

N° d'ordre : 1064

50376
1983
265

50376
1983
265

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le titre de

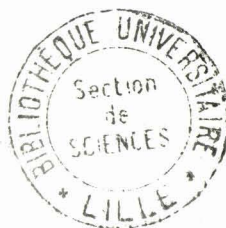
DOCTEUR DE TROISIEME CYCLE

EN BIOCHIMIE

par

Frédérique GUETTE

ETUDE DE L'INHIBITION DES ACTIVITES GLYCOSYLTRANSFERASIQUES PAR LE BIS-(P-NITROPHENYL) PHOSPHATE



Présentée le 7 Juillet 1983 devant la Commission d'Examen

Président
Rapporteur
Examineur

J. MONTREUIL
A. VERBERT
D. GODELAINE-GONZE

Ce travail a été réalisé sous la Direction de
Monsieur le 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 : Relation structure-fonction des
constituants membranaires).

A Monsieur MONTREUIL

Voici quelques années, par l'enseignement enthousiaste de la Biochimie que vous prodiguiez à l'étudiante que j'étais, vous m'avez sensibilisée à la Biologie Moléculaire des Glycoconjugués.

En m'acueillant dans votre laboratoire, vous m'avez donnée l'opportunité de goûter aux plaisirs de la recherche et du travail bien fait. Qu'il me soit aujourd'hui permis de vous en remercier.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à André VERBERT, Professeur à l'Université de Lille et à René CACAN, Maître Assistant pour l'intérêt constant, les conseils avisés et les discussions fructueuses qu'ils ont su animer pour mener à bien ce travail.

Je remercie vivement Madame Danièle GODELAINE-GONZE d'avoir bien voulu me faire l'honneur d'examiner ce mémoire.

Je ne saurais terminer sans remercier Brigitte BAUVOIS, Philippe BULET, Roméo CECHELLI et Bernard HOF Lack pour l'aide et l'amitié qu'ils m'ont témoignées.

Qu'il me soit aussi permis de remercier tous ceux qui, de près ou de loin ont contribué à ce travail, en particulier je tiens à associer à ces remerciements Madame Brigitte DOLEZ qui, avec compétence et efficacité à réaliser la frappe et la mise en page de ce mémoire.

INTRODUCTION	p. 1
GENERALITES	3
1 - STRUCTURES GÉNÉRALES DES GLYCOCONJUGUÉS	3
A - LES O-GLYCOSYLPROTEINES	3
1 - Les glycoprotéines du type collagène	4
2 - Les glycoprotéines de type mucine	4
3 - Les protéoglycannes	6
B - LES N-GLYCOSYLPROTEINES	6
1 - Les glycannes de type oligomannosidique	7
2 - Les glycannes de type N-acétyllactosaminique	7
3 - Les glycannes de type mixte	9
C - CONCLUSION	11
2 - LA BIOSYNTHESE DES GLYCOPROTÉINES	12
A - INTRODUCTION	12
1 - La réaction enzymatique	12
a - Les donneurs et accepteurs	12
b - Les glycosyltransférases	13
c - Le mécanisme	14
B - LA BIOSYNTHESE DES O-GLYCOSYLPROTEINES	14
C - LA BIOSYNTHESE DES N-GLYCOSYLPROTEINES	16
1 - Les dolichols et le cycle des dolichols	17
a - Les dolichols	17
b - Le cycle des dolichols	19
2 - Maturation du glycanne	22

3 - LES INHIBITEURS DES GLYCOSYLTRANSFÉRASES	p. 26
A - LES ANALOGUES DE SUCRES SIMPLES	26
1 - Le désoxyglucose.....	27
2 - Le fluoroglucose et fluoromannose	28
3 - La glucosamine	30
B - LES ANTIBIOTIQUES	32
1 - La tunicamycine	32
2 - L'amphotomycine	33
3 - La showdomycine	34
4 - La diumycine	35
5 - La bacitracine	35
C - LES INHIBITEURS DE STRUCTURES DIVERSES	37
1 - Les nucléotides et dérivés	37
a - Nucleotides et analogues nucléotidiques	37
b - Les dialdéhydes nucléosides	38
c - Les glycosyl-nucléotides : UDP-Man et GDP-Man .	39
d - Le pyrophosphate et les arylphosphates	40
4 - LE BIS-(P-NITROPHÉNYL)PHOSPHATE	41
A - ASPECTS BIOCHIMIQUES	41
B - ASPECTS TOXICOLOGIQUES	42
MATERIELS ET METHODES.....	44
1 - LES LYMPHOCYTES SPLÉNIQUES DE RAT	44
A - PREPARATION	44
B - VIABILITE ET COMPTAGE	46

2 - PRÉPARATION DES ACCEPTEURS	p. 46
A - L'OVOMUCOÏDE	46
B - L'ASIALOFETUINE	47
C - L'ASIALOAGALACTOFETUINE	47
1 - Principe	47
2 - Réactifs	47
3 - Protocole	48
3 - MESURE DES ACTIVITÉS GLYCOSYLTRANSFÉRASIQUES	50
A - CONDITIONS OPTIMALES D'ACTIVITÉS GLYCOSYLTRANSFÉRASIQUES.	50
B - DÉTERMINATION DE LA RADIOACTIVITÉ LIÉE AUX ACCEPTEURS .	51
1 - Acido précipitable	51
2 - Extraction séquentielle des intermédiaires lipidiques	51
3 - Hydrolyse et séparation des oligosaccharides liés aux dolichyl pyrophosphates	53
a - Hydrolyse de l'oligosaccharide du dolichyl pyrophosphate	53
b - Séparation de GlcNAc et GlcNAc-GlcNAc	54
c - Séparation du Glc-P-Dol et Cer-Glc	54
4 - Préparation de $[^{14}\text{C}]$ Man-P-Dol	54
C - INTÉGRITÉ DU PRECURSEUR RADIOACTIF	55
4 - HOMOGENÉISATION DES LYMPHOCYTES	56
5 - PRÉPARATION DE LA GALACTOSYLTRANSFÉRASE	56
A - PRINCIPE	56
B - SOLUBILISATION	58
C - PASSAGE SUR UDP-HEXANOLAMINE SEPHAROSE 4 B	58
D - STABILISATION DE L'ENZYME	59

CHOIX DU MODELE MOLECULAIRE	p. 61
MISE EN EVIDENCE DES ACTIVITES GLYCOSYLTRANSFERASIQUES	61
RESULTATS	61
1 - EFFET DU BIS-(P-NITROPHENYL)PHOSPHATE SUR LES ENZYMES DU CYCLE DES DOLICHOLS	63
A - EFFET GENERAL	63
B - EFFET DU BIS-(P-NITROPHENYL)PHOSPHATE SUR L'ADDITION ... DE RESIDUS $GLcNAc_{1,2}$ -PP-Dol	64
C - EFFET DU BIS-(P-NITROPHENYL)PHOSPHATE SUR L'ADDITION DE RESIDUS MANNOSYLS	66
1 - Effet sur l'addition de résidus mannosyls à partir de GDP-Man	67
2 - Effet sur l'addition de résidus mannosyls à partir de Man-P-Dol	69
D - EFFET DU BIS-(P-NITROPHENYL)PHOSPHATE SUR L'ADDITION DE RESIDUS GLUCOSYLS	72
E - EFFET DU BIS-(P-NITROPHENYL)PHOSPHATE SUR LE DEVENIR DES OLIGOSACCHARIDES-PP-DOL	74
F - CONCLUSION	76
2 - EFFET DU BIS-(P-NITROPHENYL)PHOSPHATE SUR LA GALAC- TOSYL-, SIALYL- ET FUCOSYLTANSFERASE	79
A - EFFET DU BIS-(P-NITROPHENYL)PHOSPHATE SUR LA GALACTOSYL- TRANSFERASE	79
B - EFFET DU BIS-(P-NITROPHENYL)PHOSPHATE SUR LA SIALYL- TRANSFERASE	81
C - EFFET DU BIS-(P-NITROPHENYL)PHOSPHATE SUR LA FUCOSYL- TRANSFERASE	81
D - CONCLUSION	82

3 - ETUDE DU K_M ET DU TYPE D'INHIBITION	p. 83
A - PREPARATION DE LA GALACTOSYLTRANSFERASE	83
B - CHOIX DE L'ACCEPTEUR EXOGENE	84
1 - Etude du (p-nitrophényl)N-acétylglucosamine.....	84
2 - Etude de l'ovomucoïde	86
a - Etude de la concentration optimale	86
b - Etude du temps optimal d'incubation	88
C - ETUDE DU K_M	88
D - TYPE D'INHIBITION DU BIS-(P-NITROPHÉNYL)PHOSPHATE.....	90
E - CONCLUSION	91
 4 - MODULATION DE L'EFFET DU BIS-(P-NITROPHÉNYL)PHOS- PHATE PAR L'INTÉGRITÉ DES ENZYMES DANS LA MEMBRANE.	 92
 CONCLUTIONS GENERALES	 97
 BIBLIOGRAPHIE.....	 99

ABBREVIATIONS

Asn : L-Asparagine

Cer-Glc : Glucosyl-céramide

CMP-NeuAc : Cytosine monophosphate N-acétylneuraminique

Dol : Dolichol

EDTA : Acide éthylène diamine tétra-acétique

Fuc : L-Fucose

Gal : D-Galactose

GalNAc : N-Acétyl-D-galactosamine

GDP-Fuc : Guanosine diphosphate L-fucose

GDP-Man : Guanosine diphosphate D-mannose

Glc : D-Glucose

GlcNAc : N-Acétyl-D-glucosamine

GlcNAc-PP-Dol : Dolichol diphosphate N-acétyl-D-glucosamine

GlcNAc₂-PP-Dol : Dolichol diphosphate di-N-acétylchitobiose

Glc-P-Dol : Dolichol phosphate D-glucose

Man : D-Mannose

Man-P-Dol : Dolichol phosphate D-mannose

NeuAc : Acide N-acétylneuraminique

Oligosaccharide-PP-Dol : Dolichol diphosphate oligosaccharide

P-Dol : Dolichol phosphate

Ser : L-Sérine

Thr : L-Thréonine

UDP-Glc : Uridine diphosphate D-glucose

UDP-GlcNAc : Uridine diphosphate N-acétyl-D-glucosamine

Xyl : D-Xylose

I N T R O D U C T I O N

Les recherches effectuées depuis les dix dernières années sur les glycoconjugués (glycolipides et glycoprotéines) ont montré l'importance considérable de ces molécules dans la biologie et la physiologie cellulaire.

Des rôles variés leur sont attribués : - intégrés dans la membrane plasmique et exposant leurs glycanes au milieu extracellulaire, ceux-ci sont des antigènes membranaires dont la structure subit de profondes modifications au cours de la transformation maligne, des sites récepteurs de virus et d'hormones ou encore des composés impliqués dans la reconnaissance de l'adhésion cellulaire (voir la revue générale de HUGHES : 1), - molécules solubles : ceux-ci sont des transporteurs ou des hormones.

La mise au point de méthodes analytiques de plus en plus fines a permis de déterminer de nombreuses structures primaires de la partie glucidique - ou glycanne - des glycoconjugués, et les lois relatives aux séquences oligosaccharidiques ont pu être établies (voir la revue de MONTREUIL : 2).

S'appuyant sur ces précieuses données structurales, les grandes lignes des mécanismes généraux de la biosynthèse de la glycosylation ont été grandement facilitées par l'utilisation d'inhibiteurs de réactions de glycosylation.

De plus, ces inhibiteurs de biosynthèse sont des outils précieux pour explorer les rôles biologiques de la partie glycannique des glycoconjugués.

Nos travaux ont porté sur l'étude d'un inhibiteur :
le bis-(p-nitrophényl)phosphate,

Où agit-il ?

Quelle réaction inhibite-t-il ?

Quel est son mécanisme d'action ?

Avant de présenter nos travaux personnels, nous allons résumer l'essentiel des connaissances sur la structure, la biosynthèse et l'apport de l'utilisation des inhibiteurs dans l'étude des glycoconjugués.

G É N É R A L I T É S

1 - STRUCTURES GÉNÉRALES DES GLYCOPROTÉINES

Les glycoprotéines forment une très vaste classe parmi ces constituants appelés glycoconjugués, résultant de l'association d'un glycanne avec une protéine.

Ce chapitre rappelle brièvement la classification et la structure de ces glycannes (voir les revues de SPIRO : 3, KORNFIELD et KORNFIELD : 4, 5, MONTREUIL : 6).

Selon le type de liaison entre le glycanne et la protéine, on distingue :

- les O-glycosylprotéines dont la liaison entre le glycanne et la protéine est de type O-glycosidique.
- les N-glycosylprotéines dont la liaison entre le glycanne et la protéine est de type N-glycosidique.

A - LES O-GLYCOSYLPROTEINES

Plusieurs types de liaison glycanne-acide aminé ont été caractérisés dans les O-glycosylprotéines. En effet, plusieurs monosaccharides tel que : la N-acétylgalactosamine, le mannose, le galactose et le xylose, et plusieurs aminoacides tel que : la sérine, la thréonine, l'hydroxylysine et l'hydroxyproline sont impliqués dans les points d'attache.

Nous nous limiterons aux glycoprotéines de type collagène, mucine et aux protéoglycannes.

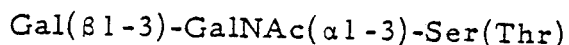
1 - Les glycoprotéines de type collagène

Dans les collagènes des mammifères, le galactose est conjugué O-glycosidiquement à l'hydroxylysine par la liaison : Gal-(α 1-)-Hyl. Les résidus galactosyls peuvent être glycosylés en position C-2 (voir les revues générales de BALASZ : 7 et SHARON : 8).

2 - Les glycoprotéines de type mucine

Le monosaccharide le plus souvent engagé dans cette conjugaison est la N-acétylgalactosamine (GOTTSCALK *et al* : 9), sur lequel se greffe soit un résidu de β -galactose en position C-3, soit un résidu d'acide sialique en position C-6.

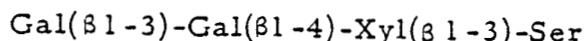
Dans le premier cas, on obtient le glycopeptide :



qui représente le noyau commun à de nombreux glycannes qui en dérivent par substitution. En effet, sur le résidu galactosyl, peuvent venir se brancher un résidu d'acide sialique en position C-3 (exemple de la glycophorine, THOMAS et WINZLER : 10) un résidu de fucose en position C-2, un résidu de N-acétylgalactosamine en position C-3 comme le montre la structure du glycopeptide de glande sous maxillaire de Porc en figure 1, page 5 (CARLSON *et al* : 11), ou en position C-6 : exemple du glycopeptide de glande sous maxillaire de Mouton (BERTOLONI et PIGMAN : 13) (figure 2, page 5)

3 - Les protéoglycannes

Les protéoglycannes, appelés également mucopolysaccharides, ont pour séquence d'attache à la protéine, la structure suivante :



Sur ce trisaccharide de base se fixent des polymères de structures répétitives, formées d'acide uronique, lié à la N-acétylgalactosamine (voir la revue générale de RODEN : 15).

B - LES N-GLYCOSYLPROTEINES

Contrairement aux O-glycosylprotéines où il existe plusieurs types de liaison glycanne-acide aminé, les N-glycosylprotéines présentent un seul type de point d'attache. Cette liaison fait intervenir la N-acétylglucosamine d'une part et l'asparagine d'autre part (voir les revues de RODEN et HOROWITZ : 16, RODEN : 17, MONTREUIL : 18). Les motifs glycaniques de ces glycoprotéines possèdent en commun le même noyau pentasaccharidique, lié par une liaison β -glycosylaminique à une asparagine toujours incluse dans le tripeptide : Asn-X-Thr(Ser) appelé "séquen" (RONIN *et al* 19). La structure de ce noyau est représentée dans la figure 3, page 5 .

Selon la nature des résidus saccharidiques qui se greffent en position 4 et 4', on distingue :

- les glycannes de type oligomannosidique
- les glycannes de type N-acétyllactosaminique

1 - Les glycannes de type oligomannosidique

Ces structures ne renferment que des résidus de mannose branchés sur le noyau pentasaccharidique et dont le nombre peut varier de 3 à 9, leur mode de branchement peut se faire en position C-2, C-3, C-6 sur les résidus mannosyls 4 et 4' (voir figure 4, page 8).

2 - Les glycannes de type N-acétyllactosaminique

Des résidus N-acétyllactosaminyls: Gal(β 1-4)-GlcNAc viennent se brancher en position C-2 sur les mannoses externes constituant ainsi la structure de base que l'on trouve par exemple dans le glycopeptide isolé de la lactotransferrine humaine (SPIK *et al* : 22) (voir figure 5).

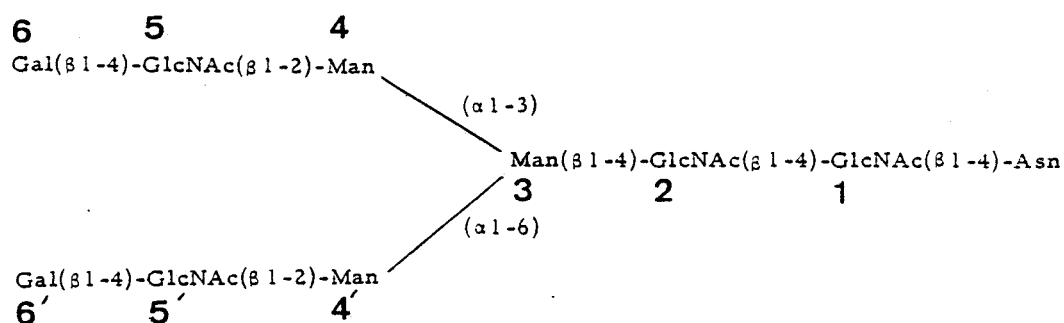
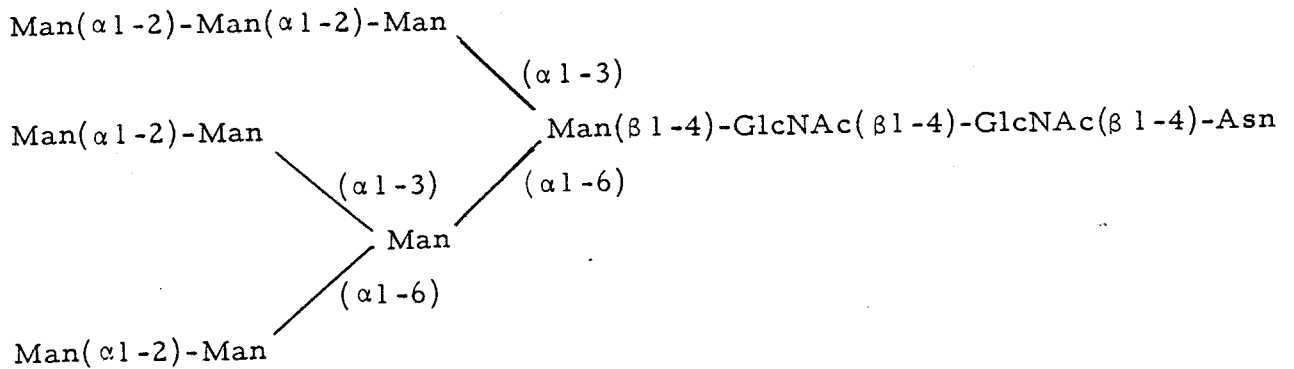


FIGURE 5 : Structure du glycopeptide isolé de la lactotransferrine humaine (Spik *et al*: 23).

A



B

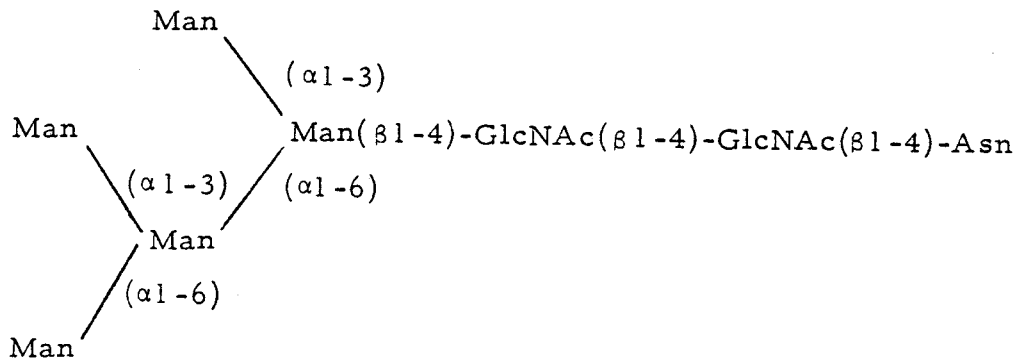


FIGURE 4 : Exemples de structures glycanniques de type oligo-mannosidique:

A-Glycopeptide B1 de cellules ovariennes de hamster chinois (Li et Kornfeld: 20).

B-Glycopeptide GP-V de l'ovalbumine (Conchie et Strackan: 21).



Ce motif peut être à son tour substitué par :

- un ou plusieurs résidus de fucose branchés soit en position C-6 sur le N-acétylglucosamine 1, soit en C-3 sur le N-acétylglucosamine 5 et 5'.
- un ou plusieurs résidus d'acide neuraminique liés en position C-3 ou C-6 sur le galactose 6 et 6'.

Récemment, FINNE *et al* (24) ont montré l'existence possible d'un branchement de l'acide sialique en position C-8 sur l'acide sialique préalablement fixé.

- une ou plusieurs branches de N-acétyllactosamine supplémentaires en position C-4 sur le mannose 4 et en C-6 sur le mannose 4', donnant des structures tri- ou tétraantennées (voir figure 6, 7, page 10).

Récemment, des structures pentaantennées ont été décrites (FRANCOIS-GERARD *et al* : 27, YOSHIMA *et al* : 28)

3 - Les glycanes de type mixte

Les structures, dites mixtes, c'est à dire entre le type oligomannosidique et N-acétyllactosaminique, ont été mises en évidence. Le glycopeptide isolé de l'ovalbumine (voir figure 8, page 10) servira d'exemple (TAI *et al* : 29), un résidu N-acétylglucosaminyl est branché en position terminale non réductrice sur un mannose du noyau pentasaccharidique.

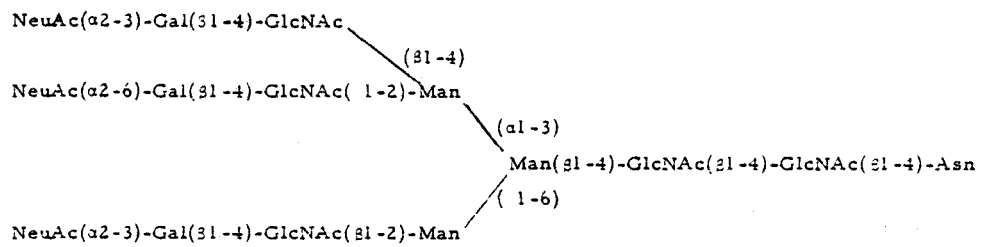


FIGURE 6 : Structure d'un glycanne triantenné de la fœtuine de veau (Nilson et al: 25).

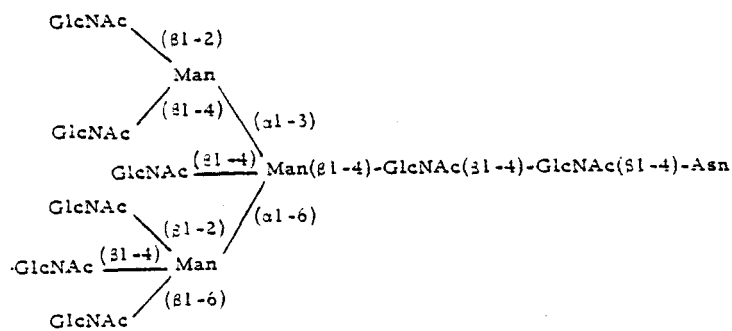


FIGURE 7 : Structure d'un glycanne pentaantenné de l'ovomucoïde de poule (Parenté et al: 26).

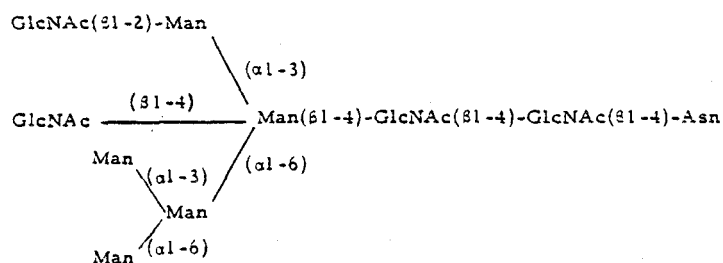


FIGURE 8 : Structure d'un glycopeptide isolé de l'ovalbumine (Tai et al: 30).



C - CONCLUSION

Il est remarquable de noter qu'il existe une certaine dualité dans la structure primaire des glycoconjugués entre une partie invariable (la séquence glycannique du point d'attache de la molécule) et une partie variable (les résidus glycanniques, disposés à sa périphérie)

Toutes ces structures sont des éléments précieux pour élucider et comprendre toutes les étapes de leur biosynthèse .

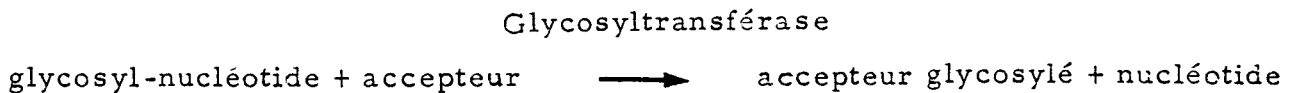
2 - LA BIOSYNTHESE DES GLYCOPROTEINES

A - INTRODUCTION

Quelle que soit la réaction de glycosylation examinée, celle-ci se fait par l'intermédiaire d'enzymes de biosynthèse : les glycosyltransférases.

1 - La réaction enzymatique

Les résidus monosaccharides sont transférés aux extrémités non réductrices d'oligosaccharides ou de polysaccharides, ou sur des protéines et des lipides par des enzymes spécifiques (ROSEMAN : 31, SCHACHTER et RODEN : 32), selon la réaction suivante :



a - Les donneurs et accepteurs

Le sucre donneur est toujours un dérivé phosphorylé.

Ce peut être un glycosyl-nucléotide tel que le GDP-Man, UDP-Gal, CMP-NeuAc, GDP-Fuc, UDP-Glc ou UDP-GlcNAc (voir la revue de STURGES *et al* : 33) ou un glycolipide (voir la revue de PARODI et LELOIR : 34).

Le taux intracellulaire de ces donneurs est modulé par la présence d'enzymes : les pyrophosphatases et les phosphatases (voir la revue de MONTREUIL : 35, SPIK *et al* : 36), capables d'hydrolyser les glycosyl-nucléotides selon la réaction suivante :



L'accepteur peut être une protéine, une glycoprotéine ou un glycolipide. La plupart des réactions de transfert ont été étudiées grâce à l'emploi de glycoprotéines ou de glycopeptides exogènes tels que, par exemple, l'ovomucoïde et l'asialofétuine ou asialoagolactofétuine (voir les structures figures 6 et 7, page 10).

b - les glycosyltransférases

Les glycosyltransférases (voir les revues de MONTREUIL : 37, SCHACHTER et ROSEMAN : 38) sont spécifiques du sucre qu'elles reconnaissent et de la liaison qu'elles forment. Leur bon fonctionnement nécessite en général la présence de cations divalents comme le magnésium et le manganèse.

Les glycosyltransférases intracellulaires sont des protéines en général liées aux membranes et leur solubilisation nécessite l'emploi de détergents. Cette étroite association glycosyltransférase-membrane est un lourd handicap pour purifier ces enzymes.

c - Le mécanisme

La biosynthèse des glycoprotéines diffère selon le type de liaison entre le glycanne et la protéine. Ainsi, la synthèse de O-glycosylprotéines s'effectue simplement par addition séquentielle de monosaccharides sur la protéine, à partir des glycosyltransférases correspondantes.

Au contraire, la synthèse des N-glycosylprotéines est beaucoup plus complexe, elle fait intervenir des intermédiaires lipidiques indispensables à l'assemblage du glycanne qui, après transfert sur la protéine et maturation, donnera la N-glycoprotéine finale.

B - LA BIOSYNTHESE DES O-GLYCOSYLPROTEINES

Le schéma de biosynthèse des O-glycosylprotéines que nous pouvons actuellement tracer se dégage des études faites sur les O-glycosylprotéines de type mucine (voir figure 9, page 15).

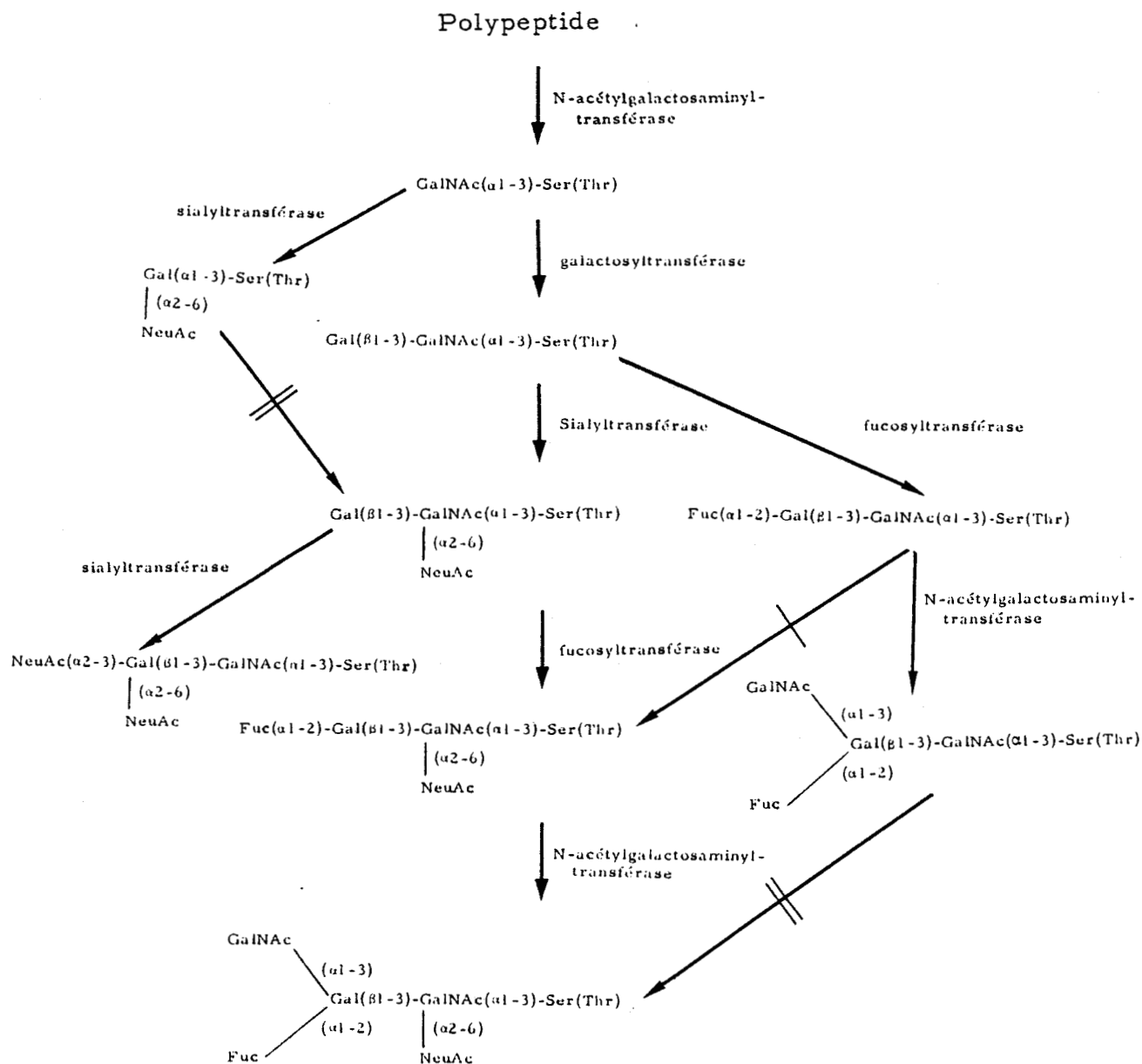


FIGURE 9 : Schéma de biosynthèse des O-glycosylprotéines

Les différentes étapes sont les suivantes :

Etape 1 : Transfert d'un résidu β -N-acétyl-galactosaminyl sur la sérine ou la théonine de la protéine sous l'action d'une β -galactosaminyltransférase (HILL *et al* : 39).

Etape 2 : Allongement de cette chaîne par étape :

- branchement d'acide sialique (CARLSON *et al* : 40, BEYER *et al* : 41, SADLER *et al* : 42) avant ou après fixation d'un résidu galactosyl en position C-3 (SCHACHTER *et al* : 43)
- branchement de fucose (BEYER *et al* : 44) ou d'acide sialique (REARICK *et al* : 45).
- transfert d'un résidu α -N-acétylgalactosaminyl terminal en C-3 sur le galactose (BEYER *et al* : 46).

La biosynthèse d'oligosaccharides de type mucine se distingue de celle des N-glycosylprotéines par le fait qu'elle ne semble pas faire intervenir d'intermédiaires lipidiques et qu'il n'existe pas de processus de maturation des glycanes préalablement synthétisés.

C - LA BIOSYNTHESE DES N-GLYCOSYLPROTEINES

La biosynthèse des N-glycosylprotéines s'effectue en plusieurs étapes :

1 - Synthèse d'un oligosaccharide précurseur, attaché à un intermédiaire lipidique au niveau du réticulum endoplasmique rugueux, suivi par le transfert en bloc de cet oligosaccharide sur la protéine. Cette synthèse est plus connue sous le nom de cycle des dolichols.

2 - Maturation du glycanne précurseur dans le Golgi.

1 - Les dolichols et le cycle des dolichols

Localisés dans le réticulum endoplasmique rugueux, ils jouent un rôle important lors de la biosynthèse des glycoprotéines.

a - Les dolichols

Ce terme qualifie une famille de dérivés polypréniques constitués par 16 à 20 unités de répétition isoprène dont la dernière en position α est toujours saturée (voir la revue de HEMMING : 47). La caractéristique de cette chaîne est sa taille (100 Å) lui permettant de traverser la bicouche lipidique des membranes (voir figure 10, page 18).

Sur ce dolichol, peut se fixer, par l'intermédiaire d'un groupement phosphate des monosaccharides tel que le mannose, le glucose ou le xylose (voir la revue de FALTYNEK:48) aboutissant à des dolichol-phosphate-glycosylés.

La N-acétylglucosamine quant à elle se fixe par l'intermédiaire d'un groupement pyrophosphate aboutissant à un dolichol-pyrophosphate-N-acétylglucosamine qui permet la constitution de composés de plus en plus complexes, par allongement de la chaîne glucidique (voir figure 11, page 18).

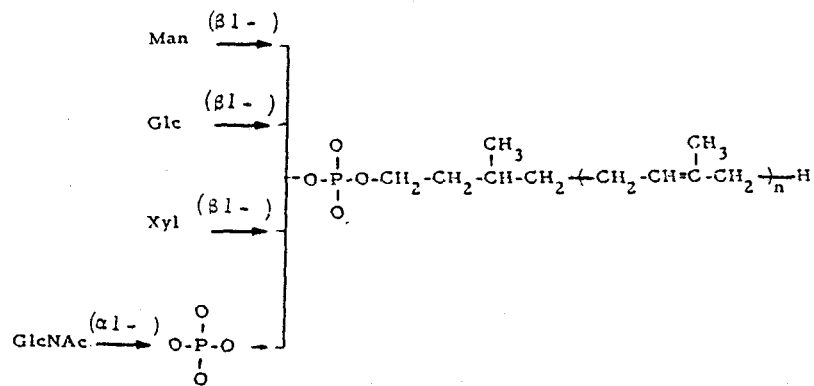


FIGURE 10 : Substitution du dolichol-phosphate par le mannose, le glucose, le xylose et la N-acétylglucosamine-1-phosphate.

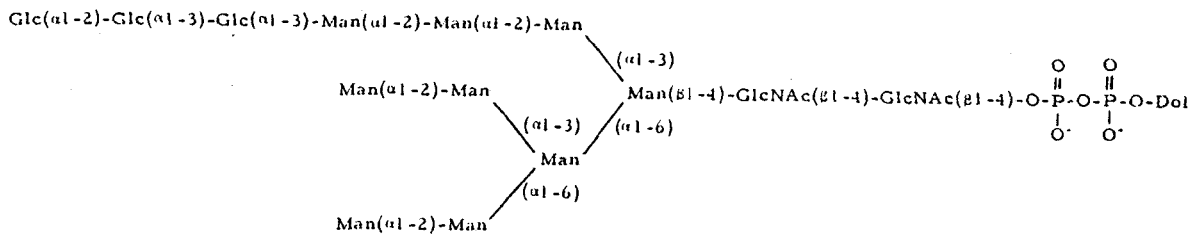


FIGURE 11 : Structure du dolichol-pyrophosphate-oligosaccharide glucosylé.

Le dolichol-phosphate joue le rôle de transporteur lors de l'élaboration de l'oligosaccharide ; c'est aussi un accepteur dans la synthèse de sucre donneur : dolichol-phosphate-mannose et dolichol-phosphate-glucose synthétisés respectivement à partir de GDP-Man et d 'UDP-Glc (voir les revues de PARODI et LELOIR : 49, BEHRENS et TABORA : 50).

D'autres intermédiaires lipidiques ont été mis en évidence tel que : les ficaprénoles chez les plantes et les rétinols ou vitamine A chez les mammifères (SASAK et DE LUCA : 51). Le rôle joué par ces lipides reste à déterminer.

b - Le cycle des dolichols

Le schéma 12, en page 20 , résume les connaissances actuelles concernant le cycle des dolichols (voir les revues générales de WAECHTER et LENNARZ : 53, HEMMING : 54, 55) qui aboutit à la formation d'un oligosaccharide composé de 14 résidus de sucre (figure 11, page 18). (LI *et al* : 56, HUBBARD et ROBBINS : 57, SPIRO *et al* : 58).

Les différentes étapes sont les suivantes :

Etape 1 : Formation de GlcNAc-PP-Dol à partir de Phospho-dolichol et d 'UDP-GlcNAc puis allongement en GlcNAc₂-PP-Dol (voir la revue de ELBEIN : 59).



Récapitulatif des diverses inhibitions de la glycosylation au niveau du cycle des dolichols

1- dGlc 2- FGLc et FMan
3- amphomycine 4- bacitracine 5- diumycine
6- showdomycine 7- tunicamycine

Etape 2 : Addition de résidus mannosyls
aboutissant à la formation de $\text{Man}_9\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$.
Les travaux de CHAPMAN *et al* (60) ont permis d'élucider l'ordre dans lequel sont ajoutés les monosaccharides au cours de cette synthèse. Ainsi, il est démontré que les cinq premiers résidus mannosyls ont pour donneur le GDP-Man (KANG *et al* : 61, GERSHMAN et ROBBINS : 62, KORNFIELD *et al* : 63) alors que les quatre suivants proviennent du Man-P-Dol.

Etape 3 : Addition de résidus glucosyls sur
l'oligosaccharide-PP-Dol faisant intervenir des glucosyl-transférases distinctes (MURPHY et SPIRO : 64). Le donneur est ici le Glc-P-Dol (STANELONI *et al* : 65) et l'accepteur peut être le $\text{Man}_5\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ ou le $\text{Man}_9\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ (CHAPMAN *et al* : 66). La nature des liaisons reliant les résidus glucosyls à la molécule (LI *et al* : 67, LIU *et al* : 68) et l'étude effectuée par les inhibiteurs (voir page 39) sont en faveur de l'existence de deux enzymes.

Etape 4 : Transfert en bloc de l'oligosaccharide
ainsi synthétisé sur un résidu d'asparagine (KIELY *et al* : 69, JAMIESON : 70) généralement situé dans un coude β de la protéine acceptrice (AUBERT *et al* : 71, BEELEY : 72). Ce transfert s'effectue par l'intermédiaire de la "dolichyl-diphosphoryl-oligosaccharide-protéine oligosaccharidyltransférase". La présence de résidus glucosyls sur l'oligosaccharide-PP-Dol bloque l'action d'une pyrophosphatase capable de couper la liaison pyrophosphate, maintenant un taux intracellulaire en oligosaccharide-PP-Dol élevé et favorisant ainsi le transfert de l'oligosaccharide sur la protéine (HOFLACK *et al* : 73).

2 - Maturation du glycanne

La diversité de structure des glycoprotéines matures suggère que, après son transfert sur la protéine, le glycanne subit un certain nombre de transformations. La figure 13, page 23 résume les différentes étapes de cette maturation.

Etape 1 : Elagage des trois résidus glucosyls et de quatre résidus mannosyls excédentaires par des enzymes spécifiques. L'élimination des résidus glucosyls se situe après le transfert de l'oligosaccharide sur la protéine (KORNFELD *et al* : 74, PARODI : 75). Plusieurs glucosidases ont été mises en évidence (SPIRO *et al* : 76) : la glucosidase I ôtant le résidu glucosyl le plus externe (GRINNA et ROBBINS : 77) et la glucosidase II - III éliminant successivement les deux résidus glucosyls restants. De même, deux activités mannosidasiques hydrolysant les liaisons $\alpha 1-2$ ont été rencontrées dans le Golgi (OPHEIM et TOUSTER : 78, TABAS et KORNFELD : 79, TULSIANI *et al* : 80).

Etape 2 : Action de la β -2-N-acétylglucosaminyl transférase I (STANLEY *et al* : 81) branchant un résidu de N-acétylglucosamine en $\alpha 1-2$. Cette enzyme isolée à partir de colostrum de vache (HARPAZ et SCHACHTER : 82) et de foie de lapin (HOPPENHEIMER et HILL : 83) a une très haute affinité pour le composé suivant : $\text{Man}_5\text{-GlcNAc}_2\text{-Asn}$ mais peut aussi utiliser le $\text{Man}_3\text{-GlcNAc}_2\text{-Asn}$ comme substrat.

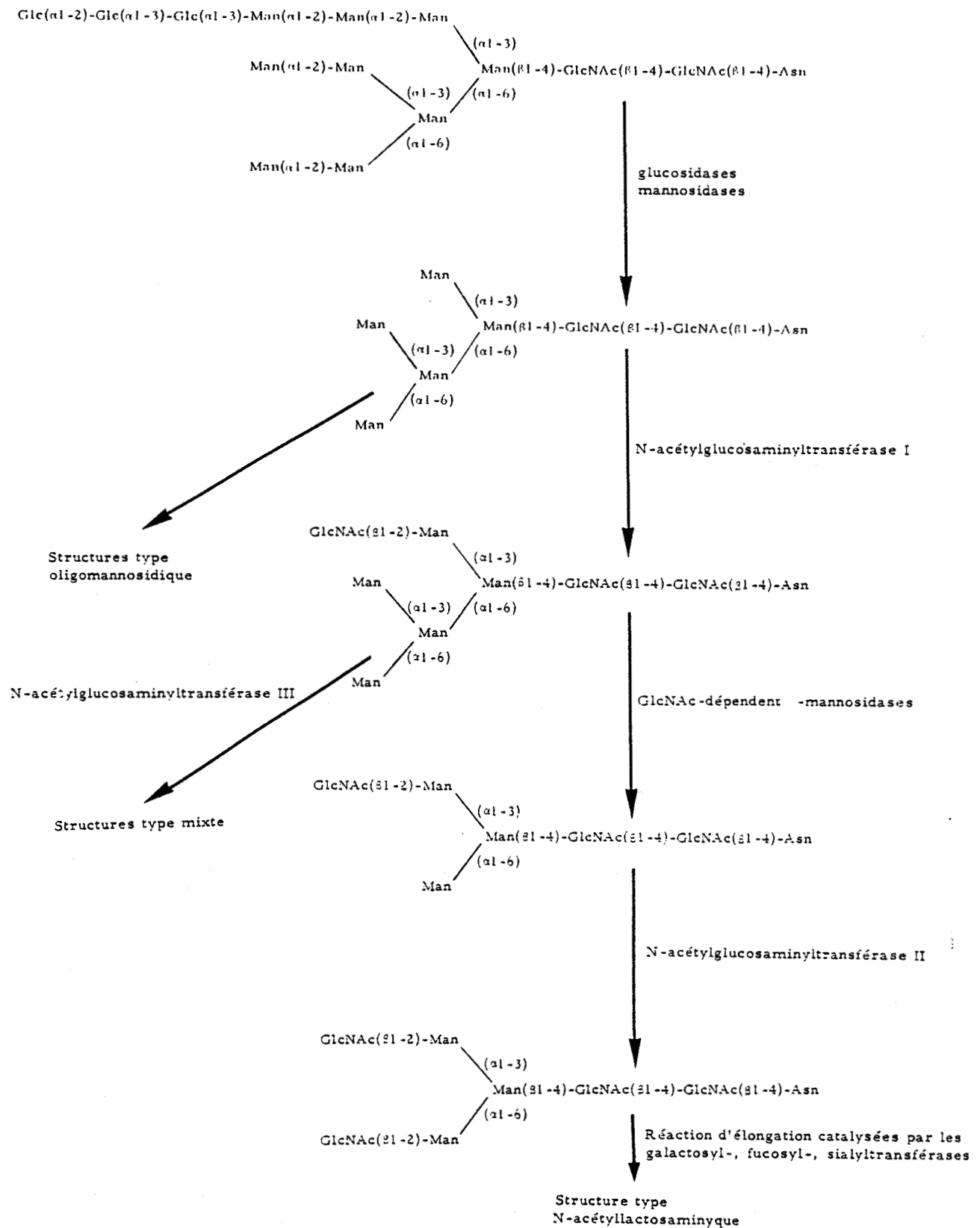


FIGURE 13: Maturation de l'oligosaccharide.

Etape 3 : Elimination de deux résidus mannosyls en α 1-6 et α 1-3 par des mannosidases golgiennes (HARPAZ et SCHACHTER : 84) très affines pour les oligosaccharides de structure : GlcNAc-Man₅-GlcNAc₂.

Etape 4 : Action de la β -2-N-acétylglucosaminyl-transférase II (NARASIMHAM *et al* : 85) avant ou après branchement de résidus fucosyls en position C-6 sur la N-acétylglucosaminyl du point d'attache (JABBAL et SCHACHTER : 86, WILSON *et al* : 87).

En fin de maturation, le branchement de résidus terminaux confère au glycanne son originalité :

- Addition de résidus galactosyls par une β -4-galactosyltransférase (KHATA *et al* : 88, SCHACHTER et ROSEMAN : 89).

- Addition de résidus fucosyls en C-3 sur la N-acétylglucosamine externe (PAULSON *et al* : 90) ou en C-2 sur le galactose (BEYER *et al* : 91)

- Addition de résidus d'acide sialique en C-3 ou C-6 des résidus galactosyls (VAN DEN EIJDEN et SCHIPHORST : 92 : PAULSON *et al* : 93).

L'ordre de ces deux dernières réactions de glycosylation n'a pu encore être établi mais obéit néanmoins à des lois strictes de substitution : la coexistence d'acide sialique et de fucose sur une même branche n'a jamais été décrite.

En conclusion, toutes les N-glycosylprotéines commencent par être des structures oligamannosidiques, c'est seulement après maturation que la spécificité est donnée par la molécule en des glycannes plus complexes de type N-acétyllactosaminique ou oligomannosidique ou encore de type hybrides.

Bien que les grands traits de la biosynthèse de glycoprotéines soient élucidés, de nombreux points restent encore obscurs. Les inhibiteurs des réactions de glycosylation sont de précieux outils aussi bien pour explorer le rôle biologique de la partie glycannique des glycoprotéines que pour disséquer certains mécanismes de réactions de glycosylation.

3 - LES INHIBITEURS DES GLYCOSYLTRANSFÉRASES

D'abord remarquées pour leurs propriétés antivirales (SCHACHTER *et al* : 94), certaines substances se sont révélées être des inhibiteurs de réactions de glycosylation.

Nous décrirons, dans ce chapitre, le mode d'action de quelques unes d'entre elles (voir les revues de STRUCK et LENNARZ : 95, SCHWARZ et DATEMA : 96, SCHWARZ *et al* : 97).

Elles peuvent être réparties en plusieurs classes :

- Les analogues de sucres simples.
- Les antibiotiques.
- Les inhibiteurs de structures diverses.

A - LES ANALOGUES DE SUCRES SIMPLES

Le 2-desoxy-D-glucose (désoxyglucose ou dGlc), le 2-desoxy-2-fluoro-D-glucose (fluoroglucose ou FGlc), le 2-desoxy-2-fluoro-D-mannose (fluoromannose ou FMan), et le 2-desoxy-2-D-glucose (glucosamine) sont depuis plusieurs années connus comme étant des inhibiteurs du développement viral (SCHWARZ et DATEMA : 98, SCHOLTISSEK : 99, SCHWARZ *et al* : 100) par inhibition de la glycosylation des glycoprotéines virales (SCHWARZ ET KLENK : 101). Ce sont des analogues de sucres spécifiques (leurs actions sont résumées dans le tableau I, page 31, ainsi que dans la figure 12, page 20).

1 - Le desoxyglucose

Les études effectuées *in vivo* sur des fibroblastes infectés par Semliki forest Virus et influenza A Virus (SCHWARZ *et al* : 102) montrent la formation de GDP-dGlc et de UDP-dGlc inhibiteur de la synthèse d'oligosaccharide-PP-Dol (SCHWARZ et DATEMA : 103) à différents niveaux :

- Le dGlc-P-Dol formé à partir de GDP-dGlc et de phospho-dolichol (SCHWARZ *et al* : 104) diminue la quantité de phospho-dolichol utilisable pour la formation de Man-P-Dol (SCHWARZ *et al* : 105), Glc-P-Dol et GlcNAc-PP-Dol (DATEMA *et al* : 106). L'utilisation de phospho-dolichol exogène réduit cette inhibition *in vivo* indiquant que les sucres entrent en compétition pour limiter le taux de phospho-dolichol. Par ce mécanisme, la formation des intermédiaires essentiels à la synthèse d'oligosaccharide-PP-Dol est diminuée ou inhibée si la quantité de dolichol est faible.

- L'élongation du GlcNAc₂-PP-Dol est inhibée par le GDP-dGlc si celui-ci est en quantité suffisante par rapport au GDP-Man (DATEMA et SCHWARZ : 107). La fixation de desoxyglucose à partir d'UDP-dGlc sur le GlcNAc₂-PP-Dol aboutit à la formation de dGlc-GlcNAc₂-PP-Dol qui ne peut être allongé par le GDP-Man ou le Man-P-Dol. Une situation similaire s'applique pour le dGlc-Man-GlcNAc₂-PP-Dol. Les oligosaccharides-PP-Dol de structures aberrantes et non fonctionnelles s'accumulent. Ce mécanisme étant irréversible, conduit à l'inhibition de la synthèse.

- Le desoxyglucose interfère également avec d'autres étapes du cycle des dolichols. Cet analogue de sucre est incorporé à la place de résidu mannosyl (DATEMA et SCHWARZ : 108) ou glucosyl (DATEMA et SCHWARZ : 109) dans l'oligosaccharide-PP-Dol. Des travaux, effectués sur des systèmes acellulaires, montrent que l'incorporation de résidu desoxyglucosaminyl à la place de résidu mannosyl dans les oligosaccharides-PP-Dol à longue chaîne, empêche le transfert en bloc de cet oligosaccharide sur la protéine (DATEMA et SCHWARZ : 110). Néanmoins, on peut rencontrer le desoxyglucose dans des glycoprotéines (KALUZA *et al* : 111, STEINER *et al* : 112), des mannanes et glycannes de levure (BIELY *et al* : 113, KRÁTKÝ *et al* : 114) si celui-ci est en quantité insuffisante pour provoquer une inhibition totale.

2 - Le fluoroglucose et le fluoromannose

Dans les levures et les cellules embryonnaires de poulet, à la fois le fluoroglucose et le fluoromannose sont métabolisés par liaison avec l'UDP et le GDP (SCHMIDT *et al* : 115). Apparemment, la cellule ne fait pas de différence entre ces deux sucres fluorés.

Le fluoroglucose interfère avec les réactions de mannosylation : il inhibe la formation de Man-P-Dol et de ce fait, bloque l'assemblage de $\text{Glc}_3\text{-Man}_9\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ (DATEMA *et al* : 116), l'élongation du $\text{Man}_5\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ ne permettant pas la synthèse de $\text{Glc}_3\text{-Man}_9\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ (DATEMA *et al* : 117).

L'inhibition de cette synthèse peut être inversée ou bloquée (DATEMA et SCHWARZ : 118) en additionnant au milieu de culture une quantité adéquate de mannose (SCHMIDT *et al* : 119) : il semblerait que le GDP-FGlc soit un inhibiteur compétitif de la formation de Man-P-Dol mais jusqu'à ce jour, l'incorporation de fluoroglucose dans les intermédiaires lipidiques du cycle des dolichols n'a pu être montrée (DATEMA *et al* : 120).

Le $\text{Man}_5\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ peut se former dans les cellules traitées au fluoroglucose (DATEMA *et al* : 121), l'heptasaccharide synthétisé peut être transféré sur la protéine *in vivo*, probablement de la même façon qu'un dérivé glucosylé. L'origine de ce manque de résidus glucosyls n'est pas encore connue. Mais le fait que le transfert de résidu glucosyl du Glc-P-Dol à l'heptasaccharide-PP-Dol n'est pas touché par l'inhibiteur (de même que le transfert de résidu mannosyl à partir de Man-P-Dol) d'une part, et que les membranes des cellules traitées montrent une diminution du taux de Man-P-Dol et Glc-P-Dol (DATEMA *et al* : 122) d'autre part, incitent à penser que le fluoroglucose intervient au niveau de la formation de Glc-P-Dol comme il le fait pour le Man-P-Dol.

Une différence notable entre le devenir métabolique du fluoromannose, fluoroglucose et desoxyglucose est que les sucres fluorés ne sont pas incorporés dans les glycolipides ou glycoprotéines. Seuls, quelques glycannes des parois cellulaires de levure renferment des résidus de fluoroglucose et fluoromannose (SCHMIDT *et al* : 123).

3 - La glucosamine

Un examen du métabolisme de la glucosamine sous des conditions inhibant la glycosylation protéique , ne révèle aucun métabolisme particulier mais on constate que la concentration intracellulaire de glucosamine est fortement augmentée (KOCK *et al* : 124). Le lavage de ces cellules avec un milieu sans glucosamine, rétablit la glycosylation en 15 minutes. Durant ce lavage, la concentration des métabolites de la glucosamine et celle des glycosyl-nucléotides ne varie pas ; seule la concentration intracellulaire de glucosamine diminue. La glucosamine agit donc en tant que telle comme inhibiteur.

Des travaux ont montré que la glucosamine inhibe les premières étapes du cycle des dolichols (DATEMA et SCHWARZ : 125) mais ceci n'est pas valable pour les systèmes acellulaires.

Une hypothèse se dégage selon laquelle la glucosamine inhibe indirectement la glycosylation dépendante des dolichols, en affectant la structure et les propriétés des systèmes membranaires (MOLNAR et BEKESI : 126, FRIEDMAN et SKEHAN : 127). En outre, la glucosamine peut causer des modifications du taux d'UTP et d'ATP lorsque le pyruvate ou le glucose servent comme source d'énergie et de carbone (SCHOLTISSEK : 128) agissant indirectement sur la biosynthèse des glycoprotéines.

INHIBITEURS	METABOLITES DETECTES SOUS DES CONDITIONS INHIBITRICES	AGENTS INHIBITEURS	REACTIONS DU CYCLE DES DOLICHOLS INHIBES
Désoxyglucose	dGlc-1-P dGlc-6-P acide 6-P-désoxygluconique UDP-dGlc GDP-dGlc dGlc-P-Dol	UDP-d-Glc dGlc-P-Dol	formation de Glc-P-Dol formation de monosaccharides-P-Dol élongation de l'oligosaccharide-PP-Dol glucosylation de Man ₉ -GlcNAc ₂ -PP-Dol
Fluoroglucose	FGlc-6-P UDP-FGlc GDP-FGlc		formation de Man-P-Dol formation de Glc-P-Dol
Fluoromannose	FMan-6-P UDP-Fman GDP-FMan		
Glucosamine	GlcNAc GlcNAc-6-P UDP-GlcNAc	GlcN	

TABEAU I : Inhibition du cycle des dolichols par les analogues de sucres.

INHIBITEURS	CATEGORIE ET ORIGINE	REACTIONS INHIBEES DANS LE CYCLE DES DOLICHOLS	MECANISME D'INHIBITION
Tunicamycine	antibiotique nucléosidique de <i>Streptomyces lysosuperificus</i>	formation de GlcNAc-PP-Dol à haute concentration formation de Glc-P-Dol	inactive la Dol-PP-GlcNAc-1-P-transférase
Amphotomycine	antibiotique polypeptidique de <i>Streptomyces canus</i>	formation de monosaccharide-P-Dol	inactive la formation de GlcNAc-PP-Dol, Man-P-Dol et Glc-P-Dol
Bacitracine	antibiotique polypeptidique de <i>Bacillus bicheniformis</i>	formation de Dol-P à partir de Dol-PP ou d'oligosaccharide-PP-Dol	forme un complexe avec le polyprénol-diphosphate et un ion métallique
Showdomycine	antibiotique nucléosidique de <i>Streptomyces showdoensis</i>	formation de Glc-P-Dol	inhébe non compétitivement la formation de Glc-P-Dol
Diamycine	antibiotique phosphoglycolipide de <i>Streptomyces umbrinus</i>	formation de GlcNAc ₂ -PP-Dol à partir de UDP-GlcNAc et de GlcNAc-PP-Dol	



TABEAU II : Inhibition du cycle des dolichols par les antibiotiques

B - LES ANTIBIOTIQUES

Certains composés connus comme étant des inhibiteurs de la formation de peptidoglycannes des bactéries sont également des inhibiteurs de la glycosylation au niveau du cycle des dolichols.

L'étude de certains d'entre eux : tunicamycine, amphomycine, showdomycine, diumycine et bacitracine est développée ci-après (le tableau II, page 31, et la figure 12, page 20 résument leurs actions).

1 - La tunicamycine

La tunicamycine a été isolée de *Streptomyces lysosupërifius* (TAKATSUKI *et al* : 129). C'est un antibiotique nucléosidique dont la structure est donnée dans la figure 14, page 36 (TAKATSUKI *et al* : 130). La nature de l'acide gras est variable et conduit à des homologues tels que : la streptovirudine, la mycospocidine et l'antibiotique 240 10. Ces composés inhibent la formation de GlcNAc-PP-Dol dans les cellules animales et végétales (STRUCK et LENNARZ : 131, ELBEIN : 132, SCHWARZ et DATEMA : 133). En considérant la structure de la tunicamycine et en tenant compte du fait qu'elle soit un inhibiteur de la dolichyl-phosphate-N-acétylglucosaminyl-1-phosphate-transférase par compétition avec l'UDP-GlcNAc soluble (KELLER *et al* : 134), une hypothèse se dégage selon laquelle la tunicamycine est un analogue des deux substrats (KELLER *et al* : 135). Cette supposition expliquerait ainsi la grande spécificité de l'inhibition de la tunicamycine.

Des antibiotiques, étudiés dans ce chapitre, seule la tunicamycine est un inhibiteur de la glycosylation de protéines dans les cellules animales intactes, par action sur la formation de GlcNAc-PP-Dol. En effet, le fait que la O-glycosylation se produit dans les cellules traitées à la tunicamycine (GAHMERB *et al* : 136, BUTTERS et HUGHES : 137, SPEAKE et WHITE : 138) indique que le "pool" intracellulaire de sucres n'est pas affecté de façon significative.

2 - L'amphomycine

L'amphomycine appartient à un groupe d'antibiotiques composé d'acide gras et d'une chaîne peptidique (voir figure 14, page 36). Il existe d'autres composés de ce groupe, tels que : la tsushimycine, l'asparticine et l'aspartomycine (TAMAKA *et al* : 139, TANAKA *et al* : 140). L'amphomycine inhibe de la même façon que la tunicamycine la synthèse de peptidoglycannes dans *Bacillus megaterium* (TANAKA *et al* : 141).

Dans le cas des cellules eucaryotes, l'amphomycine inhibe la formation de GlcNAc-PP-Dol, Man-P-Dol et Glc-P-Dol (KANG et ELBEIN : 142, KEAN : 143, KANG *et al* : 144, ERICSON *et al* : 145). Ces réactions ont un point commun ; elles requièrent l'ion manganèse et le phospho-dolichol, mais une concentration en ions et/ou en phospho-dolichol ne peut ôter ce blocage (KANG *et al* : 146), indiquant que l'inhibition est irréversible et non compétitive.

L'amphotomycine inhibe *in vitro* la formation de Man-P-Dol, Glc-P-Dol et GlcNAc-PP-Dol mais pas le transfert de résidus mannosyls à partir de GDP-Man ou de Man-P-Dol sur l'oligosaccharide-PP-Dol, en effet à des concentrations d'antibiotique inhibant complètement la formation de Man-P-Dol, la mannosylation par le GDP-Man de l'accepteur endogène donnant l'heptasaccharide $\text{Man}_5\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ est encore possible (KANG *et al* : 147).

On notera que, quand la formation de $[^3\text{H}]\text{-P-Dol}$ à partir de l'UDP- $[^3\text{H}]\text{Glc}$ est complètement inhibée, l'incorporation de $[^3\text{H}]\text{Glc}$ dans l'oligosaccharide-PP-Dol a encore lieu (KANG *et al* : 148). Malheureusement, aucune donnée structurale n'est applicable quant à l'oligosaccharide formé. Toutefois, ces résultats suggèrent l'existence de donneurs de résidus glucosyls autre que Glc-P-Dol.

3 - La showdomycine

La showdomycine, antibiotique nucléotidique (voir figure 14, page 36) (NISHIMURA *et al* : 149) est un inhibiteur spécifique de la formation de Glc-P-Dol dans des préparations d'enzymes solubles de l'aorte de porc (KANG *et al* : 150). A concentrations élevées, elle inhibe également la formation de GlcNAc-PP-Dol et Man-P-Dol.

La showdomycine semble être un inhibiteur non-compétitif de la dolichyl-glucosyltransférase bien que son mécanisme d'inhibition soit encore inconnu.

4 - La diumycine

La diumycine, agissant sur la formation de GlcNAc-PP-Dol, Man-P-Dol et GlcNAc₂-PP-Dol (VILLEMEZ et CARLO : 151, BABCZINSKI : 152) n'est pas un inhibiteur très spécifique de la synthèse des glycoprotéines. Néanmoins, l'activité glucosyltransférase étant fortement affectée (VILLEMEZ et CARLO : 153), cette drogue peut toutefois être utilisée pour étudier le rôle de Glc-P-Dol dans la formation de glycannes.

5 - La bacitracine

La bacitracine (voir figure 14, page 36), par formation d'un complexe avec le polyrénol-diphosphate et un cation divalent, inhibe la déphosphorylation du dolichol diphosphate (WEDGWOOD et STROMINGER : 154), de l'undécaprénol diphosphate (SIEWERT et STROMINGER : 155, STONE et STROMINGER : 156) et donc la synthèse de glycoconjugués à dolichol dépendant. Dans la majorité des systèmes cellulaires étudiés, la bacitracine n'entre pas dans le cytoplasme. Dans les systèmes eucaryotes, le cycle des dolichols est localisé dans le réticulum endoplasmique et pour cela inaccessible à la bacitracine. C'est pourquoi, uniquement la glycosylation, dépendant des dolichols et situé sur la membrane plasmique, peut être sensible à la bacitracine (HOFLACK *et al* : 157).

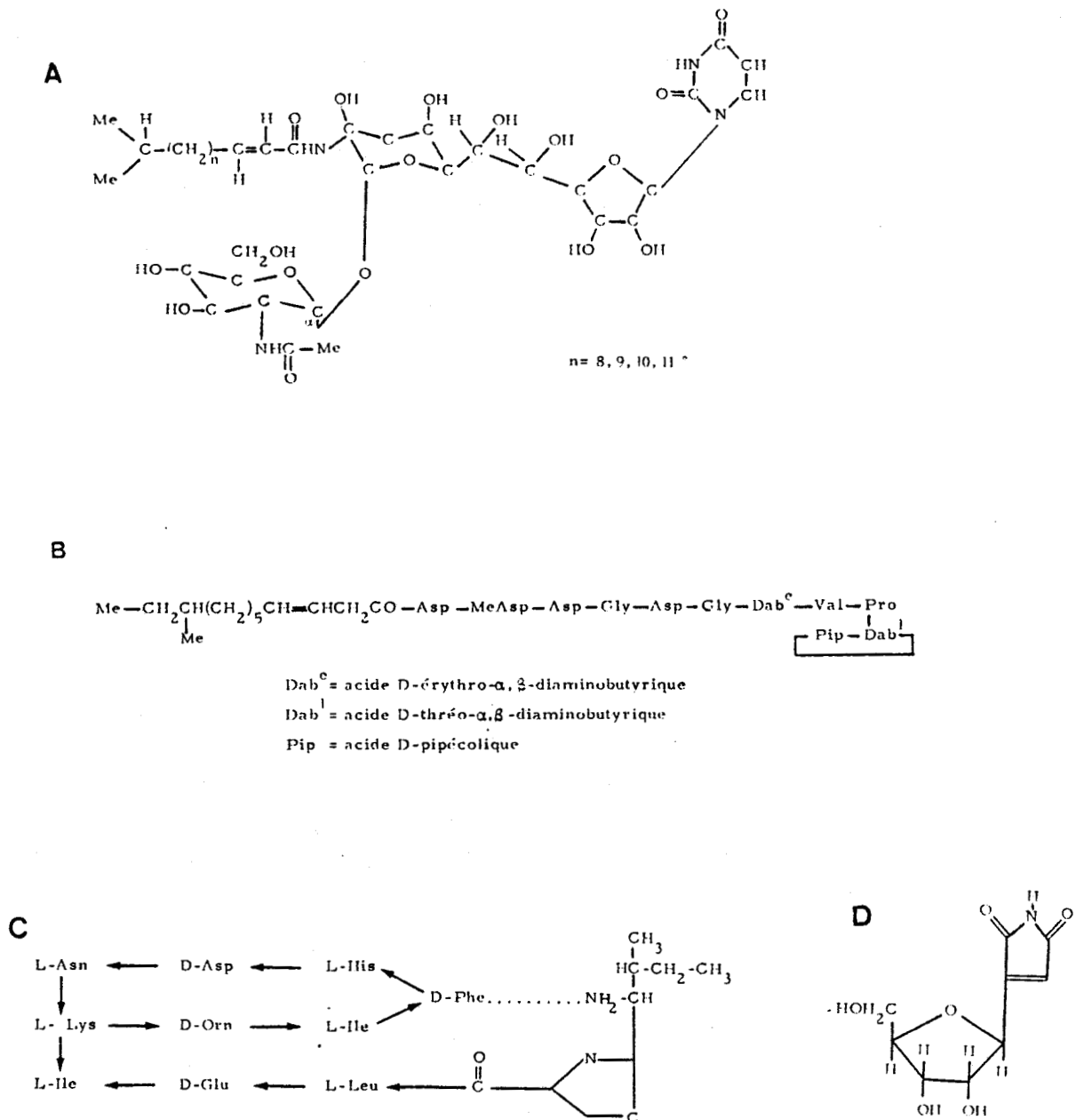


FIGURE 14 : Formules des différents antibiotiques de la glycosylation protéique:

A-Tunicamycine

B-Amphomycine

C-Bacitracine

D-Showdomycine



Le recyclage du phospho-dolichol à partir de dolichol-pyrophosphates peut apparemment se produire dans des microsomes de foie de rat et ces dolichol-phosphates peuvent être utilisés pour former du Man-P-Dol à partir de GDP-Man. Comme on pouvait l'espérer, la formation de ces Man-P-Dol, et non pas ceux formés avec le dolichol-phosphate endogène, est inhibée par la bécitracine (KATO *et al* : 158).

C - LES INHIBITEURS DE STRUCTURES DIVERSES

Les nucléotides et ses dérivés : analogues de nucléotides, dialdéhydes nucléosides, glycosyl-nucléotides ainsi que les composés phosphorylés : pyrophosphates, arylphosphates sont également des inhibiteurs de la glycosylation des protéines.

1 - Les nucléotides et dérivés

a - Nucléotides et analogues nucléotidiques

Les effets des nucléotides ont été étudiés sur la sialyltransférase de sérum humain (KLOHS *et al* : 159) : les nucléotides à cytidine agissent comme des inhibiteurs compétitifs de l'enzyme, contrairement aux nucléotides à adénosine et à uridine qui sont non compétitifs.

L'importance de l'inhibition est en rapport avec le nombre de phosphates ainsi : le XMP est moins inhibiteur que le XDP et que le XTP. Dans les cellules de lymphome de Burkitt, il semble que ce soit l'inverse (KILTON *et al* : 160) :
XMP > XDP > XTP.

Les analogues nucléotidiques tel que : le 5'-fluorocytidine-triphosphate, la cytidine-3'-5'-cyclique-monophosphate et la cytosine- β -D-arabinofuranoside-5'-triphosphate sont également des inhibiteurs de glycosyltransférases. D'autres, tels que l'AMPc et le GDPc ont un effet activateur en protégeant le précurseur par inhibition de la pyrophosphatase (MOOKEIJEA et YUNG : 161, DEBEIRE *et al* : 162, SPIK *et al* : 163).

b - Les dialdéhydes nucléosides

Les analogues dialdéhydiques de l'adénosine, inosine, cytidine et 6-méthylthiopurine-ribonucléoside sont des agents antitumoraux. L'étude des mécanismes d'action de ces agents a montré qu'ils inhibent un certain nombre d'enzymes (KIMBALL *et al* : 164, CORY et MANSELL : 165, CORY *et al* : 166) dont certaines intervenant dans la synthèse de glycoprotéines, tel que la xylosyltransférase et la galactosyltransférase de mélanome B 16 (LEE *et al* : 167). Le mécanisme d'inhibition dépend de la concentration de Mn^{++} (POWEL et BREW : 168), ce qui amène à penser que la liaison Mn^{++} avec l'enzyme est une condition préalable pour que la liaison du dérivé XDP s'établisse.

L'inhibition peut être progressivement inversée par des bases nitrées ou stabilisée par réduction au borohydrure de potassium, ce qui s'accorde avec l'hypothèse qu'une base de Schiff se forme avec un résidu de lysine comme il a été montré en isolant un peptide fortement marqué, lié à l'UDP[³H], caractérisé comme : Ser-Gly-Lys-UDP (POWEL et BREW : 169).

On notera que le dialdéhyde-UDP inactive spécifiquement la galactosyltransférase de membrane plasmique de cellule 3T 12, mais pas le dialdéhyde-ADP (CUMMINGS *et al* : 170).

c - Les glycosyl-nucléotides : UDP-Man et GDP-Man

L'UDP-Man et GDP-Man sont des inhibiteurs de la glucosyltransférase qui transfère le résidu glucosyl de l'UDP-Glc sur le phospho-dolichol dans des microsomes de foie (KERR et HEMMING : 171).

L'obtention d'une réponse biphasique suggère la présence de deux glucosyltransférases dont une seule est inhibée. L'inhibition apparaît être une propriété propre des glycosyl-nucléotides et non pas due à une compétition pour un taux limité de phospho-dolichol. Par contre, l'UDP-Gal et l'UDP-Xyl causent une inhibition peu marquée de la glucosyltransférase.

d - Le pyrophosphate et les arylphosphates

Le pyrophosphate et les arylphosphates sont des inhibiteurs de la synthèse de glycoconjugués au niveau du cycle des dolichols (KATO *et al* : 172, 173).

Le phénylphosphate inhibe le transfert de résidu mannosyl du GDP-Man au phospho-dolichol endogène dans les microsomes de foie de rat, en agissant comme un accepteur artificiel de GDP-Man. Le phényl-phosphate- β -D-mannose formé (n'étant pas un donneur de résidu mannosyl) est retrouvé dans le milieu extramicrosomal. Ce composé est également un accepteur de résidu glucosyl.

Les travaux étendus aux arylphosphates montrent que l'acide benzophosphorique est actif seulement comme accepteur de mannose alors que le (p-nitrophényl)phosphate est plus actif comme accepteur de glucose.

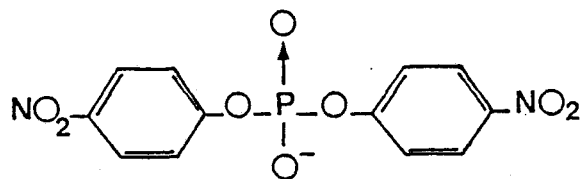
En conclusion, les inhibiteurs sont des outils précieux pour étudier la biosynthèse des glycoconjugués. Leur mode et point d'action varie en fonction de leur structure. Ainsi ils peuvent agir soit en entrant en compétition avec le substrat, soit en se comportant comme un accepteur ou encore en formant des complexes avec les glycosyltransférases.

4 - LE BIS-(P-NITROPHÉNYL)PHOSPHATE

Avant d'étudier les effets du bis-(p-nitrophényl)phosphate sur la biosynthèse des glycoconjugués, nous rappelons brièvement les propriétés biochimiques et toxicologiques de ce composé.

A - ASPECTS BIOCHIMIQUES

Le bis-(p-nitrophényl)phosphate :



est bien connu comme étant un substrat de phosphodiesterases (HEYMANN et KIRSH : 174) et un inhibiteur spécifique des carboxyestérases. Le mécanisme de cette inhibition est le suivant : après coupure du p-nitrophénol, le résidu (p-nitrophényl)phosphate se lie de façon covalente à l'hydroxyl de la sérine sur le site actif des carboxylestérases (HEYMANN et KIRSCH : 175).

Etant faiblement toxique, il a pu être utilisé *in vivo*. Ainsi, on a établi que l'inhibition des estérases a une influence sur l'induction par les narcotiques de la synthèse des porphyrines (TAUB et MARKS : 176, MURPHY *et al* : 177) ou réduit la formation de la méthémoglobine dépendante de la phénacétine (HEYMANN *et al* : 178).

Le bis-(p-nitrophényl)phosphate a été utilisé également pour la discrimination des estérases (HANSERT *et al* : 179) pour la titration des sites actifs (KUNERT et HEYMANN : 180, ARNDT *et al* : 181) et pour des investigations dans le turnover des protéines intracellulaires chez le rat.

B - ASPECTS TOXICOLOGIQUES

L'injection de [^{14}C]bis-(p-nitrophényl)phosphate a permis de localiser les points d'impact *in vivo*. La distribution de la radioactivité en fonction du temps (de 5 minutes à 3 jours) a été étudiée (BLOCK et WASSERMANN : 182). Deux phases sont mises en évidence :

- Une première, non spécifique, déterminée par les propriétés physicochimiques du bis-(p-nitrophényl)phosphate, par le degré de vascularisation des tissus, et par le métabolisme intracellulaire du bis-(p-nitrophényl)phosphate et son élimination.

- Une deuxième, après une heure, reflète sa haute spécificité et les interactions entre l'inhibition et le taux de carboxyestérases existant dans le tissu. Le schéma (voir la figure 15, page 43) représente le processus d'élimination après injection intra-veineuse du bis-(p-nitrophényl)phosphate chez le rat.

En conclusion, utilisé comme substrat pour des phosphodiesterases et bloquant certaines enzymes de façon irréversible en agissant sur des liaisons phosphodiesters il nous a donc semblé intéressant d'étudier si le bis-(p-nitrophényl)phosphate n'affecterait pas les activités glycosyltransférasiques car ces enzymes ont comme substrat des composés comprenant des ponts "phosphates" ou "diphosphates" (glycosyl-nucléotide-mono ou di-phosphates et glycosyl-mono ou di-phospho-dolichol).

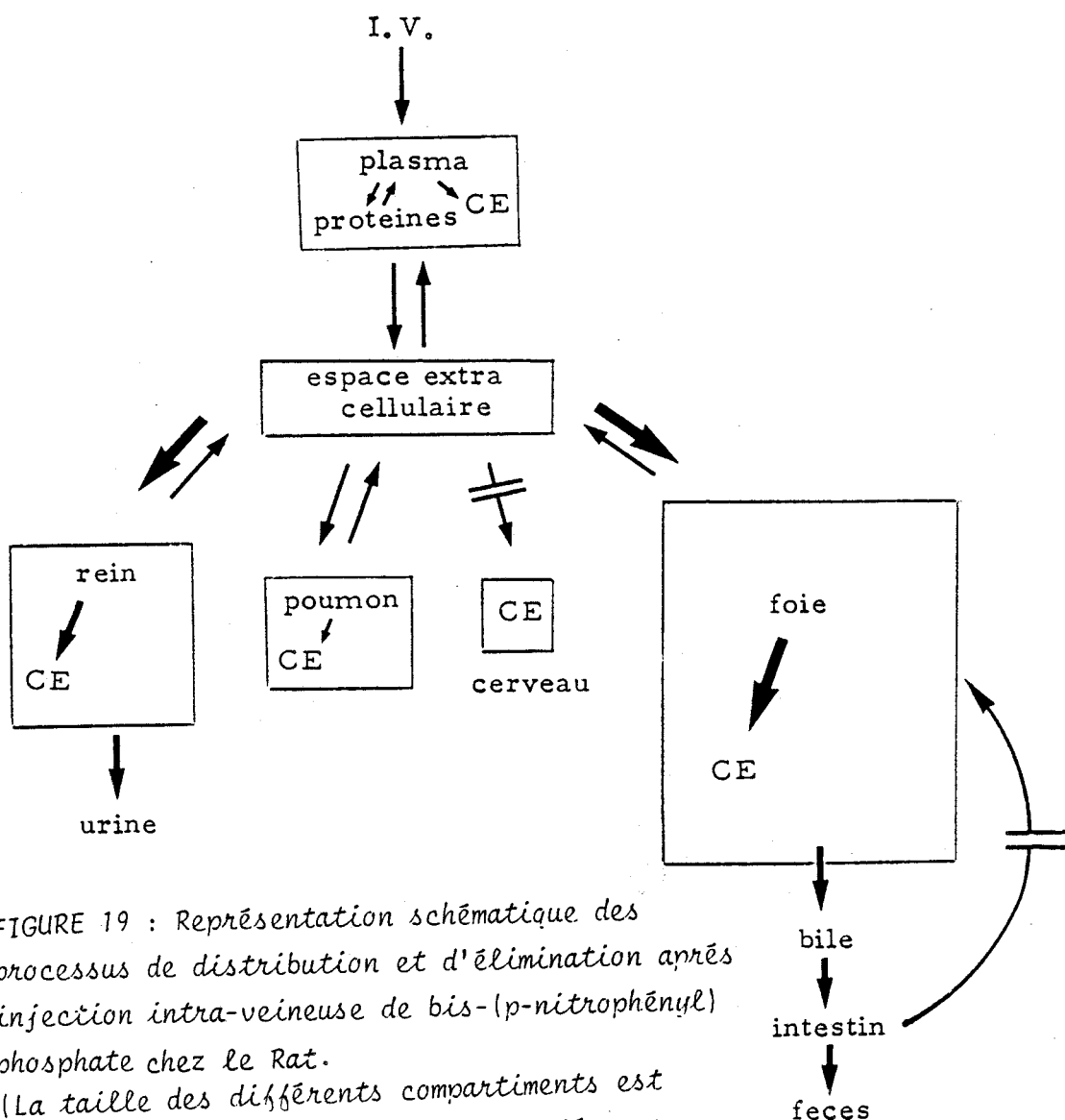


FIGURE 19 : Représentation schématique des processus de distribution et d'élimination après injection intra-veineuse de bis-(p-nitrophényl) phosphate chez le Rat.
(La taille des différents compartiments est proportionnelle au taux de carboxyestérases -CE- contenu dans ces organes) (Block et Wasserman : 183).

M A T E R I E L S E T M E T H O D E S

Ce chapitre rappelle brièvement les techniques et matériels que nous avons utilisés lors de nos travaux.

1 - LES LYMPHOCYTES SPLÉNIQUES DE RAT

A - PREPARATION

Les lymphocytes sont préparés à partir de rate de rats Wistar, âgés de 6 semaines environ.

Toutes les opérations se font à 4°C.

- Prélèvement de la rate et dilacération dans un tampon COX et PETERS (184) pH : 7,4 dont la composition pour 1 litre est de :

NaCl	7,318 g
KCl	0,29 g
CaCl ₂ (anhydre)	0,11 g
MgSO ₄ (7H ₂ O)	2,46 g
Glucose	1,8 g
Hepes	3,78 g

L'osmolarité est de : 288 mOsm.

- Après filtration sur gaze, la suspension est centrifugée à 500 g pendant 10 minutes, le culot cellulaire est repris dans un tampon d'hémolyse de composition :

NaCl	0,154 M
KHCO ₃	0,01 M
EDTA	1 M

- Après centrifugation à 500 g durant 10 minutes, les lymphocytes sont lavés dans le tampon.

Une dernière centrifugation de 500 g pendant 10 minutes permet d'obtenir un culot de lymphocytes qui, repris par un volume de tampon adéquat, donnera la concentration cellulaire désirée.

B - VIABILITE ET COMPTAGE

La viabilité de la suspension cellulaire est réalisée par le test au bleu trypan : les cellules sont mises en suspension dans un tampon COX et PETERS (185), contenant du bleu trypan à la concentration de 0,2 %. Le pourcentage de cellules colorées indique le pourcentage de lymphocytes non viables. En général, celui-ci avoisine les 10 %. On remarque que le temps d'incubation ne changent en rien la viabilité cellulaire.

Le comptage de lymphocytes se fait grâce à la cellule de Malassez.

2 - PRÉPARATION DES ACCEPTEURS

A - L'OVOMUCOIDE

L'ovomucoïde est préparée au laboratoire selon la méthode de FREDERICQ et DEUTSCH (186). La structure de ce composé est donnée dans la figure 7 , page 10

B - L'ASIALOFETUINE

La fétuine (voir figure 6 , page 10) est d'origine commerciale (Sigma, St Louis, USA).

La désialylation des glycoprotéines (10 mg/ml) s'effectue par hydrolyse ménagée par l'acide trifluoroacétique (0,1 M à 80°C) durant 35 minutes. La solution est ensuite dialysée contre de l'eau puis lyophilisée. Dans ces conditions, la désialylation complète est vérifiée après méthanolyse par chromatographie en phase gazeuse.

C - L'ASIALOAGALACTOFETUINE

1 - Principe

La désialylation de l'asialofétuine est réalisée par action de la β -galactosidase sur l'asialofétuine.

2 - Réactifs

Les réactifs utilisés sont les suivants :

- Le tampon de Mac-Ilvaine composé de :

PO_4HNa_2 0,02 M

acide citrique 0,01 M

pH : 7,4

- La β -galactosidase (purifiée du haricot Jacquier a été préparée par Stéphane BOUQUELET, que nous remercions) dont l'activité a été déterminée par la libération de paranitrophénol à partir de paranitrophénol- β -D-galactoside.

3 - Protocole

50 mg d'asialofétuine sont solubilisés dans 2 ml de tampon de Mac-Ilvaine auquel est ajouté 100 μ l de β -galactosidase. Après 15 heures d'incubation à 37°C, 100 μ l d'enzyme sont ajoutés afin d'obtenir le maximum de dégalactosylation.

L'asialoagalactofétuine est purifiée par passage sur colonne d'Ultrogel ACA 44 (Pharmindustrie), éluée en présence de formiate d'ammonium 0,1 M à pH : 6,4.

Le profil d'élution représenté en figure 16, page 49 montre la séparation de l'asialoagalactofétuine, repérée grâce à son absorbance à 280 nm et de l'enzyme, repéré grâce à son activité sur le (p-nitrophényl)galactose.

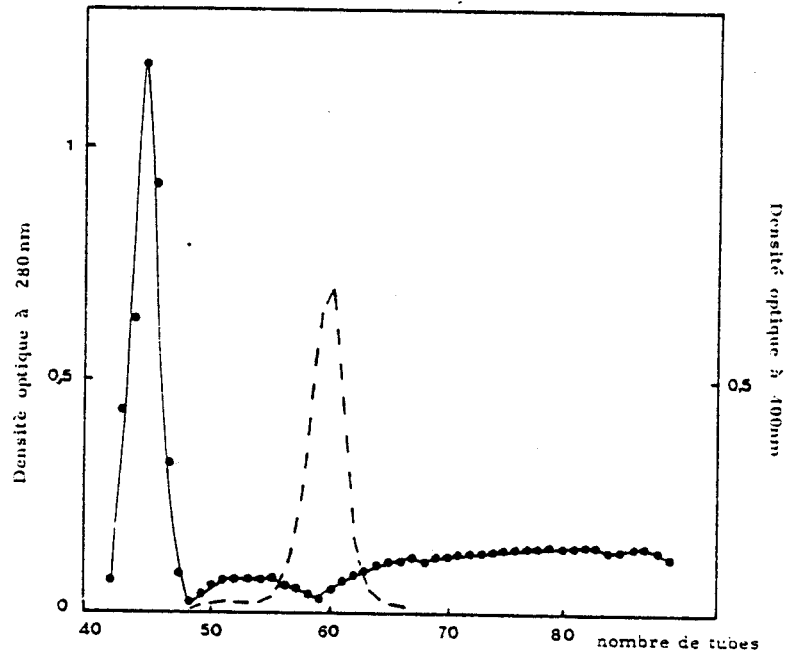


FIGURE 16 : Profil d'élution de l'asialoagalactofétuine sur
Ultrogel ACA 44 :
-Visualisation de l'activité β -galactosidase
à 400 nm (---)
-Absorbance de l'asialoagalactofétuine à 280nm (●—●)

3 - MESURE DES ACTIVITÉS GLYCOSYLTRANSFÉRASIQUES

La mesure des activités glycosyltransférasiques s'effectue par l'intermédiaire de précurseurs radioactifs dont le transfert est suivi sur les accepteurs endogènes et exogènes.

A - CONDITIONS OPTIMALES D'ACTIVITES GLYCOSYLTRANSFERASIQUES

Ces conditions sont résumées dans le tableau III pour des incubations de 100 μ l finales.

Enzymes	Précurseurs radioactifs	Accepteurs exogènes	Ions	Temps et température d'incubation	Nucléotide monophosphate protégeant le substrat
Galactosyltransférase	UDP- $[^3\text{H}]$ Gal 5 μ M 100mCi/mmol	Ovomucoïde 5mg/ml	MnCl ₂ 10mM	30mn à 37°C	AMP 5mM
Sialyltransférase	CMP- $[^3\text{H}]$ NeuAc 5 μ M 203mCi/mmol	Asialofetaine 5mg/ml	MnCl ₂ 5mM	30mn à 37°C	
Fucosyltransférase	GDP- $[^3\text{H}]$ Fuc 5 μ M 203mCi/mmol	Asialofetaine 5mg/ml Asialogalactofetaine 5mg/ml	MgCl ₂ 2mM	30mn à 37°C	UMP 5mM
Mannosyltransférase	GDP- $[^3\text{H}]$ Man 6 μ M 203mCi/mmol	Pas d'accepteur exogène	MgCl ₂ 2mM MnCl ₂ 5mM	20mn à 30°C	AMP 5mM
Glucosyltransférase	UDP- $[^3\text{H}]$ Glc 6 μ M 309mCi/mmol	Pas d'accepteur exogène	MgCl ₂ 5mM MnCl ₂ 2mM	20mn à 30°C	AMP 5mM
N-Acétylglucosaminyltransférase	UDP- $[^3\text{H}]$ GlcNAc 6 μ M 6,6mCi/mmol	Pas d'accepteur exogène	MgCl ₂ 2mM MnCl ₂ 5mM	20mn à 30°C	AMP 5mM

TABLEAU III : Conditions optimales d'activités des glycosyltransférases.

Ces produits radioactifs utilisés proviennent d'origine commerciale (Amersham, UK à l'exception de l'UDP-[³H]GlcNAc, NEN, Boston, USA).

B - DETERMINATION DE LA RADIOACTIVITE LIEE AUX ACCEPTEURS

1 - Acido-précipitable

La réaction est arrêtée suivant la méthode décrite par CACAN *et al* (187), par addition de 1 ml d'acide phosphotungstique : 5 % en HCl 2N. Le matériel acido-précipitable est recueilli sur filtre en fibres de verre (WHATMAN GFC), et lavé abondamment par de l'acide trichloroacétique à 5 %, par de l'eau et enfin par l'éthanol absolu. La radioactivité retenue sur le filtre est déterminée en scintillation liquide.

2 - Extraction séquentielle des intermédiaires lipidiques

Après incubation, la réaction est arrêtée par addition de mélange d'arrêt (cacodylate de sodium : 1 M, IgG, utilisé comme dispersant : 10 %, MgCl₂ : 100 mM, pH : 7,4). Les intermédiaires lipidiques sont ensuite extraits par la méthode décrite par HOFLACK *et al* (188). Les différentes étapes de cette extraction sont résumées dans la figure 17 page 52, elles permettent d'obtenir :

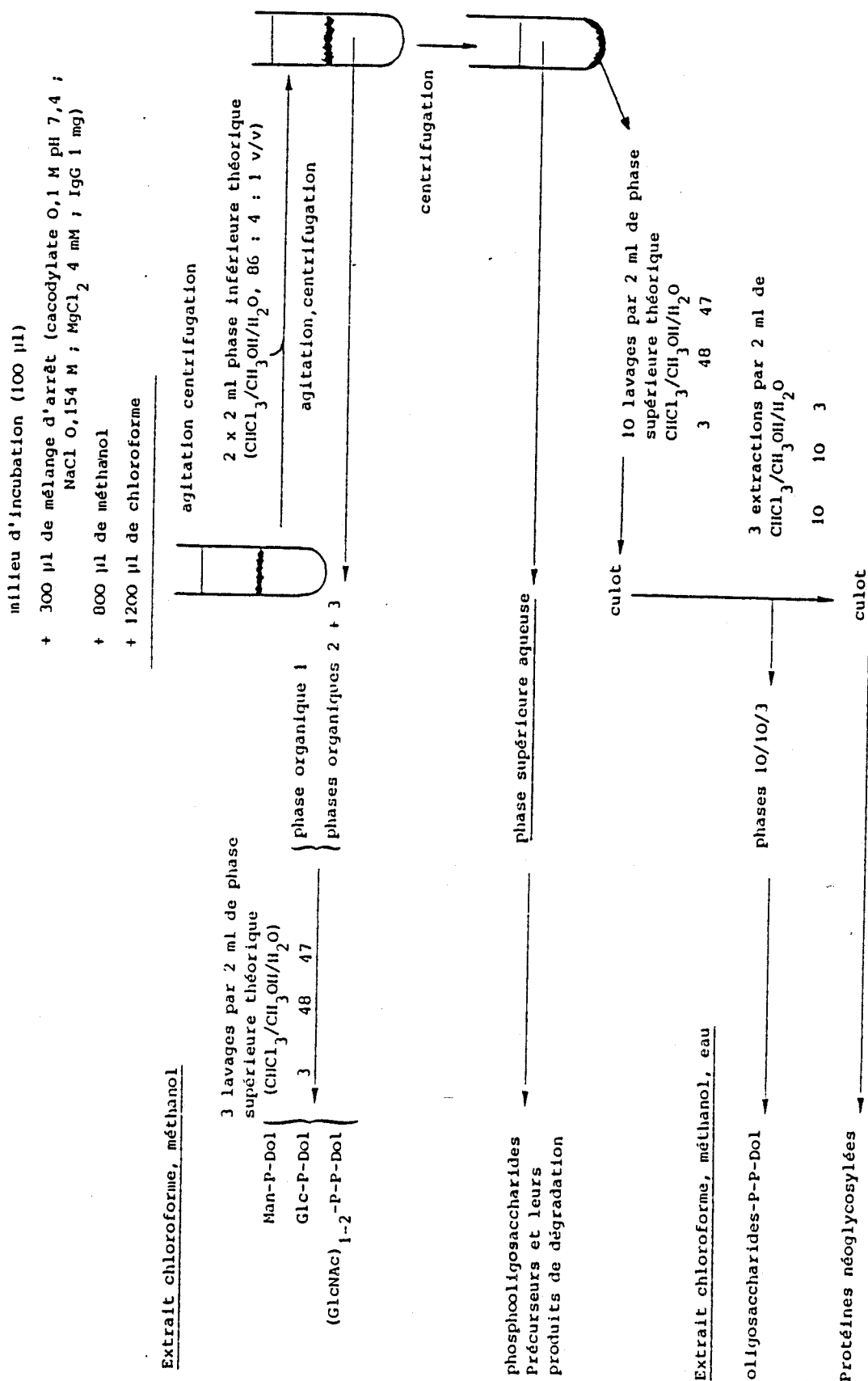


FIGURE 17 : Extraction séquentielle des intermédiaires lipidiques



1 - Une phase chloroforme / méthanol, contenant les intermédiaires lipidiques de type dolichol contenant un ou deux résidus glycosyls : Man-P-Dol, Glc-P-Dol, GlcNac₂-PP-Dol. Dans cette phase, sont également extraits les sphingoglycolipides Cer-Glc.

2 - Une phase aqueuse, renfermant les glycosyl-nucléotides marqués, leurs produits de dégradation (sucre-1P, sucre) et les produits de dégradation des intermédiaires lipidiques (phospho-oligosaccharides). Le passage sur colonne de Séphadex G 25 permet de séparer ces différents composés.

3 - Une phase chloroforme / méthanol / eau qui permet l'extraction de dolichyl-pyrophosphate-oligosaccharides.

4 - Un résidu protéique, renfermant les protéines nouvellement glycosylées.

3 - Hydrolyse et séparation des oligosaccharides liés aux dolichyl - pyrophosphates

a - Hydrolyse de l'oligosaccharide du dolichyl-pyrophosphate

L'échantillon est séché sous azote, repris dans 0,5 ml de méthanol. Après addition de 0,5 ml d'une solution de HCl : 0,02 M dans l'eau, le mélange est porté sous reflux à 100°C pendant 10 minutes.

Puis, une neutralisation est effectuée par addition de 0,5 ml de NaOH : 0,02 M dans le méthanol. Un déphasage est réalisé par addition de 1,5 ml de chloroforme après agitation et centrifugation. Les oligosaccharides et monosaccharides se retrouvent dans la phase supérieure.

b - Séparation de GlcNAc et GlcNAc-GlcNAc

Le N-acétylglucosamine et le N-N'-diacétylchitobiose sont séparés par chromatographie sur papier Whatman 3 dans le système solvant : butanol / pyridine / eau (6 : 4 : 3 en volume).

c - Séparation du Glc-P-Dol et Cer-Glc

Le dolichyl-phosphate-glucose est séparé du glucosyl-céramide par chromatographie descendante sur DEAE cellulose (WHATMAN DE 81) en présence de chloroforme / méthanol (2 : 1 en volume). Alors que le dolichyl-phosphate-glucose reste à l'origine, le glucosyl-céramide migre avec le front.

4 - Préparation du [¹⁴C]Man-P-Dol

Après incubation de lymphocytes, en présence de GDP-[¹⁴C]Man, le [¹⁴C]Man-P-Dol contenu dans la phase

chloroforme / méthanol est purifié par chromatographie sur colonne de DEAE cellulose (WHATMAN DE 52) forme acétate, contenant 10 mM d'acétate d'ammonium. Après lavages successifs au chloroforme / méthanol et méthanol, l'élution par du chloroforme / méthanol (2 : 1 en volume) libère le [^{14}C]Man-P-Dol.

C - INTEGRITE DU PRECURSEUR RADIOACTIF

L'intégrité des précurseurs radioactifs est vérifiée par chromatographie descendante sur papier WHATMAN 3 sur le système solvant selon la méthode décrite par SPIK et al (189).

- Pyridine / acétate d'éthyle/ acide acétique / eau (5 : 5 : 1 : 3 en volume) durant 12 heures, ceci pour 1'UDP- ^{14}C Gal, le GDP- ^{14}C Fuc, le GDP- ^{14}C Man, 1'UDP- ^{14}C Glc et 1'UDP- ^3H GlcNAc.

- Ethanol / ammonium acétate (7 / 3 en volume) durant 24 heures, pour le CMP- ^{14}C NeuAc.

4 - HOMOGÉNÉISATION DES LYMPHOCYTES

L'homogénéisation des cellules requiert l'utilisation d'un détergent : le Triton X100. Sa concentration optimale est étudiée pour chaque enzyme (figure 18, page 57).

Une concentration finale en Triton de 2 % sera choisie pour la galactosyl- et fucosyltransférase et de 0,05 % pour la sialyltransférase, permettant ainsi d'obtenir le maximum d'activité enzymatique.

5 - PRÉPARATION DE LA GALACTOSYLTRANSFÉRASE

A - PRINCIPE

Après solubilisation de la galactosyltransférase dans des conditions qui n'altèrent pas son activité, l'enzyme est séparé des protéines contaminantes par passage sur colonne d'UDP-hexanolamine Sépharose 4 B.

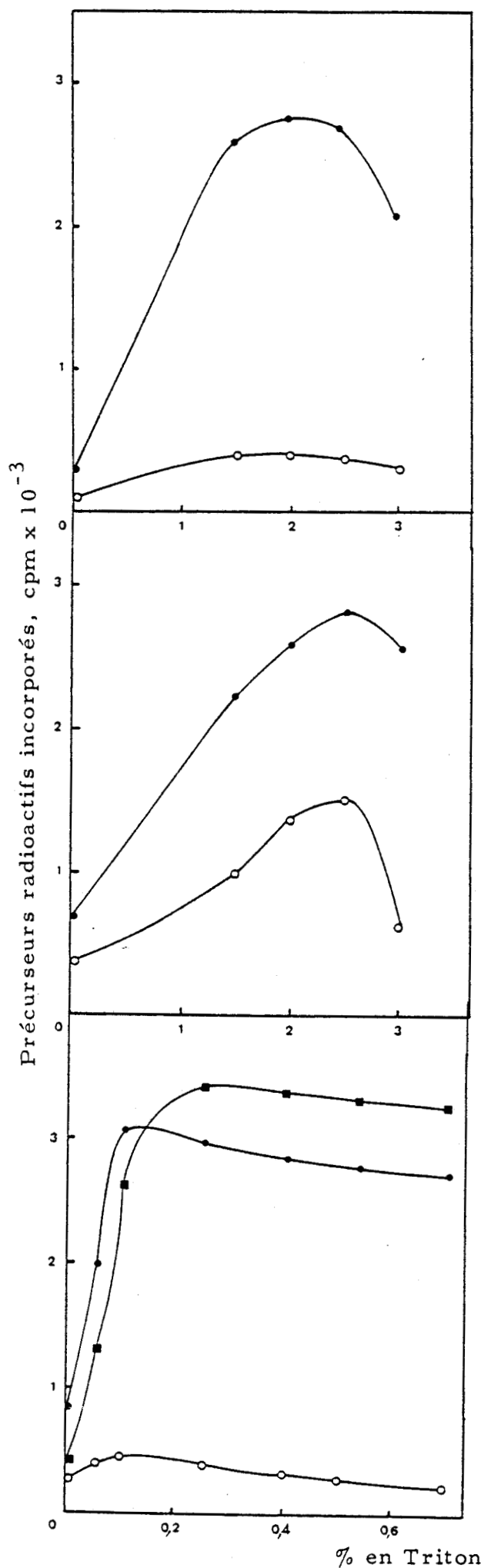


FIGURE 18 : Effet de la concentration en Triton sur:
 A- l'incorporation de [¹⁴C]Gal sur l'ovomucoïde
 B- l'incorporation de [¹⁴C]NeuAc sur l'asialofétuine
 C- l'incorporation de [¹⁴C]Fuc sur l'asialofétuine (●—●) et sur l'asialoagalactofétuine (■—■) et sur les accepteurs endogènes (○—○)



B - SOLUBILISATION

D'une façon générale, les glycosyltransférases sont fortement liées aux membranes. Lors de la préparation de la galactosyltransférase, la première étape nécessite donc une solubilisation des enzymes.

Cette solubilisation s'effectue par du Triton X100 utilisé à concentration optimale de 2 % finale et en présence de GlcNAc : 5 mM, de manière à protéger l'enzyme.

On se débarrasse du matériel insoluble par une centrifugation de 30 000 g pendant une heure. Comme toutes les suivantes, cette opération s'effectue à 4°C afin d'éviter toute altération de l'activité enzymatique.

C - PASSAGE SUR UDP-HEXANOLAMINE SEPHAROSE 4 B.

Le surnageant contenant la galactosyltransférase est déposé sur une colonne de UDP-hexanolamine Sépharose 4 B (BREW et SMITH : 190').

Le couplage de l'UDP-hexanolamine au Sépharose 4 B s'effectue de la manière suivante :

La Sépharose 4 B (20 ml) (Pharmacia, Uppsala, Suède) activée par le bromure de cyanogène selon la méthode décrite par MARSH *et al* (191) est couplée à l'UDP-hexanolamine (100 mg) (Sigma). Afin d'éviter les phénomènes d'échanges d'ions, les groupements fonctionnels activés et encore libres sont bloqués par le glycolle 1M. La Sépharose substituée est lavée par un tampon cacodylate : 25 mM, pH : 7,4, contenant du $MnCl_2$: 25 mM, GlcNAc : 5 mM et β -mercaptoéthanol : 3 mM, puis montée dans la colonne en polyéthylène. Le support est lavé par le même tampon afin d'éliminer la fixation aspécifique (c'est à dire jusqu'à ce que l'absorbance à 280 nm soit nulle) (figure 19, page 60).

L'élution par le même tampon, en absence de $MnCl_2$ et contenant de l'EDTA à concentration de 25 mM libère la fraction active. Ce passage sur colonne d'affinité est une étape importante car elle permet d'obtenir une fraction active de galactosyltransférase non contaminée par l'UDP-Gal intracellulaire et par certaines protéines contaminantes.

D - STABILISATION DE L'ENZYME

Afin d'augmenter l'activité de la galactosyltransférase celle-ci est concentrée 5 fois en volume par le polyéthylène glycol, sans perte d'activité. La conservation, en présence de sérum albumine bovine à 10 %, préserve l'activité galactosyltransférase lors de la congélation à $-20^{\circ}C$. La préparation peut ainsi être conservée plusieurs mois à $-20^{\circ}C$ sans perte d'activité.

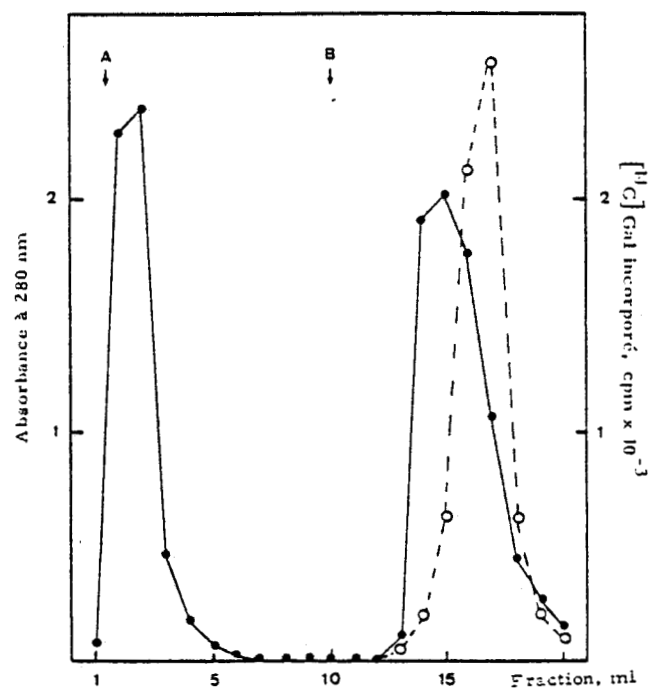


FIGURE 19 : Profil d'élution de la galactosyltransférase sur l'UDP-Hexanolamine sépharose 4B

A- Injection

B- Elution avec le tampon: cacodylate 25mM, pH 7,4

EDTA 25mM, GlcNAc 5mM, B-mercaptoéthanol 3mM

Absorbance à 280 nm (●—●)

Incorporation de [¹⁴C]Gal sur l'ovomucoïde (○—○)



CHOIX DU MODELE MOLECULAIRE

Pour l'étude des effets du bis-(p-nitrophényl) phosphate sur les activités glycosyltransférasiques, le lymphocyte splénique de rat nous a paru être le matériel biologique le plus adapté.

En effet, son isolement ne requiert aucun traitement chimique ou enzymatique ; de plus, il peut être obtenu avec un rendement élevé.

L'utilisation de cellules entières permet l'expression des activités glycosyltransférasiques en utilisant des précurseurs sans dilution isotopique : les variations d'incorporation reflètent donc les variations d'activités de l'enzyme.

MISE EN EVIDENCE DES ACTIVITES GLYCOSYLTRANSFERASIQUES

L'utilisation de précurseurs radioactifs : nucléotide-sucres permet de mesurer l'activité glycosyltransférasique sur des cellules entières d'une part ou homogénéisées d'autre part, en suivant le transfert du sucre sur des accepteurs endogènes ou exogènes (voir figure 20, page 62).

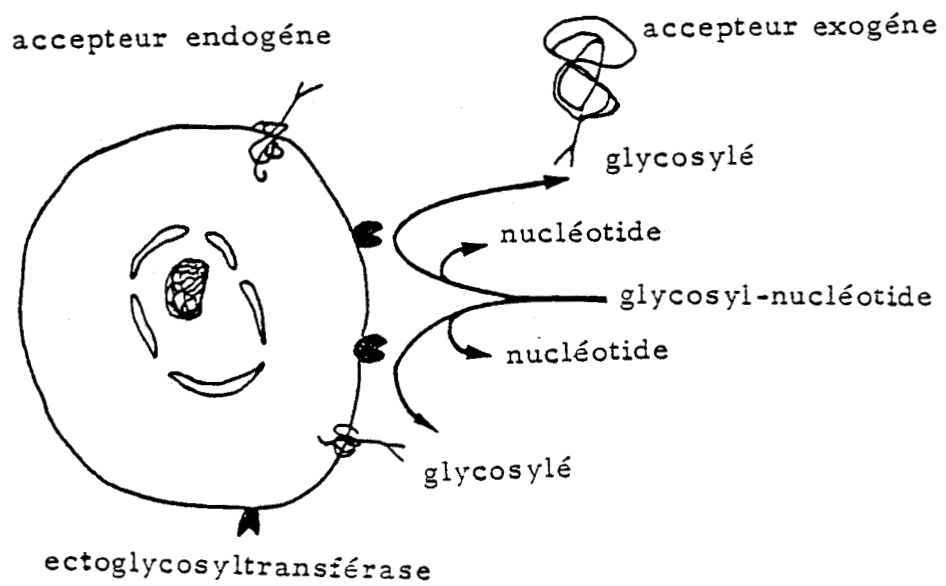


FIGURE 20 : Principe de la mesure des activités glycosyltransférasiques.

R E S U L T A T S

Après avoir rappelé les effets du bis-(p-nitrophényl)phosphate sur les enzymes du cycle des dolichols (CACAN *et al* : 192), travail auquel nous avons participé, nous exposerons nos travaux plus personnels sur l'effet du bis-(p-nitrophényl)phosphate sur les activités galactosyl-, sialyl- et fucosyltransférases.

1 - EFFET DU BIS-(P-NITROPHÉNYL)PHOSPHATE SUR LES ENZYMES DU CYCLE DES DOLICHOLS

A - EFFET GENERAL

Nous avons premièrement étudié les effets du bis-(p-nitrophényl)phosphate sur les lymphocytes entiers, en présence d'UDP-GlcNAc, GDP-[¹⁴C]Man et UDP-Glc menant à la synthèse de [¹⁴C]Man-P-Dol, oligosaccharides-PP-Dol contenant du [¹⁴C]mannose qui sont soit transférés sur les protéines, soit dégradés en phosphooligosaccharides (HOFLACK *et al* : 193).

La figure 21, page 65 montre que lorsque l'incubation est effectuée en présence de concentrations croissantes (de 0 à 20 mM) de bis-(p-nitrophényl)phosphate, la radioactivité incorporée dans les oligosaccharides-PP-Dol, protéines et phosphooligosaccharides est grandement diminuée (80 % d'inhibition à 10 mM) alors que la radioactivité incorporée dans le $[^{14}\text{C}]\text{Man-P-Dol}$ n'est pas touchée.

Beaucoup d'étapes interviennent dans la formation de l'oligosaccharide-PP-Dol. Aussi, deux questions se posent :

- Quelles sont les réactions de synthèse de l'oligosaccharide-PP-Dol inhibées par le bis-(p-nitrophényl)phosphate ?

- Le transfert "en bloc" sur les protéines est-il inhibé en lui-même ou est-ce la conséquence d'une inhibition antérieure des oligosaccharides-PP-Dol ?

L'examen des effets du bis-(p-nitrophényl)phosphate sur chaque étape du cycle des dolichols nous permettra de répondre à ces questions.

B - EFFET DU BIS-(P-NITROPHENYL)PHOSPHATE SUR L'ADDITION DE
RESIDUS $\text{GlcNAc}_{1,2}\text{-PP-Dol}$

La synthèse de $[^3\text{H}]\text{GlcNAc-PP-Dol}$ et de $[^3\text{H}]\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ s'effectue par incubation des lymphocytes en présence d'UDP- $[^3\text{H}]\text{GlcNAc}$ uniquement.

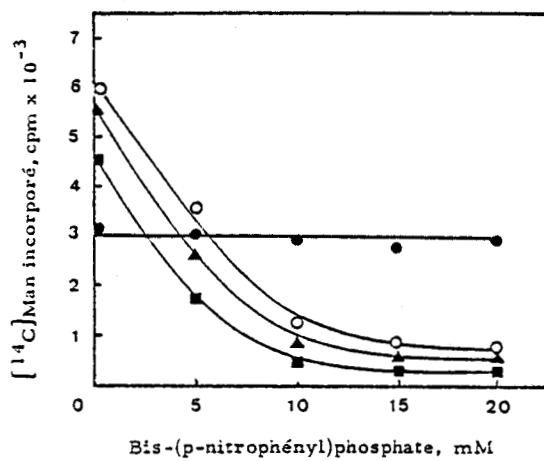


FIGURE 21 : Effet du bis-(p-nitrophényl)phosphate sur l'incorporation de $[^{14}\text{C}]$ Man à partir de GDP- $[^{14}\text{C}]$ Man dans les dolichyl-monophosphate-mannoses (●-●), les dolichyl-diphosphate-oligosaccharides (○-○), les protéines (▲-▲) et dans les phosphooligosaccharides solubles (■-■).

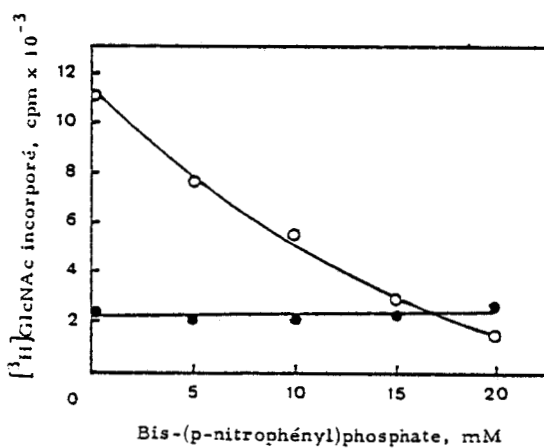


FIGURE 22 : Effet du bis-(p-nitrophényl)phosphate sur l'incorporation de $[^3\text{H}]$ GlcNAc à partir d'UDP- $[^3\text{H}]$ GlcNAc dans les dolichyl-diphosphate-N-acétylglucosamines (●-●) et dans les dolichyl-diphosphate-chitobioses (○-○).



Comme le montre la figure 22 , page 65 , l'addition de bis-(p-nitrophényl)phosphate dans le milieu d'incubation cause une diminution de l'incorporation de la radioactivité dans le $\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ alors que la formation de GlcNAc-PP-Dol n'est pas inhibée.

Le résultat indique que le transfert de résidu GlcNAc-1-P à partir d'UDP-GlcNAc sur les dolichyl-phosphates n'est pas affecté par le bis-(p-nitrophényl)phosphate, tandis que l'addition de résidu N-acétylglucosaminy l sur le GlcNAc-PP-Dol , préalablement synthétisé, est nettement inhibée. Donc, la formation des oligosaccharides-PP-Dol est déjà inhibée à cette étape.

Qu'en est-il de l'élongation par les résidus mannosyls du $\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$?

C - EFFET DU BIS(P-NITROPHENYL)PHOSPHATE SUR L'ADDITION DE
RESIDUS MANNOSYLS

Il est maintenant établi que, dans des systèmes variés, la mannosylation requiert la présence de deux donneurs :

- Le GDP-Man menant à la formation de $\text{Man}_5\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$.

- Le Man-P-Dol donnant le $\text{Man}_9\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ par allongement du $\text{Man}_5\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$.

Les effets du bis-(p-nitrophényl)phosphate sur ces deux types de mannosyltransférases sont successivement étudiés.

1 - Effet sur l'addition de résidus mannosyls à partir de GDP-Man

L'étude de cette mannosylation s'effectue tout d'abord par synthèse du $[^3\text{H}]\text{GlcNac}_2\text{-PP-Dol}$ par incubation des lymphocytes, en présence d'UDP- $[^3\text{H}]\text{GlcNac}$ puis par addition après 15 minutes d'incubation de GDP-Man et de tunicamycine ($0,5 \mu\text{g/ml}$) qui bloque la formation de nouveaux $[^3\text{H}]\text{GlcNac}_2\text{-PP-Dol}$.

La mannosylation du $[^3\text{H}]\text{GlcNac}_2\text{-PP-Dol}$, préalablement synthétisée, est observée par extraction de la radioactivité dans la phase chloroforme / méthanol / eau (10 : 10 : 3 en volume).

La figure 23, page 68 montre que la présence de bis-(p-nitrophényl)phosphate dans le milieu d'incubation empêche la mannosylation. En effet, aucun oligosaccharide-PP-Dol n'est retrouvé dans la phase chloroforme / méthanol / eau lorsque l'allongement des $[^3\text{H}]\text{GlcNac-PP-Dol}$ est effectué en présence de bis-(p-nitrophényl)phosphate.

Ces résultats montrent que la mannosylation à partir de GDP-Man est inhibée par le bis-(p-nitrophényl)phosphate ou, tout au moins, la fixation du premier résidu mannosyl en β .

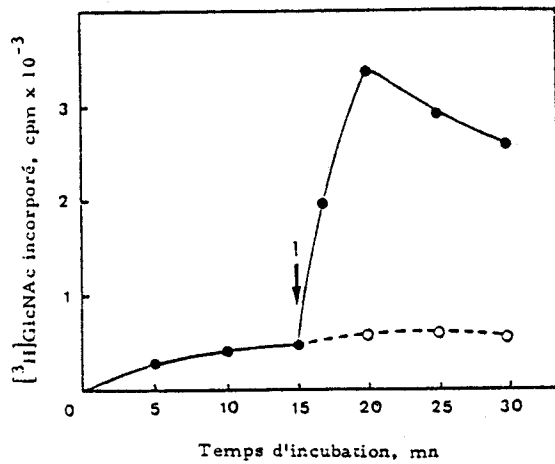


FIGURE 23: Etude de la formation de dolichyl-diphosphate-oligosaccharide à partir de dolichyl-diphosphate- $[^3\text{H}]$ chitobiose et de GDP-Man, en présence (○-○) et en absence (●-●) de bis-(p-nitrophenyl) phosphate (20 mM) 1-addition de GDP-Man et de tunicamycine.

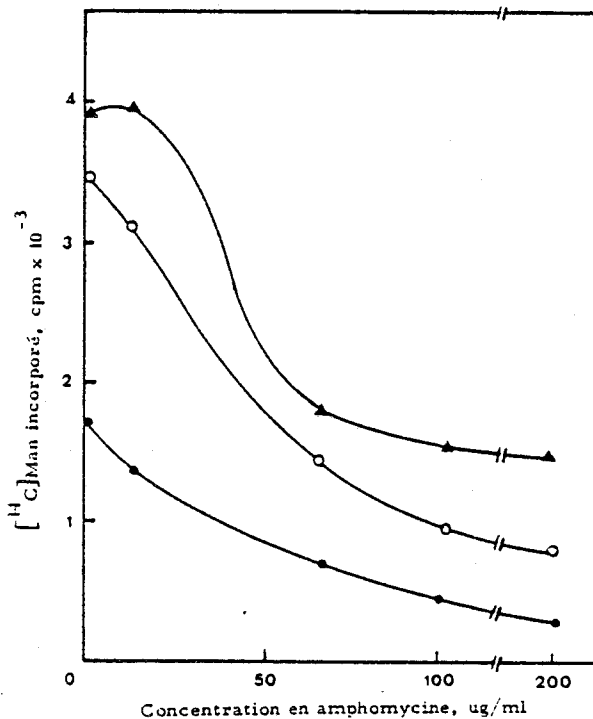


FIGURE 24: Effet de l'amphotericine sur l'incorporation de $[^{14}\text{C}]$ Man à partir de GDP- $[^{14}\text{C}]$ Man dans les dolichyl-phosphate-mannoses (●-●), dans les dolichyl-pyrophosphate-oligosaccharides (○-○) et les protéines (▲-▲) durant 15mn d'incubation.

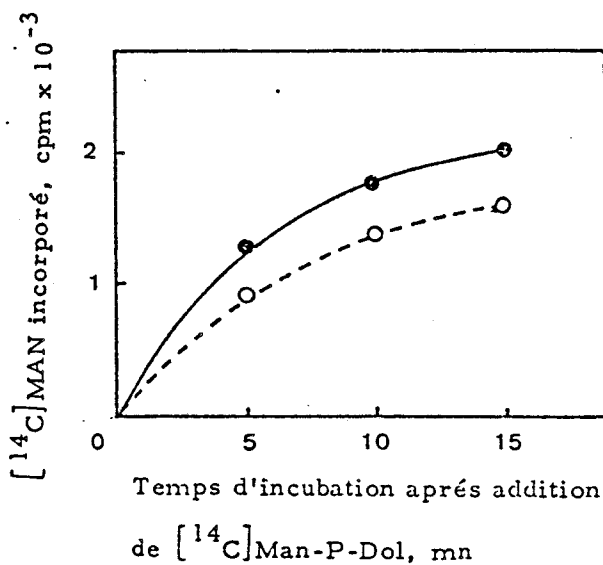


FIGURE 25: Etude de l'incorporation de $[^{14}\text{C}]$ Man à partir de $[^{14}\text{C}]$ Man-P-Dol sur le $\text{Man}_5\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ endogène en présence (○-○) et en absence (●-●) de bis-(p-nitrophenyl)phosphate (20mM).



2 - Effet sur l'addition de résidus mannosyls à partir de
Man-P-Dol

Après avoir formé le précurseur $\text{Man}_5\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$, l'utilisation de $[^{14}\text{C}]\text{Man-P-Dol}$ exogène permettra de mesurer l'élongation de ce précurseur en $\text{Man}_9\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$.

La synthèse de $\text{Man}_5\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ s'effectue en deux étapes :

1 - Synthèse de chitobiose-PP-Dol par incubation des lymphocytes en présence d'UDP-GlcNAc durant 15 minutes.

2 - Elongation avec du GDP-Man en présence d'amphotricine qui est un inhibiteur de la synthèse de Man-P-Dol et de Glc-P-Dol (voir page 33).

Les paramètres d'utilisation de l'amphotricine ont été déterminés comme suit :

1 - Etude de la concentration optimale en amphotricine

L'étude de ce paramètre s'effectue par incubation des lymphocytes en présence d'UDP-GlcNAc puis par addition après 15 minutes de GDP- $[^{14}\text{C}]\text{Man}$ et d'amphotricine à différentes concentrations.

En présence de concentrations croissantes d'amphotomycine, la radioactivité incorporée dans les Man-P-Dol, oligosaccharides-PP-Dol et protéines varie fortement pour atteindre un minimum à la concentration de 100 $\mu\text{g/ml}$ (figure 24, page 68).

2 - Taille des oligosaccharides synthétisés

Pour vérifier la taille des oligosaccharides synthétisés, en présence d'amphotomycine, les oligosaccharides-PP-Dol synthétisés préalablement sont extraits, hydrolysés et la taille des oligosaccharides est vérifiée en chromatographie sur couche mince.

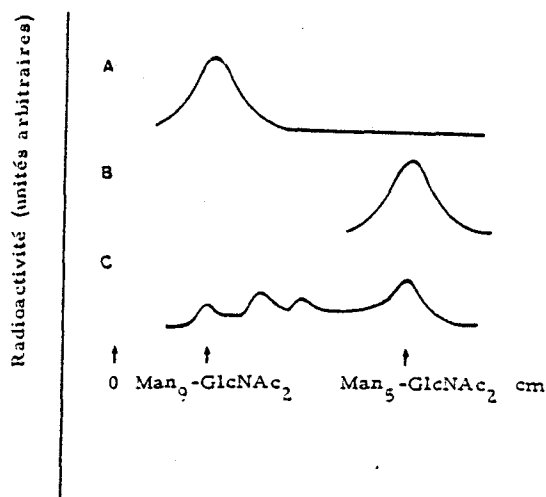


FIGURE 26: Visualisation au Numelec de la radioactivité dans les oligosaccharides synthétisés:

A- En absence d'amphotomycine

B- En présence de 200 $\mu\text{g/ml}$ d'amphotomycine

C- En présence de 100 $\mu\text{g/ml}$ d'amphotomycine

Nous constatons, figure 26, page 70 , que la taille des oligosaccharides synthétisés, en présence d'amphomycine, diminue d'autant plus que la concentration en inhibiteur est élevée. Ainsi à 200 $\mu\text{g/ml}$ d'amphomycine, nous ne synthétisons que du $\text{Man}_5\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$. C'est donc cette concentration qui est choisie.

Ces divers paramètres étant définis, nous pouvons maintenant étudier l'effet du bis-(p-nitrophényl)phosphate sur la mannosylation à partir de $[^{14}\text{C}]\text{Man-P-Dol}$.

Ceci s'effectue par incubation des lymphocytes en présence d'UDP-GlcNAc durant 15 minutes, puis par addition de GDP-Man et d'amphomycine (à 200 $\mu\text{g/ml}$) bloquant l'élongation du $\text{Man}_5\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$, préalablement synthétisé. La mannosylation s'effectue dans un troisième temps grâce à 5000 cpm de $[^{14}\text{C}]\text{Man-P-Dol}$ solubilisés par du Triton X100 à 0,25 % et préparés comme il est indiqué page 56 . La mesure s'effectue par mesure de la radioactivité dans la phase chloroforme / méthanol / eau (10 : 10 : 3 en volume).

Dans ces conditions, le résidu $[^{14}\text{C}]\text{Man}$ est effectivement incorporé à partir du $[^{14}\text{C}]\text{Man-P-Dol}$ dans l'oligosaccharide-PP-Dol (voir figure 25, page 68). Cette mannosylation est faiblement touchée (20 %) en présence de bis-(p-nitrophényl)phosphate à concentration de 20 mM.

Il apparaît donc que le bis-(p-nitrophényl)phosphate inhibe le transfert de résidu mannosyl à partir du GDP-Man et non pas à partir du Man-P-Dol.

D - EFFET DU BIS-(P-NITROPHENYL)PHOSPHATE SUR L'ADDITION DE
RESIDUS GLUCOSYLS

Des travaux antérieurs (HOFLACK *et al* :194) ont montré que le $\text{Glc}_3\text{-Man}_9\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ peut être obtenu par incubation des lymphocytes avec de l'UDP-Glc, GDP-Man et UDP-GlcNAc. Nous examinerons donc l'effet du bis-(p-nitrophényl) phosphate sur la synthèse d'intermédiaires lipidiques glucolysés : Glc-P-Dol ainsi que la glucosylation de $\text{Man}_9\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$. L'incubation de lymphocytes avec de l'UDP- ^{14}C Glc donne deux produits extractibles dans la phase chloroforme / méthanol (2 : 1 en volume), identifiés comme étant le Glc-P-Dol et la glucosyl-céramide, séparés suivant leur charge sur colonne de DEAE cellulose.

La synthèse de glucosyl-céramide est complètement inhibée en présence de 20 mM de bis-(p-nitrophényl)phosphate alors que la formation de Glc-P-Dol n'est pas touchée (figure 27 page 73) de même que le Man-P-Dol.

La glucosylation des oligosaccharides-PP-Dol a été observée comme suit : - le $\text{Man}_9\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ est synthétisé par incubation des lymphocytes avec l'UDP-GlcNAc et du GDP-Man pendant 15 minutes, - la tunicamycine (0,5 $\mu\text{g/ml}$) bloquant la synthèse de $\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ et l'UDP- ^{14}C Glc sont ajoutés, permettant l'étude de la glucosylation des oligosaccharides-PP-Dol

Comme nous pouvons le constater dans la figure 28 page 73 , la glucosylation des oligosaccharides-PP-Dol est peu touchée par la présence de bis-(p-nitrophényl)phosphate alors que le taux de Glc-P-Dol n'est pas affecté.

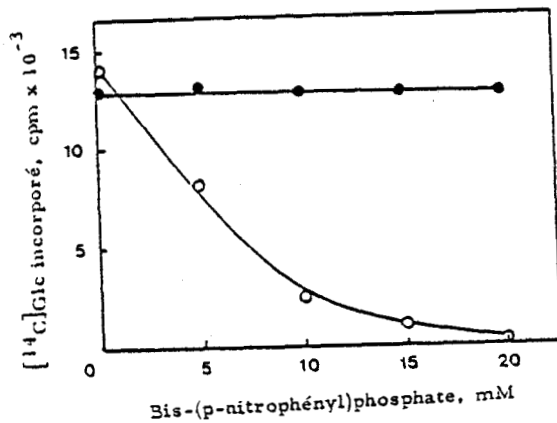


FIGURE 27: Effet du bis-(p-nitrophényl) phosphate sur l'incorporation de [¹⁴C] Glc à partir de l'UDP-[¹⁴C]Glc dans le dolichyl-phosphate-glucose (●—●) et dans le glucosyl-céramide (○—○).

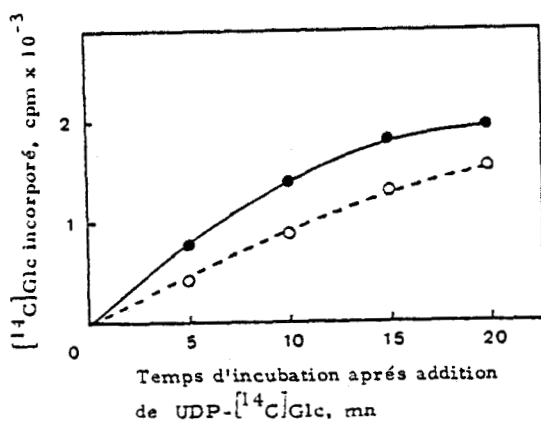


FIGURE 28: Etude de l'incorporation de [¹⁴C]Glc à partir d'UDP-[¹⁴C]Glc dans les dolichyl-phosphate-oligosaccharides en présence (○—○) et en absence (●—●) de bis-(p-nitrophényl)phosphate (20mM)

E - EFFET DU BIS-(P-NITROPHENYL)PHOSPHATE SUR LE DEVENIR DES OLIGOSACCHARIDES-PP-DOL

Les expériences précédentes montrent que le bis-(p-nitrophényl)phosphate agit principalement sur les premières étapes du cycle des dolichols, en particulier sur la synthèse de l'oligosaccharide-PP-Dol. En se référant à la figure 21, page 65, la diminution de l'incorporation sur les protéines et dans les phosphooligosaccharides peut être due à un manque d'oligosaccharide-PP-Dol mais aussi à un effet direct sur le transfert en bloc et sur la dégradation.

Pour étudier ces points, l'oligosaccharide-PP-Dol est synthétisé durant 15 minutes par incubation de lymphocytes en présence d'UDP-GlcNAc et de GDP- $[^{14}\text{C}]$ Man, puis on ajoute du bis-(p-nitrophényl)phosphate (à 20 mM) et l'on suit le devenir de l'oligosaccharide-PP-Dol synthétisé par la mesure de l'incorporation dans les protéines et celle du taux de phosphooligosaccharides rejetés dans la phase aqueuse.

Les résultats de ces expériences, montrés en figure 29, page 75, indiquent que la synthèse de $[^{14}\text{C}]$ Man-P-Dol ne varie pas (A) et que, par contre, la synthèse d'oligosaccharide $[^{14}\text{C}]$ Man-PP-Dol est bloquée (B) : ces réponses étaient attendues par les résultats précédents. Le taux d'oligosaccharide-PP-Dol formé avant l'addition de bis-(p-nitrophényl)phosphate n'est pas utilisé pour glycosyler les accepteurs protéiques comme le montre le plateau observé dans la figure (C).

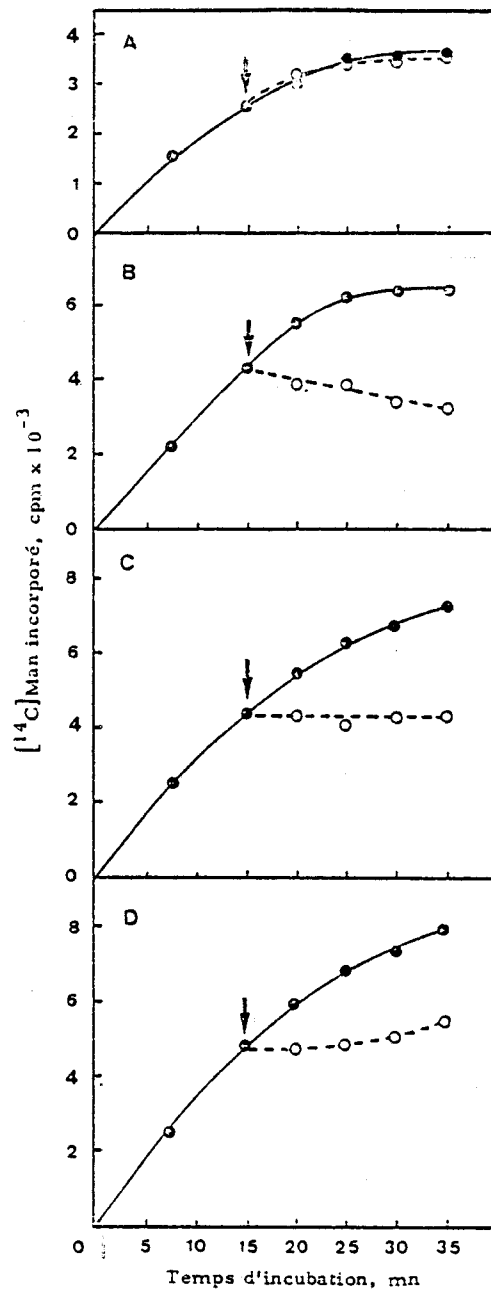


FIGURE 29 : Etude de l'incorporation de $[^{14}\text{C}]\text{Man}$ dans:

A-Les dolichyl-phosphate-mannoses

B-Les dolichyl-diphosphate-oligosaccharides

C-Les protéines

D-Les phosphooligosaccharides solubles

En présence (○—○) ou en absence (●—●) de bis-(p-nitrophényl)phosphate après 15mn d'incubation.



La dégradation de l'oligosaccharide-PP-Dol est aussi fortement, mais pas totalement, inhibée par la présence de bis-(p-nitrophényl)phosphate (D). La faible augmentation du taux de phosphooligosaccharides observée en (D) correspond à la petite diminution du taux d'oligosaccharide-PP-Dol de la figure (B), ce qui signifie que la pyrophosphatase conduisant à la formation de phosphooligosaccharides n'est pas complètement bloquée.

F - CONCLUSION

Le bis-(p-nitrophényl)phosphate est un inhibiteur de certaines réactions du cycle des dolichols (figure 30, page 78) :

- Il inhibe le transfert de résidu N-acétylglucosaminyl à partir d'UDP-GlcNAc sur le GlcNAc-PP-Dol inhibant la formation de GlcNAc₂-PP-Dol.

- Il affecte aussi la mannosylation à partir du GDP-Man, sans inhiber celle à partir du Man-P-Dol.

- Il inhibe la glucosylation de la céramide, affectant la formation de Cer-Glc.

- Il affecte partiellement la pyrophosphatase, responsable de la dégradation des oligosaccharides-PP-Dol.

Toutes ces réactions ont un point commun ; elles emploient un glycosyl-nucléotide comme précurseur.

Le transfert de phospho-N-acétylglucosamine à partir d'UDP-GlcNAc, de mannose à partir de Man-P-Dol et de glucose à partir de Glc-P-Dol n'étant pas touché, incite à penser que le bis-(p-nitrophényl)phosphate, interfère uniquement avec des réactions de transfert de sucre ayant un XDP-sucre comme donneur.

Mais dans ce cas, pourquoi la synthèse de Man-P-Dol et de Glc-P-Dol n'est-elle pas touchée ?

Afin d'élargir nos connaissances sur l'inhibition du bis-(p-nitrophényl)phosphate, nous avons étudié son action sur d'autres enzymes intervenant dans la synthèse de glycoprotéines et utilisant un glycosyl-nucléotide comme précurseur.

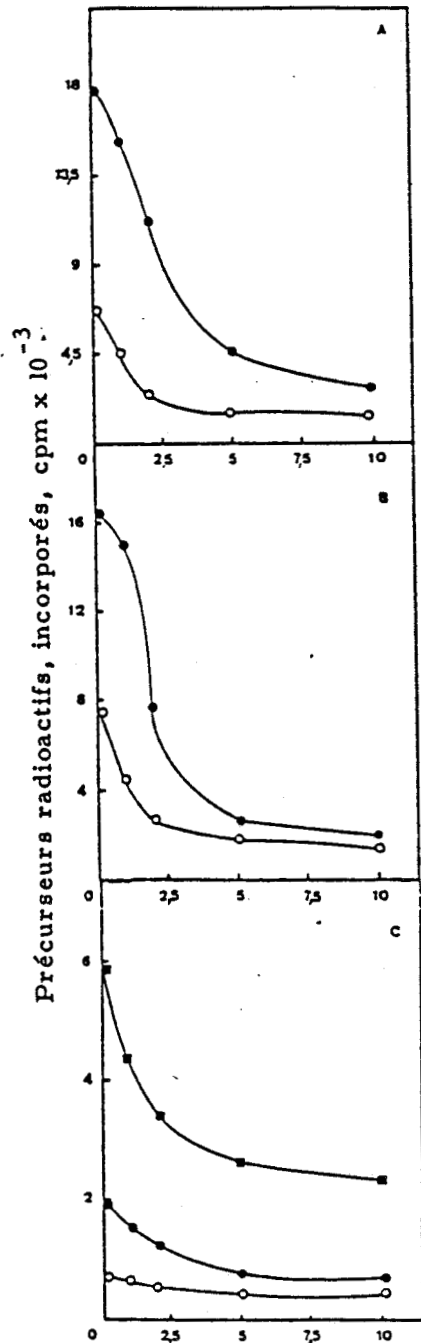
2 - EFFET DU BIS-(P-NITROPHÉNYL)PHOSPHATE SUR LA GALACTOSYL-, SIALYL- ET FUCOSYLTRANSFÉRASE

Nous avons choisi d'étudier successivement l'effet du bis-(p-nitrophényl)phosphate sur les activités galactosyl-, sialyl- et fucosyltransférases, en présence de Triton X100, ce qui permet d'augmenter substantiellement le taux d'incorporation.

A - EFFET DU BIS-(P-NITROPHENYL)PHOSPHATE SUR LA GALACTOSYLTRANSFERASE

L'étude de cette galactosylation s'effectue par incubation des lymphocytes en présence de Triton X100 à concentration optimale de 2 % et d'UDP- $[^{14}\text{C}]$ Gal sur les accepteurs endogènes et sur l'ovomucoïde (à 50 mg/ml).

Lorsque l'incubation est réalisée, en présence de concentrations croissantes de bis-(p-nitrophényl)phosphate, le transfert de $[^{14}\text{C}]$ Gal sur les accepteurs endogènes et exogènes est largement affecté (85 % pour les accepteurs endogènes et 82 % pour les accepteurs exogènes) à 15 mM (figure 31, page 80).



Bis-(p-nitrophényl)phosphate, mM

FIGURE 31 : Effet du bis-(p-nitrophényl) phosphate sur le transfert de :
A- [¹⁴C]Gal à partir d'UDP-[¹⁴C]Gal sur les accepteurs endogènes (○-○) et sur l'ovomucoïde (●-●)
B- [¹⁴C]NeuAc à partir de CMP-[¹⁴C]NeuAc sur les accepteurs endogènes (○-○) et sur l'asialofétuïne (●-●)
C- [¹⁴C]Fuc à partir de GDP-[¹⁴C]Fuc sur les accepteurs endogènes (○-○), sur l'asialofétuïne (●-●) et sur l'asialo-agalactofétuïne (■-■)

B - EFFET DU BIS-(P-NITROPHENYL)PHOSPHATE SUR LA
SIALYLTRANSFERASE

Les lymphocytes sont incubés en présence de CMP- [14 C]NeuAc et de Triton X100 à la concentration optimale de 0,05 %, le transfert de [14 C]NeuAc est visualisé sur les accepteurs endogènes et sur l'asialofétuine (à 50 mg/ml).

Nous observons, d'après la figure 31, page 80, que des concentrations croissantes en bis-(p-nitrophényl) phosphate inhibent le transfert de NeuAc. Cette inhibition étant de 85 % pour les accepteurs exogènes et de 22 % pour les accepteurs endogènes.

C - EFFET DU BIS-(P-NITROPHENYL)PHOSPHATE SUR LA
FUCOSYLTRANSFERASE

L'étude des deux activités fucosyltransférases : la galactoside-fucosyltransférase et la N-acétylglucosaminide-fucosyltransférase s'effectue par incubation des lymphocytes en présence de Triton X100 à concentration de 2 % et de GDP- [14 C]Fuc sur les accepteurs endogènes et exogènes. L'utilisation de l'asialofétuine (à 50 mg/ml) et de l'asialoagalactofétuine (à 50 mg/ml) comme accepteurs exogènes permet de distinguer les deux activités fucosyltransférasiques : l' α -6-fucosyltransférase branchant un résidu fucosyl sur le galactose terminal de l'asialofétuine et l' α -3-fucosyltransférase branchant un résidu fucosyl sur le N-acétylglucosamine terminal de l'asialoagalactofétuine (SCHACHTER *et al* : 195).

Le transfert de résidu fucosyl est affecté en fonction de concentrations croissantes de bis-(p-nitrophényl) phosphate (figure 31 , page 80) : l'inhibition de la N-acétylglucosamine-fucosyltransférase est de 57 %, celle de la galactoside-fucosyltransférase est de 60 %, l'inhibition sur les accepteurs endogènes étant plus faible : 40 %.

D - CONCLUSION

L'incubation de lymphocytes, réalisée en présence de concentrations croissantes de bis-(p-nitrophényl)phosphate inhibe le transfert de résidu galactosyl, fucosyl et d'acide sialique sur les accepteurs endogènes et exogènes. Une forte inhibition est observée sur la galactosyl- et la sialyl-transférase (1/2 inhibition obtenue à 2,5 mM et à 2 mM), les activités fucosyltransférasiques sont moins affectées (1/2 inhibition à 9 et 8 mM).

On notera que des résultats similaires sont obtenus en présence, comme en absence, de détergent.

Pour chaque cas, nous avons vérifié que l'inhibition observée n'est pas due à la dégradation du précurseur. Au contraire, l'intégrité des glycosyl-nucléotides est maintenue par la présence de nucléotide -monophosphates (AMP et UMP) et de bis-(p-nitrophényl)phosphate qui, comme nous l'avons vu précédemment, a un effet protecteur sur la dégradation des glycosyl-nucléotides par les phosphatases et pyrophosphatases.

Ces résultats confirment nos observations précédentes.: les réactions inhibées comportent toutes un glycosyl-nucléotide comme donneur.

3 - ÉTUDE DU K_M ET DU TYPE D'INHIBITION

Afin de déterminer le type d'inhibition du bis-(p-nitrophényl)phosphate, nous devons tout d'abord procéder à différentes études préliminaires, telles que :

- Préparation de la galactosyltransférase exempte d'UDP-Gal endogène.
- Choix de l'accepteur exogène.
- Etude du K_M .

A - PREPARATION DE LA GALACTOSYLTRANSFERASE

L'étude du K_M se faisant par variation du taux d'UDP-Gal, il est indispensable d'éliminer tout UDP-Gal endogène qui pourrait interagir lors de l'étude cinétique avec l'UDP- [^{14}C]Gal.

Ainsi, la galactosyltransférase est solubilisée par du Triton X100 à concentration de 2 % finale et purifiée par chromatographie d'affinité sur UDP-hexanolamine Sépharose 4B (voir page 56).

B - CHOIX DE L'ACCEPTEUR EXOGENE

L'accepteur exogène doit présenter un résidu N-acétylglucosaminyl terminal, pouvant être galactosylé et le produit doit pouvoir être identifié et isolé après galactosylation.

Le (p-nitrophényl)galactose étant un bon accepteur exogène pour la sialyltransférase, grâce à un résidu galactosyl terminal (BAUVOIS *et al*:196), nous avons pensé que le (p-nitrophényl)N-acétylglucosamine pouvait en être un pour la galactosyltransférase.

1 - Etude du (p-nitrophényl)N-acétylglucosamine

Nous avons étudié cette éventualité par incubation de la galactosyltransférase, en présence de (p-nitrophényl)N-acétylglucosamine et d 'UDP- [¹⁴C]Gal.

Le profil chromatographique de la figure 32 , page 85 , montre que le (p-nitrophényl)N-acétylglucosamine est accepteur de résidu galactose et facilement séparable par chromatographie sur papier. Il peut donc être utilisé comme accepteur exogène lors de l'étude du K_M .

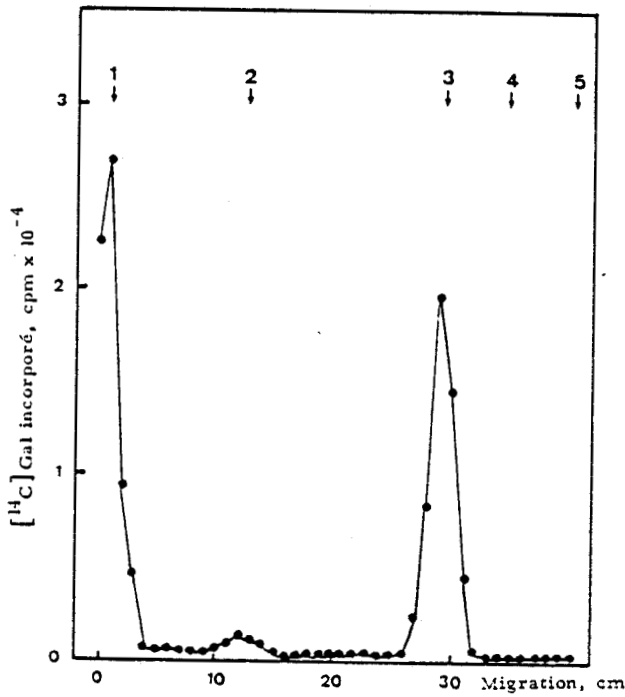


FIGURE 32 : Analyse par chromatographie sur papier des dérivés galactosylés du (p-nitrophényl)N-acétylglucosamine en présence de galactose

- 1- UDP- $[^{14}\text{C}]$ Gal
- 2- $[^{14}\text{C}]$ Gal
- 3- (p-nitrophényl)N-acétylglucosamine galactosylé
- 4- (p-nitrophényl)N-acétylglucosamine
- 5- Front

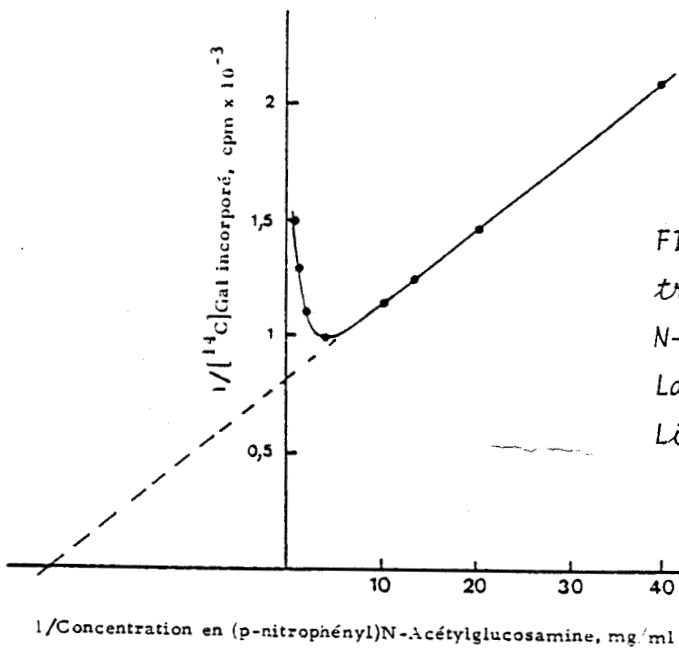


FIGURE 33 : Etude du K_m de la galactosyl transférase envers le (p-nitrophényl)N-acétylglucosamine
La représentation se fait suivant Lineweaver et Burk (197)



Pour cela, nous avons étudié la concentration de (p-nitrophényl)N-acétylglucosamine permettant le maximum de fixation de résidu galactosyl. Cette étude est réalisée par incubation de la préparation de galactosyltransférase en présence d'UDP-[¹⁴C]Gal et de (p-nitrophényl)N-acétylglucosamine à différentes concentrations.

La figure 33 , page 85 , montre que pour les faibles concentrations (de 0,025 à 0,25 mg/ml), l'activité enzymatique est proportionnelle à la quantité de substrat, le (p-nitrophényl)N-acétylglucosamine se comporte comme un bon accepteur de galactose mais lorsque l'on atteint des concentrations plus élevées (de 0,5 à 1 mg/ml) il y a inhibition par excès de substrat, ce qui rend l'utilisation de cette molécule difficile pour l'étude d'une inhibition.

Nous sommes donc revenus à un accepteur exogène plus classique : l'ovomucoïde.

2 - Etude de l'ovomucoïde

a - Etude de la concentration optimale en ovomucoïde

L'étude en fonction de concentrations croissantes en accepteur, par incubation de galactosyltransférase, en présence d'UDP-[¹⁴C]Gal montre (figure 34, page 87) un maximum d'incorporation à 0,5mg/ml, concentration à laquelle nous nous placerons pour étudier le temps d'incubation optimal.

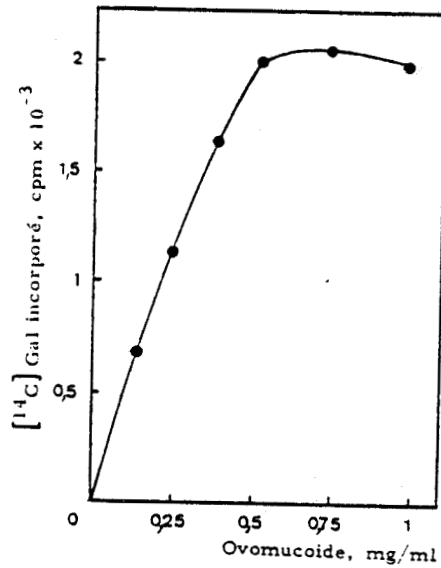


FIGURE 34 : Effet de la concentration croissante en ovomucoïde sur le transfert de [¹⁴C]Gal à partir d'UDP-[¹⁴C]Gal avec une préparation de galactosyltransférase.

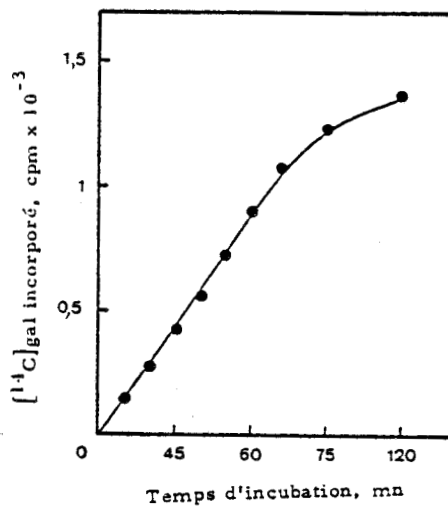


FIGURE 35 : Etude cinétique de l'incorporation du [¹⁴C]Gal à partir d'UDP-[¹⁴C]Gal sur l'ovomucoïde à 0,5 mg/ml avec une préparation de galactosyltransférase.

BUS
LILLE

b - Etude du temps optimal d'incubation

Celui-ci est étudié par incubation de la préparation de galactosyltransférase, en présence d'UDP- [^{14}C]Gal et d'ovomucoïde à concentration de 0,5 mg/ml, la mesure est effectuée à différents temps.

La vitesse initiale est maintenue durant 60 minutes (figure 35, page 87) permettant une incorporation importante de la radioactivité.

Ces divers paramètres étant déterminés, nous pouvons étudier le K_M de la galactosyltransférase.

C - ETUDE DU K_M

Cette étude se réalise par incubation de la préparation de galactosyltransférase en présence de différentes concentrations d'UDP- [^{14}C]Gal (de 40 μM à 1 mM) et d'ovomucoïde à 0,5 mg/ml. L'arrêt de la réaction s'effectue par précipitation au bout de 60 minutes.

Contrairement au (p-nitrophényl)N-acétylglucosamine, on n'observe plus d'inhibition par excès de substrat. La valeur du K_M que nous obtenons dans la figure 36, page 89, est de 250 μM . Cette valeur obtenue est en accord avec les K_M déjà relevés pour les galactosyltransférases d'origine diverses,

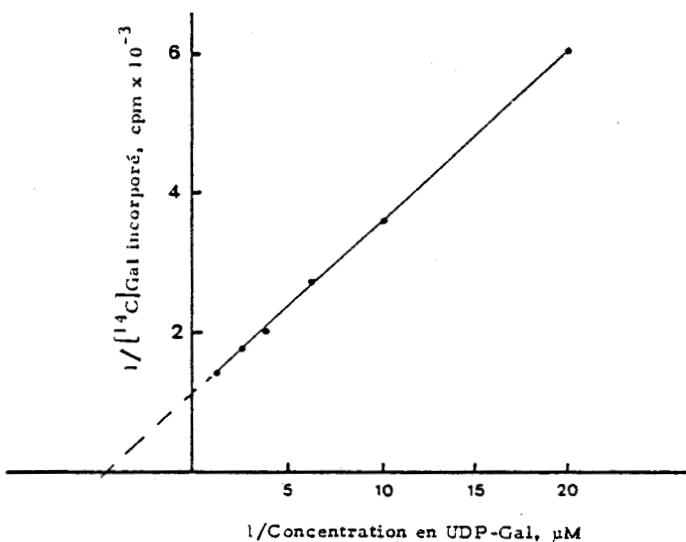


FIGURE 36 : Etude du K_m de la galactosyl transférase pour l'UDP- Gal par mesure de variation du taux de transfert de $[^{14}\text{C}]\text{Gal}$ sur l'ovomucoïde à partir de concentrations croissantes d'UDP- $[^{14}\text{C}]\text{Gal}$. La représentation se fait suivant Lineweaver et Burk (198)

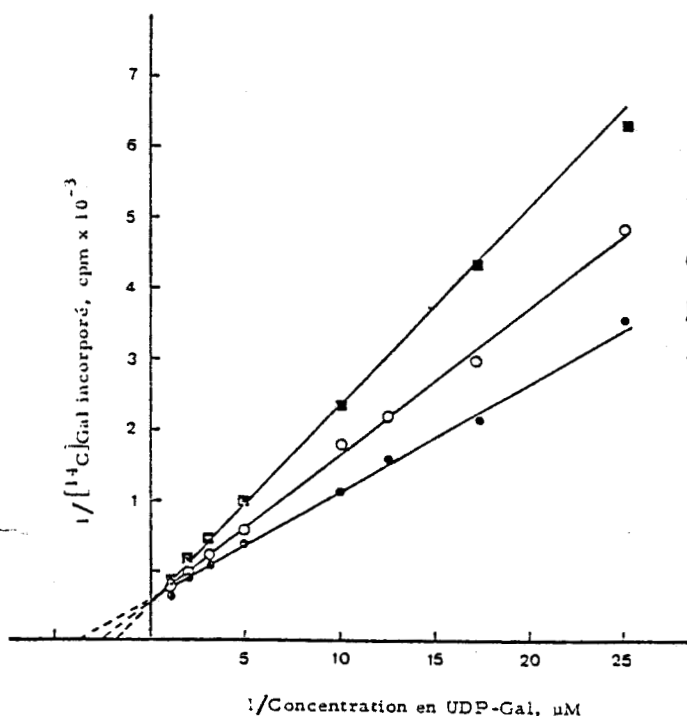


FIGURE 37 : Etude du type d'inhibition de la galactosyltransférase pour l'UDP-Gal par mesure de variation du taux de transfert de $[^{14}\text{C}]\text{Gal}$ sur l'ovomucoïde à partir de concentrations croissantes d'UDP- $[^{14}\text{C}]\text{Gal}$ en absence (●—●) et en présence de bis-(p-nitrophényl)phosphate à 5mM (○—○) et à 10 mM (■—■)



ainsi il est de $100\ \mu\text{M}$ pour la galactosyltransférase de lait de vache (SCHWARZ et DATEMA : 199), $112\ \mu\text{M}$ pour la galactosyltransférase de glande mammaire (SMITH et BREW : 200) et $120\ \mu\text{M}$ pour la galactosyltransférase d'érythrocyte humain (SPIK et al : 201).

Ces divers paramètres étant définis, l'étude du type d'inhibition peut être effectuée.

D - TYPE D'INHIBITION DU BIS-(P-NITROPHENYL)PHOSPHATE

Afin d'étudier le type d'inhibition dû au bis-(p-nitrophényl)phosphate, les variations de la vitesse initiale sont mesurées avec différentes concentrations d'UDP- ^{14}C Gal, en absence et en présence de l'inhibiteur à concentration de 5 et 10 mM.

La figure 37, page 89 , montre que le bis-(p-nitrophényl)phosphate exerce une inhibition compétitive vis à vis de l'activité galactosyltransférasique. En effet, la vitesse maximale ne varie pas en absence ou en présence du bis-(p-nitrophényl)phosphate tandis que la valeur du K_M pour l'UDP-Gal est augmentée de $250\ \mu\text{M}$ (sans inhibiteur) à $500\ \mu\text{M}$ (avec inhibiteur à concentration de 10 mM).

E - CONCLUSION

Cette inhibition compétitive suggère donc que la présence de liaison phosphodiester est nécessaire pour que cette molécule entre en compétition au niveau de l'enzyme avec le substrat c'est à dire : le glycosyl-nucléotide.

Il est à noter que les produits de dégradation du bis-(p-nitrophényl)phosphate tels que : le (p-nitrophényl) phosphate, le paranitrophénol et le phosphate n'ont pas un effet aussi puissant que le bis-(p-nitrophényl)phosphate.

	Bis(p-nitrophényl) phosphate	(p-nitrophényl) phosphate	p-nitrophénol	Phosphate
Sialyltransférase	2,5 mM	10 mM	pas d'inhibition	pas d'inhibition
Galactosyltransférase	2 mM	pas d'inhibition	pas d'inhibition	*
Fucosyltransférase	8 mM ----- 9 mM	15 mM ----- 15 mM	pas d'inhibition	pas d'inhibition

TABLEAU IV : Etude comparative des effets des différents dérivés du bis-(p-nitrophényl)phosphate
LE tableau indique la concentration nécessaire pour obtenir une inhibition à 50% des activités glycosyltransférases.

*(Nous n'avons pu déterminer l'effet du phosphate sur l'activité galactosyltransférase: le phosphate précipitant avec le $MnCl_2$ indispensable au fonctionnement de l'enzyme).

Le tableau IV montre bien que les concentrations nécessaires pour obtenir une 1/2 inhibition des activités glycosyltransférasiques sont faibles pour le bis-(p-nitrophényl) phosphate alors qu'elles sont plus élevées pour les autres composés et que souvent ceux-ci ne sont pas inhibiteurs.

Cela indique donc que seul le bis-(p-nitrophényl) phosphate et non pas un de ces produits de dégradation, est responsable de l'inhibition des activités glycosyltransférasiques utilisant un glycosyl-nucléotide comme précurseur.

Pourtant, un problème reste entier, si nos études sur les activités galactosyl-, sialyl- et fucosyltransférasiques confirment nos conclusions obtenues avec les activités glycosyltransférasiques du cycle des dolichols. Pourquoi la synthèse de Man-P-Dol et de Glc-P-Dol n'est-elle pas touchée par le bis(p-nitrophényl)phosphate alors que le précurseur utilisé est un nucléotide-sucre ?

Afin de répondre à cette question, nous avons étudié l'action du bis-(p-nitrophényl)phosphate sur des lymphocytes spléniques de rat après destruction de la structure membranaire par le Triton X100.

4 - MODULATION DE L'EFFET DU BIS-(P-NITROPHÉNYL)PHOSPHATE PAR L'INTÉGRITÉ DES ENZYMES DANS LA MEMBRANE

Cette étude s'effectue par comparaison entre l'activité enzymatique relevée en présence de bis-(p-nitrophényl)phosphate sur des lymphocytes homogénéisés donc présentant des activités enzymatiques encore intégrées dans des membranes formant des vésicules, et des homogénats soumis à l'action du Triton X100, c'est à dire possédant des activités enzymatiques qui ne sont plus incluses dans les membranes.

Les lymphocytes spléniques de rat homogénéisés sont incubés en présence ou non de Triton X100 à 0,25 % avec soit du GDP- $[^{14}\text{C}]$ Man, soit de l'UDP- $[^{14}\text{C}]$ Glc. La formation de Man-P-Dol, Glc-P-Dol et Cer-Glc est mesurée dans la phase chloroforme / méthanol après extraction de la radioactivité.

Comme le montre la figure 38 (A), page 93 , le transfert de résidu mannosyl par la phosphodolichyl-mannosyl transférase et du résidu glucosyl par la phosphodolichyl-glucosyltransférase n'est pas (ou faiblement) inhibée par le bis-(p-nitrophényl)phosphate bien que, dans les mêmes conditions, le transfert du glucose par la céramide-glucosyltransférase est largement inhibée. Cependant, (figure 38 (B) , page 93) quand l'expérience est réalisée en présence de Triton X100 à concentration de 0,25 %, l'effet inhibiteur se retrouve à la fois sur la mannosyl- et la glucosyltransférase.

Ce résultat indique que l'effet chaotropique du détergent sur les membranes a permis l'inhibition, c'est à dire l'interaction du site actif de l'enzyme avec l'inhibiteur.

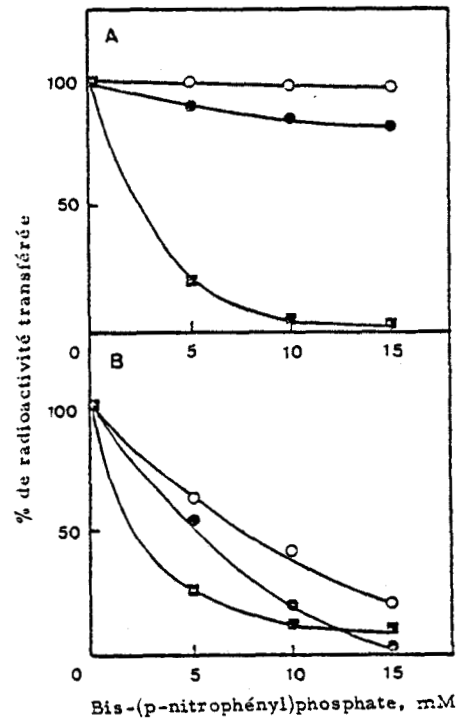


FIGURE. 38 : Effet du bis-(p-nitrophényl)phosphate sur le transfert de:

- [¹⁴C]Man à partir de GDP-[¹⁴C]Man dans les dolichyl-monophosphate-mannoses (●-●)

- [¹⁴C]Glc à partir de UDP-[¹⁴C]Glc dans les dolichyl-monophosphate-glucoses (○-○) et les glucosyl-céramides (■-■)

Dans les lymphocytes homogénéisés en présence (B) et en absence (A) de Triton X100 (0,25%)



Ces enzymes : phosphodolichyl-mannosyltransférase et phosphodolichyl-glucosyltransférase, liés à la membrane, ont leur site actif intégré dans celle-ci donc inaccessible à l'action du bis-(p-nitrophényl)phosphate en absence de détergent.

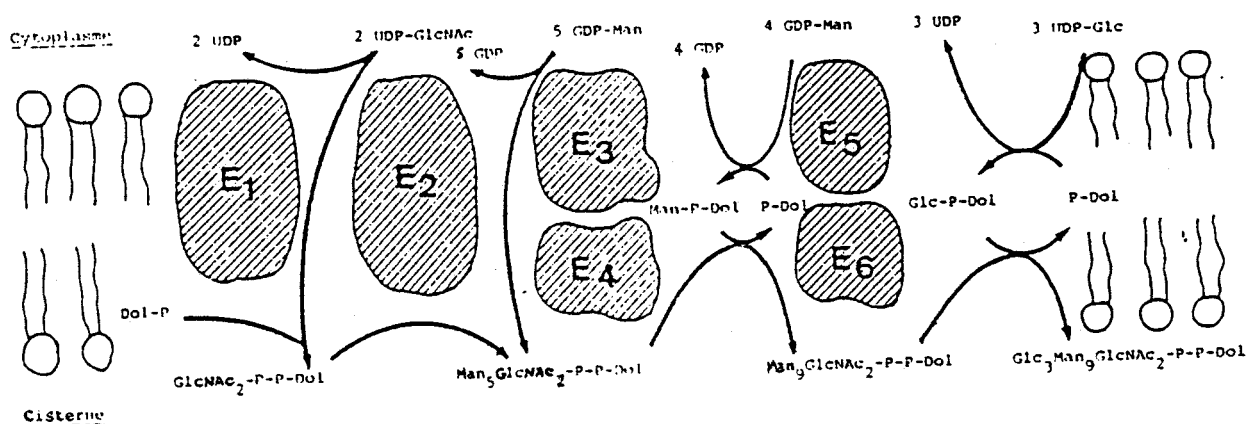


FIGURE 39 : Synthèse des intermédiaires de glycosylation dans les membranes
(d'après HEMMING, communication personnelle)

E₁ : N-acétylglucosaminyltransférases
E₂, E₃, E₄ : mannosyltransférases
E₅, E₆ : Glucosyltransférases

Ces observations peuvent être reliées au schéma de HEMMING (figure 39) montrant l'intégration des enzymes intervenant dans la synthèse des intermédiaires de glycosylation dans les membranes.

Selon ce schéma, certaines enzymes transmembranaires sont en contact à la fois avec le cytoplasme et la lumière du réticulum endoplasmique tels que : la N-acétylglucosaminyltransférase (E1) et la mannosyltransférase (E2) (branchant un résidu mannosyl à partir du GDP-Man) alors que d'autres enzymes sont en contact uniquement avec le milieu cytoplasmique tels que la mannosyltransférase (E3) (branchant un résidu mannosyl à partir du GDP-Man sur le phosphodolichol) et la glucosyltransférase (E5) (branchant un résidu glucosyl à partir de l'UDP-Glc sur le phosphodolichol) et d'autres avec la lumière du réticulum endoplasmique telles que : la mannosyltransférase (E4) (branchant un résidu mannosyl à partir du Man-P-Dol sur le $\text{Man}_5\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$) et la glucosyltransférase (E6) (branchant un résidu glucosyl du Glc-P-Dol au $\text{Man}_9\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$).

Si nous relient ces observations à nos résultats, nous constatons que les enzymes inhibées par le bis-(p-nitrophényl)phosphate, en absence de détergent, présentent un contact uniquement avec la face cytoplasmique. Tandis que pour la phosphodolichyl-mannosyltransférase et la phosphodolichyl-glucosyltransférase, l'utilisation de détergent est nécessaire pour obtenir une inhibition par le bis-(p-nitrophényl)phosphate, ces deux enzymes se situant du côté luminal. Une désagrégation structurale de la membrane par le Triton X100 permet l'accessibilité au site actif.

CONCLUSIONS GENERALES

Les études que nous avons menées sur les effets du bis-(p-nitrophényl)phosphate sur les enzymes du cycle des dolichols, la galactosyl-, sialyl- et fucosyltransférase, en utilisant comme modèle le lymphocyte splénique de rat, nous ont permis de dégager les points suivants :

- Le bis-(p-nitrophényl)phosphate est un inhibiteur des réactions de transfert de monosaccharide par des glycosyltransférases, à condition que ces réactions fassent intervenir des glycosyl-nucléotides comme donneur et non pas des dolichyl-phosphate-monosaccharides tels que le Man-P-Dol ou Glc-P-Dol.

Cette spécificité d'inhibition des effets du bis-(p-nitrophényl)phosphate envers les glycosyl-nucléotides est confirmée par l'inhibition compétitive observée envers l'UDP-Gal avec une préparation de galactosyltransférase.

- Cet effet inhibiteur apparaît être dépendant de la topologie membranaire des glycosyltransférases. En effet, le transfert de résidus glucosyls à partir d'UDP-Glc par la phosphodolichyl-glucosyltransférase et par la céramide-glucosyltransférase est inhibé différemment : le premier n'est pas affecté tant que son environnement membranaire est préservé, bien que le second soit fortement touché.

De même pour le transfert de résidu mannosyl par la phosphodolichyl-mannosyltransférase, la présence de Triton X100 est nécessaire à l'inhibition par le bis-(p-nitrophényl) phosphate.

Ceci indique que ces deux enzymes sont profondément intégrés dans la membrane.

- Le bis-(p-nitrophényl)phosphate bloque également le transfert de l'oligosaccharide sur la protéine à partir de l'oligosaccharide-PP-Dol.

- Enfin, le bis-(p-nitrophényl)phosphate inhibe partiellement les pyrophosphatases, responsables de la dégradation des oligosaccharides-PP-Dol en phosphooligosaccharides.

Le bis-(p-nitrophényl)phosphate, inhibiteur général des glycosyltransférases utilisant des glucosyl-nucléotides comme précurseur, peut donc être un outil précieux pour :

- l'étude de la topologie membranaire des glycosyltransférases.

- l'étude des réactions métaboliques par inhibition de certaines réactions de transfert de sucre.

- l'étude des transporteurs de certains nucléotides à travers la membrane. De récents travaux montrent que certains glucosyl-nucléotides tels que le CMP-NeuAc (SOMMERS et HIRSCHBERG : 202) utilisent des transporteurs pour traverser la membrane golgienne, le bis-(p-nitrophényl)phosphate analogue de glycosyl-nucléotides pourra peut-être interagir avec ces transporteurs et permettre leur étude.

BIBLIOGRAPHIE

	Ref.	Pag.
ARNDT R., HEYMANN E., JUNGE W., KRISCH K. Eur. J. Biochem. 36 (1973) 120-125	181	42
AUBERT J.P., BISERTE G., LOUCHEUX-LEFEVRE M.H. Arch. Biochem. Biophys. 175 (1976) 410-418	71	21
BABCZINSKI P. Eur. J. Biochem. 112 (1980) 53-58	152	35
BALASZ, E.A. (ed.) in Chemistry and Molecular Biology of the Intracellular Matrix, Chem. Press, New York (1970)	7	4
BAUVOIS B., CACAN R., FOURNET B., CAEN J., MONTREUIL J., VERBERT A. Eur. J. Biochem. 121 (1982) 567-572	196	84
BEELEY J.C. Biochem. Biophys. Res. Comm. 76 (1977) 1051-1055	72	21
BEHRENS N.H., TABORA E. in Méthods in Enzymology, Vol. L, GINSBURG V. (ed) Acad. Press, New York (1978) 402-435	50	19
BERTOLONI M., PIGMAN W. Carbohydr. Res. 14 (1970) 53-60	13 14	4 5
BEYER T.A., PRIEELS J.P., HILL R.L. in Glycoconjugate Reseach, Proceedings of the IVth International Symposium on Glycoconjugates, Vol. II, GREGORY J.D. et JEANLOZ R.W. (Eds) Acad. Press. New York (1979) 641-643	91	24
BEYER T.A., REARICK J.I., PAULSON L.C., PRIEELS J.P., SADLER J.E., HILL R.L. J. Biol. Chem. 254 (1979) 12531-12541	41 44 46	16 16 16
BIELY P., KRATKY Z., BAUER S. Biochim. Biophys. Acta 352 (1974) 268-274	113	28
BLOCK W., WASSERMANN O. Eur. J. Drug. Metabolism and Pharmacokinetics 3 (1978) 147-153	182 183	42 43



	Ref.	Pag.
BREW K., SMITH CH.A. J. Biol. Chem. 259 (1977) 7294-7299	190	58
BUTTERS T.D., HUGHES R.C. Biochem. Soc. Trans. 8 (1980) 170-171	137	23
CACAN R., HOFLACK B., VERBERT A. Biochem. J. 205 (1982) 603-609	191	63
CACAN R., HOFLACK B., VERBERT A. Eur. J. Biochem. 106 (1980) 473-479	187	51
CARLSON D.M. J. Biol. Chem. 243 (1968) 616-626	11 12	4 5
CARLSON D.M., Mc GUIRE E.J., JOURDIAN G.W., ROSEMAN S. J. Biol. Chem. 248 (1973) 5763-5773	40	16
CHAPMAN A., LI E., KORNFIELD S. J. Biol. Chem. 254 (1979) 10243-10249	60	21
CHAPMAN A., TROWBRIDGE I.S., HYMAN R., KORNFIELD S. Cell 17 (1979) 509-515	66	21
CONCHIE J., STRANCHAN I. Carbohydr. Res. 63 (1978) 193-213	21	8
CORY J.G., MANSELL M.M. Cancer. Res. 35 (1975) 390-401	165	38
CORY J.G., MANSELL M.M., WHIFORD T.W. Cancer. Res. 35 (1976) 3166-3172	166	38
COX T.M., PETERS T.J. J. Physiol. 289 (1979) 469-478	184 185	44 46
CUMMINGS R.D., CEBULA T.A., ROTH S. J. Biol. Chem. 254 (1979) 1233- 1239	170	39
DATEMA R., SCHWARZ R.T. Eur. J. Biochem. 90 (1978) 505-516	107 108 109	27 28 28
DATEMA R., SCHWARZ R.T. Biochem. J. 184 (1979) 113-123	118 125	29 30

	Ref.	Pag.
DATEMA R., LEZICA R.P., ROBBINS P.W., SCHWARZ R.T. Arch. Biochem. Biophys. (1980)	106	27
DATEMA R., SCHWARZ R.T., JANKOWSKI A.W. Eur. J. Biochem. 109 (1980) 331-341	116 117 120 122	28 28 29 29
DATEMA R., SCHWARZ R.T., WINKLER J. Eur. J. Biochem. 110 (1980) 355-361	121	29
DATEMA R., SCHWARZ R.T. J. Biol. Chem. 256 (1981) 11191-11198	110	28
DEBEIRE P., HOFLACK B., CACAN R., VERBERT A., MONTREUIL J. Biochimie Tome 59 n°36 (1977) 473-477	162	38
ELBEIN A.D. Ann. Rev. Plant. Physiol. 30 (1979) 239-272	59	19
ELBEIN A.D., GAFFORD J., KANG M. S. Arch. Biochem. Biophys. 196 (1979) 311-318	132	32
ERICSON M.C., GAFFORD J.T., ELBEIN A.D. Arch. Biochem. Biophys. 191 (1978) 698-704	145	33
FALTYNEK C.R., SILBERT J.E., HOF L. J. Biol. Chem. 257 (1982) 5490-5495	48	17
FINNE J., KRUSIUS T., RAUVALA H., HEMMINKI K. Eur. J. Biochem. 77 (1977) 319-323	24	9
FRANCOIS-GERARD C.H., BROCTEUR J., ANDRE A. GERDAY C., PIERCE-CRETEIL A., MONTREUIL J., SPIK G. Blood Transfusion and Immunohaematology tome XXIII n°5 (1980) 579-588	27	9
FREDERICQ E., DEUTSCH H.F. J. Biol. Chem. 181 (1949) 499-505	186	46
FRIEDMAN S.T., SKEHAN P. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 77 (1980) 1172-1176	127	30
GAHMERB C.G., JOHINEN M., KARKI K.K., ANDERSON L.C. J. Biol. Chem. 255 (1980) 2169-2175	136	33

	Ref.	Pag.
GERSHMAN H., ROBBINS P. W. J. Biol. Chem. 256 (1981) 7774-7780	62	21
GOTTSCHALK A., BHARGAVA A.S., MURTY V.L.N. in Glycoproteins, their composition, structure and function. Part B. Gottschalk A. ed., Elsevier Publishing Company, Amsterdam, London, New York (1972) 810-829	9	4
GRINNA L.S., ROBBINS P.W. J. Biol. Chem. 254 (1979) 8814-8818.	77	21
HANSERT J., KUECHLIN U., VON DEIMLING O. Histochem. J. 7 (1975) 199-206	179	42
HARPAZ N., SCHACHTER H. J. Biol. Chem. 255 (1980) 4885-4893	82 84	22 24
HEMMING F.W. in Biochemistry of Lipids, Goodwin T.W. ed., Butterworths and University Park Press, London, Vol 4 (1974) 39-97	47 54	17 19
HEMMING F.W. Biochem. Soc. Trans. 5 (1977) 1682-1687	55	19
HEMMING F.W. Conférence donnée à Lille lors des Ecoles de l'EMBO (1980)	52	20
HEYMANN E., KRISCH K. Z. Physiol. Chem. 348 (1967) 609-611	174 175	41 41
HEYMANN E., KRISCH K., BUCH H., BUZELLO W. Biochem. Pharmac. 18 (1969) 801-808	178	41
HILL H.D.T., SCHWYZER H., STEINMAN H.M., HILL R.T. J. Biol. Chem. 252 (1977) 3799-3805	39	16
HOFLACK B., CACAN R., MONTREUIL J., VERBERT A. Biochem. Biophys. Acta 568 (1979) 348-356	73	21
HOFLACK B., CACAN R., VERBERT A. Eur; J. Biochem. 112 (1980) 81-86	157 188	35 51
HOFLACK B., CACAN R., VERBERT A. Eur. J. Biochem. 117 (1981) 285-290	193 194	63 72

	Ref.	Pag.
HUBBARD S.C., ROBBINS P.W. J. Biol. Chem. 255 (1980) 11782-11793	57	19
HUGUES R.C. in Membrane Glycoproteins. A review of Structure and Function, Hughes R.C. ed. Butterworth London	1	1
JABBAL I., SCHACHTER H. J. Biol. Chem. 246 (1971) 5154-5161	86	24
JAMIESON J.C. Can. J. Biochem. 55 (1977) 408-414	70	21
KALUZA G., SCHMIDT M.F.G., SCHOLTISSEK C. Virology 54 (1973) 179-189	111	28
KANG M.S., SPENCER J.P., ELBEIN A.D. J. Biol. Chem. 253 (1978) 8860-8866	61 144 146 147	21 33 33 34
KANG M.S., ELBEIN A.D. Arch. Biochem. Biophys. 198 (1979) 304-313	142	33
KANG M.S., SPENCER J.P., ELBEIN A.D. J. Biol. Chem. 254 (1979) 10037-10043	148 150	34 34
KATO S., TSUJI M., NAKANISHI Y., SUZUKI S. Biochem. Biophys. Res. Commun. 95 (1980) 770-776	158 172	37 40
KATO S., TSUJI M., NAKANISHI Y., SUZUKI S. Biochem. J. 196 (1981) 71-79	173	40
KEAN E.L. J. Biol. Chem. 255 (1980) 1921-1927	143	33
KELLER R.K., BOON D.Y., CRUM C.F. Biochemistry 18 (1979) 3946-3952	134 135	32 32
KERR A.K., HEMMING F.W. Eur. J. Biochem. 83 (1978) 581-586	171	39
KHATA B.S., HERNIS D.G., BREW K. Eur. J. Biochem. 44 (1974) 537-560	88	24
KIELY M.L., Mc NIGHT D.G., SCHIMKE R.T. J. Biol. Chem. 251 (1976) 5490-5495	69	21

	Ref.	Pag.
KILTON L.J., MACA R.D. J. Natl. Cancer. Inst. 58 (1977) 1479-1481	160	38
KIMBALL A.P., WILSON M.J., BELL J.P., LE PAGE C.A. Cancer. Res. 28 (1968) 661-669	164	38
KLOHS W.D., BERNACKI R.J., KORYTNYK W. Cancer. Res. 39 (1979) 1231-1238	159	37
KOCH H.V., SCHWARZ R.T., SCHOLTISSEK C. Eur. J. Biochem. 94 (1979) 515-522	124	30
KORNFELD R., KORNFELD S. Ann. Rev. Biochem. 45 (1976) 217-237	4	3
KORNFELD R., KORNFELD S. in Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans, Lennartz W.J. ed., Academic Press, New York (1980) 1-34	5	3
KORNFELD S., LI E., TABAS I. J. Biol. Chem. 253 (1978) 7771-7778	74	22
KORNFELD S., GREGORY W., CHAPMAN A. J. Biol. Chem. 254 (1979) 11649-11654	63	21
KRATKY Z., BIELY P., BAUER S. Eur. J. Biochem. 54 (1975) 459-467	114	28
KUNERT M., HEYMAN E. FEBS-Lett. 49 (1975) 292-301	180	42
LEE M.H., LAZO J.S., LI C.D., HADFIELD A.F., MANIGLIA C.A., SARTORELLI A.C. Chem. Biol. Interactions 41 (1982) 141-153	167	38
LI E., TABAS I., KORNFELD S. J. Biol. chem. 253 (1978) 7762-7770	56 67	19 21
LI E., KORNFELD S. J. Biol. Chem. 254 (1979) 1600-1605	20	8
LINEWEAVER H., BURK D. J. Amer. Chem. Soc. 56 (1934) 658-666	197 198	85 89
LIU T., STETSON B., TURCO S.J., HUBBARD S.C., ROBBINS P.W. J. Biol. Chem. 254 (1979) 4554-4559	68	21
MARCH S.C., PARIKH I., CUATRECASAS P. Anal. Biochem. 60 (1974) 147-152	191	59

	Ref.	Pag.
MOLNAR Z., BEKESI J.G. Cancer. Res. 32 (1972) 380-389	126	30
MONTREUIL J. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 37 (1980) 157-223	6 18	3 6
MONTREUIL J. in Comprehensive Biochemistry, Vol. 19 B Neuberger A., Van Deenen L.L.M. (Eds), Elsevier Scientific Publishing Compagny, Amsterdam, Oxford, New York (1982)	2 35 37	2 13 13
MOOKERJEA S., YUNG J.W.M. Arch. Biochem. Biophys. 166 (1975) 223-229	161	38
MURPHY F.R., KRUPA V., MARKS G.S. Biochem. Pharmac. 24 (1975) 883-890	177	41
MURPHY L.A., SPIRO R. J. Biol. Chem. 256 (1981) 7487-7494	64	21
NARASIMHAM S., STANLEY P., SCHACHTER H. J. Biol. Chem. 252 (1977) 3926-3933	85	24
NILSON B., NORDEN N.E., SVENSSON S. J. Biol. Chem. 254 (1979) 4545-4553	25	10
NISHIMURA H., MAYAMA M., KOMATSU Y., KATO H., SHIMAOKA N., TANAKA Y. J. Antibiot. 177 (1964) 148-154	149	34
OPPENHEIMER L., HILL R. J. Biol. Chem. 256 (1981) 799-804	83	22
OPHEIM D.J., TOUSTER O. J. Biol. Chem. 253 (1978) 1017-1023	78	22
PARENTE P.J., WIERUZESKI J.M., STRECKER G., MONTREUIL J., FOURNET B. J. Biol. Chem. 257 (1982) 13173-13176	26	10
PARODI A.J. J. Biol. Chem. 254 (1979) 10051-10060	75	22
PARODI A.J., LELOIR L.F. Biochem. Biophys. Acta. 559 (1979) 1-27	34 49	13 19
PAULSON J.C., REARICK J.I., HILL R.L. J. Biol. Chem. 252 (1977) 2363-2371	93	24

	Ref.	Pag.
PAULSON J.C., PRIEELS J.P., GLASGOW L.R., HILL R.L. J. Biol. Chem. 253 (1978) 5617-5624	90	24
POWELL J.T., BREW K. Biochemistry 15 (1976) 3499-3506	168 169	38 39
REARICK J.I., SADLER J.E., PAULSON J.C., HILL J.E. J. Biol. Chem. 254 (1979) 4444-4451	45	16
RODEN L., HOROWITZ H.I. in the Glycoconjugates, Horowitz M., Pigman W. (Eds), Academic Press, New York (1978) 3-72	16	6
RODEN L. in Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans Lennarz W.J. (Eds) Plenum Press, New York (1980) 267-371	15 17	6 6
RONIN C., GRANIER C., CASETIER C., BOUCHILLOUX S., VAN RIETSCHOTEN J. Eur. J. Biochem. 118 (1981) 159-164	19	6
ROSEMAN S. Chem. Phys. Lip. 5 (1970) 270-297	31	12
SADLER J.E., REARICK J.I., HILL R.L. J. Biol. Chem. 254 (1979) 5934-5941	42	16
SASAK W., DE LUCA L.M. FEBS- Lett. 114 (1980) 313-318	51	51
SCHACHTER H., MC GUIRE E.J., ROSEMAN J. J. Biol. Chem. 246 (1971) 5321-5328	43	16
SCHACHTER H., RODEN L. in Metabolic Conjugation and Metabolic Hydrolysis, Fishman W.H., ed. Vol. 3, Academic Press, (1973) 1-149	32	12
SCHACHTER H. Conférence donnée lors de l'"EMBO Workshop" organisée à Lille du 19 au 30 septembre 1978 au Laboratoire de Chimie Biologique, Villeneuve d'Ascq, France	159	81
SCHACHTER H., ROSEMAN S. in the Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans Lennarz W.J. (ed.) Plenum Press, New York (1980) 85-160	38 89 94	13 24 26
SCHOLTISSEK C. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 70 (1975) 101-119	99 128	26 30

	Ref.	Pag.
SCHWARZ R.T., KLENK H.D. J. Virol. 14 (1974) 1023-1034	101	27
SCHWARZ R.T., SCHMIDT M.F.G., LEHLE L. Eur. J. Biochem. 85 (1978) 163-172	102 104 105	27 27 27
SCHWARZ R.T., SCHMIDT M.F.G., DATEMA R. Biochem. Soc. Trans. 7 (1979) 322-326	97 100	26 26
SCHWARZ R.T., DATEMA R. Trends Biochem. Sci. 5 (1980) 65-67	96 98 103 199	26 26 27 90
SCHWARZ R.T., DATEMA R. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. (1982)	133	32
SCHMIDT M.F.G., SCHWARZ R.T., LUDWIG H. J. Virol. 18 (1976) 819-823	119	29
SCHMIDT M.F.G., BIELY P., KRATKY Z., SCHWARZ R.T. Eur. J. Biochem. 87 (1978) 55-68	115 123	28 29
SHARON N. (Ed.) Complex Carbohydrates, Their Chemistry, Biosynthesis and Functions, Addison-Wesley, Reading (1975)	8	4
SIERWERT G., STROMINGER J. L. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 57 (1967) 767-773	155	35
SMITH C.A., BREW K. J. Biol. Chem. 259 (1977) 7294-7299	200	90
SOMMERS L.W., HIRSCHBERG C.B. J. Biol. Chem. 257 (1982) 10811-10817	202	98
SPEAKE B.K., WHITE D.A. Biochem. J. 180 (1979) 481-489	138	33
SPIK G., SIX P., MONTREUIL J. Biochim. Biophys. Acta. 584 (1979) 203-214	36 163 189 201	13 38 55 90
SPIK G., STRECKER G., FOURNET B., BOUQUELET S., DORLAND L., Vliegenthart J.F.G., MONTREUIL J. Biochim. Biophys. Acta. 675 (1981) 293-296	22 23	7 7

	Ref.	Pag.
SPIRO R.G. Adv. Prot. Chem. 27 (1973) 349-467	3	3
SPIRO R.G., SPIRO M.J., BHOYROO V.D. J. Biol. Chem. 254 (1979) 7659-7667	58 76	19 21
STANELONI R.J., UGALDE R.A., LELOIR L.F. Eur. J. Biochem. 105 (1980) 275-278	65	21
STANLEY P. in the Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans, Lennarz W.J. (Ed.), Plenum Press, New York (1980) 161-190	81	22
STEINER S., COURTNEY R.J., MELNICK J.L. Cancer Res. 33 (1973) 2402-2407	112	28
STONE K.J., STRONINGER J.L. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69 (1972) 1287-1289	156	35
STRUCK D.K., LENNARZ W.J. in the Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans, Lennarz W.J., ed., Plenum Press, New York (1980) 35-83	95 131	26 32
STRUGES J., MOSCARELLO M., SCHACHTER H. in Current Topics in Membranes and Transport, Vol. 11, Bronner F.; Kleinzeller A. (Eds.), Academic Press, New York, London (1978) 15-105	33	13
TABAS I., KORNFELD S. J. Biol. Chem. 254 (1978) 716-722	79	22
TAI T., YAMAKITA K., KOBATA A. Biochem. Biophys. Res. Commun. 78 (1977) 434-440	29 30	9 10
TAKATSUKI A., KAWAMURA K., OKINA M., KODAMA Y., ITO T., TAMURA G. Agric. Biol. Chem. 41 (1977) 2307-2309	129 130	27 27
TANAKA H., IWAI Y., OIWA R., SHINOHARA S., SHOJI S., OKA T., OMURA S. Biochim. Biophys. Acta. 497 (1977) 633-640	139	33
TANAKA H., OIWA R., MATSUKURA S., OMURA S. Biochem. Biophys. Res. Commun. 86 (1979) 902-908	140 141	33 33
TAUB H., MARKS G.S. Can. J. Physiol. Pharmac. 24 (1975) 883-890	176	41

	Ref.	Pag.
THOMAS D.B., WINZLER R.T. Biochem. Biophys. Res. Commun. 78 (1977) 434-440	10	4
TULSIANI D.R.P., OPHEIM D.J., TOUSTER O. J. Biol. Chem. 252 (1977) 3227-3233	80	22
VAN DEN EIJDEN D.H., SCHIPHORST W.E. in the Proceedings of the fifth International Symposium on Glycoconjugates, Schauer R., Boer P., Buddecke E., Kramer M.F., Vliegenthart J.F.G., Wiegand H.(Eds), Georg Thieme Publisher, Stuttgart (1979) 250-251	92	24
VILLEMEZ C.L., CARLO P.L. J. Biol. Chem. 255 (1980) 8174-8178	151 153	35 35
WAECHTER C.J., LENNARZ W.J. Ann. Rev. Biochem. 45 (1976) 95-112	53	19
WEDGWOOD J.F., STROMINGER J.L. J. Biol. Chem. 255 (1980) 1120-1123	154	35
WILSON J.R., WILLIAMS D., SCHACHTER H. Biochem. Biophys. Res. Comm. 72 (1976) 909-916	87	24
YAMASHITA K., TACHIBANA Y., KOBATA A. J. Biol. Chem. 253 (1978) 3862-3869	22	10
YOSHIMA H., TAKASAKI S., KOBATA A. J. Biol. Chem. 255 (1980) 10793-10904	28	9

