITASAKA O.,
Study on glycosphingolipids of fresh-water bivalves and
characterization.
III - Isolation of a novel globoside containing mannose
from spermatozoa of the fresh-water bivalve *Hirriopsis
schlegelii*.
Journal of Biochemistry (TOKYO)., 81, 107-114 (1977) a.

HORI T., SUGITA M., ANDO S., KUWAHARA M., KUMAUCHI K.,
SUGIE E., ITASAKA O.,
Characterization of a novel glycosphingolipid, ceramide
nonasaccharide, isolated from spermatozoa of the fresh-
water bivalve *Hirriopsis schlegelii*.
The journal of biological chemistry., 256, 10979-10985 (1981).

HORI T., TAKEDA H., SUGITA M., ITASAKA O.,
Studies of glycosphingolipids of fresh-water bivalves.
IV - Structure of a branched globoside containing mannose
from spermatozoa of the fresh-water bivalve *Hirriopsis
schlegelii*.
Journal of Biochemistry (TOKYO)., 82, 1281-1285 (1977) b.

HUBBARD S. C., IVATT R. J.,
Synthesis and processing of asparagine oligosaccharides.
An. Rev. Biochem., 50, 555-583 (1981).

ISEMURA M., IKENAKA T., MATSUSHIMA Y.,
Comparative study of carbohydrate - protein complexes.
I - The structures of glycopeptides derived from cuttlefish
skin collagen.
J. Biochem. (TOKYO)., 74, 11-21 (1973).

KORNFELD R. H., GINSBURG V.,
Control of synthesis of guanosine 5'-diphosphate D-mannose
and guanosine 5'-diphosphate L-fucose in bacteria.
Biochem. Biophys. Acta., 177, 79-87 (1966).

KORNFELD R., KORNFELD S.,
Structure of glycoproteins and their oligosaccharides units.
Dans Biochemistry of glycoproteins and proteoglycans, LENNARZ
W. J., Ed Academic Press, NEW YORK., 1-34 (1980).

KOSCIELAK J., PIASEK A., GORNIK H., GARDAS A., GREGOR A.,
Structures of fucose -containing glycolipids with H and B
blood-group activity and of sialic acid and glucosamine-
containing glycolipid of human-erythrocyte membrane.
Eur. J. Biochem., 37, 214-225 (1973).

MARKOVITZ A.,
Biosynthesis of guanosine diphosphate D-rhamnose and guanosine
diphosphate D-talomethylose from guanosine diphosphate -D-
mannose.
J. Biol. Chem., 239, 2091-2098 (1964).

MARKWELL M. A. K., HAAS S. H., BIEBER L. C., TOLBERT N. E.,
A modification of the Lowry procedure to simplify protein
determination in membrane and lipoproteins samples.
Analy. Biochem., 87, 206-210 (1973).

MAXWELL E. S., DE ROBICHON-SZULMAJSTER H.,
Purification of uridine diphosphate galactose-4-epimerase
from yeast, and the identification of protein-bound
diphosphopyridine nucleotide.
J. Biol. Chem., 235, 308-312 (1960).

MONTREUIL J.,
Glycoproteins.
Dans Comprehensive Biochemistry, 19b, NEUBERGER A., VAN DEENEN
L. L. M., Eds, Elsevier Scientific publishing company, AMSTERDAM.
OXFORD. NEW YORK., (1982).

MUIR L., LEE Y. C.,
Glycopeptides from earthworm cuticle collagen.
J. Biol. Chem., 245, 502-509 (1970).

NAKAJIMA T., BALLOU C. E.,
Structure of the linkage region between the polysaccharide
and protein parts of *Saccharomyces cerevisiae* mannan.
J. Biol. Chem., 249, 7685-7694 (1974).

NEUFELD E. F., GINSBURG V., PUTMAN E. W., FANSHIER D.,
HASSID W. Z.,
Formation and interconversion of sugar nucleotides by
plant extracts.
Arch. Biochem. Biophys., 69, 602-616 (1957).

O' GRADY S. M., CLARKE A., DE VRIES A. L.,
Characterization of glycoprotein antifreeze biosynthesis
in isolated hepatocytes from *Pagothenia borchgrevinki*.
The journal of experimental Zoology., 220, 179-189 (1982).

OLIVER I. T.,
Inhibitor studies on uridine diphosphoglucose pyrophosphorylase
Biochim. Biophys. Acta., 52, 75-81 (1961).

OLIVER G. J. A., HEMMING F. W.,
The transfer of mannose to dolichol diphosphate oligosaccharides
in pig liver endoplasmic reticulum.
Biochem. J., 152, 191-199 (1975).

OKAZAKI R., OKAZAKI T., KURIKI Y.,
Isolation of thymidine diphosphate rhamnose and a novel
thymidine diphosphate sugar compound from *Escherichia coli*
strain B.
Biochem. Biophys. Acta., 38, 384-386 (1960).

OKAZAKI R., OKAZAKI T., STROMINGER J. L., MICHELSON A. M.,
Thymidine diphosphate 4-keto-6-deoxy-D-glucose, an intermediate
in thymidine diphosphate L-rhamnose synthesis in *Escherichia*
coli strains.
J. Biol. Chem., 237, 3014-3026 (1962).

PALADINI A. C., LELOIR L. F.,
Studies on uridine-diphosphate-glucose.
Biochem. J., 51, 426-430 (1952).

PARODI A. J., LELOIR L. F.,
The role of lipid intermediates in the glycosylation of
proteins in the eucaryotic cell.
Biochem. Biophys. Acta., 559, 1-37 (1979).

PARODI A. J., BEHRENS N. H., LELOIR L. F., CARMINATTI H.,
The role of polyprenol-bound saccharides as intermediates
in glycoproteins synthesis in liver.
Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 69, 3268-3875 (1972).

PAZUR J. H., SHADAKSHARASWAMY M.,
Galactose-1-phosphate uridyl transferase activity in soybean
extracts.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 5, 130-134 (1961).

PAZUR J. H., SHUEY E. W.,
The enzymatic synthesis of thymidine diphosphate glucose and
it's conversion to thymidine diphosphate rhamnose.
J. Biol. Chem., 236, 1780-1785 (1961).

PAZUR J. H., KNULL H. R., CEPURE A.,
Glycoenzymes : structure and properties of the two forms
of glucoamylase from *Aspergillus niger*.
Carbohy. Res., 20, 83-96 (1971).

PHILLIPS D. M. et SWIFT M.,
Cytoplasmic fine structure of *Sciara* salivary glands.
I - Secretion.
J. Cell. Biol., 27, 395-409 (1965).

PORCHET M.,
Activité endocrine cérébrale chez les Néréidae. Données
quantitatives, influence sur la teneur en glucides des ovocytes
et du liquide coelomique mécanisme régulateur de la sécrétion
hormonale.
Thèse présentée pour obtenir le grade de docteur es sciences
naturelles. Université des Sciences et Techniques de LILLE I.,
(1974).

PORCHET M., SPIK G.,
Biochemical analysis of Nereidae gametogenesis. Evolution
of glycoconjugates during natural oogenesis of *Perinereis
cultrifera*.
Comp. Biochem. Physiol., 59, 177-181 (1978).

PORCHET M., SPIK G., DHAINAUT A.,
Evolution des constituants glucidiques de l'ovocyte de
Perinereis cultrifera (annelide polychète) dans les
conditions naturelles.
I - Etude biochimique.
Biol. Cell., 28, 225-232 (1977).

PREISS J., WOOD E.,
Sugar nucleotide reactions in *Arthrobacter*.
J. Biol. Chem., 239, 3119-3132 (1964).

PROHASKA R., SCHENKEL-BRUNNER H.,
A simple and efficient method for the preparation of
GDP-fucose.
Analytical biochemistry., 69, 536-544 (1975).

RAIZADA H. K., SCHUTZBACH J. S., ANKEL H.,
Cryptococcus laouotri cell envelope glycoprotein.
J. Biol. Chem. 250., 3310-3315 (1975).

REITMAN M. L., TROWBRIDGE I. S., KORNFELD S.,
Mouse lymphoma cell lines resistant to pea lectin are
defective in fucose metabolism.
J. Biol. Chem., 255, 9900-9906 (1980).

RONIN C., BOUCHILLOUX S.,
Evidence for mannosyl lipids as intermediates in mannose transfer
to thyroid rough microsomal glycoproteins.
Biochem. Biophys. Acta., 428, 445-455 (1976).

RONIN C., GRANIER C., CASETI C., BOUCHILLOUX S.,
VAN RIETSCHOTEN J.,
Synthetic substrates for thyroid oligosaccharides transferases
effects of peptide chain length and modification in the
Asn-X-Thr region.
Eur. Journal of biochemistry., 118, 159-164 (1981).

ROSENTHAL A. L., NORDIN J. H.,
Enzymes that hydrolyse fungal cell wall polysaccharides.
J. Biol. Chem., 250, 5295-5303 (1975).

ROTHMAN J. E.,
The Golgi apparatus : two organelles in tandem.
Science., 213, 1212-1219 (1981).

ROTHMAN J. E., FINE R. E.,
Coated vesicles transport newly synthesized membrane
glycoproteins from endoplasmic reticulum to plasma
membrane in two successive stages.
Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 77, 780-784 (1980).

SANDOZ D.,
Etude cytochimique des polysaccharides au cours de la
spermatogénèse d'un amphibien anoure : le discoglosse
Discoglissius puctus (OTTH).
J. Microscopie., 9, 243-262 (1970).

SCHACHTER H., ROSEMAN S.,
Mammalian glycosyltransferases.
In the Biochemistry of glycoproteins and proteoglycans,
Ed LENNARZ W. J. Plenum, Press. NEW YORK., (1980).

SCHACHTER H., ISHIHARA H., HEATH E. C.,
GDP-L- [¹⁴C] fucose.
In methods in enzymology (GINSBURG V. ed.), vol 28,
285-287, Academic Press. NEW YORK., (1972).

SHEN L., GROLLMAN E. F., GINSBURG V.,
An enzymatic basis for secretor status and blood group
substance specificity in humans.
Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 59, 224-230 (1968).

SHIER W. T., LIN Y., DE VRIES A. L.,
Structure of the carbohydrate of antifreeze glycoproteins
from an antartic fish.
FEBS Lett., 54, 135-138 (1975).

SLOMIANY A., SLOMIANY B. L., HOROWITZ M. I.,
Structural study of the blood group A active glycolipids
of hog gastric mucosa.
J. Biol. Chem., 249, 1225-1230 (1974).

SPIK G., SIX P., MONTREUIL J.,
Chemical and enzymic degradation of nucleoside mono and
diphosphate sugars.
I - Determination of the degradation rate during the
glycosyltransferase assays.
Biochim. Biophys. Acta., 584, 203-215 (1979).

SPIK G., STRECKER G., FOURNET B., BOUQUELET S., DORLAND L.,
VANHALBEEK., Vliegenthart J. F. G., MONTREUIL J.,
Primary structure of the glycans from human lactotransferrin.
Eur. J. Biochem., 121, 413-419 (1982).

SPIRO R. G., BHOYROO V. D.,
The carbohydrate of invertebrate collagens : a glucuronic
acid mannose disaccharide unit.
Fed. Proc., 30, 1223-1228 (1971).

STROMINGER J. L.,
Accumulation of uridine and cytidine nucleotides in
Staphylococcus aureus inhibited by gentian violet.
J. Biol. Chem., 234, 1520-1524 (1959).

STROMINGER J. L., MAPSON L. W.,
Uridine diphosphoglucose deshydrogenase of pea seedlings.
Biochem J., 66, 567-572 (1957).

STROMINGER J. L., KALLKAR H. M., AXELROD J., MAXWELL E. S.,
Enzymatic oxidation of uridine diphosphate glucose to
uridine diphosphate glucuronic acid.
J. Am. Chem. Soc., 76, 6411-6412 (1954).

STRUCK D. K., LENNARZ W. J.,
The function of saccharide-lipids in synthesis of glycoproteins.
Dans Biochemistry of glycoproteins and proteoglycans, ed.
LENNARZ W. J., p 35-83. Plenum Press. NEW YORK., (1980).

TABAS I., SCHLESINGER S., KORNFELD S.,
Processing of high mannose oligosaccharides from complex
type oligosaccharides on the newly synthesized polypeptides
of the vesicular *Stomatitus virus* G protein and the IgG heavy
chain.
J. Biol. Chem., 253, 716-722 (1978).

TAI T., YAMASHITA K., KOBATA A.,
The substrate specificities of endo- -N-acetylglucosaminidases.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 78, 434-440 (1977).

TATA J. R.,
The action of growth and developmental hormones.
Biol. Rev., 55, 285-319 (1980).

TURNER D. H., TURNER J. F.,
Uridine diphospho-glucose pyrophosphorylase of pea seeds.
Biochem J., 69, 448-452 (1958).

VILLAR-PALASI C., LARNER J.,
Uridine diphosphate glucose pyrophosphorylase from
skeletal muscle.
Arch. Biochem. Biophys., 86, 61 (1960).

WAECHTER C. J., LENNARZ W. J.,
The role of polyprenol linked sugars in glycoprotein
synthesis.
A. Rev. Biochem., 45, 95-112 (1976).

WARREN L., BLACKLOW S.,
The biosynthesis of cytidine 5'-monophospho-N-acetylneuraminic
acid by an enzyme from *Neisseria meningitidis*.
J. Biol. Chem., 237, 3527-3534 (1962).

YAMASHITA K., TACHIBANA Y., KOBATA A.,
The structures of the galactose containing sugars chains
of ovalbumin.
J. Biol. Chem., 253, 3862-3869 (1978).





Les études que nous avons menées sur les mannosyltransférases en utilisant comme modèle expérimental les ovocytes de *Perinereis cultrifera* nous ont permis de démontrer les points suivants :

1. Un homogénat ovocytaire est capable d'exprimer des activités mannosyltransférases. Lorsque l'on fait un marquage à partir de GDP- $[^{14}\text{C}]$ mannose, des produits marqués sont retrouvés dans les différentes phases obtenues après extraction séquentielle d'intermédiaires lipidiques.

2. En présence d'un homogénat ovocytaire, le GDP-mannose est rapidement transformé en GDP-fucose.

3. Une étude plus complète de ce phénomène de conversion du GDP-mannose en GDP-fucose a permis de définir avec plus de précision le mécanisme réactionnel mis en jeu :

- la transformation du GDP-mannose en GDP-fucose se fait en plusieurs étapes et nécessite la formation d'un glycosyl-nucléotide intermédiaire dont le monosaccharide serait un méthyl pentose à fonction cétonique.

- la formation du GDP-fucose à partir du glycosylnucléotide intermédiaire se fait en présence de NADPH, H^+ .

- le GDP-fucose formé contrôle le taux de sa propre formation en inhibant la première réaction.

- l'activité enzymatique responsable de la transformation du GDP-mannose en GDP-fucose est localisée dans la fraction cytosolique des ovocytes.

4. Nous avons montré que cette activité enzymatique responsable de la conversion du GDP-mannose en GDP-fucose était un excellent marqueur de l'évolution ovocytaire chez *Perinereis cultrifera*.

Ovogenèse - Maturation ovocytaire - Glycoconjugués - Marqueur biochimique -
Glycosyltransférase - Glycosylnucléotides -
Mannose - Fucose - Conversion