

50376
1984
N° d'ordre : 635 281

THESE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR ES SCIENCES

par

Khaled MEFLAH



**APPROCHE PAR LES LECTINES
ET LES GLYCOSIDASES
DE LA STRUCTURE GLYCANNIQUE
DE L'ACETYLCHOLINESTERASE
ET DE LA 5'NUCLEOTIDASE BOVINES**

Présentée le 19 octobre 1984 devant la Commission d'Examen

J. MONTREUIL	Président, Rapporteur
R. BOURRILLON	Rapporteur
J. MASSOULIÉ	Rapporteur
A. VERBERT	Examinateur
S. BERNARD	Examinateur

A la mémoire de mon père,

A ma famille.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Jean MASSOULIE, qui, avec beaucoup d'amitié, a guidé mon travail. Le soutien scientifique et moral qu'il a su à tout moment m'apporter, est à la base de ce travail.

Je tiens également à remercier Monsieur le Professeur BOURRILLON pour les conseils qu'il a bien voulu me prodiguer. J'ai toujours trouvé auprès de lui une grande disponibilité et un sens critique qui m'ont beaucoup aidé.

Monsieur le Professeur MONTREUIL, malgré ses lourdes responsabilités, a accepté de présider mon jury de thèse. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de ma sincère gratitude pour l'attention qu'il a portée à mon travail.

Je remercie également Monsieur le Professeur VERBERT d'avoir accepté de consacrer un peu de son temps à l'examen de ce manuscrit.

Ma gratitude va aussi à Monsieur le Professeur BERNARD qui m'a accueilli dans son laboratoire et m'a permis de réaliser ce travail. Il a su avec beaucoup de patience encourager mes efforts.

Je ne peux oublier les différentes personnes qui ont collaboré à ce travail. En particulier, Jean HARB, qui m'a beaucoup aidé tout au long de nos recherches. Ma reconnaissance va aussi à Danielle LASSORT et Yves DUFLOS qui, par leurs compétences techniques, ont apporté une contribution précieuse à la réalisation de ce travail.

La réalisation dactylographique de cette thèse n'aurait pas été possible sans la patience et la gentillesse d'Annie COMBALOT.

T A B L E d e s M A T I E R E S

<u>AVANT-PROPOS</u>	1
<u>CADRE ET BUT</u>	3
<u>INTRODUCTION</u>	5
I - La membrane plasmique	6
II - La 5'nucléotidase	9
III - L'acétylcholinestérase	11
A) L'acétylcholinestérase des organes électriques de poissons	12
B) L'acétylcholinestérase des vertébrés supérieurs	14
IV - Les glycoconjugués membranaires	15
A) Les glycolipides membranaires	16
B) Les glycoprotéines	16
1 - structure	16
2 - métabolisme	21
3 - rôle des glycannes des glycoprotéines	23
V - Les lectines	26
A) Spécificité des lectines	27
B) Type d'interaction	27
C) Rôle biologique	30
VI - Les glycosidases	33
A) Les exoglycosidases	34
B) Les endoglycosidases	35
<i>Bibliographie</i>	40

CHAPITRE I :

Mise en évidence d'une hétérogénéité de la structure glycannique de la 5'nucléotidase et de l'acétylcholinestérase des membranes de différents tissus	54
I - La 5'nucléotidase	55
A) Constantes cinétiques	55
B) Effet des lectines	55
C) Traitement par les glycosidases	58
II - L'acétylcholinestérase	59
A) Constantes cinétiques	59
B) Effet des lectines	62
C) Etude des formes moléculaires de l'acétylcholinestérase membranaire des différents tissus. Interactions avec les lectines	62
III - Influence de la structure glycannique	65
A) Sur l'affinité pour les substrats	65
B) Sur la réactivité avec un anticorps	66
IV - Conclusion	66
<i>Bibliographie</i>	70
<i>Article 1</i>	72

CHAPITRE II :

Production d'anticorps orientés contre la 5'nucléotidase purifiée à partir des membranes plasmiques de foie de boeuf	84
Introduction	85
Article 2	87

Matériels et Méthodes	96
I - Préparation et immobilisation de la 5'nucléotidase	96
II - Immunisation des lapins	96
III - Préparation des immunoglobulines	96
IV - Purification des anticorps orientés contre la 5'nucléotidase ...	97
V - Dosages	98
VI - Ultracentrifugation en gradient continu de saccharose	98
VII - Immunoempreinte	98
VIII - Colonne d'immunoadsorbants	99
Résultats	100
I - Immobilisation de l'antigène	100
II - Immunsérum	100
III - Purification des immunoglobulines G	102
IV - Purification des immunoglobulines orientées contre la 5'nucléotidase	106
V - Sémination en gradient continu	106
VI - Réactivité des anticorps avec la 5'nucléotidase lymphocytaire, hépatocytaire et nerveuse	109
VII - Immunodétection	111
VIII - Immunoadsorption	111
Discussion	113
<i>Bibliographie</i>	117

CHAPITRE III :

Etude de la 5'nucléotidase et de l'acétylcholinestérase des membranes plasmiques de noyau caudé. Approche de la structure glycannique par les glycosidases et les lectines	120
Résultats	122
I - Préparation des membranes de noyau caudé de boeuf	122
II - Constantes cinétiques de la 5'nucléotidase de membranes nerveuses de noyau caudé	123
III - Effets des cations divalents et des agents chelatants	123
IV - Solubilisation	123
V - Effet des lectines	127
VI - Traitement par les glycosidases	127
Discussion	134
 <i>Bibliographie</i>	137
 Article 3	139
 <u>CONCLUSION GENERALE</u>	149

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

CON A	<i>Concanavalin A</i>	Concanavaline A
LCA	<i>Lens culinaris Agglutinin</i>	Agglutinine de lentille
PNA	<i>Peanut Agglutinin</i>	Agglutinine d'arachide
RCA	<i>Ricinus communis Agglutinin RcA I</i>	Agglutinine de ricin I
TPA	<i>Lotus tetragonolobus</i>	Agglutinine de lotus
UEA	<i>Ulex europeus Agglutinin</i>	Agglutinine d'ajonc
WGA	<i>Wheat Germ Agglutinin</i>	Agglutinine de germe de blé
Limuline	<i>Limulus polyphemus</i>	Agglutinine de limule

A V A N T - P R O P O S

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire de Neurobiologie, dirigé par Monsieur Jean MASSOULIE, à l'Ecole Normale Supérieure, Paris, et dans le laboratoire du Professeur Serge BERNARD, Faculté de Médecine, Nantes.

Il a fait l'objet, en totalité ou en partie, des publications citées ci-dessous :

Publications :

1. Khaled MEFLAH, Serge BERNARD and Jean MASSOULIE
Interactions with lectins indicate differences in the carbohydrate composition of the membrane-bound enzymes acetylcholinesterase and 5'nucleotidase in different cell types.
BIOCHIMIE (1984), 66, 59-59.
2. Khaled MEFLAH, Jean HARB, Yves DUFLOS and Serge BERNARD
5'nucleotidase from bovine caudate nucleus synaptic plasma membranes : specificity for substrates and cations ; study of the carbohydrate moiety by glycosidases.
J. NEUROCHEM. (1984), 42, 1107-1115.
3. Jean HARB, Khaled MEFLAH, Yves DUFLOS and Serge BERNARD
Purification and properties of bovine liver plasma membrane 5'nucleotidase.
EUR. J. BIOCHEM. (1983), 137, 131-138.
4. Jean MASSOULIE, Suzanne BON, Monique LAZAR, Jacques GRASSI, David MARSH, Khaled MEFLAH, Jean-Pierre TOUTANT, François VALLETTE and Marc VIGNY
The polymorphism of cholinesterases : classification of molecular forms ; interactions and solubilization characteristics ; metabolic relationships

and regulations.

Cholinesterases : fundamental and applied aspects (Proceedings of the 2nd International Meetings on Cholinesterases). M. BRZIN, T. KIAUTA and E.A. BARNARD, eds), W. De GRUYTER and Co., Berlin (1984) 73-97.

5. Jean HARB, Khaled MEFLAH, Yves DUFLOS and Serge BERNARD
Evidence for a metalloprotein structure of plasma membrane 5'nucleotidase.
FEBS Lett. (1984), 171, 215-220.
6. Khaled MEFLAH, Jean HARB, Danièle LASSORT and Serge BERNARD
Antibodies against bovine liver plasma membrane 5'nucleotidase:
XXXII COLLOQUIUM PROTIDES OF THE BIOLOGICAL FLUIDS, BRUXELLES (1984) 1153-1156.
7. Jean HARB, Khaled MEFLAH, Yves DUFLOS and Serge BERNARD
5'nucleotidase from bovine liver plasma membrane : effect of cations and chelating agents.
XXXII COLLOQUIUM PROTIDES OF THE BIOLOGICAL FUIDS, BRUXELLES (1984) 1149-1152.

CADRE et BUT

A partir des observations montrant que la formation de rosettes entre les lymphocytes T humains et les globules rouges de mouton est inhibée par l'ésérine (CHANDRA et KUTTY, 1975) ; KUTTY *et al.*, 1976), nous nous sommes tout d'abord intéressés à l'éventuelle présence d'une activité acétylcholinestérasique dans les membranes plasmiques de lymphocytes humains. Pour des raisons matérielles, nous avons dû abandonner notre matériel de départ et nous avons choisi le lymphocyte bovin. Dans la caractérisation biochimique de l'acétylcholinestérase des membranes plasmiques, nous avons plus particulièrement porté notre attention sur la partie glycannique, et l'implication de celle-ci sur le mode d'action de l'enzyme. Nous avons ensuite étendu notre intérêt à d'autres tissus bovins.

Dans le premier chapitre de notre mémoire, nous exposons une étude des interactions de la 5'nucléotidase et de l'acétylcholinestérase avec les lectines (Biochimie, 1984, 66, 59-69). Nous avons choisi les membranes plasmiques, de foie, de lymphocyte, de noyau caudé, de muscle strié, de ganglion cervical supérieur et d'érythrocyte. Nous définissons une variabilité tissulaire dans l'interaction des lectines avec la 5'nucléotidase et l'acétylcholinestérase.

Afin de poursuivre notre étude, nous avons été amenés à purifier la 5'nucléotidase des membranes de foie dans le but de déterminer par des méthodes de spectroscopie la structure glycannique de l'enzyme. Si nous avons obtenu une préparation enzymatique très purifiée (16 000 fois), les quantités dont nous disposions (quelques dizaines de µg) se sont avérées très inférieures à celles nécessaires pour une étude structurale. Ces résultats font l'objet

d'une publication (European Journal of Biochemistry, 1983, 137, 131-138). Les méthodes de purification que nous utilisons sont relativement longues. C'est pourquoi nous avons entrepris de produire un antisérum orienté contre la 5'nucléotidase purifiée à partir des membranes de foie. Nous espérons, en utilisant l'immunoabsorption sur des anticorps immobilisés, obtenir plus rapidement des quantités suffisantes de 5'nucléotidase, afin d'en déterminer la structure glycannique. Dans le deuxième chapitre, nous exposons le mode d'immunisation des lapins et son intérêt ; nous caractérisons les anticorps obtenus par l'étude de l'immunoréactivité croisée vis-à-vis des 5'nucléotidases d'origines tissulaires différentes.

Les tentatives de purification de la 5'nucléotidase par immuno-adsorption, n'ont pas encore abouti à une méthode satisfaisante. En effet, quelque soit le mode d'élution utilisé, nous n'avons pas encore pu désorber l'enzyme avec conservation de l'activité. Afin de poursuivre notre étude sur les structures saccharidiques, nous avons choisi d'utiliser les propriétés des lectines et des glycosidases, pour caractériser le type de glycanne de la 5'nucléotidase et de l'acétylcholinestérase des membranes de noyau caudé.

Dans ce travail, nous déterminons tout d'abord les propriétés cinétiques de la 5'nucléotidase (affinité pour les substrats, effet des agents chélatants, solubilisation). Puis, par des techniques d'hydrolyse enzymatique des résidus saccharidiques et par les interactions de l'acétylcholinestérase et de la 5'nucléotidase avec les lectines, nous tentons de définir le type de structure glycannique des deux enzymes. Nous développons cette approche dans le deuxième chapitre (Journal of Neurochemistry, 1984, 42, 1107-1115).

INTRODUCTION

La présence de sucres à la surface des cellules animales et végétales, a suscité un grand intérêt dans l'étude des interactions cellulaires. On admet actuellement que les glycannes jouent un rôle important dans les phénomènes d'adhésion, de reconnaissance et d'inhibition de contact. De nombreuses observations ont permis de penser que les glycoconjugués, tout comme les acides nucléiques, peuvent être des véhicules d'informations nécessaires à la cellule. Ces molécules seraient des antennes localisées sur la membrane plasmique.

I - LA MEMBRANE PLASMIQUE

En 1966, ARON et GRASSE proposaient la définition suivante : "La membrane biologique limite et confère à la cellule une unité anatomique". A côté de cette observation purement morphologique, SINGER et NICHOLSON (1972) émettaient une hypothèse qui faisait de la membrane plasmique une mosaïque fluide où protéines et glycoprotéines flottaient dans une bicouche lipidique (planche 1).

Constituant une barrière biologique, la membrane plasmique des

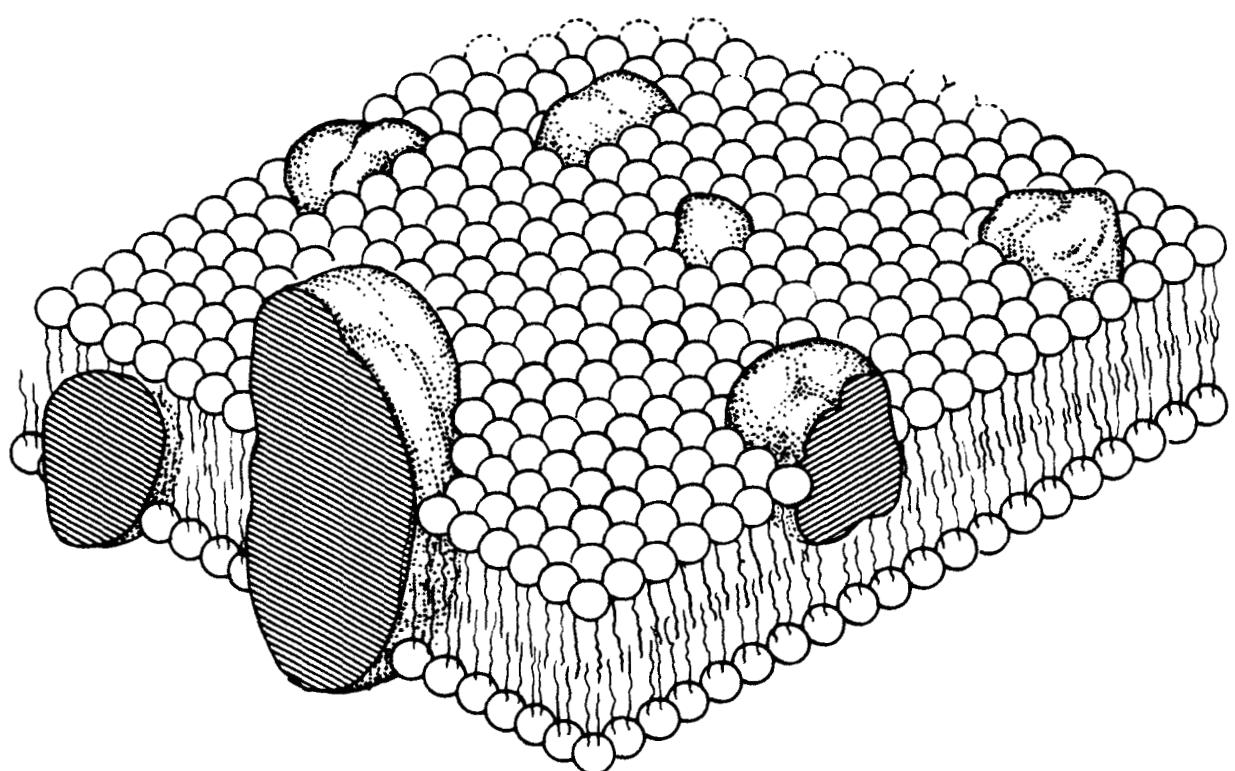


Planche 1. Modèle en mosaïque fluide de la structure membranaire. (d'après SINGER et NICOLSON , 1972)

cellules eucaryotes possède de nombreux récepteurs capables de fixer des ligands et de subir des modifications métaboliques et structurales. C'est ainsi que l'une des questions fondamentales de la biologie cellulaire est de savoir par quelle(s) voie(s) une molécule interagit avec la cellule provoquant ainsi l'expression (inhibition ou stimulation) d'un processus physiologique. Dans de nombreux cas, la molécule ne pénètre pas dans la cellule, mais agit seulement au niveau de récepteurs membranaires. L'exemple de la transmission neuromusculaire illustre parfaitement ce phénomène. L'acétylcholine, médiateur chimique libéré par la terminaison présynaptique lors d'une excitation nerveuse (NACHMANSOHN, 1955) diffuse dans l'espace intersynaptique et se fixe sur un récepteur protéique, induisant ainsi une modification conformationnelle du récepteur avec ouverture de canaux ioniques spécifiques (ionophores) (CHANGEUX, 1981). Un autre phénomène impliquant des récepteurs de la membrane plasmique, est celui de l'induction de la mitogénèse par l'interaction ligand - récepteurs membranaires. En effet, dès 1971, TAYLOR *et al.* montraient que la fixation d'anti-immuno-globulines produisait un réarrangement des immunoglobulines "cibles" dans les membranes de lymphocytes B. On observe alors l'apparition de petits agrégats répartis sur toute la surface cellulaire (patching) précédant la formation d'une calotte polaire (capping). Ce processus aboutit à une stimulation cellulaire entraînant une mitogénèse (DE PETRIS, 1975).

Pour que l'on observe un effet mitogène, il faut donc que la membrane plasmique :

- fixe spécifiquement l'effecteur : fonction réceptrice
- intègre le signal : étape de reconnaissance
- transmette le message au noyau : information

La fixation d'un mitogène sur la surface cellulaire des lymphocytes induit des modifications structurales et métaboliques.

Ces observations ont conduit de nombreuses équipes à s'intéresser aux phénomènes membranaires. C'est ainsi que certains auteurs ont analysé les activités d'enzymes membranaires, telle que l'ATPase Na^+/K^+ dépendante, essayant de relier les modifications de son activité à l'élaboration d'un signal transmembranaire (AUBRY *et al.*, 1977 ; ZACHOWSKI *et al.*, 1977).

D'autres groupes ont étudié les glycoconjugués membranaires, et plus particulièrement les glycoprotéines. En effet, ces molécules entrent, dans des proportions importantes, dans la composition des membranes plasmiques et semblent impliquées dans des phénomènes d'interaction spécifique (planche 2).

Parmi les enzymes présents sur la surface des cellules eucaryotes, la 5'nucléotidase et l'acétylcholinestérase constituent deux molécules qui interviennent dans des phénomènes biologiques spécifiques. L'étude de ces deux enzymes a fait l'objet de nombreux travaux. Cependant, dans certains types cellulaires, la détermination de leur rôle biologique reste parfois hypothétique.

II - La 5'NUCLEOTIDASE

La 5'nucléotidase catalyse la déphosphorylation des nucléotides monophosphorylés en position 5' du ribose.

Le rôle physiologique de l'enzyme reste encore mal défini. Cependant, quelques hypothèses ont été avancées. Par sa propriété de déphosphoryler les 5'mononucléotides, la 5'nucléotidase permettrait aux nucléosides de traverser la membrane plasmique (FLEIT *et al.*, 1975 ; YAGIL et BEACHAM, 1975). L'enzyme serait aussi impliqué dans des phénomènes de régulation du flux sanguin au niveau du muscle cardiaque (BERNE *et al.*, 1971), du muscle strié (BURGER et LOWENSTEIN, 1975), et du cerveau (DALY, 1976). Il interviendrait dans la lipolyse des tissus adipeux (PHILLIS et EDSTROM, 1976), et dans la neurotransmission (SCHUBERT *et al.*, 1976 ; SCHWAB *et al.*, 1975). La 5'nucléotidase intervient dans la régulation du taux d'adénosine au cours de la prolifération cellulaire (CARSON et SEEGMILLER, 1976), de l'immunosuppression (FISHER *et al.*, 1976), et de la libération hormonale (WOLFF et COOK, 1977). BANIK et DAVISON (1969) ont observé une augmentation de l'activité 5'nucléotidase au cours de la myelinisation.

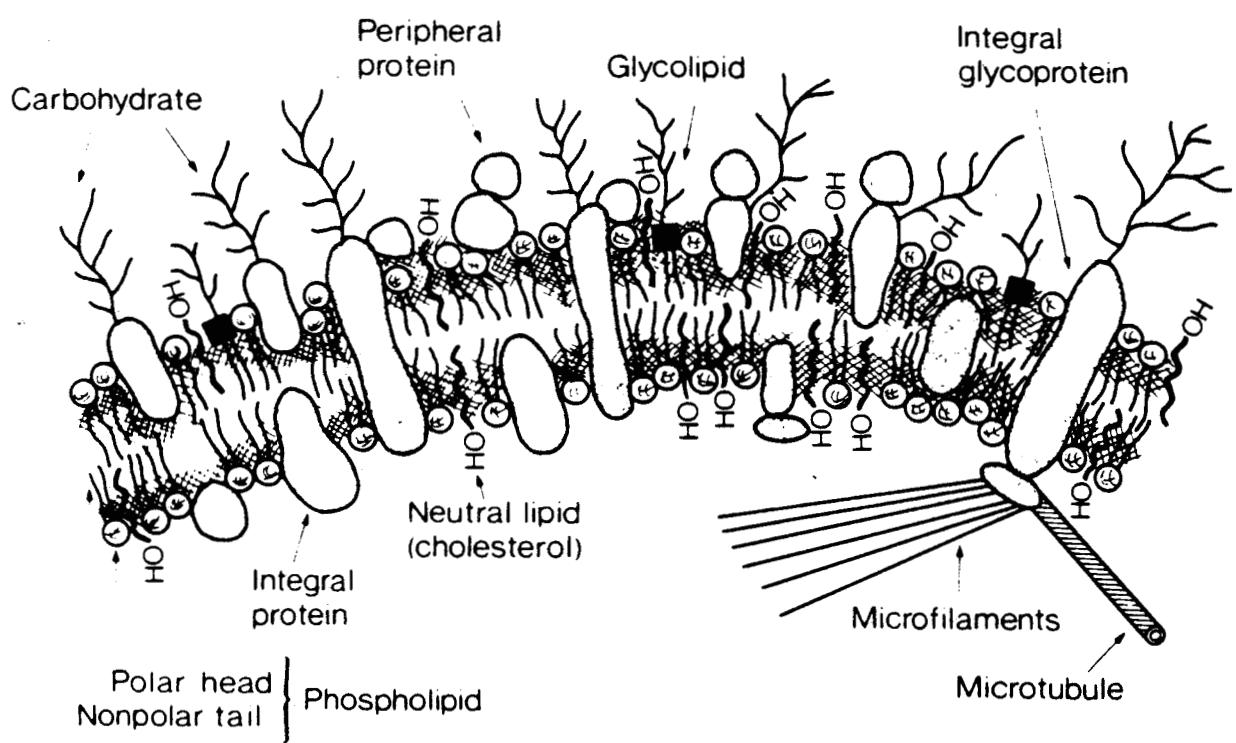


Planche 2. Représentation des glycoconjugués dans les membranes plasmiques. (Immunological methods vol.II 1981)

D'un poids moléculaire de l'ordre de 150 000 daltons, la 5'nucléotidase est constituée de deux sous-unités identiques (EVANS et GURD, 1973 ; IPATA, 1968 ; LELIEVRE *et al.*, 1977 ; HARB *et al.*, 1983). Considérée comme un marqueur de la membrane plasmique (EMMELOT *et al.*, 1964 ; EVANS et GURD, 1973), la 5'nucléotidase est aussi présente dans l'appareil de Golgi et les vacuoles de sécrétion (FARQUHAR *et al.*, 1974 ; LITTLE et WIDNELL, 1975). On ne la trouve pas dans certaines lignées cellulaires, comme les leucocytes polynucléaires (SHIRLEY *et al.*, 1976).

Le site catalytique de l'enzyme est généralement orienté vers le milieu extracellulaire (BENEDETTI et DELBAUFFE, 1971 ; DE PIERRE et KARNOVSKY, 1974 ; GURD et EVANS, 1974). Par l'utilisation d'anticorps anti-5'nucléotidase, ZACHOWSKI *et al.* (1981) ont montré que l'enzyme avait une localisation transmembranaire dans les cellules d'un plasmocytome murin (MOPC 173).

L'activité 5'nucléotidase est généralement inhibée par les lectines (RIORDAN et SLAVIK, 1974 ; DORNAND *et al.*, 1977). La liaison de l'enzyme aux lectines a été mise à profit pour effectuer une étape de purification par chromatographie d'affinité (DORNAND *et al.*, 1978 ; HARB *et al.*, 1983).

Par sa situation dans la membrane plasmique, sa structure et son rôle biologique, la 5'nucléotidase apparaît comme une molécule intéressante, dont l'étude pourrait contribuer à la connaissance de phénomènes membranaires induits par la fixation de molécules capables de reconnaître les sucres. Nous avons étudié en particulier ses interactions avec différentes lectines.

III - L'ACETYLCHOLINESTERASE (E.C. 3.1.3.7.) =====

Le deuxième enzyme que nous avons particulièrement étudié est l'acétylcholinestérase membranaire. Comme la 5'nucléotidase, l'acétylcholinestérase est une glycoprotéine qui peut être membranaire (GURD, 1976 ; ZANETTA *et al.*, 1981 ; MASSOULIE et BON, 1982).

Dès 1914, DALE postulait l'existence d'un enzyme capable d'inactiver l'acétylcholine. Cette activité fut mise en évidence vingt ans plus tard grâce à différents travaux (STEDMAN et STEDMAN, 1935 ; ALLES et HAWES, 1940), MENDEL et RUDNEY (1943) ont montré que l'on pouvait distinguer deux types d'enzymes susceptibles d'hydrolyser l'acétylcholine. Les travaux d'AUGUSTINSSON et NACHMANSOHN (1949) ont permis de différencier l'acétylcholinestérase, hydrolysant spécifiquement l'acétylcholine et l'acétyl- β -méthylthiocholine, des pseudocholinestérases qui hydrolysent en général plus efficacement d'autres esters de la choline (propionylcholine, butyrylcholine).

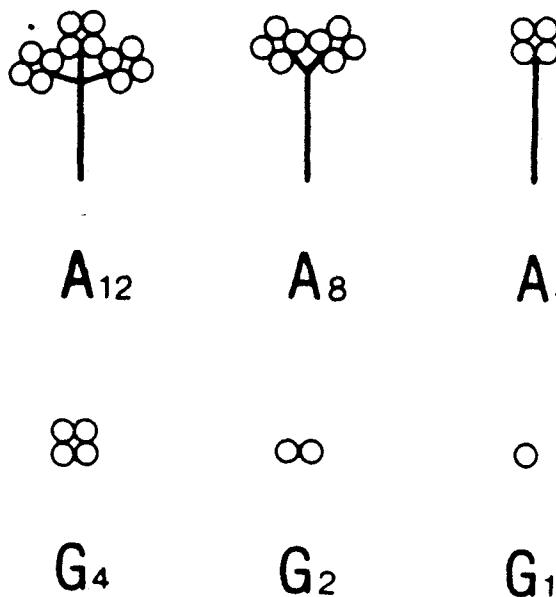
L'acétylcholinestérase joue un rôle essentiel dans les mécanismes de la transmission nerveuse, d'où son abondance particulière dans les tissus nerveux et musculaires. Elle est néanmoins présente également dans de nombreux autres tissus, où son rôle reste largement hypothétique (SILVER, 1974).

A) L'acétylcholinestérase des organes électriques de poissons

Correspondant phylogénétiquement à des muscles modifiés, les organes électriques d'*Electrophorus electricus* et *Torpedo marmorata* possèdent une activité acétylcholinestérase importante (NACHMANSOHN et LEDERER, 1939). La centrifugation en gradient de saccharose d'un extrait d'organe électrique frais d'*Electrophorus electricus*, homogénéisé dans un tampon de force ionique élevée, a permis de caractériser trois formes moléculaires de l'enzyme, de coefficient de sédimentation 18 S, 14 S et 9 S (MASSOULIE et RIEGER, 1969). Ces formes moléculaires sont constituées de tétramères de sous-unités catalytiques identiques, associés à un élément en forme de bâtonnet appelé communément "queue".

De structure collagénique, la "queue" confère aux formes asymétriques des propriétés hydrodynamiques particulières (MASSOULIE et al., 1980). Elle est responsable d'interactions ioniques provoquant l'agrégation des formes asymétriques à basse force ionique (CHANGEUX, 1966). Ce phénomène résulte de l'association de l'enzyme avec des polysaccharides acides

(BON *et al.*, 1978). Les formes asymétriques sont sensibles à la collagénase (LWEBUGA-MUSAKA *et al.*, 1976 ; ANGLISTER *et al.*, 1976 ; BON et MASSOULIE, 1978). La structure collagénique aurait ainsi pour rôle d'associer l'acétylcholinestérase à des éléments de la membrane basale (MAC MAHAN *et al.*, 1978 ; VIGNY *et al.*, 1983). Les formes asymétriques, qui sont dénommées A_4 , A_8 , A_{12} , correspondent respectivement à l'association d'un, deux ou trois tétramères. Elles sont sensibles à l'action des protéases et à celle des ultrasons. De tels traitements provoquent des dissociations entraînant l'apparition de formes A_8 , A_4 , G_4 , G_2 et G_1 catalytiquement actives (BON et MASSOULIE, 1976). Les formes asymétriques s'agrègent à basse force ionique et n'interagissent pas avec les détergents non dénaturants, par exemple le Triton x 100



d'après J. MASSOULIE (T.I.B.S., juin 1980)

Les formes moléculaires G_4 , G_2 , G_1 sont constituées de sous-unités catalytiques et correspondent respectivement aux tétramères, dimères et monomères. Elles constituent une classe hétérogène dont les variants moléculaires diffèrent essentiellement par des propriétés d'interactions hydrophobes. Si certaines de ces molécules sont cytosolubles, d'autres nécessitent l'action de détergents pour être extraites. LAZAR et VIGNY (1980) ont montré que les cellules murines T_{28} ,秘ètent des formes solubles d'acétylcholinestérase

G_1 , G_4 , et de faibles quantités de G_2 , qui n'interagissent pas avec les détergents. Cependant, les formes G_1 et G_4 liées aux membranes peuvent être solubilisées seulement en présence de Triton X-100, et présentent des coefficients apparents de sédimentation différents. Des observations similaires ont été faites dans le noyau caudé de boeuf (GRASSI *et al.*, 1982).

B) L'acétylcholinestérase des vertébrés supérieurs

Toutes les formes moléculaires (asymétriques et globulaires) se retrouvent chez les vertébrés supérieurs et leurs répartitions tissulaires varient selon le tissu considéré. En particulier chez le boeuf, GRASSI *et al.* (1982) ont montré que les formes A_{12} et A_8 constituent une proportion significative de l'acétylcholinestérase du ganglion cervical supérieur, alors que dans le noyau caudé, celles-ci sont à peine décelables à l'état de trace (< 0,002 %). Les formes globulaires G_4 , G_2 , G_1 présentent d'une façon générale une répartition plus étendue que les formes asymétriques, et ne sont pas limitées au système nerveux et aux muscles. Par exemple, dans la membrane érythrocytaire humaine, l'acétylcholinestérase se présente sous une forme dimérique amphiphile (OTT *et al.*, 1975). Sa composition en acides aminés et en sucres est semblable à celle de l'enzyme d'*Electrophorus electricus* (GROSSMAN *et al.*, 1979 ; NIDAY *et al.*, 1977).

L'acétylcholinestérase est particulièrement intéressante par son polymorphisme. Par exemple, les muscles squelettiques de vertébrés supérieurs contiennent les différentes formes d'acétylcholinestérase. Cependant, chaque muscle, selon qu'il est lent ou rapide, possède une distribution particulière des formes moléculaires (BARNARD *et al.*, 1982 ; GISIGER et STEPHENS, 1983 ; BACOU *et al.*, 1982).

Chez le rat adulte, la forme asymétrique A_{12} semble localisée en majorité dans la membrane basale des jonctions neuromusculaires, alors qu'elle est répartie dans la fibre musculaire entière de l'embryon de rat, ainsi que dans le muscle humain (CARSON *et al.*, 1979). Cette molécule constituerait un marqueur de développement neuromusculaire. En effet, il est apparu qu'au cours du développement embryonnaire sa biosynthèse coïncide avec la formation

de la jonction neuromusculaire de l'embryon (VIGNY *et al.*, 1976 ; KATO *et al.*, 1980), et d'autre part que chez l'adulte sa régulation dépend de l'innervation (HALL, 1973 ; VIGNY *et al.*, 1976).

La distribution des différentes formes moléculaires de l'acétylcholinestérase reflète donc différentes situations physiologiques, sans qu'il soit encore possible d'attribuer un rôle précis à chaque forme. Indépendamment des différentes formes, qui diffèrent essentiellement par leur structure quaternaire, d'autres différences peuvent intervenir entre les molécules d'acétylcholinestérase. Dans le cas de l'érythrocyte humain, GALBRAITH et WATTS (1981) ont mis en évidence une diminution de la Vmax de l'enzyme liée à l'âge des cellules.

La 5'nucléotidase et l'acétylcholinestérase sont présentes en quantités relativement faibles dans les membranes plasmiques des différents tissus bovins que nous avons étudiés (foie, lymphocyte, noyau caudé, muscle strié, ganglion cervical supérieur, érythrocyte). Ces deux enzymes ont été décrites comme étant des glycoprotéines. Présentes sur la surface de certaines cellules, ces deux molécules appartiennent à la famille des glycoconjugués membranaires.

IV - LES GLYCOCONJUGUES MEMBRANAIRES

Une des caractéristiques des glycoconjugués membranaires est d'avoir :

- une partie hydrophobe de leur molécule solidement ancrée dans la bicouche lipidique de la membrane cellulaire.
- une partie oligosaccharidique exposée à la face externe de cette membrane.

Il existe deux groupes de glycoconjugués membranaires : les glycolipides et les glycoprotéines.

A) Les glycolipides membranaires

Les glycolipides sont des composés résultant de l'union d'une fraction glucidique avec une fraction lipidique par des liaisons de covalence. Les glycolipides membranaires se subdivisent en deux sous-classes dépendantes de la nature de leur portion lipophile : les glycéroglycolipides et les glycosphingolipides.

Le rôle biologique de ces lipides membranaires est encore mal défini. Ces molécules ont-elles d'autres fonctions (reconnaissance, adhérence, différenciation, translocation, récepteur), que celles d'éléments structuraux ? Les connaissances actuelles permettent d'affirmer l'existence d'une fonction de reconnaissance cellulaire : celle des groupes sanguins. En effet, à la surface des hématies, les facteurs de groupe A, B, H, Le, P₁, et P ont été identifiés comme étant des glycosphingolipides (HAKOMORI et JEANLOZ, 1964 ; HAKOMORI *et al.*, 1978). Une autre fonction a été aussi mise en évidence : celle du ganglioside G_{M1}, qui serait le récepteur de la toxine cholérique (VAN HEYNINGEN *et al.*, 1971 ; HOLMGREN *et al.*, 1973).

B) Les glycoprotéines

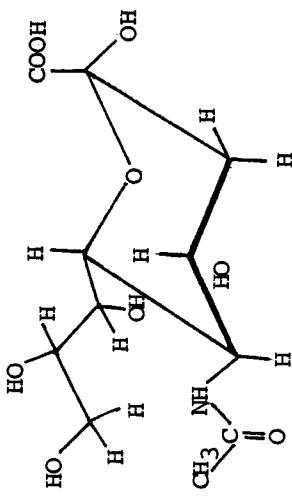
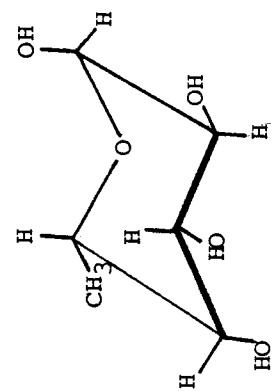
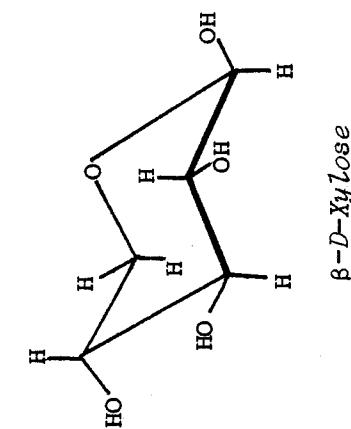
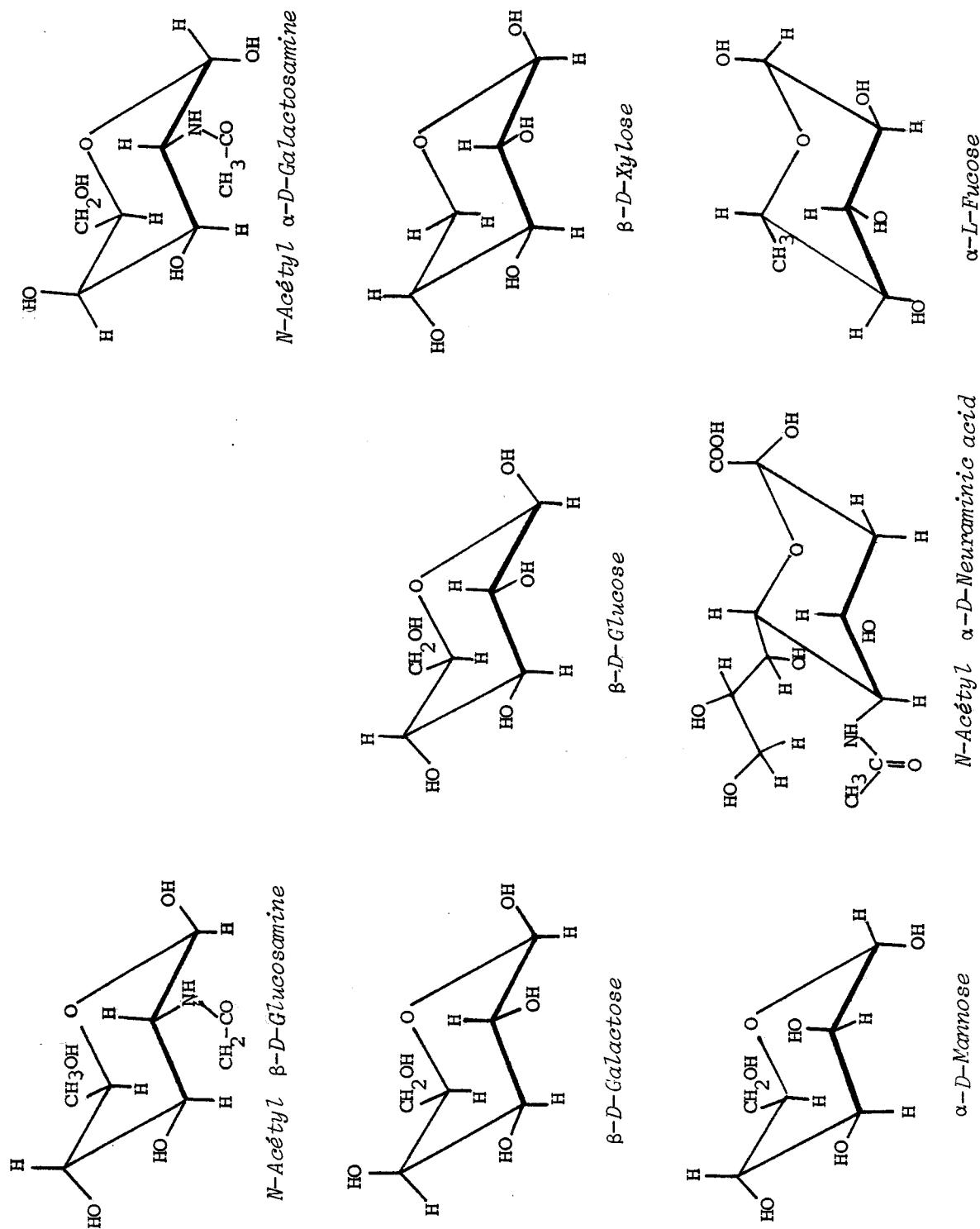
1) Structure

Les polysaccharides associés aux protéines membranaires sont principalement composés des sucres cités dans la figure 1.

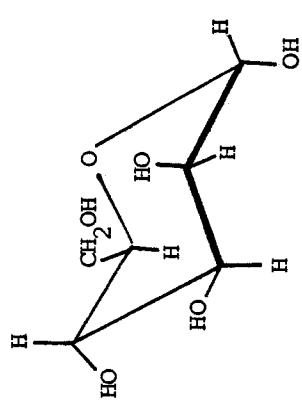
Des divers enchaînements de ces sucres, qui peuvent être variés et complexes, dépendent certaines activités biologiques. Ils sont liés aux protéines de façon covalente, et peuvent être :

- soit de type O-glycosidique
- soit de type N-glycosidique

Le développement des méthodologies chimiques, enzymatiques et plus récemment physiques, avec la résonance magnétique nucléaire (RMN), a permis la caractérisation de nombreuses glycoprotéines (DORLAND *et al.*, 1977).



α-L-Fucose



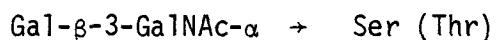
N-Acetyl α-D-Neuraminic acid

FIGURE 1

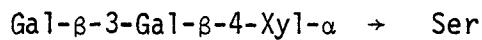
a) liaison de type O-glycosidique

Dans ce mode de liaison, il convient de différencier deux types :

- liaison d'une N-acétyl-galactosamine (GalNAc) à un acide aminé, thréonine (Thr), ou sérine (Ser). Cette structure se rencontre dans la plupart des O-glycoprotéines.



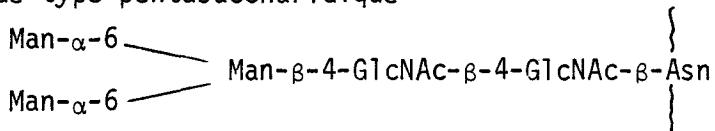
- liaison d'un xylose (Xyl) à une sérine, ce qui constitue la séquence terminale de beaucoup de protéoglycannes.



Il existe parfois des liaisons entre une hydroxylysine et le galactose, où le disaccharide est Glc- α -2-Gal- β comme dans le tropocollagène de la peau de cobaye, la membrane basale glomérulaire, le collagène de seiche (STRECKER et MONTREUIL, 1979)..

b) liaison de type N-glycosidique

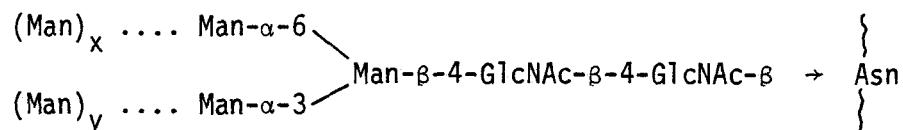
Il y a dans ce cas liaison d'une N-acétyl-glucosamine à une asparagine (ASN) et la partie glycannique comprend une structure interne, généralement de type pentasaccharidique



Des séquences glycosidiques diverses peuvent se greffer à partir de ce noyau (MONTREUIL, 1980). Ces régions variables, qui confèrent au glycanne sa spécificité, constituent la structure antennaire du glycanne (MONTREUIL, 1975).

Pour les N-glycoprotéines, il convient de distinguer trois familles, suivant la nature des oligosaccharides liés au noyau pentasaccharidique

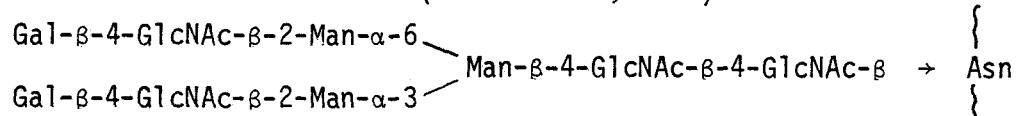
- les N-glycoprotéines de type oligomannosidique qui comportent uniquement des résidus mannose liés au noyau, comme dans le cas du glycanne de la protéine du virus Sindbis S-4 (ROBBINS, 1979), de l'unité A de la tyroglobuline de veau (ITO *et al.*, 1977).



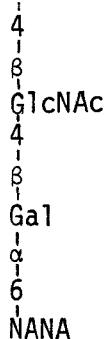
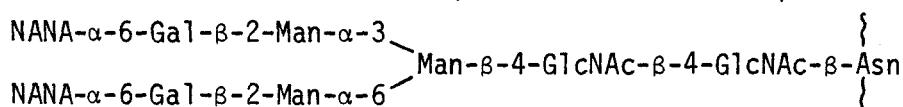
- les N-glycoprotéines de type N-acétyl-lactosaminique, qui comportent un nombre variable de résidus N-acétyl-lactosaminique liés au noyau pentasaccharidique, avec ou sans acide(s) sialique(s) terminal(aux) et un (L) fucose. Il se forme ainsi des structures pouvant être :

. diantennées, comportant deux résidus N-acétyl-lactosaminique fixé sur les mannoses terminaux du "noyau".

Exemple : la sérotransferrine humaine (SPIK *et al.*, 1975).



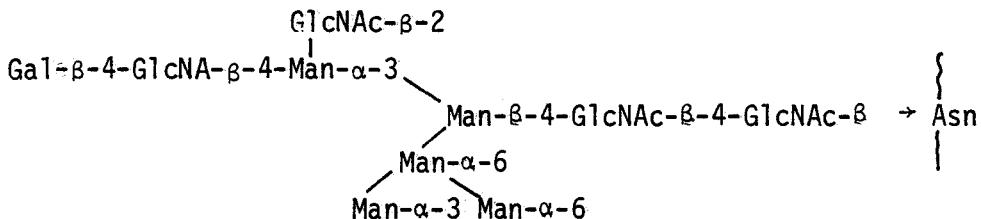
. triantennées, comportant trois résidus N-acétyl-lactosaminique, comme le glycopeptide GP₃ de la thyroglobuline de porc (KONDO *et al.*, 1977), ou le glycanne de la protéine de capsid du virus de la stomatite vésiculaire (READING *et al.*, 1978).



. tétraantennées, par exemple dans une structure glycanique de l'orosomucoïde humain (SCHMID *et al.*, 1977 ; FOURNET *et al.*, 1977 ; DORLAND *et al.*, 1977).

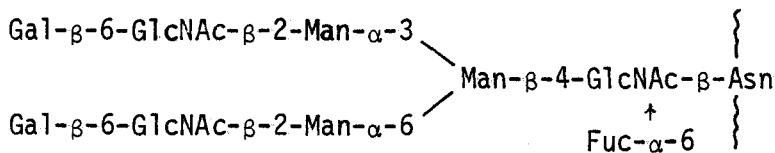
- les N-glycoprotéines de type hybride possèdent une structure oligosaccharidique mixte de type oligomannosidique-N-acétyl-lactosaminique. On trouve ce type de glycanne dans les glycopeptides GPI, GPII_4 et $\text{GPII}B$ de l'ovalbumine de poule (YAMASHITA *et al.*, 1978).

Exemple de GPI :

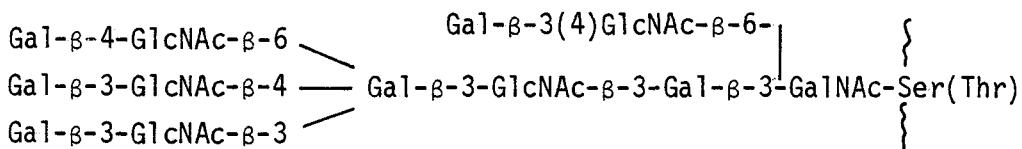


Par ailleurs, l'existence d'un noyau pentasaccharidique commun associé à des motifs oligosaccharidiques identiques à toutes les classes de N-glycoprotéines n'est pas une règle immuable. Certaines comportent un seul résidu de N-acétyl-glucosamine au lieu de deux à l'extrémité liée à l'asparagine, avec addition de résidus isoacétyl-lactosaminique.

Exemple : IgG myélomateuse humaine (MILLER, 1972)



Les séquences saccharidiques responsables des groupes sanguins, illustrent aussi la complexité des glycannes. La connaissance de ces structures a essentiellement débuté par l'étude des glycoprotéines hydrosolubles des liquides de sécrétions (WATKINS, 1972). En effet, le glycanne de ces molécules constitue le "reflet" de celui des glycolipides érythrocytaires responsables de la spécificité des groupes sanguins. Ces glycannes possèdent un motif saccharidique commun, à partir duquel l'addition aux extrémités de monosaccharides en liaison 1-3 exprime la spécificité A, B, O et Lewis (HUGUES, 1976, a).



D'autres structures complexes peuvent apparaître dans certaines pathologies. NATO et BOURRILLON (1982) ont décrit une glycoprotéine portant à la fois des glycannes de type O et N dans les membranes cellulaires de l'hépatome de ZAJDELA.

2) Métabolisme

Si de grands progrès ont été faits en ce qui concerne la structure des chaînes polysaccharidiques des glycoprotéines, les mécanismes de leur biosynthèse et de leur métabolisme en général, posent encore de nombreux problèmes. Cependant, la N-glycosylation est relativement bien connue.

a) N-glycosylation

Le mécanisme de N-glycosylation d'une protéine est connu depuis quelques années et comporte une série d'étapes distinctes. La biosynthèse d'une structure de type N-acétyl-lactosaminique est la plus complexe. Le processus débute au niveau du réticulum endoplasmique, et passe par l'intermédiaire d'une structure oligomannosidique. L'étape préliminaire commence par la synthèse d'un glycosyl diphosphodolichol ; le polysaccharide est ensuite transféré en bloc sur l'asparagine, cible de la protéine. Puis, des transformations ont lieu, par action de glycosidases, au niveau du réticulum lisse et de l'appareil de Golgi. Alors interviennent des glycosyltransférases spécifiques (N-acétyl-glucosaminyl, galactosyl, sialyl et/ou fucosyl), qui vont aboutir à la synthèse du glycanne final. Les glycoprotéines sont ensuite libérées du réticulum endoplasmique, soit pour être excrétées par la cellule, soit pour s'intégrer dans la membrane plasmique (SNIDER, 1984) (planche 3).

b) catabolisme

La connaissance de ce phénomène est moins avancée. Il s'effectue au niveau des lysosomes où le glycanne subit l'action de glycosidases et de protéases aboutissant à la libération de monosaccharides et d'acides aminés dans le cytoplasme. Si le mécanisme concernant le catabolisme des glycoprotéines cellulaires n'est pas encore connu, celui des glycoprotéines circulantes a été élucidé grâce aux travaux de ASHWELL et MORELL (1974). En effet, les glycoprotéines sous forme désialylée, sont reconnues par des

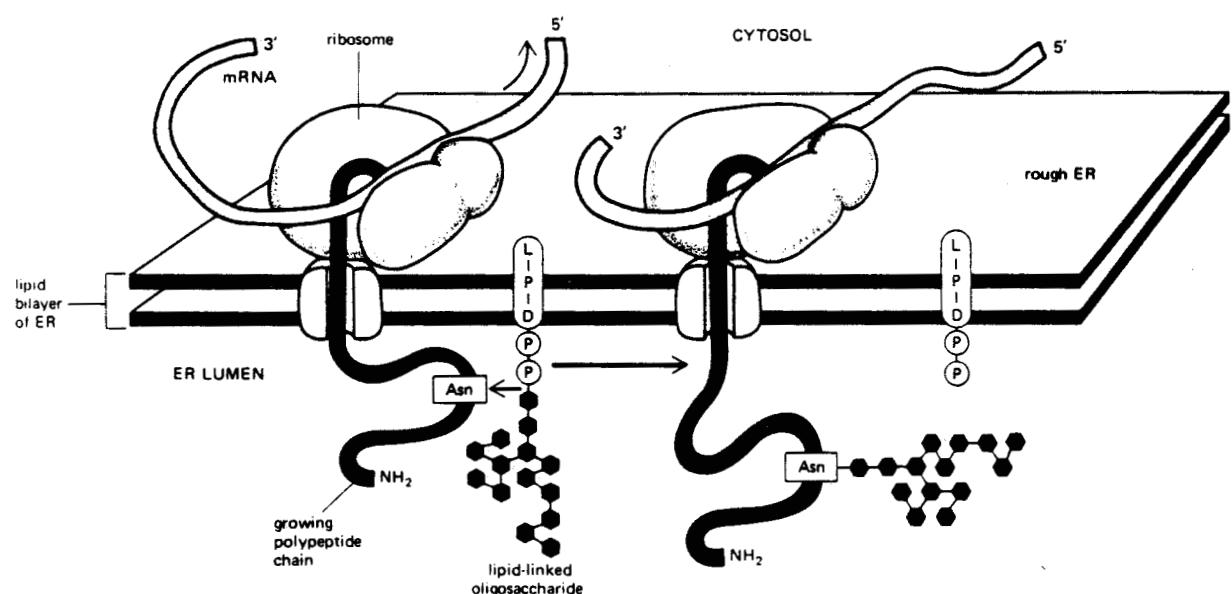
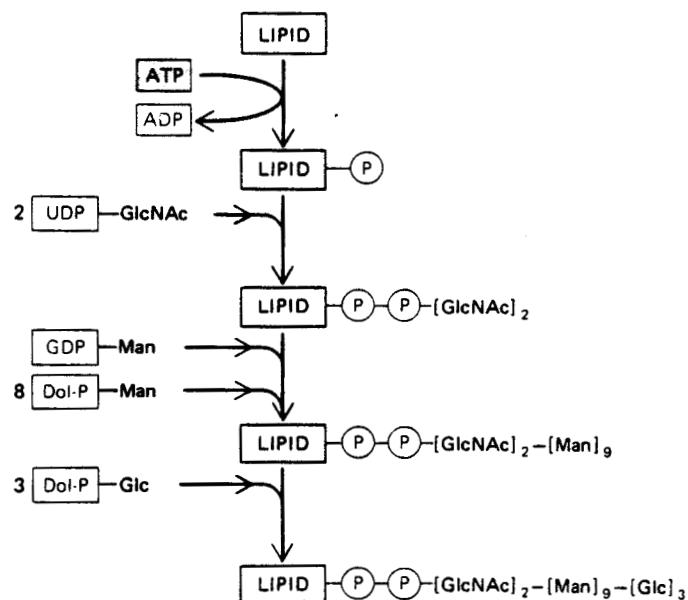


Planche 3. Schéma de la N-glycosylation d'après ALBERTS B., BRAY D., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K. et WATSON J.D.
(Molecular Biology of the cell, 1983).

récepteurs membranaires hépatocytaires, puis sont internalisées par endocytose. Les vésicules fusionnent alors avec les lysosomes, dans lesquels s'effectue la dégradation des glycoprotéines, essentiellement par action d'exoglycosidases. Un dysfonctionnement de ce processus, dû à l'absence de certaines glycosidases lysosomiales, provoque des maladies métaboliques appelées "glycoprotéinoses" qui se traduisent par l'accumulation dans les tissus et dans les urines de composés glucidiques résultant du catabolisme incomplet des glycannes des glycoprotéines (STRECKER et MONTREUIL, 1979).

3) Rôle des glycannes des glycoprotéines

Le rôle de la structure oligosaccharidique dans les phénomènes de reconnaissance a été démontré dans les processus d'élimination des glycoprotéines sériques au niveau du foie et de régulation de leur durée de vie. ASHWELL et MORELL (1971), cherchant à élucider le rôle biologique de la céruleoplasmine, molécule assurant le transport du cuivre dans le sérum sanguin des mammifères, ont désialylé cette molécule et l'ont injectée à des animaux de laboratoire. Ils constatèrent sa disparition au bout de 15 minutes, alors que la concentration de la molécule native ne diminuait pas. Ces mêmes auteurs ont montré que pour de nombreuses glycoprotéines sériques, l'élimination de résidus terminaux d'acide sialique (permettant l'exposition d'un galactose) provoquait la disparition rapide de ces molécules modifiées du système circulatoire, par suite de leur incorporation dans les hépatocytes après fixation à des récepteurs membranaires.

GESNER et GINSBURG (1964) ont montré que les lymphocytes, préalablement marqués et réinjectés à l'animal, se fixaient dans la rate. Cependant, une hydrolyse enzymatique des résidus fucose présents sur la surface cellulaire des lymphocytes, déviait la fixation vers le foie. Ces résultats indiquent donc qu'un résidu monosaccharide d'une structure complexe peut déterminer la spécificité de reconnaissance permettant la liaison des cellules.

L'existence de liaisons sélectives, liées à la structure des glycannes, permet de dégager la notion de molécule cible au niveau de certaines cellules. En effet, les travaux d'ASHWELL et MORELL (1977), sur

l'hépatocyte, et ceux de SANDO et NEUFELD (1977) sur le fibroblaste, ont permis de mettre en évidence des structures membranaires spécifiques des sucres, donc comparables aux lectines trouvées dans les plantes.

Il existe dans les membranes d'hépatocytes une lectine qui reconnaît spécifiquement les glycoconjugués désialylés du sérum, alors que les résidus mannose-6-P des enzymes lysosomiques sont reconnus par les lectines membranaires des fibroblastes humains. Parallèlement à l'étude des glycoconjugués membranaires, s'est donc développée celle des lectines présentes sur la surface des cellules cibles (MONSIGNY *et al.*, 1979, 1983). Il apparaît que ces molécules pourraient être impliquées dans des phénomènes biologiques, telle la pinocytose. ZANETTA *et al.* (1984) ont mis en évidence, au niveau des cellules de Purkinje, une protéine membranaire présentant les caractéristiques d'une lectine, qui jouerait un rôle important dans la synaptogénèse au cours de développement embryonnaire du cervelet de rat.

Ce mode de reconnaissance peut intervenir aussi dans certaines pathologies. En effet, les cellules tumorales expriment des antigènes de surface qui présentent des structures et des spécificités variées pouvant induire le rejet ou la protection de la tumeur (GAHMBERG et ANDERSON, 1982).

Les cellules réticuloendothéliales du foie sont capables de fixer spécifiquement les sucres des enzymes lysosomiaux par l'intermédiaire de récepteurs membranaires (STAHL *et al.*, 1976 ; ACHORD *et al.*, 1978). Ces récepteurs possèdent des spécificités saccharidiques différentes de celles des fibroblastes et des hépatocytes. KAWASAKI *et al.* (1978) ont isolé, à partir du foie de lapin, un récepteur capable de reconnaître le mannose et la N-acétyl-glucosamine.

Certains motifs polysaccharidiques peuvent donc être caractéristiques de types cellulaires particuliers ou d'états de différenciation spécifique. Il était évidemment intéressant de rechercher certaines structures spécifiques aux cellules tumorales. C'est ainsi que GOLD et FREEDMAN (1965) et GOLD (1971) ont montré qu'une glycoprotéine appelée "carcinoembryonnaire" était présente dans les tissus embryonnaires et dans les cellules tumorales. Cette glycoprotéine, de poids moléculaire 80 kd, pouvait constituer aussi un marqueur de différenciation cellulaire. Elle est très riche en sucres,

qui constituent environ 60% de sa masse, en particulier en N-acétyl-gluco-samine et en mannose (PRITCHARD et TODD, 1976 ; SLAYTER et COLIGAN, 1976), le diacétyl-chitobiose constitue l'un des déterminants antigéniques (TODD et SHIVELY, 1978), et se rencontre dans le sérum des patients atteints d'un cancer du colon. D'autre part, certaines glycoprotéines membranaires peuvent n'apparaître que dans des cas pathologiques ; par exemple, dans l'hépatome de Zajdela, une molécule majeure GPII₂ apparaît à la surface des cellules ascitiques (NATO et BOURRILLON, 1982).

Ainsi, certaines glycoprotéines pourraient constituer des marqueurs tumoraux, et de ce fait, ouvrir de nouvelles voies diagnostiques et peut-être thérapeutiques. L'une des orientations possible consiste en la production et l'utilisation d'anticorps monoclonaux, capables de reconnaître spécifiquement des antigènes de surface impliqués dans les phénomènes tumoraux. Les molécules ainsi obtenues peuvent, dans certains cas, bloquer le processus néoplasique (HERLYN et KOPROWSKY, 1982 ; SHOUVAL *et al.*, 1982) ou devenir des vecteurs de substances médicamenteuses (BLYTHMAN *et al.*, 1981). Une autre observation montrant l'intervention des glycoprotéines a été faite lors de l'infection virale. En effet, les virus se fixent sur des hématies par l'intermédiaire de structures sialylées. L'élimination de ces résidus par la neuraminidase inhibe la fixation du virus sur la membrane cellulaire (revue de SHARON et OFEK, 1983).

Les glycoconjugués sont donc capables d'être modifiés dans certaines pathologies. Quel est leur rôle dans les conditions physiologiques normales ? Les progrès effectués dans l'étude de la structure des glycannes ont permis de proposer divers rôles biologiques.

- Elles interviennent dans les phénomènes d'adhésion, de reconnaissance cellulaire et d'inhibition de contact (YAMADA et OLDEN, 1978).

- Elles pourraient être des récepteurs vis-à-vis de certains effecteurs (virus, protéines, hormones) (HUGUES, 1976, b).

- La structure glycannique pourrait avoir une influence sur la

conformation de la chaîne polypeptidique et la protègerait contre les attaques protéolytiques (LOH et GAINER, 1978).

- Elles permettraient aux glycoprotéines de sortir des cellules et de reconnaître des cellules cibles (EYLAR, 1965).

- Elles contrôleraient le catabolisme des protéines circulantes par différents organes, ainsi que la durée de vie des cellules sanguines (ASHWELL et MORELL, 1971 ; ASHWELL et HARFORD, 1982).

La détection des glycannes membranaires était essentiellement basée sur des techniques d'histochimie, qui permettaient l'étude de la répartition et de la densité cellulaires de ces molécules. Ces méthodes utilisent principalement les caractéristiques chimiques des glycannes. Cependant, il faut noter que ces techniques de visualisation possèdent un large spectre d'action permettant ainsi la mise en évidence globale des glycoconjugués. Elles ne donnent aucune indication sur la nature ou la structure du glycanne. C'est ainsi que s'est développée l'utilisation de lectines qui, par leurs propriétés de se lier spécifiquement sur des structures glycanniques, devenaient un "outil" intéressant.

V - LES LECTINES

Le terme "lectine" venant du mot latin "legere" (choisir) a été proposé par BOYD et SHAPLEIGH (1954), pour qualifier des molécules capables d'agglutiner certaines cellules de manière sélective. D'abord extraites des plantes, il est apparu qu'elles étaient présentes dans de nombreux autres organismes. A la lumière de nombreux travaux concernant ces molécules, GOLDSTEIN *et al.* (1980) proposent la définition suivante : "Une lectine est une protéine ou une glycoprotéine, ne provenant pas d'un processus immunologique, qui agglutine des cellules et précipite des glycoconjugués".

Les lectines ne sont pas les seules molécules capables de reconnaître spécifiquement les sucres. Certaines toxines possèdent cette propriété, mais ne sont ni agglutinantes, ni précipitantes. De même, les enzymes glycolytiques peuvent aussi agglutiner transitoirement les cellules. La purification de WGA par chromatographie sur une colonne d'affinité de benzyl-1-thio-2-acétamide-2-deoxy- β -D-glycopyrannoside à partir d'un extrait de germe de blé, permet l'isolement d'une β -N-acétyl-glucosaminidase à des pH différents de ceux nécessaires à l'élution de la lectine (BOUCHARD *et al.*, 1976).

A) Spécificité des lectines

L'effet des lectines peut être inhibé par des sucres simples ou complexes. Leur spécificité est généralement définie par les monosaccharides ou les oligosaccharides qui inhibent l'agglutination induite par les lectines. Le tableau I récapitule les spécificités de quelques lectines.

B) Type d'interaction

Les lectines peuvent, dans une même population cellulaire, discriminer les cellules saines des cellules tumorales par agglutination sélective (AUB *et al.*, 1965 ; BURGER *et al.*, 1973 ; REISNER *et al.*, 1976 ; PAULIE *et al.*, 1983).

Cependant, le processus dépend d'une part de l'état physiologique de la cellule (charges électriques de la surface cellulaire, nombre de sites récepteurs, nature des structures glycanniques), d'autre part de la polyvalence de la lectine (LOTAN *et al.*, 1973).

Les techniques spectrométriques (rayon X, fluorescence ...) ont permis d'élucider certains types d'interactions lectine - sucre. La reconnaissance des glycannes, par la Con A et la WGA, semble être essentiellement due à certains acides aminés de la lectine : acide aspartique, tyrosine, tryptophane (NAGATA et BURGER, 1972 ; ALLEN *et al.*, 1973 ; MONSIGNY *et al.*, 1979) (Figure 2).

Tableau I : Spécificité de reconnaissance de quelques lectines.

(Cytochemistry of cell glycoconjugates, J. SCHREVEL,
D. GROS, M. MONSIGNY)

ABBREVIATION et NOM COURANT	SOURCE	SPECIFICITE	REFERENCES
Con A Concanavaline A	<i>Canavalia ensiformis</i>	α -D-Man α -D-Glc D-D-Fruc	AGRAWAL and GOLDSTEIN, 1968 GOLDSTEIN <i>et al.</i> , 1979 PORETZ and GOLDSTEIN, 1970
Suc Con A Concanavaline A succinylée			GUNTHER <i>et al.</i> , 1973
LcA Agglutinine de lentille	<i>Leus culinaris</i>	α -D-Man α -D-Glc	HOWARD <i>et al.</i> , 1971 FORIERS <i>et al.</i> , 1978
PNA Agglutinine d'arachide	<i>Arachis hypogea</i>	D-Gal Gal- β -3-GalNAc	LOTAN <i>et al.</i> , 1975 FISH <i>et al.</i> , 1978
RcA Agglutinine de ricin I	<i>Ricinus communis</i>	D-Gal,D-GalNAc	NICOLSON and BLAUSTEIN, 1972 NICOLSON <i>et al.</i> , 1974
	Agglutinine de ricin II	D-Gal	OLNES <i>et al.</i> , 1975
SBA Agglutinine de soja	<i>Glycina maxima</i>	D-GalNAc D-Gal	LIS <i>et al.</i> , 1970 LOTAN <i>et al.</i> , 1974
HpA Agglutinine d'escargot	<i>Helix pomatia</i>	GalNAc	HAMMARSTROM, 1972
BSA Agglutinine de guarane I	<i>Bandeira simplicifolia</i> BSI A 4 BSI B 4	α -D-GalNAc α -D-Gal D-GlcNAc	SHANKAR-IYER <i>et al.</i> , 1976 EBISCU <i>et al.</i> , 1978
	Agglutinine de guarane II		
PHA Agglutinine de haricot L-PHA E-PHA	<i>Phaseolus vulgaris</i>	α -D-GalNAc (NeuNAc)-Gal-D-GlcNAc	MILLER <i>et al.</i> , 1973 MONSIGNY <i>et al.</i> , 1978 PERLES <i>et al.</i> , 1977 KORNFELD, 1970
LtA Agglutinines de lotus A B C	<i>Lotus tetragonolobus</i>	α -L-Fuc α -L-Fuc α -L-Fuc	YARIV <i>et al.</i> , 1972
UeA Agglutinines d'ajonc I II	<i>Ulex europeus</i>	α -L-Fuc GlcNAc β -4-GlcNAc	HOREJSI and KOCOUREK, 1974 HOREJSI, 1979
StA Agglutinine de pomme de terre	<i>Solanum tuberosum</i>	GlcNAc- β -4-GlcNAc	DELMOTTE <i>et al.</i> , 1973 ALLEN <i>et al.</i> , 1978
WGA Agglutinine de germe de blé	<i>Triticum vulgare</i>	β -GlcNAc	NAGATA and BURGER, 1974 BHAVANANDAN and KATLIC, 1979 MONSIGNY <i>et al.</i> , 1980 MONSIGNY <i>et al.</i> , 1980
Suc WGA		β -GlcNAc	
Limuline Agglutinine de limule	<i>Limulus polyphemus</i>	α -NeuNAc-GalNAc α -Neu	ROCHE <i>et al.</i> , 1975 ROCHE and MONSIGNY, 1979

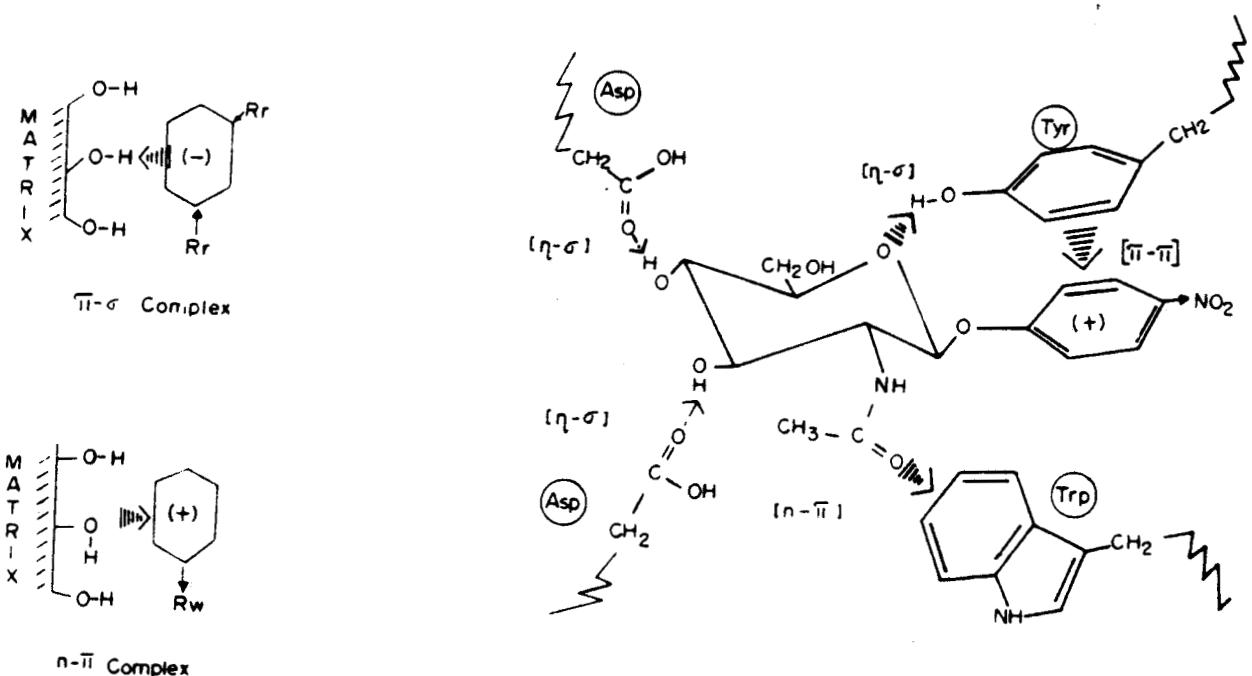


FIGURE 2

Interactions possibles entre les lectines et les résidus saccharidiques
(OCHOA, 1981)

Les lectines sont souvent des métalloprotéines (LIS et SHARON, 1981), dont la fixation avec les glycannes peut exiger la présence de cations divalents tels que Mn^{++} , Mg^{++} , Ca^{++} (LONNERDAL *et al.*, 1983).

C) Rôle biologique

Bien que les lectines aient été étudiées depuis de nombreuses années, leurs fonctions biologiques sont peu connues. Les lectines ont été tout d'abord isolées à partir de plantes, et si leur situation n'a pas été déterminée, quelques hypothèses concernant leur rôle et leur origine ont été avancées, en particulier :

- Elles seraient un agent protecteur contre les phytopathogènes (MIRELMAN *et al.*, 1975 ; SEQUEIRA, 1978).
- Elles interviendraient dans le transport et la réserve des sucres (KAUSS et ZIEGLER, 1974).
- Elles seraient un récepteur des bactéries fixant l'azote (BOHLOOL et SCHMIDT, 1976 ; DAZZO *et al.*, 1978 ; CALVERT *et al.*, 1978).
- Ce seraient des enzymes qui auraient perdu leur fonction catalytique.
- Elles joueraient un rôle dans la régulation de la croissance et de l'elongation (BOWLES *et al.*, 1976 ; KAUSS et BOWLES, 1976).

La mise en évidence des lectines sur la surface cellulaire des eucaryotes a ouvert un champ d'investigation dans l'étude des interactions cellulaires mettant en jeu des glycoconjugués (MONSIGNY *et al.*, 1979). La coopération cellulaire, les processus de mitogénèse induits par les lectines et la migration des cellules lors de l'embryogénèse, sont-ils liés à des interactions de type lectines membranaires glycoconjuguées ? Un certain nombre d'éléments de réponse ont été apportés par différents auteurs (SIMPSON *et al.*, 1977 ; MONSIGNY *et al.*, 1983 ; ZANETTA *et al.*, 1984 ; BARONDES, 1981).

1) Coopération cellulaire

Parmi les principaux travaux ayant mis en évidence le rôle biologique des lectines, il convient de citer ceux effectués sur les myxomycètes *Dictyostelium discoideum* et *Polysphondylillum pallidum* qui peuvent s'agréger pour former un *pseudoplasmodium*, lorsque le milieu est pauvre en éléments nutritifs. Ce phénomène fut utilisé par ROSEN *et al.* (1973) pour mettre en évidence différents états de différentiation de ces organismes par des tests d'agglutination. FRAZIER *et al.* (1975) ont mis en évidence deux lectines (*discoïdine I* et *II*) à la surface membranaire de *Dictyostelium discoideum*, apparaissant à des stades différents du cycle cellulaire, et plusieurs pallidines dans le cas de *Polysphondylillum pallidum*. Les travaux de ROSEN et BARONDES (1977), ainsi que ceux de GREMO *et al.* (1978) ont montré que des mutants ne possédant pas les lectines sont incapables de s'agréger, mais peuvent acquérir cette capacité par addition de souche sauvage, indiquant ainsi qu'ils sont pourvus du récepteur de la lectine.

2) Stimulation mitogénique

Un autre effet des lectines est la stimulation de la division des lymphocytes (NOWELL, 1960). La fixation de certaines lectines provoque des modifications structurales et métaboliques qui constituent le ou les signaux de la mitogénèse. En effet, après fixation sur une partie de la population lymphocytaire T, les cellules vont produire un facteur de croissance : le T Cell Growth Factor (TCGF ou interleukine) (MORGAN *et al.*, 1976). Cette molécule va reconnaître des récepteurs spécifiques sur la membrane des lymphocytes T, et induire la mitogénèse en présence de transferrine (NECKERS et COSSMAN, 1983). Le rôle de la transferrine, qui pénètre dans la cellule et celui du fer qu'elle transporte, n'est d'ailleurs pas élucidé. La transferrine est une glycoprotéine et sa pénétration dans la cellule résulte d'un phénomène d'endocytose, probablement lié à la présence de lectines membranaires à la surface du lymphocyte.

De même, un effet cytotoxique a été observé au niveau de certaines lignées cellulaires (SITKOWSKY *et al.*, 1982). Les lectines sont aussi capables de révéler certaines pathologies : tumeurs coliques (PAULIE *et al.*, 1983), malaria (JUNGERY *et al.*, 1983), sarcome des cellules endothéliales (MARKKU MIETTINEN *et al.*, 1983).

3) Lectines considérées comme réactifs des glycoconjugués

Par leur propriété de reconnaître spécifiquement certains sucres, les lectines constituent un outil précieux dans l'étude des glycoconjugués. Les principaux domaines d'application sont :

- l'étude des migrations cellulaires
- l'adhésion cellulaire
- l'étude du transport membranaire
- la mise en évidence des glycoconjugués
- la purification des glycoconjugués
- l'étude de la structure des glycoconjugués.

Ces dernières années, plusieurs méthodes de visualisation cytochimiques des glycoconjugués membranaires se sont développées grâce à différents marquages par des lectines modifiées.

- lectines couplées à des ligands fluorescents (LOOR, 1973 a et b)
- lectines couplées à la peroxydase (GRAHAM et KARNOVSKY, 1966), glucose oxydase (FRANCOIS et MONGIAT, 1977).
- lectines marquées par l'iode 125 ou le tritium (revue SHARON et LIS, 1975).
- lectines couplées à la ferritine (NICOLSON et SINGER, 1971).
- lectines couplées à l'or colloïdal (ROTH et BINDER, 1978).

Les nombreux travaux de purification et de caractérisation des lectines (revue LIS et SHARON, 1981) ont ouvert de nouvelles voies dans l'identification des structures glycanniques (GOLDSTEIN et HAYES, 1978). En effet, les lectines sont non seulement capables de reconnaître un monosaccharide, mais il semble que l'environnement glucidique modifie les interactions de la lectine avec les monosaccharides spécifiques. Cette propriété permet ainsi d'avoir une idée de la structure polysaccharidique (BAENZIGER et FIETE, 1979 ; DEBRAY *et al.*, 1981 ; CUMMINGS et KORNFELD, 1982).

Si les lectines permettent de connaître des motifs saccharidiques, elles ne constituent pas un outil suffisant pour déterminer l'intégralité de la chaîne glycannique. Dans l'analyse des glycannes, la méthylation s'est avérée l'une des plus importantes méthodes (LINDBERG, 1972). Basée sur la méthylation rapide et totale des glycannes solubilisées dans le diméthylsulfoxyde, cette technique a permis l'identification de nombreuses structures polysaccharidiques. Les problèmes rencontrés dans son application sont essentiellement d'une part l'obtention d'une méthylation totale, et d'autre part l'identification et le dosage des dérivés méthylés libérés après hydrolyse du glycanne méthylé. Plus récemment, le développement de la spectrométrie en résonance magnétique nucléaire (RMN) permet actuellement des déterminations rapides et précises. Une technique d'analyse basée sur la perméthylation des structures glycanniques et sur la RMN s'avère être un outil précieux dans l'étude des structures glycanniques (DORLAND *et al.*, 1977).

Malgré l'évolution de ce type d'appareillage, qui devient de plus en plus résolutif, les quantités de produits purifiés, nécessaires à l'étude, restent relativement importantes.

L'hydrolyse enzymatique séquentielle des résidus saccharidiques peut aussi constituer un moyen d'étude d'une structure glycannique. Le progrès de méthodes de purification des macromolécules, a permis l'isolement de glycosidases spécifiques. Ainsi, par la propriété des substances, il peut être envisagé l'approche indirecte des structures glycanniques (KOBATA, 1979).

VI - LES GLYCOSIDASES

Ce sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des structures glycanniques des glycoconjugués. De nature glycoprotéique, ils sont localisés principalement au niveau des lysosomes. On les rencontre également dans le milieu extracellulaire et dans les membranes plasmiques. Selon leur mode d'action, on distingue deux classes de glycosidases (KOBATA, 1979) :

- les exoglycosidases
- les endoglycosidases

A) Les exoglycosidases

Les exoglycosidases hydrolysent spécifiquement les liaisons osidiques externes d'une structure polysaccharidique. Dans notre étude, nous avons principalement utilisé :

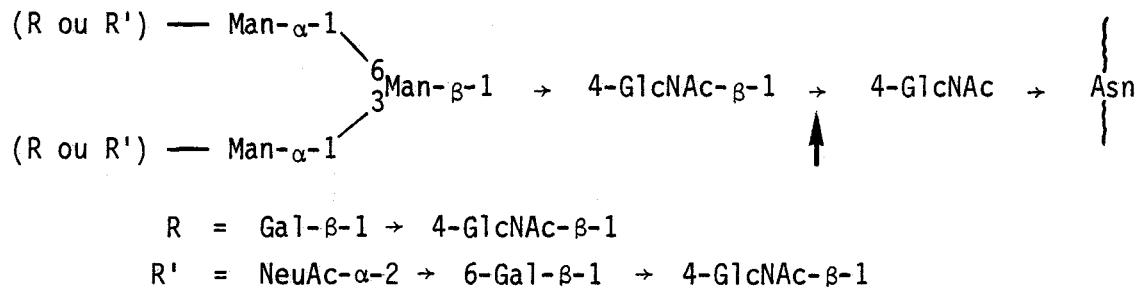
- la β -galactosidase (E.C. 3.2.1.23) est isolée à partir du haricot (LI et LI, 1973, a) d'*Aspergillus niger* (BAHL et AGRAWAL, 1973), de *Diplococcus pneumoniae* (HUGUES et JEANLOZ, 1964) ou d'*Escherichia coli* (WALLENFELS et WEIL, 1972). Elle hydrolyse les galactoses terminaux d'une structure β -D-galactopyranoside.
- l' α -fucosidase (E.C. 3.2.1.51) isolée à partir de *Clostridium perfringens* (AMINOFF, 1973), de *Turbo cornutus* (IIJIMA et al., 1971) ou d'*Aspergillus niger* (BAHL, 1973) catalyse la libération des fucoses terminaux liés en $\alpha(1-2)$.
- la neuraminidase (E.C. 3.2.1.18) de *Clostridium perfringens* (CASSIDY et al., 1965) ou de *Arthrobacter ureafaciens* (UCHIDA et al., 1974), hydrolyse les acides neuraminiques liés en $\alpha(2-3)$ à un galactose.
- la β -N-acétylglucosaminidase (E.C. 3.2.1.30) de l'oviducte de poule (TARENTINO et al., 1973), ou de *Clostridium perfringens* (Mc GUIRE et al., 1973) libère les résidus N-acétylglucosamine terminaux d'une chaîne polysaccharidique.
- l' α -mannosidase (E.C. 3.2.1.24) d'*Aspergillus niger* (SWAMINATHAN et al., 1972) ou de haricot (LI et LI, 1973, b) hydrolyse les liaisons terminales de type α -D-mannopyranoside.

Il existe d'autres exoglycosidases qui peuvent être aussi utilisées pour l'étude des structures polysaccharidiques : l' α -galactosidase (E.C. 3.2.1.22) ; la β -mannosidase (E.C. 3.2.1.25).

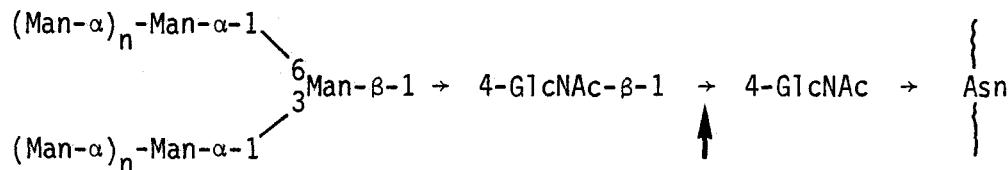
B) Les endoglycosidases

Les endoglycosidases peuvent reconnaître et hydrolyser des liaisons osidiques internes d'un polysaccharide. Les endoglycosidases sont classées selon leur spécificité. On distingue :

- l'endo- β -N-acétylglucosaminidase (E.C. 3.2.1.96), extraite de *Diplococcus pneumoniae* (MURAMATSU, 1971), hydrolyse des structures glycanniques de type complexe, telles que celles des IgG bovines, de la transferrine ou de l'unité β de la thyroglobuline (KOIDE et MURAMATSU, 1974).

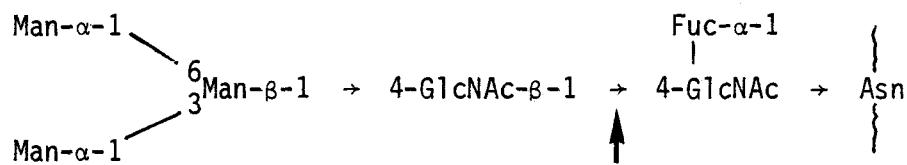


- l'endo- β -N-acétylglucosaminidase H purifiée à partir de *Streptomyces grisens* (TARENTINO et MALEY, 1974) reconnaît les structures de type oligomannosidique et hydrolyse les liaisons osidiques du di-N-acétyl-chitobiose lié à l'asparagine.

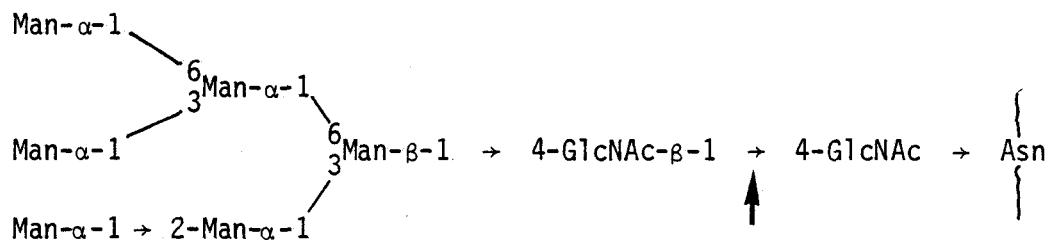


- l'endo- β -N-acétylglucosaminidase C_I et C_{II}, toutes deux extraites de *Clostridium perfringens* (ITO et al., 1975) de la figure (OGATA et al., 1977 ; CHIEN et al., 1977) ou de l'oviducte de poule (TARENTINO et MALEY, 1978), reconnaissent et hydrolysent des structures de N-acétyl-chitobiose lié à l'asparagine (KOBATA, 1979).

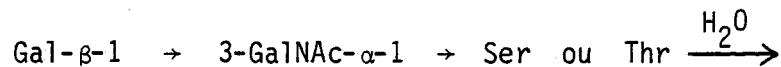
Endoglycosidase C_I



Endoglycosidase C_{II}

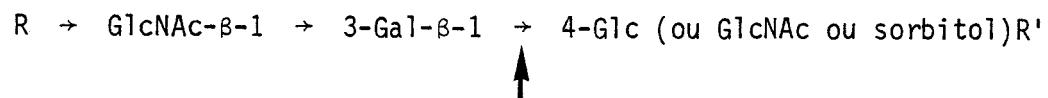


- l'endo- α -N-acétylgalactosaminidase (E.C. 3.2.1.97), isolée à partir de *Diplococcus pneumoniae* (ENDO et KOBATA, 1976 ; UMEMOTO *et al.*, 1977), hydrolyse les réactions de type :



- l'endo- β -galactosidase, extraite de *Diplococcus pneumoniae* (TAKASAKI et KOBATA, 1976), hydrolyse les liaisons de type β -galactosidase des glycannes responsables des groupes sanguins A et B, avec respectivement libération de $\text{GalNAc-}\alpha\text{-1} \rightarrow 3(\text{Fuc-}\alpha\text{-1} \rightarrow 2)\text{Gal}$ et $\text{Gal-}\alpha\text{-1} \rightarrow 3(\text{Fuc-}\alpha\text{-1} \rightarrow 2)\text{Gal}$ (TAKASAKI et KOBATA, 1976).

- l'endo- β -galactosidase d'*Escherichia freundii* hydrolyse spécifiquement les liaisons β -galactosidiques des résidus galactosyls des glycoconjugués de type (FUKUDA *et al.*, 1979, a et b) :



- l'endo- β -N-acétylglucosaminidase F, récemment isolée à partir de *Flavobacterium meningosepticum*, hydrolyse les structures glycanniques de type oligomannosidique et N-acétyllactosaminique, sans altération du glycanne libéré (ELDER et ALEXANDER, 1982).

Dans l'introduction de ce mémoire, nous avons évoqué les principales fonctions de l'acétylcholinestérase, et celles supposées de la 5'nucléotidase. Nous avons choisi ces enzymes, non seulement pour leur(s) rôle(s) biologique(s), mais aussi à cause de leur présence dans les membranes plasmiques des différents tissus. Cette distribution tissulaire, nous permet donc d'envisager une étude comparative de ces deux molécules, et ceci dans le but de déterminer des propriétés ou des structures spécifiques liées aux différents tissus bovins. L'importance des glycannes dans les phénomènes biologiques, nous a conduits à porter plus précisément notre attention sur la copule glucidique de ces deux enzymes.

Les quantités de 5'nucléotidase et d'acétylcholinestérase liées aux membranes plasmiques étant relativement faibles et variables d'un tissu à l'autre, il ne nous est actuellement pas possible d'effectuer l'étude des glycannes par des méthodes de détermination plus précises (RMN). En effet, l'obtention de 5'nucléotidase et d'acétylcholinestérase en concentrations suffisantes, se heurte à un problème de méthodologie que nous évoquerons dans notre mémoire. C'est ainsi que dans notre expérimentation, nous nous sommes basés sur la propriété qu'ont les lectines de reconnaître spécifiquement des structures saccharidiques. Dans le but de préciser la nature du glycanne, nous avons utilisé le pouvoir catalytique des glycosidases afin d'effectuer des hydrolyses séquentielles des structures polysaccharidiques. Cette approche a pour principal objectif de définir si :

- 1) Deux glycoprotéines enzymatiques liées à une même membrane plasmique, possèdent une structure glycannique identique ?
- 2) Cette structure intervient-elle dans les propriétés catalytiques de ces enzymes ?
- 3) Le glycanne de ces enzymes diffère d'un tissu à l'autre.

4) Sa nature intervient dans la réactivité vis-à-vis
d'anticorps spécifiques (anti 5'nucléotidase ou anti-acétylcholinestérase).

Chaque chapitre commence par un bref exposé des résultats,
qui sont ensuite détaillés dans une publication.

B I B L I O G R A P H I E

- ACHORD, D.T., BROT, F.F., BELL, C.E. and SLY, W.S. (1978) Cell., 15, 269.
- ALLEN, A.K., NEUBERGER, A. and SHARON, N. (1973) Biochem. J., 129, 847.
- ALLES, G.A. and HAWES, R.C. (1940) J. Biol. Chem., 133, 375.
- AMINOFF, D. (1973) in Methods in Enzymology (Ginsburg V. Ed.) vol. 28, p. 763, Academic Press New-York.
- ANGLISTER, L., ROGOZINSKY, S. and SILMAN, I. (1976) FEBS Lett., 69, 129.
- ARON, M. and GRASSE, P. (1966) Précis de biologie animale, Masson et Cie, Paris.
- ASHWELL, G. and MORELL, A.G. (1971) in Glycoproteins of blood cells and plasma. (JAMIESON, G.A. and GREENWALT, T.J. ed.) LIPPINCOTT J.B. Co, Philadelphia, p. 173.
- ASHWELL, G. and MORELL, A.G. (1974) in Adv. Enzymol., MEISTER, A. ed. John WILEY, New-York, p. 99.
- ASHWELL, G. and MORELL, A.G. (1977) Trends Biochem. Sci., 2, 76.
- ASHWELL, G. and HARFORD, J. (1982) Ann. Rev. Biochem., 51, 534.
- AUB, J.C., SANFORD, B.H. and COTE, H.N. (1965) Proc. Nat. Acad. Sci. US, 54, 396.
- AUBRY, J., ZACHOWSKI, A. and PARAF, A. (1977) Protides of the Biological Fluids, 25th Colloquium (M. Peeters ed.) Pergamon Press, Oxford, p 723.
- AUGUSTINSSON, K.B. and NACHMANSON, D. (1949) Science, 110, 98.
- BACOU, F., VIGNERON, P. and MASSOULIE, J. (1982) Nature, 296, 661.

- BAENZIGER, J. and FIETE, D. (1979) J. Biol. Chem., 254, 2400.
- BAHL, O.P. (1973) in Methods in Enzymology, vol. 28, p. 738.
- BAHL, O.P. and AGRAWAL, K.M.L. (1973) in Methods in Enzymology, (Ginsburg V. ed.) vol. 28, p. 728.
- BANIK, N.L. and DAVISON, A.N. (1969) Biochem. J., 115, 1051.
- BARNARD, E.A., LYLES, J.M., SILMAN, I., JEDRZEJEZYK, J. and BARNARD, P.J. (1982) Reprod. Nutr. Dev., 22, 261.
- BARONDES, S.H. (1981) Ann. Rev. Biochem., 50, 207.
- BENEDETTI, E.L. and DELBAUFFE, D. (1971) in Cell Membranes (ed. G.W. Richter and D.G. Scarpelli), Williams and Wilkins, p. 54.
- BERNE, R.M., RUBIO, R., DOBSON, J.G. and CURNISH, R.R. (1971) R.R. Circ. Res., 28-29, suppl. 1, p. 115.
- BLYTHMAN, M.E., CASELLAS, P., GROS, O., GROS, P., JANSEN, F.K., PAOLUCCI, F., PAU, B. and VIDAL, M. (1981) Nature, 290, 145.
- BOHLOOL, B.B. and SCHMIDT, E.L. (1976) J. Bacteriol., 125, 1188.
- BON, S. and MASSOULIE, J. (1976) FEBS Lett., 71, 273.
- BON, S., CARTAUD, J. and MASSOULIE, J. (1978) Eur. J. Biochem., 85, 1.
- BON, S. and MASSOULIE, J. (1978) Eur. J. Biochem., 89, 89.
- BOUCHARD, P., MOUROUX, Y., TIXIER, R., PRIVAT, J.P. and MONSIGNY, M. (1976) Biochimie, 58, 1247.
- BOWLES, D.J., SCHNARRENBERGER, O. and KAUS, H. (1976) Biochem. J., 160, 375.

- BOYD, W.C. and SHAPLEIGH, E. (1954) *Science*, 119, 419.
- BURGER, M.M. (1973) *Fed. Proc.*, 32, 91.
- BURGER, M.M. and LOWENSTEIN, J.M. (1975) *Biochemistry*, 14, 2362.
- CALVERT, H.E., LALONDE, M., BHUVANESWARI, T.V. and BAUER, W.D. (1978) *Scand. J. Microbiol.*, 24, 785.
- CARSON, D.A. and SEEGMILLER, S.E. (1976) *J. Clin. Invest.*, 57, 274.
- CARSON, S., BON, S., VIGNY, M., MASSOULIE, J. and FARDEAU, M. (1979) *FEBS Lett.*, 97, 348.
- CASSIDY, J.T., JOURDIAN, G.W. and ROSENMAN, S. (1965) *J. Biol. Chem.*, 240, 3501.
- CHANDRA, R.K. and KUTTY, K.M. (1975) *Experientia*, vol. 31, p. 858.
- CHANGEUX, J.P. (1966) *Mol. Pharmacol.*, 2, 369.
- CHANGEUX, J.P. (1981) *Harvey Lecture*, 75, 85.
- CHIEN, S.F., WEINBURG, R., LI, S.C. and LI, Y.T. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 76, 317.
- CUMMINGS, R.D. and KORNFELD, S. (1982) *J. Biol. Chem.*, 257, 11235.
- DALE, H.H. (1914) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 6, 147.
- DALY, J.W. (1976) *Life Sci.*, 18, 1349.
- DAZZO, F.B., YANKE, W.E. and BRILL, W.J. (1978) *Biochim. Biophys. Acta*, 539, 276.

- DEBRAY, H., DECOUT, D., STRECKER, G., SPIK, G. and MONTREUIL, J. (1981) *Eur. J. Biochem.*, 117, 41.
- DE PETRIS, S. (1975) *J. Cell. Biol.*, 65, 123.
- DE PIERRE, J.W. and KARNOVSKY, M.L. (1974) *J. Biol. Chem.*, 249, 7111.
- DORLAND, L., HAVERKAMP, J., SCHUT, B.L., VLIEGENTHART, J.F.C., SPIK, G., STRECKER, G., FOURNET, B. and MONTREUIL, J. (1977) *FEBS Lett.*, 77, 15.
- DORNAND, J., REMINIAC, C. and MANI, J.C. (1977) *Biochimie*, 59, 425.
- DORNAND, J., BONNAFOUS, J.C. and MANI, J.C. (1978) *Eur. J. Biochem.*, 87, 459.
- ELDER, J.H. and ALEXANDER, S. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79, 4540.
- EMMELOT, P., BOS, C.S., BENEDETTI, E.L. and RUMKE, P. (1964) *Biochim. Biophys. Acta*, 90, 126.
- ENDO, Y. and KOBATA, A. (1976) *J. Biochem.*, 80, 1.
- EVANS, W.M. and GURD, J.W. (1973) *Biochem. J.*, 133, 189.
- EYLAR, H. (1965) *J. Theoret. Biol.*, 10, 89.
- FARQUHAR, M.G., BERGERON, J.J.M. and PALADE, G.E. (1974) *J. Cell. Biol.*, 60, 8.
- FISHER, D., VAN DER WEYDEN, M.B., SNYDERMAN, R. and KELLEY, W.N. (1976) *J. Clin. Invest.*, 58, 399.
- FLEIT, H.M., CONKLYN, R.D., STEBBINS, R. and SILBER, R. (1975) *J. Biol. Chem.*, 250, 8889.

- FOURNET, B., MONTREUIL, J., STRECKER, G., DORLAND, L., HAVERKAMP, J., VLIEGENTART, J.F.G., SCHIMD, K. and BINETTE, J.P. (1977) Biochemistry, 17, 5206.
- FRANCOIS, D. and MONGIAT, F. (1977) J. Ultrastruct. Res., 59, 119.
- FRAZIER, W.A., ROSEN, S.D., REITHERMAN, R.W. and BARONDES, S.H. (1975) J. Biol. Chem., 250, 7714.
- FUKUDA, M., FUKUDA, M.N. and HAKAMORI, S. (1979) J. Biol. Chem., 254, 3700.
- FUKUDA, M.N., FUKUDA, M. and HAKAMORI, S. (1979) J. Biol. Chem., 254, 5458.
- GAHMBERG, C.G. and ANDERSON, L.C. (1982) Biochim. Biophys. Acta., 651, 65.
- GALBRAITH, D.A. and WATTS, D.C. (1981) Biochem. J., 195, 221.
- GEISNER, B.M. and GINSBURG, N. (1964) Proc. Natl. Acad. Sci., US, 52, 750.
- GISIGER, V. and STEPHENS, H.R. (1983) J. Neur. Chem., 41, 919.
- GOLD, P. and FREEDMAN, S.O. (1965) J. Exp. Med., 102, 467.
- GOLD, P. (1971) Prog. Exp. Tumor. Res., 14, 43.
- GOLDSTEIN, I.J. and HAYES, C.E. (1978) Adv. Carbohyd. Chem. Biochem., 35, 127.
- GOLDSTEIN, I.J., HUGHES, R.C., MONSIGNY, M.M., OSAWA, T. and SHARON, N. (1980) Nature, 285, 66.
- GRAHAM, R.C. and KARNOVSKY, M.J. (1966) J. Histochem. Cytochem., 14, 291.
- GRASSI, J., VIGNY, M. and MASSOULIE, J. (1982) J. Neur. Chem., 39, 457.

- GREMO, F., KOBILER, D. and BARONDES, S.H. (1978) J. Cell. Biol., 79, 491.
- GROSSMAN, H. and LIEFLANDER, M. (1979) Naturforsch Teil C 34, 721.
- GURD, J.W. (1976) J. Neurochem., 27, 1257.
- GURD, J.W. and EVANS, W.H. (1974) Arch. Biochem. Biophys., 164, 305.
- HAKOMORI, S.I. and JEANLOZ, R.W. (1964) J. Biol. Chem., 239, 3606.
- HAKOMORI, S.I., STELLNER, K. and WATANABE, K. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun., 49, 1061.
- HALL, Z. (1973) J. Neurobiol., 4, 343.
- HARB, J., MEFLAH, K., DUFLOS, Y. and BERNARD, S. (1983) Eur. J. Biochem., 137, 131.
- HERLYN, M.F. and KOPROWSKY, H. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. US, 79, 4761.
- HOLMGREN, J., LONNROTH, I. and SWENNERHOLM, L. (1973) Scand. J. Infect. Dis., 5, 77.
- HUGUES, R.C. (a) (1976) in Membrane glycoproteins : a review of structure and function, p. 269. Butterworth and Co Ltd, London.
- HUGUES, R.C. (b) (1976) in Membrane glycoproteins : a review of structure and function, p. 114 and 152. Butterworth and Co Ltd, London.
- HUGUES, R.C. and JEANLOZ, R.W. (1964) Biochemistry, 3, 1535.
- IIJIMA, Y., MURAMATSU, T. and EGAMI, F. (1971) Arch. Biochem. Biophys., 145, 50.
- IPATA, P.L. (1968) Biochemistry, 7, 507.

- ITO, S., MURAMATSU, T. and KOBATA, A. (1975) Arch. Biochem. Biophys., 171, 78.
- ITO, S., YAMASHITA, K., SPIRO, R.G. and KOBATA, A. (1977) J. Biol. Chem., 81, 1621.
- JUNGERY, M., BOYLE, D., PATEL, T., PASVOL, G. and WEATHERALL, D.J. (1983) Nature, 301, 704.
- KATO, A.C., VRACHLIOTIS, A., FULPIUS, B. and DUNANT, Y. (1980) Devl. Biol., 76, 222.
- KAUSS, H. and BOWLES, D.J. (1976) Planta, 130, 169.
- KAUSS, H. and ZIEGLER, H. (1974) Planta, 121, 197.
- KAWASAKI, T., ETOH, R. and YAMASHITA, I. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun., 81, 1018.
- KOBATA, A. (1979) Anal. Biochem., 100, 1.
- KOIDE, N. and MURAMATSU, T. (1974) J. Biol. Chem., 249, 4897.
- KONDO, T., FUKUDA, M. and OSAWA, T. (1977) Carbohydr., 58, 405.
- KUTTY, K.M., CHANDRA, R.K. and CHANDRA, S. (1976) Experientia, 32, 289.
- LAZAR, M. and VIGNY, M. (1980) J. Neurochem., 35, 1067.
- LELIEVRE, L., ZACHOWSKY, A., MAGET-DANA, R., AUBRY, J. and JONKMAN-BARK, G. (1977) Eur. J. Biochem., 80, 185.
- LI, Y.T. and LI, S.C. (a) (1973) in Methods in Enzymology, (Ginsburg V. ed.) vol. 28, p. 714. Academic Press New-York.

- LI, Y.T. and LI, S.C. (b) (1973) in Methods in Enzymology, (Ginsburg V. ed.) vol. 28, p. 699. Academic Press New-York.
- LINDBERG, B. (1972) in Methods in Enzymology, (Ginsburg V. ed.) vol. 28 B, P. 178. Academic Press New-York.
- LIS, H. and SHARON, N. (1981) J. Chromatogr., 215, 361.
- LITTLE, J.S. and WIDNELL, C.C. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 4013.
- LOH, Y.P. and GAINER, H. (1978) FEBS Lett., 96, 269.
- LONNERDAL, B., BORREBAECK, C.A.K., ETZLER, M.E. and ERSSON, B. (1983) Biochem. Biophys. Res. Commun., 115, 1069.
- LOOR, F. (1973) Exp. Cell. Res., 82, 415.
- LOTAN, R., LIS, H., ROSENWASSER, A., NOVOGRODSKY, A. and SHARON, N. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun., 55, 1347.
- LWEBUGA-MUSAKA, J.S., LAPPI, S. and TAYLOR, P. (1976) Biochemistry, 15, 1425.
- MAC GUIRE, E.J., CHIPOWSKY, S. and ROSEMAN, S. (1973) in Methods in Enzymology, (Ginsburg V. ed) vol. 28, p. 755. Academic Press New-York.
- MAC-MAHAN, U.J., SANES, J.R. and MARSHALL, L.M. (1978) Nature, 271, 172.
- MARKU MIETTINEN, M.D., HARRYHOLTHOFER, M.D., VELI-PERKA LEHTO, M.D., ARROMIETTINEN, M.D. and ISMO VIRTANIEN, M.D. (1983) Amer. J. of Clin. Pathol., 79, 32.
- MASSOULIE, J., BON, S. and VIGNY, M. (1980) Neurochemistry International, 2, 161.

- MASSOULIE, J. and BON, S. (1982) Ann. Rev. Neurosci., 5, 57.
- MASSOULIE, J. and RIEGER, F. (1969) Eur. J. Biochem., 11, 441.
- MENDEL, B. and RUDNEY, H. (1943) Biochem., 37, 473.
- MILLER, F. (1972) Immunochemistry, 9, 217.
- MIRELMAN, M., GALUN, E., SHARON, N. and LOTAN, R. (1975) Nature, 256, 414.
- MONSIGNY, M., KIEDA, C. and ROCHE, A.C. (1979) Biol. Cell., 35, 289.
- MONSIGNY, M., KIEDA, C. and ROCHE, A.C. (1983) Biol. Cell., 47, 95.
- MONTREUIL, J. (1975) Proc. VIIth Intern. Symp. Carbohydr. Chem., Bratislava, 1974, Pure and Appl. Chem., 42, 431.
- MONTREUIL, J. (1980) Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 37, 157.
- MORGAN, D.A., FRUSCETTI, F.W. and GALLO, R. (1976) Science, 193, 1007.
- MURAMATSU, T. (1971) J. Biol. Chem., 246, 5535.
- NACHMANSOHN, D. (1955) Harvey Lecture, 49.
- NACHMANSOHN, D. and LEDERER, E. (1939) Bull. Soc. Chim. Biol., 21, 761.
- NAGATA, Y. and BURGER, M.M. (1972) J. Biol. Chem., 247, 2248.
- NATO, F. and BOURRILLON, R. (1982) J. Cell. Biochem., 18, 245.
- NECKERS, L.M. and COSSMAN, J. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. US., 80, 3494.
- NICOLSON, G.L. and SINGER S.J. (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. US., 68, 942.

- NIDAY, E., WANG, C.J. and ALAUPOVIC, P. (1977) Biochim. Biophys. Acta, 459, 180.
- NOWELL, P. (1960) Cancer Res., 20, 462.
- OGATA, A.M., MURAMATSU, T. and KOBATA, A. (1977) J. Biochem., (Tokyo), 82, 611.
- OTT, P., JENNY, B. and BRODBECK, V. (1975) Eur. J. Biochem., 57, 469.
- PAULIE, S., HANSSON, Y., LUNDBLAD, M.L. and PERLMANN, P. (1983) Int. J. Cancer, 31, 297.
- PHILLIS, J.W. and EDSTROM, J.P. (1976) Life Sci., 19, 1041.
- PRITCHARD, B.G. and TODD, C.W. (1976) Cancer Res., 36, 4699.
- READING, C.L., PENHOET, E.E. and BALLON, C.E. (1978) J. Biol. Chem., 253, 5600.
- REISNER, Y., LINKER-ISRAELI, M. and SHARON, N. (1976) Cell. Immunol., 25, 129.
- RIORDAN, J.R. and SLAVIK, M. (1974) Biochim. Biophys. Acta., 373, 356.
- ROBBINS, P.W. (1979) in Proc. 4th Intern. Symp. Glycoconjugates, Woods Hole, 1977, Acad. Press. New-York, 441.
- ROSEN, S.D. and BARONDES, S.H. (1977) in Specificity of Embryological Interactions (Garrod D.R. ed.), 235. Chapman and Hall, London.
- ROSEN, S.D., KAFKA, J.A., SIMPSON, D.L. and BARONDES, S.H. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. US, 70, 2554.
- ROTH, J. and BINDER, M. (1978) J. Histochem. Cytochem., 26, 163.

- SANDO, G.N. and NEUFELD, E.G. (1977) *Cell*, 12, 619.
- SCHMID, K., NIMBERG, R.B., KIMURA, A., YAMAGUCHI, H. and BINETTE, J.P. (1977) *Biochim. Biophys. Acta*, 492, 291.
- SCHUBERT, P., LEE, K., WEST, M., DEADWYLER, S. and LYNCH, G. (1976) *Nature*, 260, 541.
- SCHWABE, U., EBERT, R., ERBLER, H.C. (1975) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.*, 5, 569.
- SEQUEIRA, L. (1978) *Ann. Rev. Phytopathol.*, 16, 453.
- SHARON, N. and LIS, H. (1975) in *Methods in Membrane Biology*, 3, *Plasma membranes*. Korn E.D. ed., Plenum Press New-York, p. 147.
- SHARON, N. and OFEK, I. (1983) *La Recherche*, 142, 376.
- SHIRLEY, P.S., WANG, P., DECHATELET, L.R. and WAITE, M. (1976) *Biochem. Med.*, 15, 289.
- SHOUVAL, D., SHAFRITZ, D.A., ZURAWSKI, V.R., ISSEL BACHER, K.J. and WANDS, J.R. (1982) *Nature*, 298, 567.
- SILVER, A. (1974) *The biology of cholinesterase*. Neuberger, A. and Tatum, E.L., eds. North Holland Publish Co., Amsterdam.
- SIMPSON, D.L., THORNE, P.R. and LOH, H.H. (1977) *Nature*, 266, 367.
- SINGER, S.J. and NICOLSON, G.L. (1972) *Science*, 175, 720.
- SITKOVSKY, M.V., PASTERNACK, M.S. and EISEN, H.N. (1982) *J. Immunol.*, 129, 1372.

- SLAYTER, H.S. and COLIGAN, J.E. (1976) *Cancer Res.*, 36, 1696.
- SNIDER, M.D. (1984) *Biology of carbohydrates*, vol. 2, Ginsburg V. and Robbins, P.N., (ed. Wiley, J. and son, New-York), in press.
- SPIK, G., BAYARD, B., TOURNET, B., STRECKER, G., BOUQUELET, S. and MONTREUIL, J. (1975) *FEBS Lett.*, 50, 296.
- STAHL, P., SCHLESSINGER, P.M., RODMAN, S.S. and DOEBBER, T. (1976) *Nature*, 264, 86.
- STEDMAN, E. and STEDMAN E. (1935) *Biochem. J.*, 29, 2107.
- STRECKER, G. and MONTREUIL, J. (1979) *Biochimie*, 61, 1199.
- SWAMINATHAN, N., MATTA, K.L. and BAHL, O.P. (1972) in *Methods in enzymology*, Ginsburg V. ed., vol. 28, p. 744, Academic Press New-York.
- TAKASAKI, S. and KOBATA, A. (1976) *J. Biol. Chem.*, 251, 3610.
- TARENTINO, A.L. and MALEY, F. (1974) *J. Biol. Chem.*, 249, 811.
- TARENTINO, A.L. and MALEY, F. (1978) in *Methods in enzymology*, Ginsburg V. ed., vol. 50, p. 580. Academic Press New-York.
- TARENTINO, A.L., PLUMMER, T.H. Jr. and MALEY, F. (1973) *J. Biol. Chem.*, 248, 5547.
- TAYLOR, R.B., DUFFU, P.H., RAFF, M.C. and DE PETRIS, S. (1971) *Nature*, 233, 225.
- TODD, C.W. and SHIVELY, J.E. (1978) *Glycoproteins and glycolipids in Disease Processes*, vol. 80, p. 342.
- UCHIDA, Y., TSUKADA, Y. and SUGIMORI, T. (1974) *Biochim. Biophys. Acta*, 350, 425.

- UMEMOTO, J., BHAVANANDAN, V.P. and DAVIDSON, E.A. (1977) J. Biol. Chem., 252, 8609.
- VAN HEYNINGEN, W.E., CARPENTER, C.C.J., PIERCE, N.F. and GREENOUGH, W.B. (1971) J. Infect. Dis., 124, 415.
- VIGNY, M., KOENIG, J. and RIEGER, F. (1976) J. Neurochem., 27, 1347.
- VIGNY, M., MARTIN, G.R. and GROTENDORST, G.R. (1983) J. Biol. Chem., 258, 8794.
- WALLENFELDS, K. and WEIL, R. (1972) in the Enzymes, Boyer, P.D. ed., vol. 7, p. 618, Academic Press New-York.
- WATKINS, W.M. (1972) Blood group specific substances : In glycoproteins. Their structure and function, Gottschalk, A. ed. Elsevier, Amsterdam, p. 830.
- WOLFF, J. and COOK, G.M. (1977) J. Biol. Chem., 252, 687.
- YAGIL, E. and BEACHAM, I.F. (1975) J. Bacteriol., 121, 401.
- YAMADA, K.M. and OLDEN, K. (1978) Nature, 275, 179.
- YAMASHITA, K., TACHIBANA, Y. and KOBATA, A. (1978) J. Biol. Chem., 253, 3862.
- ZACHOWSKI, A., LELIEVRE, L., AUBRY, J., CHARLEMAGNE, D. and PARAF, A. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci., 74, 633.
- ZACHOWSKI, A., SIMONIN, G., AUBRY, G., POMMIER, C., SINGH, S.H., POTTER, M. and PARAF, A. (1981) J. Receptor Res., 2, 97.
- ZANETTA, J.P., RACKONCZAY, Z., REEBER, A., KASA, P. and VINCENDON, G. (1981) FEBS Lett., 129, 293.
- ZANETTA, J.P., REEBER, E.E., DONTENWILL, M. and VINCENDON, G. (1984) J. Neurochem., 42, 334.

CHAPITRE I

MISE EN EVIDENCE D'UNE HETEROGENEITE DE LA STRUCTURE GLYCANNIQUE
DE LA 5'NUCLEOTIDASE ET DE L'ACETYLCHOLINESTERASE
DES MEMBRANES DE DIFFERENTS TISSUS

Dans ce chapitre, nous avons étudié de manière comparative l'interaction des lectines avec la 5'nucléotidase et l'acétylcholinestérase membranaires de différents tissus bovins (lymphocyte, érythrocyte, foie, muscle strié, ganglion cervical supérieur, noyau caudé). Nous avons, tout d'abord, déterminé les constantes cinétiques de ces enzymes. Puis, par ultracentrifugation en gradient de saccharose, nous avons caractérisé les formes moléculaires de l'acétylcholinestérase membranaire. Par ailleurs, nous avons étudié l'influence de certaines lectines sur les propriétés catalytiques de la 5'nucléotidase et de l'acétylcholinestérase. Nous avons cherché à préciser la structure glycoprotéique de ces deux enzymes en utilisant la chromatographie d'affinité sur colonnes de lectines immobilisées, et le traitement par les glycosidases. A partir de ces données, nous mettons en évidence une spécificité tissulaire de la structure glycannique de la 5'nucléotidase et de l'acétylcholinestérase des membranes plasmiques.

I - LA 5'NUCLEOTIDASE

A) Constantes cinétiques

L'activité 5'nucléotidase varie selon l'origine des membranes plasmiques : par exemple, elle est élevée dans les membranes hépatocytaires mais relativement faible dans celles des synaptosomes de noyau caudé. Dans les tissus où il existe, l'enzyme présente, semble-t-il, la même affinité pour son substrat, le 5'AMP. Nous n'avons détecté aucune activité 5'AMPasique, dans les membranes érythrocytaires (Tableau I).

B) Effet des lectines

La Con A inhibe avec la même efficacité l'activité 5'nucléotidase des différents tissus bovins que nous avons étudiés, comme cela a déjà été observé chez d'autres espèces (RIORDAN et SLAVIK, 1974). La Con A immobilisée sur des billes d'agarose fixe la 5'nucléotidase de quelque origine membranaire qu'elle soit, et l'élution est obtenue par l' α -méthylmannose (100 mM).

Cependant, les interactions de l'enzyme avec d'autres lectines, de spécificités différentes, varient selon le tissu. Le tableau II récapitule

Tableau I : Constantes cinétiques de la 5'nucléotidase des membranes plasmiques des différents tissus bovins.

5' nucléotidase membranaire	lymphocyte	foie	noyau caudé	muscle digestif	ganglion cervical supérieur	érythrocyte
Activité spécifique ($\mu\text{mol}/\text{mn}/\text{mg}$)	0,26	0,30	0,04	0,06	0,05	0
K_m (μM)	110	135	100	92	104	-

Tableau II : Interaction des lectines avec la 5'nucléotidase des membranes plasmiques de différents tissus.

LECTINE	L . C . A .		Con A		W . G . A .	
Sucres spécifiques	D-Glucose D-Mannose N-Acétylglucosamine		D-Glucose D-Mannose		Acide neuraminique N-acétylglucosamine	
Membranes	Liaison	inhibition	Liaison	inhibition	Liaison	inhibition
Lymphocytes	+	85%	+	90%	-	-
Foie	+	25%	+	90%	+	50%
Noyau caudé	+	80%	+	85%	+	80%
G.C.S.*	+	74%	+	80%	+	47%
Muscle digastrique	+	70%	+	83%	+	73%

*G.C.S. : ganglion cervical supérieur

l'effet des lectines sur la 5'nucléotidase membranaire des différents tissus bovins. Seul, l'enzyme lymphocytaire n'est pas inhibé par la WGA. L'inhibition observée en présence de lectines est de type apparemment non compétitif ; elle se produit non seulement avec les membranes intactes, mais aussi avec l'enzyme solubilisé en présence de détergents. Le phénomène est réversible en présence de sucres compétiteurs. La chromatographie d'affinité sur lectines immobilisées confirme que l'interaction 5'nucléotidase-lectine résulte d'une interaction directe, impliquant la structure saccharidique de l'enzyme.

Les résultats expérimentaux obtenus nous permettent de proposer un type de structure glycannique de la 5'nucléotidase des membranes plasmiques lymphocytaires. L'enzyme, reconnu par la Con A et par la LCA, et non par la WGA, pourrait avoir une structure glycannique de type oligomannosidique. Cependant, les enzymes membranaires du muscle et du noyau caudé interagissent avec la WGA et ne semblent donc pas présenter une structure comparable à celle de l'enzyme lymphocytaire.

C) Traitements par les glycosidases

1) exoglycosidases

Le traitement des membranes plasmiques lymphocytaires par l' α -D-mannosidase modifie le comportement de la 5'nucléotidase vis-à-vis des lectines. L'activité enzymatique devient moins sensible à la Con A, et il apparaît au contraire une inhibition par la WGA. Cette interaction est confirmée par la chromatographie d'affinité sur WGA Ultrogel. Il semble donc que la glycosidase hydrolyse des résidus α -mannosyls, entraînant ainsi l'apparition d'une structure glycannique résiduelle, capable de fixer la WGA. Ceci est en faveur d'une structure oligomannosidique.

Lorsque les membranes de noyau caudé sont traitées par la neuraminidase, 51% de l'activité 5'nucléotidase est inhibée par la PNA. L'apparition d'une inhibition par la PNA résulte probablement du démasquage par la neuraminidase d'un résidu β -D-galactose inclus dans une structure

N-acétyl-lactosaminique. L'action de la neuraminidase ne modifie pas l'effet inhibiteur de la Con A, alors que celui de la WGA est sensiblement diminué, passant de 80% à 56%.

2) endoglycosidases

Lorsque les membranes de noyau caudé sont traitées par l'endoglycosidase H, qui reconnaît et hydrolyse des structures de type oligomannosidique (VARKI et KORNFELD, 1983), aucune modification de l'interaction de la 5'nucléotidase avec les lectines n'est observée. Cependant, le traitement des membranes lymphocytaires par cette même glycosidase, provoque une sensibilité de la 5'nucléotidase à la WGA (Figure 1). Ces observations confirment que la structure glycannique de la 5'nucléotidase de noyau caudé n'est pas de type oligomannosidique, contrairement à celle de l'enzyme lymphocytaire. Il apparaît donc que le glycanne de la 5'nucléotidase de la membrane plasmique du lymphocyte est bien de type oligomannosidique.

II - L'ACETYLCHOLINESTERASE

A) Constantes cinétiques

La méthode de purification des lymphocytes que nous avons adoptée nous a permis d'obtenir une population cellulaire très purifiée, excluant toute contamination par les érythrocytes. Nous avons ainsi pu mettre en évidence une activité acétylcholinestérase, liée aux membranes plasmiques de lymphocytes de boeuf. L'activité spécifique de l'acétylcholinestérase de différents tissus, et en particulier de différentes préparations membranaires, est très variable. Néanmoins, à l'exception de l'enzyme lymphocytaire, les k_m de ces enzymes sont, semble-t-il, les mêmes (Tableau III).

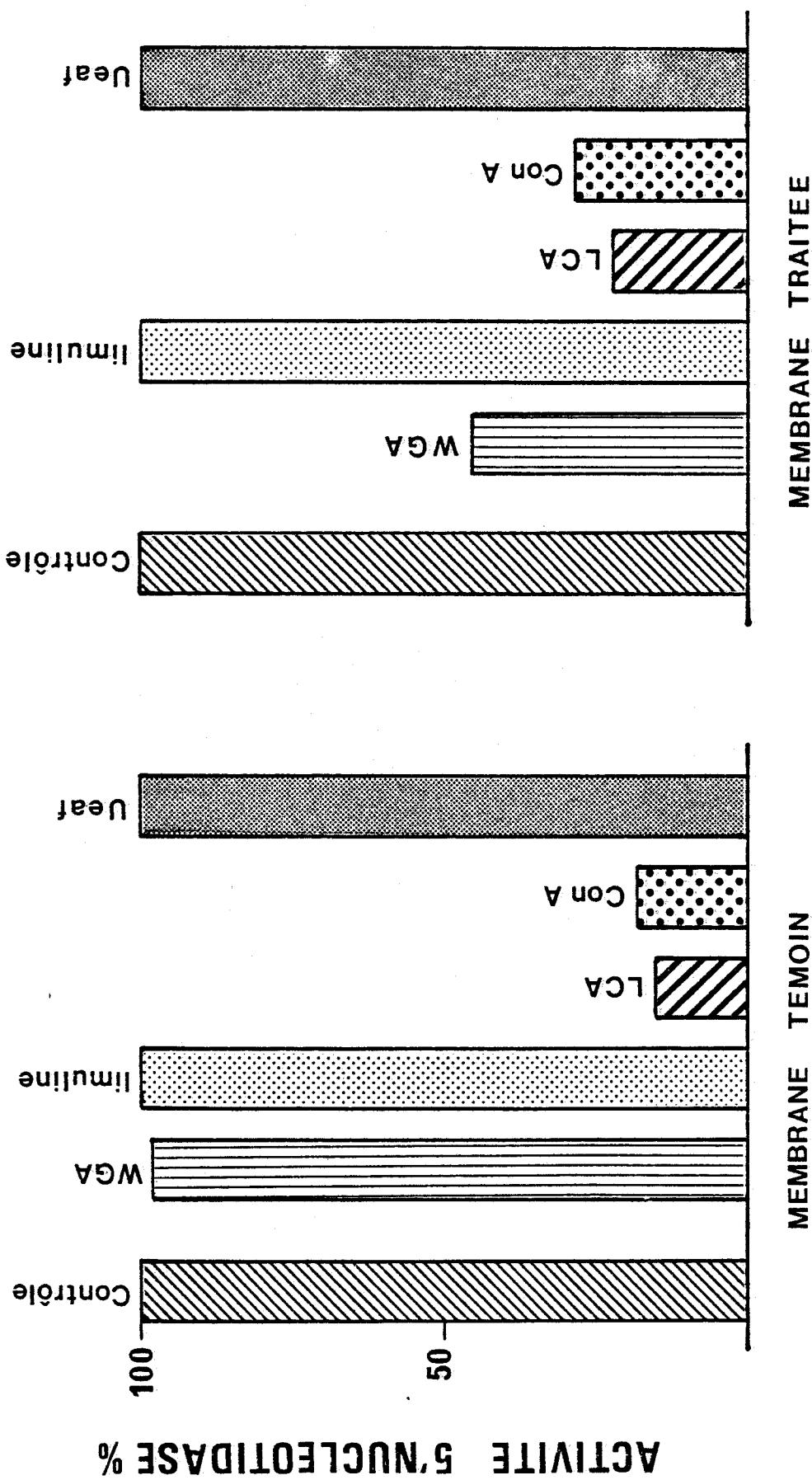


FIGURE 1

Effet des lectines sur l'activité de la 5'nucléotidase des membranes plasmiques des lymphocytes après traitement par l'endoglycosidase H

Tableau III : Constantes cinétiques de l'acétylcholinestérase des membranes plasmiques des différents tissus bovins

Tissus	Lymphocytes	Erythrocytes	Noyau caudé	GCS ^❶	Muscle
activité spécifique nmol/mn/mg de protéines	0,065	1,620	0,69	0,35	0,012
Km (mM)	0,35	0,15	0,15	0,15	0,15

❶ GSC : ganglion cervical supérieur

B) Effet des lectines

Les lectines que nous avons étudiées n'interfèrent généralement pas avec l'activité de l'acétylcholinestérase, à l'exception de l'enzyme des membranes de lymphocytes. En effet, en présence d'UEA et TpA, l'activité acétylcholinestérase des membranes plasmiques de lymphocyte est fortement inhibée (70%). Cette inhibition de type apparemment non compétitif, est réversible en présence d' α -L-fucose (50 mM). La chromatographie d'affinité sur colonne UEA immobilisée permet d'observer une association enzyme-lectine. Le traitement par l' α -L-fucosidase abolit ces interactions (inhibition et fixation).

L'activité acétylcholinestérase a été mesurée en présence d'autres lectines (Con A, LCA, WGA) ; aucun effet inhibiteur n'a été observé. Cependant, la chromatographie d'affinité sur Con A et LCA immobilisées permet la fixation de l'enzyme qui peut être élué par l' α -méthyl-mannose (200 mM) ; nous n'avons observé au contraire aucune fixation sur WGA (Tableau IV).

C) Etude des formes moléculaires de l'acétylcholinestérase membranaire des différents tissus. Interactions avec les lectines.

Les coefficients de sédimentation des différentes formes moléculaires de l'acétylcholinestérase sont déterminés par centrifugation en gradient continu de saccharose (5-20%), selon la méthode de MARTIN et AMES (1961), en présence de Triton X-100 (1%), NaCl 1 M, MgCl₂ 50 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7, bacitracine 0,1%. Les membranes solubilisées par le Triton X-100 (1%) sont centrifugées à 100 000 g pendant 1 heure, puis le surnageant est déposé avec ou sans lectines au sommet du gradient. La centrifugation est effectuée à 40 000 RPM pendant 20 heures à 4°C (Rotor SW 41 Beckman). Les marqueurs internes inclus dans le dépôt sont la phosphatase alcaline d'*Escherichia coli* (6,1 S), et la catalase de foie de boeuf (11,3 S).

Dans les membranes plasmiques de lymphocytes, nous avons caractérisé une forme globulaire d'acétylcholinestérase G₂. Le profil de sédimentation est sensiblement modifié lorsque l'extrait est préincubé en

TABLEAU IV

INTERACTION des LECTINES avec l'ACETYLCHOLINESTERASE

		SPECIFICITE des LECTINES		
		U.E.A.	Con A	W.G.A.
Origine des acétylcholinestérases	Formes moléculaires	α -L-Fuc	D-Man D-Glc	NeuNAc GlcNAc
Lymphocytes	G ₂	+ inhibition 70%	++	-
Erythrocytes	G ₂	-	-	-
Noyau caudé	G ₄	-	++	++
Ganglion cervical supérieur	G ₄ G ₁	- -	+ ++	++ -
Muscle squelettique	G ₄ G ₂	- -	++ +	++ +

présence de LCA ou de Con A. Le pic d'activité acétylcholinestérase est sensiblement réduit par rapport au témoin, indiquant ainsi une précipitation de l'enzyme par les lectines.

Dans le cas de la membrane érythrocytaire, nous avons également caractérisé une forme moléculaire G_2 , mais celle-ci ne présente aucune interaction avec les lectines (Con A, LCA, WGA, PNA). Ceci était surprenant car l'acétylcholinestérase des membranes d'hématies a été bien caractérisée comme une glycoprotéine (NIDAY *et al.*, 1977). Nous avons aussi confirmé l'absence d'interaction de l'acétylcholinestérase des membranes érythrocytaires avec les lectines, par des techniques de chromatographie d'affinité. En effet, différentes lectines immobilisées (Con A, WGA, PNA, LCA, UEA) ne fixent pas l'acétylcholinestérase érythrocytaire préalablement solubilisée. Si cette non accessibilité du glycanne par les lectines paraît curieuse, nous ne pouvons pas avancer l'hypothèse d'une absence de glycosylation de la protéine. En effet, nous pourrions aussi être en présence d'une conformation particulière de l'enzyme qui ferait que le glycanne ne puisse pas être reconnu par les lectines.

Seule, la forme globulaire tétramérique G_4 est présente au niveau des membranes du noyau caudé. La séparation en gradient continu de saccharose montre que l'amplitude du pic d'activité acétylcholinestérase est réduite, lorsque l'enzyme est préincubé avec la Con A, la LCA ou la WGA. Contrairement à la forme moléculaire G_2 du lymphocyte, l'enzyme nerveux est reconnu par la WGA. De plus, lorsque les membranes sont soumises à l'action de la neuraminidase, l'interaction avec la WGA est sensiblement réduite, alors qu'apparaît une fixation de la PNA, indiquant sans doute le démasquage d'un galactose. Ce résultat est plus longuement développé dans le troisième chapitre de notre mémoire.

Les membranes du ganglion cervical supérieur possèdent deux formes globulaires prédominantes (G_1 et G_4), avec une proportion plus faible de dimères (G_2). La séparation en gradient de saccharose nous a permis de mettre en évidence que les formes G_1 et G_4 réagissaient avec la Con A, et que seule G_4 reconnaît la WGA. Ces résultats montrent que les formes moléculaires de l'acétylcholinestérase ne diffèrent pas seulement par leur

structure quaternaire, mais aussi par la nature de leur glycanne au sein d'un même tissu. De plus, le tétramère G_4 du ganglion cervical, reconnu par la WGA, a une structure glycannique probablement différente de celle de la forme moléculaire G_4 des membranes de noyau caudé.

Le sarcolemme du muscle digastrique possède, quant à lui, les formes G_2 et G_4 qui reconnaissent la Con A et la WGA. Il n'apparaît aucune différence notable permettant de conclure que leurs structures glycanniques soient différentes. Il est possible cependant que la forme G_2 , qui représente peut-être un précurseur de la forme plus complexe G_4 , ne possède qu'une glycosylation incomplète. Par ailleurs, il est évident que la structure glycannique de la forme G_2 du muscle digastrique est différente de celle du lymphocyte (Tableau IV).

III - INFLUENCE DE LA STRUCTURE GLYCANNIQUE

A) Sur l'affinité pour les substrats

Comme nous l'avons vu, le traitement des différentes préparations enzymatiques par les glycosidases, modifie leurs glycannes, comme l'indiquent les variations des interactions avec les lectines. Par exemple dans le cas de la 5'nucléotidase et de l'acétylcholinestérase des membranes de noyau caudé, nous avons observé le démasquage d'un résidu galactose après désialylation. De même, dans le cas du lymphocyte, le traitement par l' α -mannosidase permet une fixation sur la WGA. Cependant, l'amputation partielle de la structure glycannique n'a provoqué aucune modification dans l'affinité des deux enzymes pour leur substrat respectif (5'AMP, acétyl-thiocholine).

B) Sur la réactivité avec un anticorps

Un anticorps préparé contre la forme G₄ du cerveau de rat réagit avec l'acétylcholinestérase de boeuf (MARSH *et al.*, 1984). Cet anticorps reconnaît également toutes les formes obtenues à partir des différents tissus. En particulier, il ne différencie pas les acétylcholinestérases de lymphocytes et d'érythrocytes, dont nous avons vu que les interactions avec les lectines sont très différentes. Il apparaît donc que la reconnaissance antigénique dans ce cas précis n'est pas dépendante de la structure glycannique des différentes formes moléculaires de l'acétylcholinestérase. Cette observation semble à priori en accord avec le caractère peu immunogène des sucres.

IV - CONCLUSION

Cette première étude des interactions de la 5'nucléotidase et de l'acétylcholinestérase membranaires avec des lectines de spécificité saccharidique variées, nous a permis de montrer qu'un même enzyme glycoprotéique membranaire peut être reconnu par des lectines de façon différente, selon son origine tissulaire. La structure glycannique peut donc varier d'un tissu à l'autre. Cependant, la réactivité de l'acétylcholinestérase des différents tissus bovins avec les anticorps, orientés contre la forme moléculaire d'acétylcholinestérase G₄ du cerveau de rat, est en faveur d'une grande similitude peptidique.

Par ailleurs, les interactions avec les lectines et les séquences glucidiques peuvent affecter l'activité catalytique ou n'avoir aucune influence. En effet, l'acétylcholinestérase des différentes membranes reconnaît certaines lectines mais son activité n'est pas affectée par leur fixation, à l'exception de l'enzyme lymphocytaire qui, lui, est sensible aux agglutinines spécifiques de l'α-L-fucose (UEA et TPA). Cependant, la 5'nucléotidase est inhibée par toutes les lectines qui

reconnaissent sa structure glycannique. Celle-ci est donc probablement localisée dans le voisinage du site catalytique, ou exerce une influence déterminante sur la conformation de la protéine.

Dans le cas de l'acétylcholinestérase, nous avons observé différentes formes moléculaires de l'enzyme lié aux membranes plasmiques. C'est par exemple la forme globulaire G_4 que l'on rencontre au niveau des membranes du noyau caudé et du muscle squelettique, alors que la forme dimérique G_2 est prédominante dans les membranes de lymphocytes et d'érythrocytes. Dans le ganglion cervical supérieur, on trouve deux formes globulaires G_1 et G_4 , qui réagissent différemment avec les lectines. Cette observation pose le problème de la glycosylation des formes monomériques et de la biosynthèse des formes plus élaborées. Il n'est peut-être pas fortuit que la forme plus complexe G_4 se rencontre dans les membranes de cellules nerveuses ou musculaires, alors que la forme G_2 est seule présente dans les membranes de cellules sanguines, qui ne sont pas impliquées dans la neurotransmission cholinergique. G_4 apparaîtrait donc comme la forme physiologiquement responsable de l'hydrolyse de l'acétylcholine au niveau synaptique.

Les travaux récents de ROTUNDO (1984) sur des muscles de caille en culture ont montré qu'à partir de sous-unités déjà glycosylées, l'assemblage en polymère (A_{12}) s'effectuait au niveau de l'appareil de Golgi. Il existe donc une compartimentation subcellulaire des différentes formes de l'acétylcholinestérase. Dans le cas de la lignée de cellules nerveuses murines T28, on a montré qu'il existe en effet plusieurs compartiments de la forme intracellulaire G_1 . L'un d'eux pourrait être le précurseur des formes polymériques G_2 et G_4 , alors que la majeure partie de cet enzyme est dégradée (LAZAR *et al.*, 1984). Ces observations suggèrent que les différents compartiments subcellulaires pourraient différer dans leur glycosylation. En particulier, on peut supposer qu'un compartiment de forme G_1 de type N-acétyl-lactosaminique serait le précurseur des formes polymériques (G_2 et G_4) des membranes de ganglion cervical supérieur et qu'un autre compartiment de G_1 , possédant peut-être une structure glycannique

de type oligomannosidique, serait destiné à la dégradation.

On peut expliquer cette diversité de l'acétylcholinestérase et de la 5'nucléotidase de plusieurs façons :

- l'existence de gènes distincts ou des remaniements au niveau des ARN messagers ("splicing" différentiels), amènerait à des structures polypeptidiques qui induisent des glycosylations et des distinctions cellulaires différentes. Malgré l'immunoréactivité croisée, on ne peut exclure l'existence de séquences polypeptidiques variables d'une molécule à l'autre, qui pourrait en quelque sorte constituer un "signal qualitatif" de glycosylation de la protéine. Ces structures seraient restreintes et n'interviendraient que très faiblement dans la réactivité avec un anticorps orienté contre l'enzyme.

- ou bien, les différences pourraient s'introduire seulement au niveau post-traductionnel, et permettraient éventuellement une régulation du métabolisme et du transport subcellulaire de l'enzyme, indépendante de la traduction.

Cependant, toute hypothèse concernant la glycosylation de ces molécules ne peut être avancée que si la détermination précise des chaînes glycanniques est effectuée, selon la nature du glycanne oligomannosidique, N-acétyl-lactosaminique ou hybride, de structure di, tri, tétra-antennée (plus ou moins complète). L'étude des mécanismes d'action des glycosyltransférases et des glycosidases lysosomiales devrait aussi contribuer à la connaissance de ces phénomènes.

L'interaction des lectines avec la 5'nucléotidase et l'acétylcholinestérase nous a donc permis de déduire une hétérogénéité, de la structure glycannique, liée à l'origine tissulaire. Afin de préciser le type de glycanne de chacune des molécules, nous avons envisagé la purification de certaines d'entre elles.

Dans le chapitre suivant, nous exposerons comment, après purification de la 5'nucléotidase des membranes plasmiques de foie de boeuf, nous avons produit un immunsérum. Nous étudierons la réactivité de ces anticorps avec l'enzyme des différents tissus.

B I B L I O G R A P H I E

.....

- LAZAR, M., SALMERON, E., VIGNY, M. and MASSOULIE, J. (1984) 259, 3703.
- MARSH, D., GRASSI, J., VIGNY, M. and MASSOULIE, J. (1984) J. Neurochem., 43, 204.
- MARTIN, R.G. and AMES, B.M. (1961) J. Biol. Chem., 236, 1372.
- NIDAY, E., WANG, C.J. and ALAUPOVIC, P. (1977) Biochim. Biophys. Acta, 459, 180.
- RIORDAN, J.R. and SLAVIK, M. (1974) Biochim. Biophys. Acta, 373, 356.
- ROTUNDO, R.L. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci., in press.
- VARKI, A. and KORNFELD, J. (1983) J. Biol. Chem., 258, 2808.

Article 1 :

Interactions with lectins indicate differences in the carbohydrate composition of the membrane-bound enzymes acetylcholinesterase and 5'nucleotidase in different cell types.

Khaled MEFLAH, Serge BERNARD and Jean MASSOULIE,
Biochimie (1984), 66, 59-69.

Interactions with lectins indicate differences in the carbohydrate composition of the membrane-bound enzymes acetylcholinesterase and 5'-nucleotidase in different cell types.

Khaled MÉFLAH*, Serge BERNARD* and Jean MASSOULIÉ**^o.

* Laboratoire de Biochimie Médicale, Université de Nantes, 1, rue Gaston Veil, 44000 Nantes.

** Laboratoire de Neurobiologie, Ecole Normale Supérieure, 46, rue d'Ulm, 75005 Paris.

(Reçu le 24-11-1983, accepté le 30-1-1984).

Résumé — Nous avons étudié les interactions de diverses lectines avec deux enzymes membranaires, la 5'-nucléotidase et l'acétylcholinestérase, obtenues à partir de divers tissus de bœuf. Nous observons des différences qui indiquent que les chaînes polysaccharidiques de chacune de ces protéines varient suivant les tissus.

Les lectines qui se lient à la 5'-nucléotidase inhibent aussi partiellement son activité. La 5'-nucléotidase des membranes lymphocytaires n'interagit pas avec l'agglutinine de germe de blé (WGA), contrairement aux enzymes des membranes d'hépatocytes et de noyau caudé. Cette différence est confirmée par l'effet de la neuraminidase, qui suggère que l'enzyme de lymphocytes, contrairement aux autres, ne possède pas d'acide sialique.

Nous avons étudié les interactions de l'acétylcholinestérase avec les lectines par adsorption sur des colonnes de lectines immobilisées, et par sédimentation. L'activité catalytique n'est généralement pas affectée, sauf dans le cas de l'acétylcholinestérase de lymphocyte qui est inhibée par l'agglutinine d'*Ulex europeus*, spécifique du fucose. Cette inhibition est levée en présence de α -L-fucose mais non de α -D-fucose, et réduite après traitement par la α -L-fucosidase. Cet enzyme se distingue aussi par son K_m plus élevé, bien qu'il paraisse immunologiquement équivalent aux acétylcholinestérases d'autres tissus.

Les différentes formes d'acétylcholinestérase présentes dans un même tissu peuvent différer dans leurs interactions avec les lectines. C'est ainsi que dans le muscle G₁ porte des carbohydrates de type complexe, alors que G₁ ne semble comporter que des chaînes à mannosides terminaux. Nous examinons comment ces différences peuvent être liées aux relations biosynthétiques des différentes formes.

Mots-clés : lectines / acétylcholinestérase / 5'-nucléotidase / polymorphisme cellulaire.

Summary — We have examined the interactions of the membrane-bound enzymes, 5'-nucleotidase and acetylcholinesterase from bovine tissues with lectins and shown that glycosylation contributes significantly to the polymorphism of these enzymes, in a tissue-specific manner.

Lectins which bind 5'-nucleotidase also inhibit its catalytic activity to various degrees. We found different specificities with 5'-nucleotidases from various cell types : for example lymphocyte 5'-nucleotidase did not interact with wheat germ agglutinin, in contrast with 5'-nucleotidases from hepatocyte and caudate nucleus membranes. Treatment with glycohydrolases, α -D-mannosidase

^o To whom all correspondence should be addressed.

and neuraminidase, suggested that the latter enzymes possess sialic residues which are absent in the lymphocyte enzyme.

Interactions of acetylcholinesterase with lectins were demonstrated by sedimentation analysis and binding to immobilized lectins, but its activity was generally not affected. A notable exception was lymphocyte acetylcholinesterase which was inhibited by the fucose-binding *Ulex europeus* agglutinin. This inhibition was relieved by α -L-fucose but not by α -D-fucose and reduced after treatment with α -L-fucosidase. In addition this enzyme differs from acetylcholinesterases from other tissues by its higher K_m value, although it appears immunologically equivalent. The different forms of acetylcholinesterase from the same tissue may differ in their interactions with lectins. In muscle for example G_1 carries carbohydrate chains of the complex type whereas G_1 appears to possess only the high mannose type. We discuss the possible relationships between these forms.

Key-words : lectins / acetylcholinesterase / 5'-nucleotidase / cellular polymorphism.

Introduction

Lectins, which bind glycans with a certain specificity for particular sugar residues [1, 2], are useful tools to investigate the biological significance of carbohydrates. We report here the results of a study in which we have used lectins to probe the structure of the carbohydrate moieties of two membrane-bound enzymes : 5'-nucleotidase (E.C. 3.1.3.5.) and acetylcholinesterase (E.C. 3.1.1.7.) from membranes of bovine lymphocytes, erythrocytes, hepatocytes, muscle, superior cervical ganglion and brain. The two enzymes are known to be glycoproteins : 5'-nucleotidase from various tissues has been shown to be inhibited by concanavalin A (Con A) and by *Lens culinaris* agglutinin (LCA) [3, 8]. Acetylcholinesterase from electric organs, as well as from erythrocyte membranes, contains about 15 per cent carbohydrate [9, 10]. Binding of acetylcholinesterase to immobilized concanavalin A has been used as an efficient purification step for acetylcholinesterase from rat brain [11, 12] and human erythrocytes [13]. It has also been reported that acetylcholinesterase from rat brain appears heterogeneous in its binding to various lectins [14] and it has been suggested that its attachment to cellular membranes may involve interactions with an endogenous lectin, ligatin [15].

We studied the effect of lectins on the enzymatic activity of 5'-nucleotidase and acetylcholinesterase and on their sedimentation in sucrose gradients as well as the binding of the enzymes to lectin-conjugated Ultrogel columns. We also examined how treatment of the enzymes by glycohydrolases such as α -D-mannosidase and neuraminidase modified their interactions with lectins. In the present work, we used whole membranes and unfractionated membrane ex-

tracts, in order to avoid, as far as possible, any alterations which might occur in the structure of the enzymes during fractionation.

Materials and methods

Chemicals, lectins and enzymes

All chemicals were of analytical grade. Lectins and Ultrogel-immobilized-lectins were purchased from Industrie Biologique Française (IBF), except *Ulex europeus* agglutinin which was from Sigma (St Louis, Missouri). Neuraminidase from *Clostridium perfringens*, and α -D-mannosidase from Jack bean were purchased from Boehringer (Mannheim).

Membrane preparations and solubilized extracts

Fresh bovine tissues were obtained from the slaughterhouse. Bovine blood, retropharyngeal lymphatic ganglia, superior cervical ganglia, caudate nuclei, digastric muscle (posterior belly) and liver were obtained less than one hour after the death of the animals. Lymphatic ganglia were decapsulated and dilacerated, and lymphocytes were recovered after filtration through glass wool and separation in a Ficoll gradient. They were lysed by treatment with high pressure nitrogen (40 atm, 30 min) and decompression. Membranes were obtained by centrifugation in a discontinuous sucrose gradient, as described by Farber *et al.* [17]. Membranes from caudate nucleus were prepared as described by Jones and Matus [18], except that the 9 000 g pellet was lysed by high pressure nitrogen and decompression before centrifugation in a discontinuous sucrose gradient. Hepatocyte [19] and muscle [19] membranes were prepared in a similar manner. Blood erythrocytes were lysed by nitrogen decompression, and ghosts were washed 4 times. The membrane preparations were finally resuspended in 110 mM NaCl, 40 mM Tris-HCl pH 7.4. Solubilized extracts were prepared by stirring the membrane preparations in 2 per cent Triton X 100, 1 M NaCl, 50 mM MgCl₂,

Tris-HCl pH 7.4 for 1 hour at 4°C and centrifuging at 100 000 g for 1 hour.

In the case of superior cervical ganglia, the pellet obtained after homogenization in 10 mM Tris-HCl pH 7, was solubilized in 1 per cent Triton X 100. 10 mM Tris-HCl pH 7 and the 100 000 g supernatant was used as the solubilized membrane preparation.

Treatment with glycosidases

Membrane preparations were incubated with α -D-mannosidase (2.5 U/2 mg membrane protein in 1 ml) or neuraminidase (0.05 U/2 mg membrane protein in 1 ml), in 50 mM Na⁺-citrate pH 6.0 at 37°, for 14 hours and 1 hour, respectively. Membranes were then sedimented and resuspended in 110 mM NaCl, 40 mM Tris-HCl pH 7.4.

Determination of 5'-nucleotidase and acetylcholinesterase activities

5'-nucleotidase activity was determined as indicated by Rackonczay *et al.* [11]: hydrolysis of 1 mM AMP was followed by assaying inorganic phosphate by the colorimetric method of Aner and Mossmayer [21]. Acetylcholinesterase was assayed by the method of Ellman *et al.* [22] as described previously [23]. We verified that the activity was in all cases exclusively due to specific acetylcholinesterase, by using ethopropazine, an inhibitor of butyrylcholinesterase. In addition, acetylcholinesterase from all sources displayed the characteristic property of excess substrate inhibition.

Effect of lectins on 5'-nucleotidase and acetylcholinesterase activity

The effect of lectins on the activity of acetylcholinesterase and 5'-nucleotidase was examined on the membrane-bound and soluble enzymes. In each case the membrane preparation or solubilized extract was incubated for 30 minutes in 110 mM NaCl, 40 mM Tris-HCl pH 7.4 at 37°C, in the presence or absence of lectin, before assaying the enzyme activity.

Chromatography on immobilized lectins

2 ml aliquots of the solubilized extracts in 2 per cent Triton X 100, 1 M NaCl, 50 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 7.4 (2 mg protein/ml) were applied to 5 ml columns, equilibrated in the same solvent (2.6 ml/hour). Elution was performed with 200 mM solution of the appropriate sugar. 1 ml fractions were collected and assayed for 5'-nucleotidase and acetylcholinesterase.

Sedimentation analysis in sucrose gradients

The effects of lectins on the sedimentation of 5'-nucleotidase and acetylcholinesterase were examined in the following manner: lectin (1 mg/ml) was added to the solubilized extracts and 200 μ l aliquots were layered on 5/20 per cent sucrose gradients, in 1 per cent Triton X 100, 1 M NaCl, 50 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 7. Centrifugation was performed at 40000 rev/min for 20 hours at 4° (Beckman SW 41 rotor). Catalase from beef liver (11.3 S) and alkaline-phosphatase from *E. coli* (6.1 S) were included as internal sedimentation standards.

TABLE I
Inhibition of 5'-nucleotidase by lectins.

Origin of 5'-nucleotidase	Specific activity (μ mol/min/mg protein)	K_m (μ M)	Specificity of the lectins							
			<i>Ulex europeus</i> agglutinin (UEA)	<i>Lens culinaris</i> agglutinin (LCA)	concanavalin A (Con A)	wheat germ agglutinin (WGA)				
			<i>L</i> -fucose	<i>D</i> -glucose <i>D</i> -mannose	<i>D</i> -glucose <i>D</i> -mannose	Neuraminic acid <i>N</i> -acetylglucosamine				
Lymphocyte membranes	0.26	110	-	-	+	85 %	+	90 %	-	-
Hepatocyte membranes	0.30	135	-	-	+	25 %	+	90 %	+	50 %
Caudate nucleus membranes	0.04	100	-	-	+	80 %	+	85 %	+	80 %

The inhibitory effects of lectins were similar with solubilized extracts. Interactions between lectins and solubilized 5'-nucleotidase were demonstrated by chromatography on immobilized lectins (cf. Fig. 2) and confirmed by sedimentation analysis; 5'-nucleotidase from lymphocytes was found to sediment at 5.5 S and is probably dimeric; brain membranes contain a similar form, as well as a minor (about 10 per cent sedimenting one (11 S) which is probably a tetramer.

Results

A. 5'-nucleotidase

In the case of 5'-nucleotidase, we found that lectins interacting with the solubilized enzyme, as shown by sedimentation or by binding to immobilized lectins, also inhibit the catalytic activity of the membrane-bound or solubilized enzyme (in this case, the activity was assayed on the total incubation mixture, so that the observed effect is independent of possible precipitation (table I). Concanavalin A (Con A) for example inhibits in a similar manner 5'-nucleotidase from the different sources. We found that this inhibition is not

modified by salt, up to 2 M NaCl; it is non competitive and, in the presence of an excess of lectin, we found a residual activity (10-15 per cent of the control) (fig. 1), which must be due to the lectin-enzyme complex, since the totality of the enzyme was bound to immobilized Con A (fig. 2), as reported previously by Dornand *et al.* [5]. It should be noted that although *Lens culinaris* agglutinin (LCA) was also inhibitory for lymphocyte 5'-nucleotidase, only 30 per cent of the enzyme was retained on the LCA-conjugated column. This partial binding corresponds to a lower capacity of the column, and not to heterogeneity of the enzyme : an equivalent activity can be bound by applying the wash-through fraction

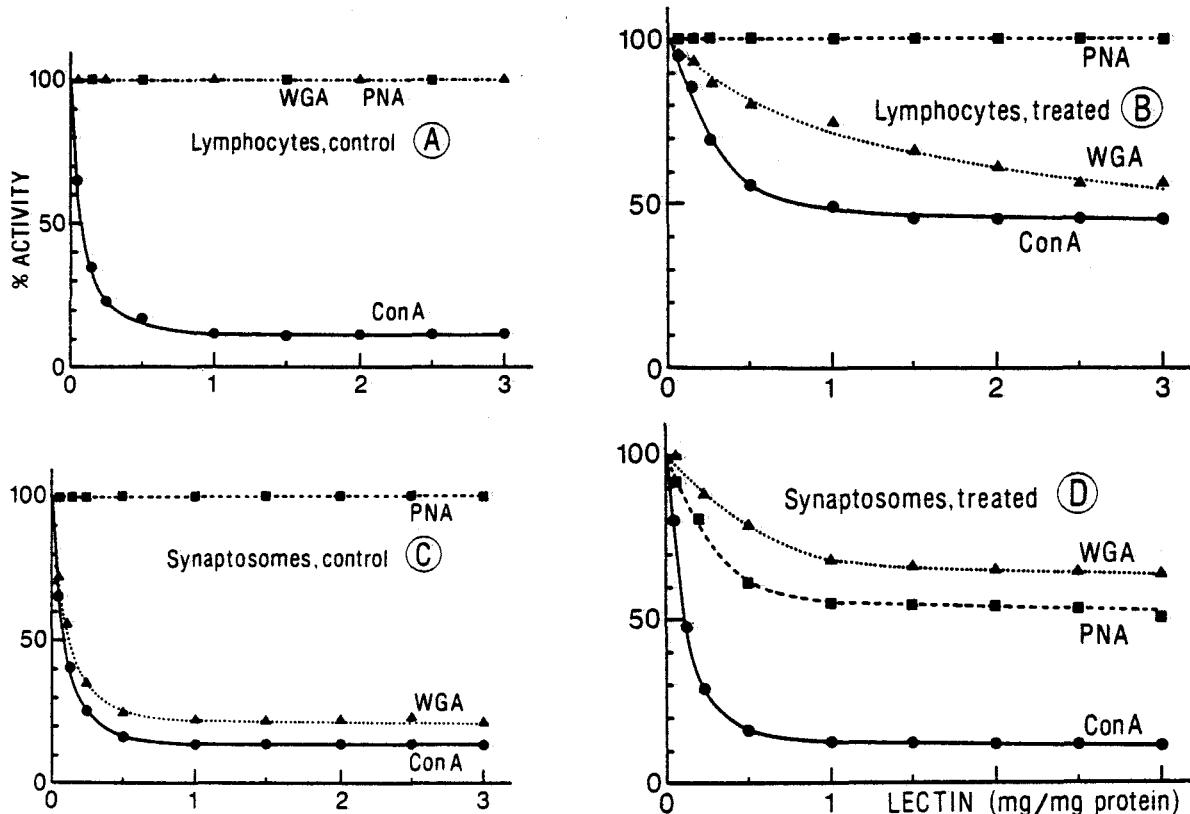


FIG. 1. — Effect of lectins on the activity of 5'-nucleotidase from bovine lymphocytes and brain synaptosomes before and after treatment with α -D-mannosidase and neuraminidase.

The 5'-nucleotidase activity of a membrane preparation (see legend of table I) is plotted as a function of the lectin concentration, expressed as mg lecting/mg membrane protein.

(A) and (B) control and α -D-mannosidase-treated lymphocyte membranes : treated membranes are less inhibited by Con A, and become sensitive to WGA.

(C) and (D) control and neuraminidase-treated synaptosomal membranes : neuraminidase does not modify the effect of Con A, reduces that of WGA, and allows PNA to become inhibitory.

(—●—) concanavalin A (Con A); (■—■) peanut agglutinin (PNA); (▲ . . . ▲) wheat germ agglutinin (WGA).

Binding of lectins to acetylcholinesterase and 5'-nucleotidase

to a second, identical column, and all activity may be eventually bound, and specifically released by using three successive columns (results not shown).

Figure 1 illustrates how lectin interactions reveal differences between 5'-nucleotidases from lymphocytes and caudate nucleus membranes : while Con A is inhibitory in both cases, wheat germ agglutinin (WGA) inhibits only the latter enzyme. It seems likely that Con A binds to a terminal mannose since its effect is reduced after incubation of lymphocyte 5'-nucleotidase with α -D-mannosidase; the modified enzyme also becomes sensitive to WGA, suggesting that an N-acetylglucosamine residue, attached to the

central core β -mannose, is rendered accessible to the lectin by removal of terminal α -mannose residues. The interaction of WGA with 5'-nucleotidase from caudate nucleus membranes seems to take place through a terminal sialic acid residue, since neuraminidase treatment reduces the effect of this lectin, and allows peanut agglutinin (PNA) to inhibit the enzyme, probably by unmasking a galactose residue, as further demonstrated in another article [24].

Although the 5'-nucleotidases from caudate nucleus and hepatocyte membranes are both sensitive to LCA, WGA and Con A, they differ markedly in the degree of inhibition observed in the presence of these lectins (table I). These

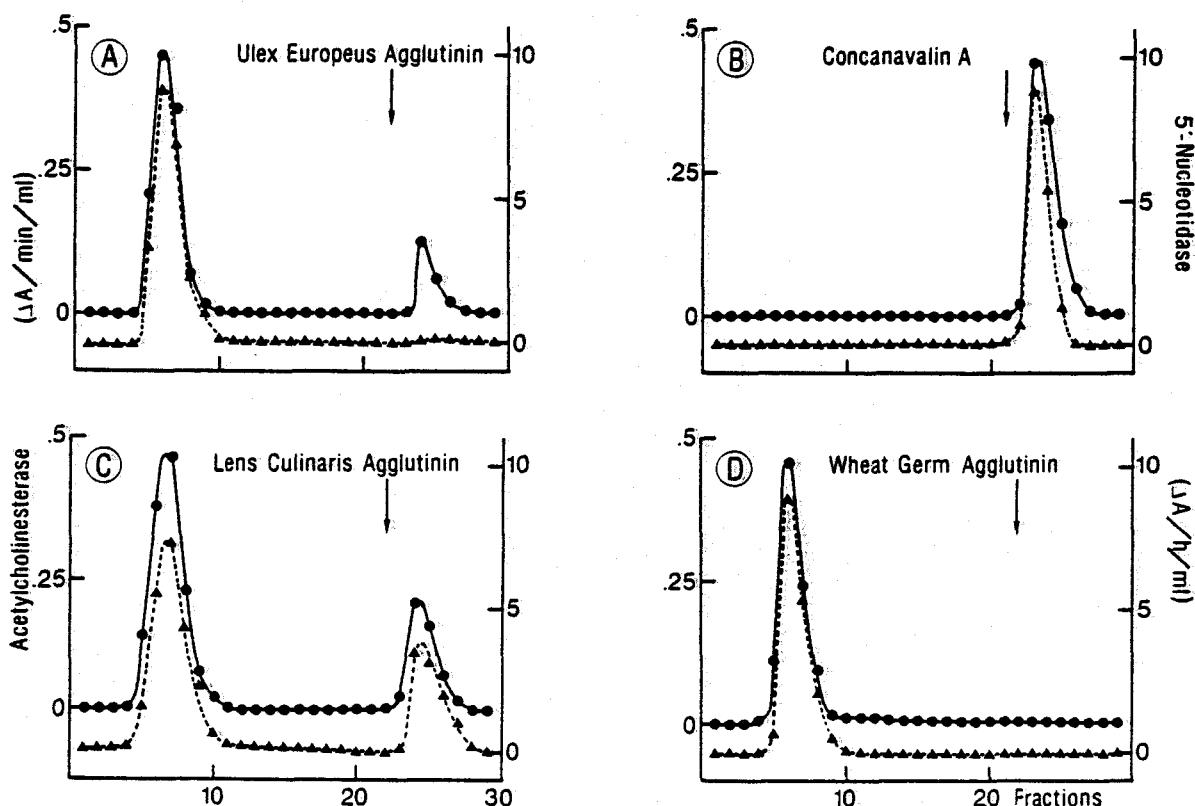


FIG. 2. — *Binding of 5'-nucleotidase and acetylcholinesterase, solubilized from lymphocytes membranes, by lectin-conjugated Ultrogel.*

A solubilized extract from lymphocyte membranes was applied to lectin conjugated columns, and eluted with 200 mM competing sugar. (A, α -L-fucose; B, C, D-mannose; D, N-acetylglucosamine) as indicated by the arrows.

▲ . . . ▲ 5'-nucleotidase ● — acetylcholinesterase.

(A) UEA-conjugated Ultrogel weakly retains acetylcholinesterase but not 5'-nucleotidase, in agreement with inhibition experiments.

(B) Con A-conjugated Ultrogel retains both enzymes quantitatively.

(C) LCA-conjugated Ultrogel partially retains both enzymes.

(D) WGA-conjugated Ultrogel does not bind the lymphocyte enzymes.

effects probably reveal differences in the glycosidic moieties of the enzymes obtained from various cells.

B. Acetylcholinesterase

In general 5'-nucleotidase and acetylcholinesterase from lymphocyte membranes bind to immobilized lectins with the same specificity and a remarkably similar efficiency (fig. 2) : in the case of the LCA column we observed for example an incomplete binding to the LCA column; but the totality of both enzymes could be bound and released by using three successive columns; this probably indicates a competition of the enzymes with other constituents of the crude extracts. In contrast with other lectins *Ulex europeus* agglutinin (UEA) appeared to interact only with acetylcholinesterase.

The effects of lectins on the catalytic activity of the two enzymes were very different : acetylcholinesterase activity was generally not affected by lectins although it was bound by immobilized lectins (cf. fig. 2 and table II). We only observed an inhibition in the case of acetylcholinesterase from lymphocytes, which was inhibited 35 per cent by *Lotus tetragonolobus* agglutinin (LTA) and 70 per cent by UEA in excess (2 mg lectin/mg membrane protein). The inhibition of lymphocyte

acetylcholinesterase by UEA was suppressed in the presence of α -L-fucose, but not of α -D-fucose (fig. 3). It was also reduced after treatment of the enzyme preparation with α -L-fucosidase. As noted for 5'-nucleotidase, the residual activity of the lectin-acetylcholinesterase complex was not affected by salt, up to 2 M NaCl. The inhibitory effects of UEA and LTA on lymphocyte acetylcholinesterase clearly indicate that its carbohydrates differ from those of lymphocyte 5'-nucleotidase which is neither bound nor inhibited by these lectins. They are also different from those of acetylcholinesterases from other origins which are not inhibited by UEA and do not bind to UEA immobilized columns. These observations therefore suggest that only acetylcholinesterase from lymphocytes possesses a fucose residue, accessible for lectin interaction. Lymphocytes membranes were incubated with Con A in excess, and then with UEA. In this case we did not observe any inhibition of the acetylcholinesterase activity, probably because the binding of Con A to the polysaccharide chain prevented further interaction with UEA by steric hindrance.

Because of the lack of inhibition observed in most cases, we studied interactions between acetylcholinesterase and lectins mainly by chromatography on immobilized lectins (cf. fig. 2). Interactions were also demonstrated in some

TABLE II
Interactions of lectins with acetylcholinesterase as indicated by sedimentation analysis

Origin of acetylcholinesterase	Specific activity $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$	K_m mM	main molecular forms	<i>Ulex europeus</i> agglutinin (UEA)	concanavalin A (Con A)	wheat germ agglutinin (WGA)
Lymphocytes	0.065	0.35	G_2	+ (70 % inhibition)	++	-
Erythrocytes	1.620	0.15	G_2	-	-	-
Caudate nucleus	0.690	0.15	G_4	-	++	++
Superior cervical ganglion	0.35	0.15	G_4 G_1	-	+	++
Skeletal muscle	0.012	0.15	G_4 G_2	-	++	++
				-	+	+

The only inhibition observed with lectins was obtained with UEA for lymphocyte acetylcholinesterase (cf. fig. 3). In this case, we observed a partial binding to lectin-conjugated Ultrogel.

Binding was demonstrated by affinity chromatography on immobilized lectins (cf. fig. 2) and/or by sedimentation analysis : the lectin reduced the peaks of acetylcholinesterase activity, either producing faster sedimenting aggregates, or precipitating the enzyme to the bottom of the tube (cf. figs. 4 and 5) : ++ indicates that the peak was almost entirely displaced, and + that it was still present but significantly reduced. The lymphocyte and erythrocyte enzymes were not retained on WGA columns ; the effect of LCA was very similar to that of Con A.

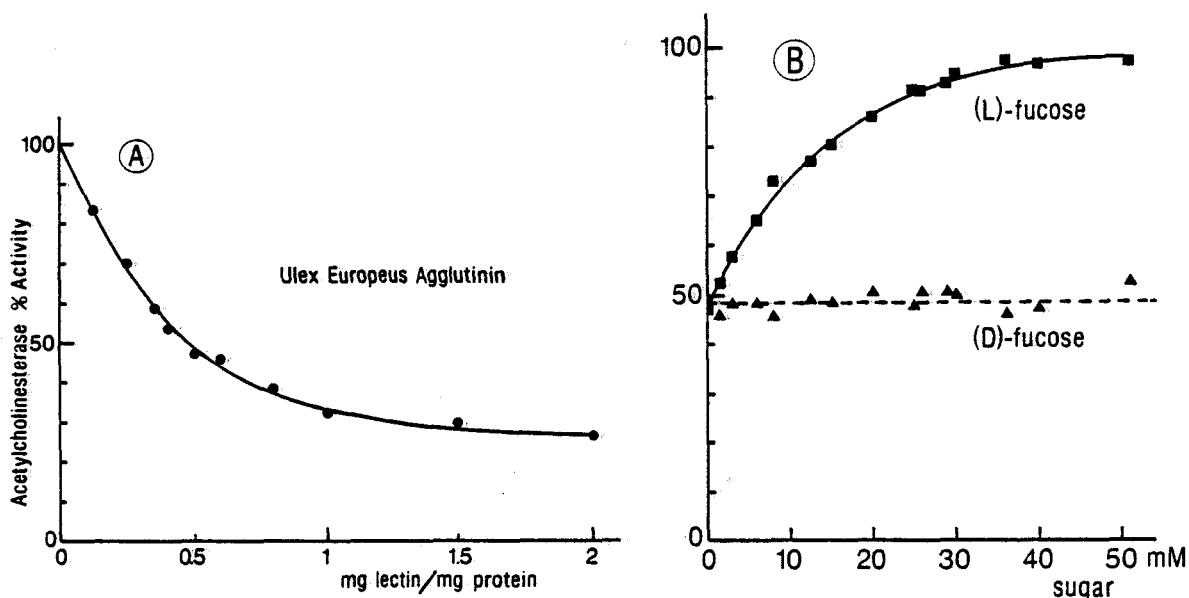


FIG. 3. — Effect of *Ulex europeus* agglutinin on the activity of acetylcholinesterase from bovine lymphocytes.

A — Acetylcholinesterase extracts were incubated in the presence of lectin in 2 per cent Triton X 100, 1 M NaCl, 50 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 7.4, and 100 µl aliquots were assayed in 1 ml of Ellman medium as described previously [23].
B — The inhibition observed with 0.5 mg lectin/mg protein was relieved by L-fucose (■—■), but not by D-fucose (▲—▲).

cases by sedimentation in sucrose or CsCl gradients. It should be noted however that sucrose may displace lectin binding so that negative results are not necessarily significant: for example interactions of lymphocyte acetylcholinesterase with UEA could not be demonstrated in this way.

In the case of acetylcholinesterase we paid particular attention to the nature of the oligomeric forms of the enzyme, as characterized by their sedimentation properties. Similar forms obtained from distinct cells were found to differ: for example erythrocyte and lymphocyte membranes both contain dimeric acetylcholinesterase (G_2), but only the latter interacts with Con A (fig. 4A and 4B), and with LCA (not shown). In fact we did not observe any clear interaction of acetylcholinesterase from bovine erythrocytes with any of the lectins investigated (table II), although in other species the erythrocyte enzyme is known to be a glycoprotein [10]. It may be that acetylcholinesterase from bovine erythrocytes is less glycosylated than that of human erythrocytes, or that its carbohydrate moieties are less accessible to lectin binding, since we did find an unambiguous effect of WGA on the sedimentation of the human, but not of the bovine enzyme, under identical expe-

rimental conditions. We also observed that the human erythrocyte acetylcholinesterase was retained on immobilized Con A and WGA columns, while the bovine enzyme was not (data not shown).

We examined whether bovine erythrocyte and lymphocyte acetylcholinesterase differ in other properties. Indeed we found that lymphocyte acetylcholinesterase possesses a significantly higher K_m value (fig. 5, table II) than the enzymes from erythrocytes or other origins.

Membranes from caudate nucleus contain exclusively the tetrameric form (G_4) of acetylcholinesterase. Like 5'-nucleotidase from the same origin, the caudate nucleus G_4 acetylcholinesterase form interacts with Con A (fig. 4C). This enzyme also interacts with WGA (cf. fig. 1) perhaps through a terminal sialic acid residue, since treatment with neuraminidase markedly reduced its binding to immobilized WGA (but not to immobilized Con A) (data not shown).

In membranes from superior cervical ganglion (SCG) and from skeletal muscle, we found the G_4 form together with the smaller dimeric (G_2) and monomeric (G_1) forms, G_2 being predominant in muscle (not shown), and G_1 in SCG (fig. 4D). We

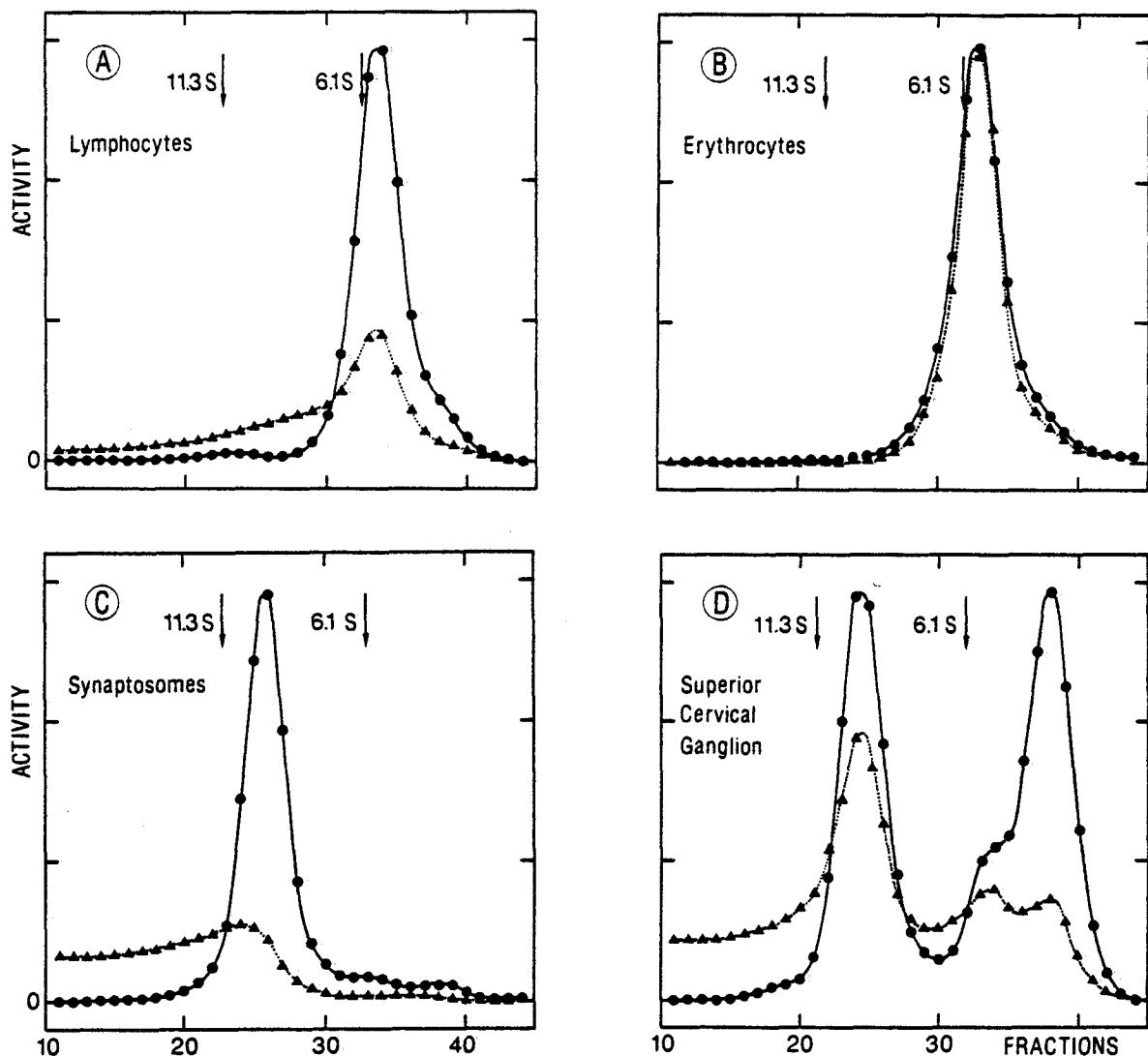


FIG. 4. — Effect of concanavalin A on the sedimentation of acetylcholinesterase from bovine lymphocytes, erythrocytes, caudate nucleus and superior cervical ganglion (SCG).

- (A) Acetylcholinesterase solubilized from lymphocyte membranes.
- (B) Acetylcholinesterase solubilized from erythrocyte membranes.
- (C) Acetylcholinesterase solubilized from caudate nucleus membranes.
- (D) Acetylcholinesterase solubilized from SCG.

● control ▲ . . . ▲ extracts preincubated with Con A.

do not know whether the different forms, observed after solubilization of a particulate preparation, derive from the same membranes or from distinct subcellular compartments. In any case, the influence of lectins on the sedimentation patterns indicated that the different forms did not interact in the same manner. In muscle extracts, G₄ was clearly bound by both Con A and WGA,

while G₁ interacted with Con A but not with WGA (not shown).

In spite of their differences in polymeric form and in carbohydrate composition, acetylcholinesterase forms solubilized from membranes of bovine erythrocytes (G₂), lymphocytes (G₂) and superior cervical ganglion (mainly G₄) all reacted with similar titers with a rabbit antiserum raised

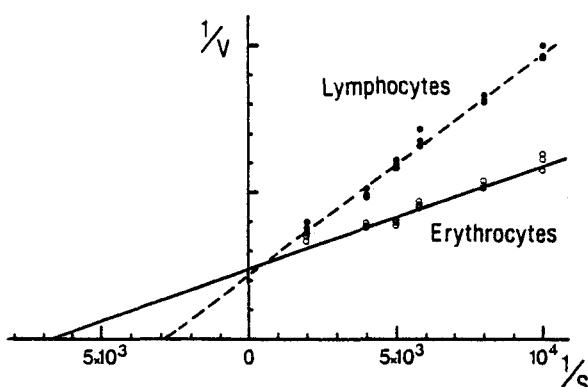


FIG. 5. — Lineweaver-Burke plot of acetylcholinesterase solubilized from lymphocyte and erythrocyte membranes.

Acetylcholinesterase activity in solubilized extracts from lymphocyte and erythrocyte membranes was assayed in Ellman medium containing various concentrations of acetylthiocholine iodide. $1/V$ values are plotted on an arbitrary scale as a function of substrate concentration (below excess substrate inhibition). The rates obtained in the presence or absence of 0.01 per cent Triton X 100 were identical.

●—● lymphocyte acetylcholinesterase
○—○ erythrocyte acetylcholinesterase.

against rat brain (G_4) acetylcholinesterase, in an immunoprecipitation assay in the presence of antirabbit IgG serum.

Discussion

Our use of whole membranes and of non-fractionated solubilized membrane extracts, while precluding the possibility of estimating affinities between the enzymes and the lectins, offers the advantage of avoiding modifications of the enzymes which might occur during purification procedures [23]. This approach however does not allow any quantitative determination of the sugar composition of the enzymes. The results obtained, as summarized in tables I and II, clearly show that 5'-nucleotidase and acetylcholinesterase from different cellular origins may differ in the structure of their glycan moieties. When the two enzymes coexist, they are generally similar in their interactions with lectins, but there are also clear differences.

It has been well established in the case of viral proteins that the processing of N-linked oligosaccharides depends not only on the enzymatic equipment of the cell but also on the conformation of the protein [references in 25]. In fact the carbohydrates carried by a polypeptide chain are

not identical, and the extent of processing appears correlated to the proximity of the N-terminus [25]. Differences in glycosylation of viral proteins synthesized in various types of cells have also been reported [25].

Carbohydrates are thought to be involved in a number of biological functions [for reviews see 26, 27], including the determination of protein transport routes and destinations within the cell. It is therefore surprising to find that the glycosylation of a plasma membrane protein varies in different cells, as observed here. Indeed, lectin interactions suggest that various membrane-bound polypeptide hormone receptors possess identical carbohydrates in different tissues [28].

The binding of lectins inhibits 5'-nucleotidase, leaving only a residual activity. This suggests that the polysaccharidic moiety is in the close vicinity of the active center of the enzyme, or that it strongly interferes with its conformation. However, it should be noted that 5'-nucleotidases from different cell types do not significantly differ in their K_m values : the structure of the carbohydrate thus does not seem in itself to affect the catalytic activity. By studying the effect of glycosidases on the interaction of 5'-nucleotidase from bovine caudate nucleus with various lectins, we confirmed that the enzyme carries complex carbohydrate chains with terminal sialic acid residues and an internal fucose [24].

In the case of acetylcholinesterase, the activity is in general totally insensitive to the binding of lectins, except for the lymphocyte enzyme which is partially inhibited by the fucose-specific *Ulex europeus* agglutinin (UEA) and *Lotus tetragonolobus* agglutinin (LTA).

The membrane-bound forms of acetylcholinesterase are not the same in different cell types : for example, we found G_2 in erythrocytes and lymphocytes, and G_4 in caudate nucleus membranes. This is consistent with previous findings : in human erythrocytes the enzyme has been thoroughly characterized as a dimeric (G_2) form [29], while in cultures of the murine neural T28 cell line, the plasma membrane associated form is predominantly G_4 [30]. It must be noted however that there are differences between species, since erythrocyte membrane acetylcholinesterase appears to be G_1 in rat [31].

As noted earlier, homologous forms of acetylcholinesterase from different origins may possess distinct interactions with lectins : the most conspicuous example is that of G_2 forms from erythrocytes and lymphocytes. Although the lym-

phocyte enzyme appeared immunologically equivalent to acetylcholinesterases from other sources, suggesting that the protein backbones may be identical, it differed clearly in two respects : its interaction with UEA, indicated by binding to immobilized lectin and by inhibition of its catalytic activity, and its significantly higher K_m value. The interaction with UEA implies the presence of a fucose residue which does not appear to be present or accessible in other enzymes. The inhibitory effect of UEA contrasts with the lack of effect of other lectins on acetylcholinesterase activity, and this may be related to the internal position of fucose in the carbohydrate chain. It is indeed tempting to propose that the higher K_m value of the lymphocyte enzyme might reflect a conformational effect related to the structure of its carbohydrate chains.

When different forms are present in the same tissue, e.g. in superior cervical ganglion or in muscle, they also show differences in their lectin interactions. In superior cervical ganglion for example, G_4 , but not G_1 , interacts with WGA. Thus the tetrameric G_4 form is not equivalent to an assembly of four G_1 subunits. It is in fact not known whether G_4 consists of identical catalytic subunits, and it may even include non catalytic components [32]. In any case our results suggest that the G_1 form carries rather simple glycans of the oligomannosidic type, whereas G_4 possesses more elaborate structures of the *N*-acetyllactosaminic type resulting from secondary remodelling of the carbohydrate chains [33, 34].

Indeed, G_4 appears to represent a more mature form of acetylcholinesterase than G_1 in mammalian nervous tissue, because it accumulates preferentially during embryonic development in the central nervous system [35] and because it is exposed at the outer surface of the plasma membrane in T28 cells, while the G_1 form is intracellular [29, 35]. There is a similar relationship between G_4 and the lower molecular weight forms in skeletal muscle, although a significant fraction of all forms is intracellular [37].

Studies of the metabolic renewal of acetylcholinesterase in T28 cultures have recently shown that each of the G_1 and G_4 forms consists of several components with distinct half-lives, which probably correspond to different subcellular compartments, and may be destined for degradation, secretion, or in the case of G_1 , for polymerization into G_2 and G_4 [39]. It is likely that within a given cell, molecular forms corresponding to metabolically distinct pools differ in their

state of glycosylation. In this case lectin interactions would obviously offer a most convenient means for analyzing the different enzyme compartments.

By analyzing lectin binding to the different forms of acetylcholinesterase in primary cultures of embryonic quail muscle cells, Rotundo recently provided interesting insights into their biosynthesis [38]. These cells synthesize G_1 , G_2 , G_4 and A_{12} forms of acetylcholinesterase, and a fraction of all these forms is exposed at the outer cell surface. Whereas only a fraction of the globular forms (including the surface enzyme) interacts with WGA, this lectin binds the totality of the collagen tailed A_{12} form. This indicates that the assembly of this complex molecule takes place after elaboration of complex oligosaccharides in the Golgi apparatus [34].

The results reported here demonstrate that glycosylation contributes to the polymorphism of acetylcholinesterase. Additional variations may be introduced by other post-translational processing and also by differential mRNA splicing operating on the structural gene, or genes, which code for the enzyme. The molecular diversity observed for acetylcholinesterase may thus resemble that of immunoglobulins : it is known for example that membrane-bound and secreted versions of the same immunoglobulin M, produced by a given cell, differ in their mRNA splicing and in the structure of their glycans [40, 41].

The membrane-bound enzymes, 5'-nucleotidase and acetylcholinesterase, offer an interesting model for investigating the biological significance of carbohydrate structures, and show that lectins provide an extremely useful tool to approach this problem.

Acknowledgments

We are grateful to Prof. Roland Bourrillon, Prof. Jean Montreuil, Dr. Henri Debray, Dr. Suzanne Bon, Dr. Richard Rotundo and Dr. Martin Snider for helpful discussions. We thank Dr. Jacques Grassi for the immunological assays, Dr. Jean-Pierre Sine for his contribution to the preparation of lymphocyte membranes and Mrs. Jacqueline Pons for the preparation of the manuscript. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique and the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale.

REFERENCES

1. Lis, H. & Sharon, N. (1977) in *the Antigens* (Sela, M., ed) 4, 429-529 Academic Press, New-York.
2. Debray, H., Decout, D., Strecker, G., Spik, G. & Montreuil, J. (1981) *Eur. J. Biochem.*, **117**, 41-55.
3. Riordan, J.R. & Slavik, M. (1974) *Biochim. Biophys. Acta*, **373**, 356-360.
4. Stefanovic, V., Mandel, P. & Rosenberg, A. (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 7081-7083.
5. Dornand, J., Reminiac, C. & Mani, J.C. (1977) *Biochimie*, **59**, 425-432.
6. Slavik, M., Kartner, N. & Riordan, J.R. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **75**, 342-349.
7. Dornand, J., Bonnafous, J.C. & Mani, J.C. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **82**, 685-692.
8. Cammer, W., Sirota, S.R., Zimmerman, T.R. Jr & Norton, W.T. (1980) *J. Neurochem.*, **35**, 367-373.
9. Bon, S., Huet, M., Lemonnier, M., Rieger, F. & Massoulié, J. (1976) *Eur. J. Biochem.*, **68**, 523-530.
10. Niday, E., Wang, C.J. & Alaupovic, P. (1977) *Biochim. Biophys. Acta*, **459**, 180-193.
11. Rackonczay, Z., Mallol, J., Schenk, H., Vincendon, G. & Zanetta, J.P. (1981) *Biochim. Biophys. Acta*, **657**, 243-256.
12. Zanetta, J.P., Rackonczay, Z., Reeber, A., Kása, P. & Vincendon, G. (1981) *FEBS Lett.*, **129**, 293-296.
13. Ravazzolo, R., Garré, C. & Ajmar, F. (1983) *Scand. J. clin. lab. invest.*, **43**, 123-126.
14. Gurd, J.W. (1976) *J. Neurochem.*, **27**, 1257-1259.
15. Gaston, S.M., Marchase, R.B. & Jakoi, E.R. (1982) *J. Cell Biochem.*, **18**, 447-459.
16. Massoulié, J. & Bon, S. (1982) *Ann. Rev. Neurosci.*, **5**, 57-106.
17. Farber, E., Resh, K., Wallach, D.F.H. & Imm, W. (1972) *Biochim. Biophys. Acta*, **266**, 494-504.
18. Jones, D.H. & Matus, A.I. (1974) *Biochim. Biophys. Acta*, **356**, 276-287.
19. Emmelot, P., Bos, C.J., Benedetti, E.L. & Rumke, P. (1964) *Biochim. Biophys. Acta*, **90**, 126-145.
20. Oliveira, M.C. & Holzhacker, S. (1974) *Biochim. Biophys. Acta*, **332**, 221-232.
21. Anner, B. & Moosmayer, M. (1975) *Anal. Biochem.*, **65**, 305-309.
22. Ellman, C.L., Courtney, K.D., Andres, V. & Featherstone, R.M. (1961) *Biochem. Pharmacol.*, **7**, 88-95.
23. Grassi, J., Vigny, M. & Massoulié, J. (1982) *J. Neurochem.*, **39**, 457-469.
24. Meflah, K., Harb, J., Duflos, Y. & Bernard, S. *J. Neurochem.*, in press.
25. Atkinson, P.H. & Hakimi, J. (1982) "Membranes in Growth and Developpement" p. 445-457, (Ed. Alan Liss, New York).
26. Montreuil, J. (1980) *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **37**, 157-223.
27. Feizi, T. (1981) *Trends in Biochem. Sci.*, **6**, 333-335.
28. Hedo, J.A., Harrisson, L.C. & Roth, J. (1981) *Biochemistry*, **20**, 3385-3393.
29. Römer-Luthi, C.R., Ott, P. & Brodbeck, H. (1980) *Biochim. Biophys. Acta*, **601**, 123-133.
30. Lazar, M. & Vigny, M. (1980) *J. Neurochem.*, **35**, 1067-1079.
31. Fernandez, H.L., Duell, M.J. & Festoff, B.W. (1983) *J. Neurobiol.*, **10**, 441-454.
32. Bon, S., Vigny, M. & Massoulié, J. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 2546-2550.
33. Hubbard, S.G. & Ivatt, R.J. (1981) *Ann. Rev. Biochem.*, **50**, 555-584.
34. Snider, M.D. "Biology of Carbohydrates", vol. 2, V. Ginsburg and P.W. Robbins, (ed. J. Wiley and son, New York), in press.
35. Rieger, F. & Vigny, M. (1976) *J. Neurochem.*, **27**, 121-129.
36. Taylor, P.B., Rieger, F., Shelanski, M.L. & Greene, L.A. (1981) *J. Biol. Chem.*, **256**, 3827-3830.
37. Younkin, S.G., Rosenstein, C., Collins, P.L. & Rosenberry, T.L. (1982) *J. Biol. Chem.*, **257**, 13630-13637.
38. Rotundo, R.L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press.
39. Lazar, M., Salmeron, E., Vigny, M. & Massoulié, J. *Biol. chem.*, in press.
40. Rogers, J., Early, P., Carter, C., Calame, K., Bond, M., Hood, L. & Wall, R. (1980) *Cell*, **20**, 303-312.
41. Early, P., Rogers, J., Davis, M., Calame, K., Bond, M., Wall, R. & Hood, L. (1980) *Cell*, **20**, 313-319.

CHAPITRE II

PRODUCTION D'ANTICORPS ORIENTES CONTRE LA 5'NUCLEOTIDASE PURIFIEE
A PARTIR DES MEMBRANES PLASMIQUES DE FOIE DE BOEUF

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

.....

Nous avons donc entrepris la purification de la 5'nucléotidase des membranes plasmiques de foie de boeuf. Nous avons obtenu une préparation homogène en protéine hautement purifiée (16 000 fois) (HARB *et al.*, 1983), mais en quantité relativement faible, de l'ordre de 50 µg par purification. De telles quantités ne pouvaient, en aucun cas, nous permettre d'envisager l'étude structurale du glycanne par des techniques physicochimiques. Nous avons donc entrepris la production d'un anticorps anti-5'nucléotidase des membranes plasmiques du foie. L'obtention de cet anticorps nous permettrait d'aborder la purification de cet enzyme en plus grande quantité, par le biais des techniques d'immuno-adsorption. Cette méthode permet en effet l'isolement de la protéine antigénique en quantité relativement importante, parfois en une seule étape (PARKINSON *et al.*, 1983).

L'obtention d'immunsérum, par les méthodes classiques d'immunisation d'un lapin, peut constituer la principale difficulté, si l'on ne dispose que de quantités réduites d'une protéine purifiée. En effet, les doses généralement utilisées sont de l'ordre de quelques centaines de microgrammes, selon le caractère antigénique de la molécule.

Les quantités relativement faibles obtenues par notre méthode de purification ne nous permettraient pas de mener conjointement les caractérisations biochimique et immunologique de la 5'nucléotidase membranaire. Afin de réduire le taux de protéine nécessaire pour les immunisations, nous avons donc choisi de fixer l'enzyme sur des billes d'agarose et d'injecter de manière sous-cutanée cette suspension de la protéine immobilisée.

Dans ce chapitre, nous exposerons et discuterons le mode de fixation de l'enzyme avec conservation de son activité enzymatique, l'obtention d'un immunosérum des immunoglobulines et la réactivité de celles-ci, avec la 5'nucléotidase membranaire du foie, du noyau caudé, du lymphocyte et du muscle.

Article 2 :

Purification and properties of bovine liver plasma membrane
5'nucleotidase.

Jean HARB, Khaled MEFLAH, Yves DUFLOS and Serge BERNARD,
Eur. J. Biochem. (1983), 137, 131-138.

Purification and properties of bovine liver plasma membrane 5' nucleotidase

Jean HARB, Khaled MEFLAH, Yves DUFLOS, and Serge BERNARD

Laboratoire de Biochimie Médicale, Nantes

(Received June 13/August 5, 1983) — EJB 83 0660

5'-Nucleotidase from bovine liver plasma membranes has been extracted by the zwitterionic detergent sulfobetaine 14, and purified to apparent homogeneity. Two affinity chromatographies on concanavalin-A-Ultrogel and 5'AMP-Sepharose 4B followed by AcA-54-Ultrogel filtration resulted in a purification of 16000 times relative to the homogenate. Sodium dodecyl sulphate gel electrophoresis indicates that the apparent molecular weight of the subunit is 70000. Cross-linking of the native enzyme with dimethylpimelimidate followed by gel electrophoresis shows a band with an apparent molecular weight of 140000 indicating that the enzyme is a dimer. 5'-Nucleotidase is a glycoprotein and its activity is inhibited to different degrees by various lectins, indicating a direct interaction with the enzyme. The purified enzyme shows a sevenfold greater affinity for AMP than the membrane-bound enzyme. The optimum activity of the purified enzyme occurs at pH 7.5 while the membrane-bound enzyme showed a wide range of pH optimum (7.5–8.3). An Arrhenius plot of the membrane-bound enzyme shows a break at 28°C, which disappears in the purified enzyme. The enzyme was inhibited by EDTA, and this inhibition was reversed by divalent cations. This, as well as other evidence, indicates that the enzyme contains a highly bound metal cation, perhaps Mn²⁺ or Mg²⁺.

The major contribution of plasma membrane 5'-nucleotidase to cellular purine metabolism is the hydrolysis of extracellular nucleoside 5'-monophosphates [1]. Otherwise, adenosine has been implicated in the control of biological processes such as vasodilation [2], cellular proliferation [3], immunosuppression [4] and hormone liberation [5]. 5'-Nucleotidase has been shown to be a plasma transmembrane [6] ectoenzyme [7, 8]. In addition, the enzyme has been described as an integral glycoprotein of the plasma membrane [9]. Cell-surface oligosaccharides, linked to asparagine residues of membrane glycoproteins, are thought to participate in a variety of specific biological interactions such as recognition and adhesion mechanisms [10], since some lectins induce transmembrane signals [11].

In a recent study [12] we demonstrated differences in the affinity of lectins for 5'-nucleotidase and acetylcholinesterase isolated from various bovine tissues. This phenomenon is probably due to a heterogeneity in glucidic structure of these enzymes. In order to elucidate these differences, we have undertaken a detailed study of liver plasma membrane 5'-nucleotidase.

This paper describes the purification of 5'-nucleotidase and its properties compared to those of the membrane-bound enzyme; in addition the behaviour of the enzyme towards different lectins has been studied. The fact that lectins are able specifically to recognize oligosaccharide residues [13, 14] allows us to investigate the carbohydrate structure of 5'-nucleotidase.

Abbreviations. ConA, concanavalin A; LCA, *Lens culinaris* agglutinin; WGA, wheat germ agglutinin; SB 14, sulfobetaine 14; SDS, sodium dodecyl sulphate.

Enzymes. 5'-Nucleotidase or 5'-ribonucleotide phosphohydrolase (EC 3.1.3.5); alkaline phosphatase or orthophosphoric-monoester phosphohydrolase (EC 3.1.3.1); acetylcholinesterase or acetylcholine acetylhydrolase (EC 3.1.1.7).

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Sulfobetaine 14 (SB 14), 3-(*N,N*-dimethyl-*N*-tetradecyl)ammoniopropane-1-sulfonate was obtained from Serva. Concanavalin A (ConA), wheat germ agglutinin (WGA), *Lens culinaris* agglutinin (LCA), concanavalin A-ultrigel (3–4 mg/ml gel), LCA-Ultrigel (2–4 mg/ml gel), WGA-Ultrigel (3–4 mg/ml gel), Trisacryl GF05 and AcA-54-Ultrigel were purchased from IBF (France). 5'AMP-Sepharose 4B (2 μmol AMP/ml) and the electrophoresis calibration kit were obtained from Pharmacia. AMP, IMP, UMP, CMP and GMP were obtained from Boehringer, Mannheim, and 2'AMP, 3'AMP and glycerol 2-phosphate from Sigma. Dimethylpimelimidate dihydrochloride was obtained from Fluka.

Buffers

Buffer A: 110 mM NaCl, 40 mM Tris/HCl, pH 7.4; buffer B: 110 mM NaCl, 1 mM MnCl₂/MgCl₂/CaCl₂, 40 mM Tris/HCl, pH 7.4; Buffer C: 110 mM NaCl, 1 mM MnCl₂/MgCl₂/CaCl₂, sulfobetaine 14 (SB 14) 0.4%, 40 mM Tris/HCl, pH 7.4; buffer D: 110 mM NaCl, 20 mM glycerol 2-phosphate, 40 mM Tris/HCl, pH 7.4.

Isolation of plasma membranes

Bovine liver was obtained from the slaughterhouse, put into buffer A, and used within 1 h after the death of the animal.

Liver was homogenized as described by Fleisher and Fleisher [15] in hypotonic buffer: 1 mM NaHCO₃, 2 mM CaCl₂, 5 mM Tris/HCl pH 8.

The homogenate was centrifuged at 2000 × g and 4°C for 11 min. The pellet was resuspended in hypotonic buffer and was re-centrifuged at 1500 × g and 4°C for 11 min. This second pellet

was suspended in 8% sucrose (w/w), 5 mM Tris/HCl pH 8 and 61% sucrose was added to the suspension until the final sucrose concentration was 48% (*d* 1.22).

The suspension, divided into 12 tubes (10 ml each), was overlaid with five layers of sucrose solution according to the method of Emmelot et al. [16] and was centrifuged for 2 h at 100000 × g and 4°C in an L5-50 Beckman ultracentrifuge using an SW 27 rotor. The liver plasma membranes accumulated as a compact zone at the interface *d* 1.16/*d* 1.18. The membranes were collected, diluted twofold with 5 mM Tris/HCl pH 8 and re-centrifuged for 1 h at 100000 × g. The membranes were resuspended in buffer A and stored at -80°C until used.

Extraction and purification of 5'-nucleotidase from plasma membranes

a) *Solubilization.* Plasma membranes (6 mg/ml) were sonicated for three 10-s periods at 100 W and 4°C in a Labsonic 1510 sonicator. Sulfobetaine was added, in buffer B, to a final concentration of 0.4% (w/v). The suspension (3 mg/ml) was stirred at 4°C for 4 h and was then centrifuged at 100000 × g and 4°C for 30 min in a Ti 50 rotor. The supernatant and the pellet were collected for protein and 5'-nucleotidase activity assays. The same procedure was carried out when Triton X-100 was used.

b) *ConA-Ultrogel affinity chromatography.* The supernatant from step (a) was applied at a flow rate of 2.5 ml/h to ConA-Ultrogel column (1.14 × 8 cm) equilibrated with buffer C (buffer B containing 0.4% SB 14) at 6°C. Fractions of 1 ml were collected and the column was washed with buffer C until the absorbance at 280 nm of the effluent ceased to change. 5'-Nucleotidase was then eluted at the same flow rate with the same buffer containing 0.3 M methyl α-D-mannoside. Fractions containing the highest 5'-nucleotidase activity were pooled, dialyzed against 1000 ml buffer A and concentrated to about 3 ml on a Micro-Prodicon device using a PA 15 membrane. The same procedure was carried out for LCA-Ultrogel and WGA-Ultrogel affinity chromatography, using methyl α-D-mannoside and *N*-acetyl-D-glucosamine respectively for enzyme elution.

c) *5'-AMP-Sepharose 4B affinity chromatography.* The concentrated eluate from step (b) was applied at a flow rate of 2.5 ml/h to a 5'AMP-Sepharose 4B column (1.14 × 8 cm) equilibrated with buffer C at 6°C. After washing, 5'-nucleotidase was eluted with buffer C containing 10 mM 5'-AMP.

d) *Trisacryl GF 05 desalting.* Fractions eluted from step (c) were pooled and applied at a flow rate of 120 ml/h for desalination on a column of Trisacryl GF 05 (2.5 × 6 cm; exclusion limit 3000) equilibrated with buffer A. This step was necessary to eliminate AMP, adenosine and P_i from the eluate; SB 14 was not retained on this column, and was eluted with the proteins in the void volume. The fractions containing 5'-nucleotidase activity were dialyzed against buffer A, and then concentrated on Micro-Prodicon as described in (b).

e) *AcA-54-Ultrogel filtration gel.* The concentrated eluate from step (d) was applied at a flow rate of 20 ml/h to a AcA-54-Ultrogel column (2.5 × 16 cm; exclusion limit 90000) equilibrated with buffer A containing 0.4% SB 14. The eluted fractions containing 5'-nucleotidase were pooled, dialyzed and concentrated as described in (b).

Polyacrylamide gel electrophoresis

Sodium dodecyl sulphate (SDS) gel electrophoresis [17] was performed using slab gels containing a 5–15% (w/v) gradient

of acrylamide with 0.2% (w/v) *N,N*-methylenebisacrylamide. Samples were reduced and alkylated [18] before application to the gels. Native enzyme was cross-linked with dimethylpimelimidate dihydrochloride [19] before SDS treatment. Molecular weight standards used were trypsin inhibitor (20100), carbonic anhydrase (30000), lactate dehydrogenase (36000), ovalbumin (43000), catalase (60000), albumin (67000), phosphorylase (94000), β-galactosidase (130000), ferritin (220000).

Gels were stained for protein developing with silver nitrate [20].

Assays

5'-Nucleotidase activities of fractions pre-incubated for 10 min in buffer A were determined at 37°C according to the method of Zachowsky et al. [21]. 20 mM sodium glycerol 2-phosphate was present to saturate non-specific phosphatases [22]. The reaction was started by addition of 1 mM AMP. The inorganic phosphate was determined according to Anner et al. [23]. Alkaline phosphatase activity was determined by the increase of absorbance at 405 nm using *p*-nitrophenyl phosphate as a substrate [24]. Protein was assayed by the method of Lowry et al. [25] with bovine serum albumin as a standard. For the diluted preparations, the proteins were precipitated according to Polachech and Labib [26] before Lowry assay.

RESULTS

5'-Nucleotidase activity was 19 times higher in plasma membranes than in the homogenate; 19% of the whole homogenate activity was recovered in the membranes (Table 1). These values are in agreement with those obtained in rat liver plasma membranes [27].

5'-Nucleotidase solubilization

Bovine liver plasma membrane 5'-nucleotidase solubilization with 2% (w/v) Triton X-100 did not exceed 66%; moreover, an inhibition of 25–30% of this enzyme specific activity was observed with this concentration of Triton (results not shown). On the other hand, the zwitterionic detergent SB 14 was very efficacious for 5'-nucleotidase solubilization, even at low concentration: Fig. 1 shows that more than 90% of the enzyme was solubilized with 0.2% SB 14 whereas only 60% of the total proteins were solubilized at this detergent concentration. The specific activity was 1.55 times higher in the 100000 × g supernatant than in membranes. At 0.4% SB 14, almost all of the enzyme was solubilized with only 67% of the proteins; specific activity was about 1.5 times higher than in membranes. Thus, we have chosen for the enzyme purification to solubilize the membranes with 0.4% SB 14 in order to obtain the maximum of 5'-nucleotidase.

Table 1. Recovery of 5'-nucleotidase activity during the different steps of plasma membranes preparation
The values are the mean of six experiments

Fraction	Specific activity μmol P _i · min ⁻¹ · mg ⁻¹	Yield %
Homogenate	0.016	100
1500 × g pellet	0.078	41
Plasma membranes	0.310	19

Table 2. Purification of 5'-nucleotidase from bovine liver plasma membranes

Fraction	Total protein	5'-Nucleotidase			Alkaline phosphatase	
		specific activity	yield	purification factor	specific activity	yield
Homogenate	—	0.016 ^a	—	1	—	—
Plasma membranes	13.0	0.384	100	24	0.20	100
Solubilized membranes	9.1	0.566	103	35	0.26	88
ConA-Ultrogel eluate	0.8	5.466	87	341	0.50	15
AMP-Sepharose eluate	0.120	33.600	80	2100	0	0
AcA 54 eluate	0.0135	256.660	69	16040	0	0

^a This value was the mean of six experiments

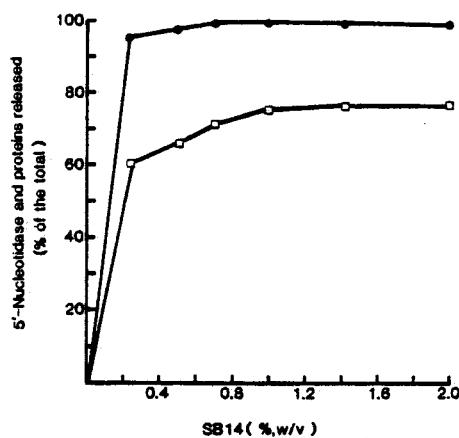


Fig. 1. Solubilization of 5'-nucleotidase and plasma membrane proteins by SB 14. Bovine liver plasma membranes were sonicated for three 10-s periods at 100 W and 4°C; then 100-μl samples (0.6 mg) were each mixed with 100 μl different concentrations of SB 14 in buffer A to obtain the final concentrations shown. After agitation at 4°C during 4 h, the samples were centrifuged at 100000 × g in a Beckman Airfuge for 45 min. Supernatants were then assayed for proteins (□) and 5'-nucleotidase activity (●).

Lectins-Ultrogel chromatography

In a preliminary experiment we tried to bind solubilized membranes to WGA-Ultrogel and LCA-Ultrogel affinity columns: 95% and 85% of total 5'-nucleotidase activity applied on these respective columns was eluted in the void volume (results not shown). For this reason we chose to perform the chromatography on ConA-Ultrogel, in spite of the broad specificity of this lectin for sugars. ConA-Ultrogel columns retained almost 90% 5'-nucleotidase activity applied and 87% of this activity was eluted with 0.3 M methyl α-D-mannoside. The enzyme was purified by a factor of about ten by this step (Table 2).

5'AMP-Sepharose chromatography

More than 90% of the activity applied on the AMP-Sepharose column was recovered after elution with AMP and desalting on Trisacryl GF 05. The enzyme was purified six times after this chromatography as compared to the concanavalin A eluate. Low-molecular-weight contaminating proteins were detected on SDS/polyacrylamide gel electrophoresis and,

therefore, we decided to perform a gel filtration with the AMP eluate.

AcA-54-Ultrogel filtration

Filtration on AcA-54-Ultrogel led to an 8-fold purification of the enzyme. The specific activity was about 256 units and the yield was 70% of the total membrane activity and consequently 14% of the initial homogenate. Alkaline phosphatase activity was measured at all stages of purification. 85% of this enzyme was not retained on the ConA Ultrogel column and no alkaline phosphatase activity was detected in the 5'AMP-Sepharose eluate.

Purity and molecular weight of purified 5'-nucleotidase

The purified preparation gave one major band on SDS/polyacrylamide gel electrophoresis. However, the silver nitrate staining detected very faint minor bands even after gel filtration (Fig. 2). The apparent molecular weight of the major band was 70000. When the enzyme was cross-linked with dimethylpimelimidate, a protein band corresponding to an apparent molecular weight of 140000 was observed. However, the band at 70000 was also present. This fact was probably due to an incomplete cross-linking under conditions used. Another explanation might be the existence of a monomeric form of the enzyme in addition of the dimeric form; but the gel filtration on AcA 54 indicated that all the enzyme was eluted in void volume and no 5'-nucleotidase activity was detected in the fractionation range between 5000 and 70000. All these results constitute evidence that 5'-nucleotidase is composed of two sub-units which are probably identical.

Substrate specificity

The activity of membrane-bound 5'-nucleotidase and purified enzyme towards a number of nucleoside monophosphates and other phosphate esters is shown in Table 3. The enzyme showed a higher affinity for purine nucleosides than for pyrimidine nucleosides. The K_m of the purified enzyme for AMP was seven times lower than the K_m of the membrane-bound enzyme; whereas it was only two times lower for the other substrates.

Substrate specificity was better expressed by V_{max}/K_m . According to this criterion, AMP was the best substrate, the other purine nucleosides were two times less effective, whereas

Table 3. Substrate specificity of plasma membranes and purified 5'-nucleotidase

Plasma membranes (37 µg) or purified enzyme (40 ng) were incubated in buffer D at 37 °C. The substrate concentration ranges used for K_m determinations were 10–1000 µM (final volume: 0.4 ml). The initial velocity was calculated by using a short incubation period (kinetics each 15 s). Kinetic constants were determined using a basic program on a P 1500 Sharp calculator. V_{max} relative to the V_{max} for AMP was calculated from the K_m for each substrate. The V_{max} for AMP was 0.41 and 0.56 units/mg in plasma membranes and purified enzyme respectively. Results are means of two determinations. (1 unit = 1 µmol P_i · min⁻¹ · mg⁻¹)

Substrate	Fractions	Relative V_{max}	K_m	Relative V_{max}/K_m
AMP	membrane-bound	100	98.7	1.01
	purified	100	15.3	6.53
GMP	membrane-bound	73	71.2	1.02
	purified	132	41.6	3.16
IMP	membrane-bound	89	116.0	0.76
	purified	139	51.9	2.67
CMP	membrane-bound	84	111.0	0.75
	purified	143	63.1	2.26
UMP	membrane-bound	101	91.8	1.09
	purified	166	74.5	2.22
2'AMP	membrane-bound	0		
	purified	0		
3'AMP	membrane-bound	0		
	purified	0		
<i>p</i> -Nitrophenyl phosphate	membrane-bound	0		
	purified	0		

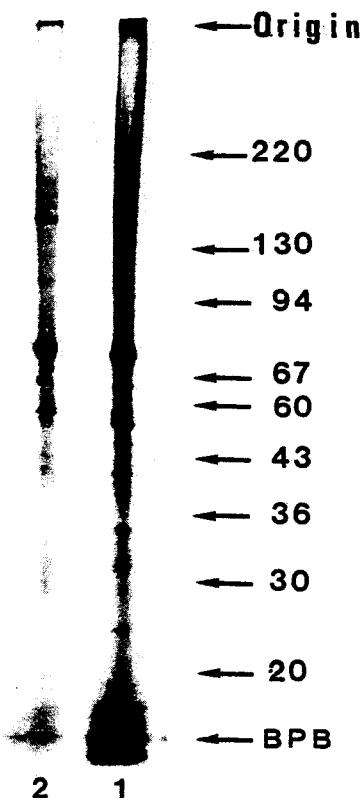


Fig. 2. SDS/polyacrylamide gel electrophoresis. Electrophoresis was performed as described in Materials and Methods, followed by silver nitrate staining. (1) 4 µg purified enzyme treated with SDS. (2) 4 µg purified enzyme cross-linked with dimethylpimelimidate dihydrochloride before SDS treatment. Arrows indicate the mobility of standard proteins, numbers are molecular weight $\times 10^{-3}$. BPB, bromophenol blue

the pyrimidine nucleosides were three times less effective. These differences were less important in membrane-bound enzyme. No activity was observed toward 2'AMP, 3'AMP or *p*-nitrophenylphosphate.

Effect of lectins

The effects of concanavalin A, wheat germ agglutinin and *Lens culinaris* agglutinin were studied on both the membrane-bound 5'-nucleotidase and the purified enzyme. Fig. 3A shows that 90% of 5'-nucleotidase activity was inhibited by concanavalin A (ratio ConA/membrane proteins = 1). This inhibition was maximal and was completely reversed by the addition of 0.1 M methyl α-D-mannoside. The ConA inhibited, but to a lesser degree, the purified enzyme; only 75% of the activity was inhibited after addition of 150 µg ConA/26 ng enzyme.

The inhibition of both membrane bound 5'-nucleotidase and purified enzyme with wheat germ and *L. culinaris* agglutinins was much lower than with concanavalin A. Moreover, the inhibition of purified enzyme activity by *L. culinaris* agglutinin was higher than that observed in membrane-bound enzyme. The inverse phenomenon was noted with wheat germ agglutinin (Fig. 3B, C). These inhibitions were completely reversed by competing sugars.

A Lineweaver-Burk plot showed that the inhibition observed with the three lectins was non-competitive for both the membrane-bound enzyme and the purified enzyme. Table 4 shows the K_i values for the different lectins: the purified enzyme K_i for concanavalin A and wheat germ agglutinin increased, while the purified enzyme K_i for *L. culinaris* agglutinin decreased. These results confirm the low inhibition of purified enzyme by concanavalin A and wheat germ agglutinin and the relatively high inhibition of the enzyme by *L. culinaris* agglutinin.

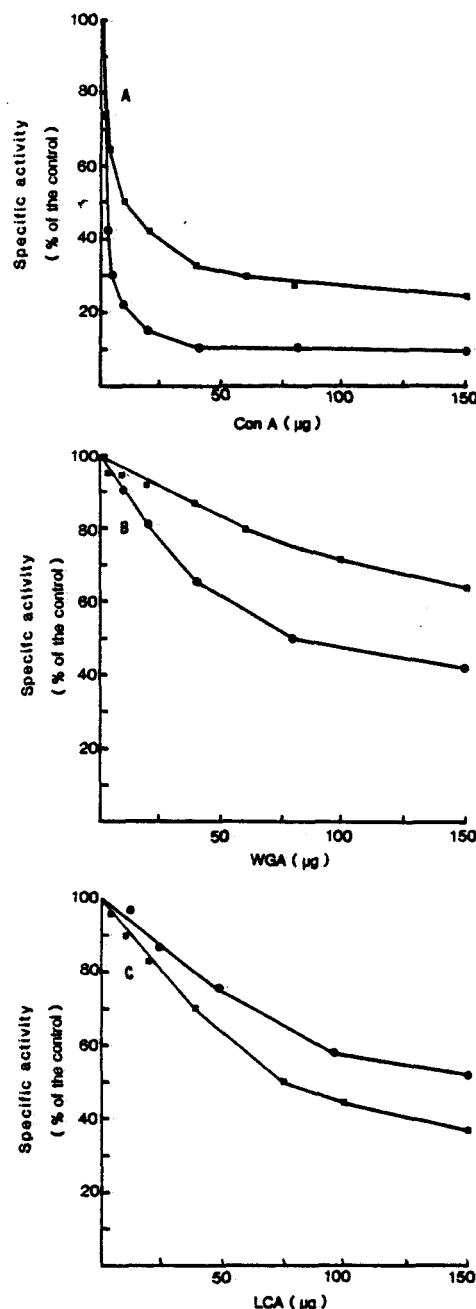


Fig. 3. Effects of lectins on 5'-nucleotidase activity. Plasma membranes (26 μg) or purified enzyme (26 ng) were incubated in buffer D at 37 °C in the absence or in the presence of concanavalin A (A), wheat germ (B) or *L. culinaris* agglutinin (C). The reaction was started after 20 min by addition of 1 mM AMP. Results are expressed as percentages of the control specific activity. (●) Plasma membranes; (■) purified enzyme

Effects of pH and temperature

Purified 5'-nucleotidase has a pH optimum at 7.5 in contrast with membrane-bound enzyme, which exhibited maximum specific activity over a wide pH range between 7.5 and 8.3 (Fig. 4). Similar results have been reported for lymphocyte plasma membrane 5'-nucleotidase [28]. 5'-Nucleotidase shows optimum activity in Tris/HCl buffer at pH 7.5. A somewhat higher activity is observed in Mes/Tris buffer at pH < 7; glycine/NaOH buffer yields a lower activity than Tris/HCl

Table 4. Inhibition constants of 5'-nucleotidase for lectins

Plasma membranes (26 μg) or purified enzyme (26 ng) were incubated in buffer D at 37 °C, in absence or in presence of lectins: 4 μg and 10 μg concanavalin A, 40 μg and 80 μg of *L. culinaris* or wheat germ agglutinin (final volume: 0.4 ml). The AMP concentrations were 10–1000 μM. The initial velocity was calculated by using a short incubation period (kinetics each 15 s). The K_i was calculated by the measure of V_{max} in the absence and in the presence of lectins

Fraction	K_i			
		ConA	WGA	LCA
M				
Plasma membranes	1.0×10^{-7}	5.38×10^{-6}	11.80×10^{-6}	
Purified enzyme	1.85×10^{-7}	25.50×10^{-6}	7.33×10^{-6}	

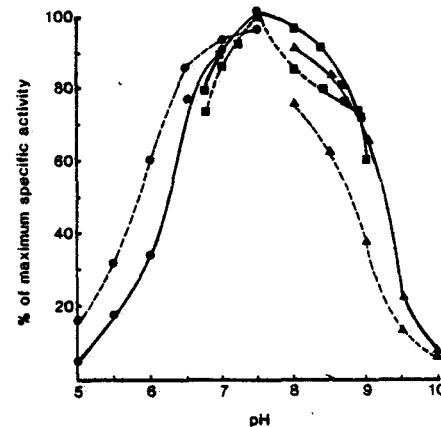


Fig. 4. Effects of pH on 5'-nucleotidase activity. Plasma membranes (—) or purified enzyme (---) were incubated at 37 °C in 40 mM Tris/HCl (■) or Mes/Tris (●) or glycine/NaOH (▲) buffers each containing 110 mM NaCl at indicated pH. The reaction was started by 1 mM AMP addition. Results are expressed as percentages of the maximal specific activity observed in Tris/HCl buffer

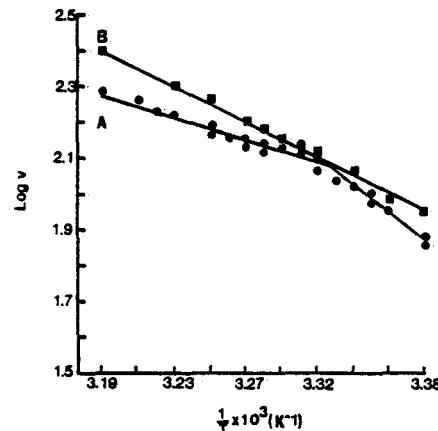


Fig. 5. Arrhenius plots of temperature effects on 5'-nucleotidase. Plasma membranes (A, ●) or purified enzyme (B, ■) were incubated in buffer D at different temperatures (22–40 °C). The reaction was started by 1 mM AMP addition. Two determinations

buffer. The both membrane-bound and purified enzyme have no second pH optimum at basic pH.

The Arrhenius plot of 5'-nucleotidase activity in bovine liver plasma membrane exhibited a well-defined break at

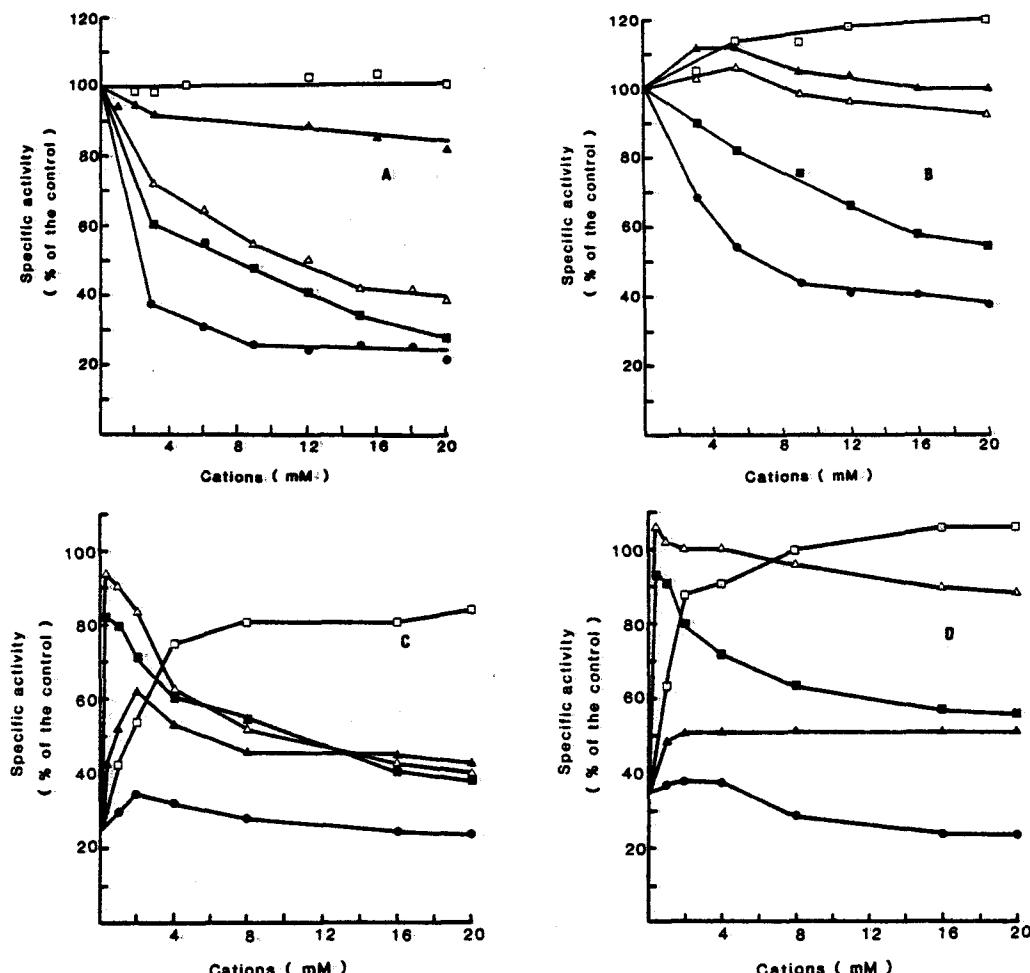


Fig. 6. Effects of divalent cations on 5'-nucleotidase activity. Plasma membranes (A) or purified enzyme (B) were incubated in buffer D containing different concentrations of cations at 37°C during 10 min. The reactions were started by 1 mM AMP addition. Plasma membranes (C) and purified enzyme (D) were incubated with 5 μM and 100 μM EDTA respectively during 15 min at 37°C before addition of divalent cations. The reactions were started 15 min after cations addition by AMP; results are expressed as percentages of the control without EDTA and cations; initial activity represents the residual activity after EDTA addition. (□) Mg²⁺; (■) Co²⁺; (▲) Ca²⁺; (●) Ni²⁺; (△) Mn²⁺

around 28°C (Fig. 5). The activation energy was greater at temperatures below the break than above the break (17 kJ/mol and 8 kJ/mol respectively). In contrast, the Arrhenius plot of purified 5'-nucleotidase was a straight line. The activation energy was 11 kJ/mol.

Effects of divalent cations and EDTA

Fig. 6 shows that Ni²⁺, Co²⁺ and Mn²⁺ were strong inhibitors for plasma membrane 5'nucleotidase. Ca²⁺ slightly inhibited only at high concentration and Mg²⁺ had no effect on the activity. However, only Ni²⁺ and Co²⁺ inhibited purified 5'-nucleotidase; Ca²⁺ and Mn²⁺ were weak activators only at low concentration. In contrast to membrane-bound enzyme, Mg²⁺ induced an activation of purified enzyme (120% at 20 mM) (Fig. 6B). Furthermore, 0.5 mM Zn²⁺ inhibited 95% and 60% of 5'-nucleotidase activity in membrane and purified enzyme respectively. All these inhibitions are non-competitive for both the membrane-bound enzyme and the purified enzyme. The purified enzyme K_i values for Ni²⁺, Co²⁺ and Zn²⁺ were respectively 5.7 mM, 20 mM and 0.21 mM; they were 2–3 times lower for the membrane-bound enzyme.

0.05 mM EDTA inhibited 80% of the membrane-bound 5'-nucleotidase activity, whereas this inhibition was only about 53% in purified enzyme at the same EDTA concentration. On the other hand, we have studied the effect of different cations on the reactivation of 5'-nucleotidase after EDTA addition. 0.2 mM Mn²⁺ and Co²⁺ restored respectively 90% and 80% of the 5'-nucleotidase activity in membrane-bound enzyme; this reactivation disappeared at high concentrations of Mn²⁺ and Co²⁺. Mg²⁺ slowly restored the membrane-bound activity: 83% of the activity was recovered at 20 mM Mg²⁺. Ca²⁺ was less effective for the activity restoration and Ni²⁺ had no effect (Fig. 6C).

In the purified enzyme (Fig. 6D) Mn²⁺ and Co²⁺ restored the activity in the same way as in membrane-bound enzyme, at 0.2 mM; but at high concentration, only Co²⁺ was a strong inhibitor. Mg²⁺ was more efficacious in purified enzyme activity restoration than in membrane bound enzyme (88%/54% respectively at 2 mM) and slightly activated the purified enzyme at high concentration. Ca²⁺ and Ni²⁺ had no effect. 5 μM Zn²⁺ restored 100% of membrane-bound 5'-nucleotidase activity, whereas 50 μM Zn²⁺ reactivated only

60% of the purified enzyme. These reactivations disappeared at high concentrations.

DISCUSSION

We have found that the zwitterionic detergent Sulfobetaine 14 is very effective in solubilizing 5'-nucleotidase from bovine liver plasma membranes as has previously been noted in the case of rat liver 5'-nucleotidase [29].

In order to purify plasma membrane 5'-nucleotidase we have used a double-chromatography method based on the one hand on the glycoproteic nature of the enzyme and on the other hand on its affinity for AMP. This method resulted in a purification factor of about 2000. Low-molecular-weight contaminating proteins (30000–50000) were present in the purified product as detected on SDS/polyacrylamide gel electrophoresis. A gel filtration step allowed us to eliminate almost all these contaminants and obtain a preparation purified 16000 times more than the homogenate. This purification factor and the percentage of total 5'-nucleotidase activity recovery were higher than those obtained from rat liver [29–31], pig lymphocytes [28] and mouse liver [32]. The apparent molecular weight of the native enzyme is about 140000. The dimeric form of the 5'-nucleotidase has been described in rat liver [29], mouse liver [32], rat heart [33]. In contrast, a monomeric 5'-nucleotidase was obtained in pig lymphocytes [28].

One of the consequences of the enzyme purification was the increase in enzyme affinity towards substrates, especially for AMP. Indeed, the K_m value for AMP approached those observed in cytosol enzyme from bovine brain [34] and photoreceptor [35]. However, it was much lower than the K_m observed in rat liver cytosol 5'-nucleotidase [36, 37]. Although the purified enzyme affinity towards AMP increased, the hydrolysis rate of this substrate was lower than that observed with the other substrates: similar phenomena have been noted in rat liver enzyme [36] and brain enzyme [38]. The V_{max}/K_m criterion indicates, however, that AMP constitutes the best substrate for 5'-nucleotidase.

The wide range of pH optimum for plasma membrane 5'-nucleotidase disappeared in purified enzyme indicating that, in plasma membranes, interactions occur and protect the enzyme by minimizing, in some way, the effects of pH variation. Identical results have been observed in pig lymphocyte 5'-nucleotidase [28].

The Arrhenius plots of both membrane-bound enzyme and purified enzyme show that a lipid-mediated effect occurs in plasma membrane 5'-nucleotidase. This phenomenon has also been observed in rat liver plasma membrane enzyme [39] and mammary gland enzyme [40]. However, Stanley and Luzio [41] showed that the biphasic Arrhenius plot obtained in rat liver plasma membrane as well as partially purified 5'-nucleotidase was independent of its lipid environment.

The low affinity of bovine plasma membrane 5'-nucleotidase for wheat germ and *Lens culinaris* agglutinins is in agreement with the fact that the enzyme is not retained on affinity columns prepared from these lectins. The inhibition of purified enzyme by the three lectins results from direct binding between lectins and saccharidic residues of the enzyme. However, the inhibition of the plasma membrane 5'-nucleotidase activity by wheat germ agglutinin and concanavalin A is higher than that observed in purified enzyme. This phenomenon is probably due, on the one hand, to the specific binding of lectins with the carbohydrate residues near the catalytic center and, on the other hand, to structural rearrangements of the membrane induced by the binding of the lectins with other membrane glycoconjugates [11].

In a previous study [12] we have shown that bovine lymphocyte plasma membrane 5'-nucleotidase was not inhibited by wheat germ agglutinin and that the glycosylation of the enzyme was of the high-mannose type; in contrast, the bovine synaptosomal plasma membrane 5'-nucleotidase showed a high affinity for wheat germ agglutination ($K_i = 2.43 \times 10^{-7}$ M) probably due to a complex type of glycosylation [42].

Although the inhibition of bovine liver plasma membrane 5'-nucleotidase with wheat germ agglutinin was lower than that observed in synaptosomal enzyme, this inhibition disappeared after plasma membrane neuraminidase treatment (data not shown) indicating a sialylation of the enzyme. All these results allow us to infer a hybrid type of glycosylation for bovine liver plasma membrane 5'-nucleotidase.

The exogenous divalent cations were not necessary for maximal activity of the membrane-bound 5'-nucleotidase, in contrast with the cytosolic enzyme [36]. In addition, Mn^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} and Ni^{2+} induced to different degrees a non-competitive inhibition of the enzyme activity. On the other hand, Mn^{2+} and Ca^{2+} were not inhibitors of the purified enzyme activity while Mg^{2+} was an activator. This phenomenon was probably due to the membrane environment of the 5'-nucleotidase. The non-competitive type inhibition of the enzyme observed in the presence of Zn^{2+} , Co^{2+} or Ni^{2+} can be explained either by the binding of the exogenous cations to the enzyme inducing a conformational change of the catalytic site or, more probably, by the formation of an AMP–exogenous-cations complex, which did not modify the enzyme affinity for AMP but produced a decrease of the hydrolysis velocity. Nevertheless, with this experimental procedure we can't affirm one or another of these two hypotheses.

The inhibition of the enzyme with EDTA was reversed by addition of exogenous cations. A low concentration of inhibitory cations was the most effective (Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+}) while at high concentrations, these cations re-inhibited the 5'-nucleotidase activity. Two hypotheses can explain this reversible EDTA effect: (a) the formation of an inactive complex, EDTA–endogenous-cations – enzyme. (b) the chelation and the removing by EDTA of essential endogenous cations for the enzyme activity.

Thus, the addition of exogenous cations induces a shifting of EDTA towards them and liberates the endogenous cations allowing the restoration of 5'-nucleotidase activity. On the other hand, the 5'-nucleotidase activity of plasma membranes treated with EDTA is restored by a simple wash of these membranes by a free EDTA buffer (results not shown). These observations suggest that EDTA is bound to the cations but does not remove them from the enzyme; consequently, the first hypothesis seems to be more plausible. However, sophisticated experiments are necessary to confirm one or other of these two hypotheses and these are underway in our laboratory.

All these observations indicate that plasma membrane 5'-nucleotidase must be a metalloenzyme with perhaps Mg^{2+} or Mn^{2+} as cation.

We are grateful to Dr C. Bertrand and Dr J. Aubry for advice and discussion, A. Combolot for helping to prepare the manuscript, D. Lassort for her technical assistance and A. Longuet for the photographs. We thank Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 211 for its material assistance.

REFERENCES

1. Frick, G. P. & Lowenstein, J. M. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 1240–1244.

2. Berne, R. M. & Rubio, R. (1979) *Handb. Physiol.*; sect. 2: Cardiovascular systems 1, 873–952.
3. Carson, D. A. & Seegmiller, J. E. (1976) *J. Clin. Invest.* 57, 274–282.
4. Fischer, D., Van Der Weyden, M. B., Snyderman, R. & Kelley, N. N. (1976) *J. Clin. Invest.* 58, 399–407.
5. Wolff, J. & Cook, G. H. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 687–693.
6. Zackowski, A., Evans, W. H. & Paraf, A. (1981) *Biochim. Biophys. Acta*, 644, 121–126.
7. Gurd, J. W. & Evans, W. H. (1974) *Arch. Biochem. Biophys.* 164, 305–311.
8. De Pierre, J. W. & Karnovsky, M. L. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 7111–7120.
9. Hayman, M. J. & Crumpton, M. J. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 47, 923–930.
10. Heifetz, A. & Lennarz, W. J. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 6119–6127.
11. Bourguignon, L. Y. W. & Singer, S. J. (1977) *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 74, 5031–5035.
12. Meflah, K., Bernard, S. & Massoulié, J. (1983) *EMBO J.* in the press.
13. Lis, H. & Sharon, N. (1973) *Annu. Rev. Biochem.* 42, 541–574.
14. Monsigny, M., Delmotte, F. & Helene, C. (1978) *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 75, 1324–1328.
15. Fleischer, B. & Fleischer, S. (1969) *Biochim. Biophys. Acta*, 183, 265–275.
16. Emmelot, P., Bos, C. J., Benedetti, E. L. & Rumke, Ph. (1964) *Biochim. Biophys. Acta*, 90, 126–145.
17. Laemmli, V. K. (1970) *Nature (Lond.)* 227, 680–685.
18. Lane, L. C. (1978) *Anal. Biochem.* 86, 655–664.
19. Davis, G. E. & Kaplan, J. C. (1972) *Can. J. Biochem.* 50, 416–421.
20. Merrill, C. R., Goldman, D., Sedman, S. A. & Ebert, M. H. (1981) *Science (Wash. DC)* 211, 1437–1438.
21. Zachowski, A., Simonin, G., Aubry, J., Pommier, P., Singh, S. N., Potter, M. & Paraf, A. (1981) *J. Recept. Res.* 2, 97–118.
22. Stanley, K. K., Edwards, M. R. & Luzio, J. P. (1980) *Biochem. J.* 186, 59–69.
23. Anner, B. & Moosmayer, M. (1975) *Anal. Biochem.* 65, 305–309.
24. Bessey, O. A., Lowry, O. H. & Brock, M. J. (1946) *J. Biol. Chem.* 164, 321–329.
25. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
26. Polacheck, I. & Labib, E. (1981) *Anal. Biochem.* 117, 311–314.
27. Coleman, R., Michell, R. H., Finean, J. B. & Hawthorne, J. N. (1967) *Biochim. Biophys. Acta*, 135, 573–579.
28. Dornand, J., Bonnafous, J. C. & Mani, J. C. (1978) *Eur. J. Biochem.* 87, 459–465.
29. Bailyes, E. M., Newby, A. C., Siddle, K. & Luzio, J. P. (1982) *Biochem. J.* 203, 245–251.
30. Nakamura, S. (1976) *Biochim. Biophys. Acta*, 426, 339–347.
31. Slavik, M., Karthner, N. & Riordan, J. R. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 75, 342–349.
32. Evans, W. H. & Gurd, J. W. (1973) *Biochem. J.* 133, 189–199.
33. Naito, Y. & Lowenstein, J. M. (1981) *Biochemistry*, 20, 5188–5194.
34. Montero, J. M. & Fes, J. B. (1982) *J. Neurochem.* 39, 982–989.
35. Fukui, H. & Shichi, H. (1982) *Biochemistry*, 21, 3677–3681.
36. Itoh, R. (1981) *Biochim. Biophys. Acta*, 657, 402–410.
37. Van Den Berghe, G., Van Pottelsbergh, C. & Hers, H. G. (1977) *Biochem. J.* 162, 611–616.
38. Tanaka, R., Morita, H. & Teruya, A. (1973) *Biochim. Biophys. Acta*, 298, 842–849.
39. Dipple, I. & Houslay, M. D. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 105, 259–263.
40. Doss, R. C., Carothers-Carraway, C. A. & Carraway, K. L. (1979) *Biochim. Biophys. Acta*, 570, 96–106.
41. Stanley, K. K. & Luzio, J. P. (1978) *Biochim. Biophys. Acta*, 514, 198–205.
42. Meflah, K., Harb, J., Duflos, Y. & Bernard, S. (1983) *J. Neurochem.* in the press.

J. Harb, K. Meflah, Y. Duflos, and S. Bernard, Laboratoire de Biochimie Médicale, Faculté de Médecine,
1 rue Gaston Veil, F-44035 Nantes-Cedex, France

MATERIELS et METHODES

I - PREPARATION ET IMMOBILISATION DE LA 5'NUCLEOTIDASE

La 5'nucléotidase est purifiée à partir des membranes plasmiques de foie de boeuf (HARB *et al.*, 1983). L'enzyme est alors fixé sur des billes d'agarose activées au glutaraldéhyde, selon la technique de TERNINCK et AVRAMEAS (1972). Après les différents traitements, le gel est remis en suspension dans un tampon Tris 40 mM, NaCl 110 mM, pH 7,40. On mesure alors l'activité enzymatique fixée sur le gel.

II - IMMUNISATION DES LAPINS

Le lapin témoin reçoit trois injections sous-cutanées de 300 µl d'une suspension de gel contenant 10 mg d'hydroxyde d'aluminium et 10 mg d'oxyde de magnésium. La même opération est effectuée sur les autres animaux, mais avec le gel contenant l'enzyme immobilisé. Dix jours après la troisième injection, 20 ml de sang sont prélevés dans la veine marginale de l'oreille et décantés par centrifugation, 15 minutes à 800 g. On examine alors l'immune réactivité contre la 5'nucléotidase, par l'immunoélectrophorèse (LAURELL, 1965) et par la propriété inhibante de l'activité enzymatique.

III - PREPARATION DES IMMUNOGLOBULINES

Deux techniques de purification des immunoglobulines G (IgG)

à partir de l'immunsérum sont utilisées : la première est effectuée par chromatographie sur échangeuse d'ions, selon la méthode proposée par IBF France. 10 ml d'immunsérum sont dessalés sur colonne de Trisacryl GF 05 (30 ml) puis appliqués sur une colonne échangeuse d'ions (30 ml de DEAE-Trisacryl).

La deuxième technique de purification des IgG, que nous avons adoptée, est basée sur une chromatographie d'affinité sur colonne de protéine A de *Staphylococcus aureus* (ENDERSEN, 1978). 10 ml de l'immunsérum sont déposés sur une colonne de 5 ml, équilibrée par un tampon Tris 10 mM (pH 7,4). Après lavage, l'élution est effectuée par une solution de glycine 0,2 M tamponnée à pH 2,5 par HCl. Les fractions obtenues sont immédiatement neutralisées et dialysées contre un tampon Tris-HCl 40 mM, NaCl 110 mM, pH 7,4. Les IgG ainsi purifiées sont caractérisées immunologiquement par un antisérum des antiglobulines ou des anti-IgG de chèvre orientées contre le lapin. En outre, une électrophorèse sur acétate de cellulose est effectuée sur les échantillons afin d'apprécier le degré de purification des IgG. La migration s'effectue sous une tension de 150 volts pendant 15 minutes.

IV - PURIFICATION DES ANTICORPS ORIENTES CONTRE LA 5'NUCLEOTIDASE

2 ml d'une solution d'immunoglobulines G (2,5 mg/ml) purifiées sur protéine A Ultrogel, sont déposés sur une colonne de 5'nucléotidase immobilisée sur Sepharose 4 B (2 ml). Après lavage, l'élution est effectuée par une solution de glycine 0,2 M tamponnée à pH 2,5 par HCl. Les fractions obtenues sont neutralisées et dialysées contre un tampon Tris HCl 40 mM, NaCl 110 mM, pH 7,4. Après concentration, l'effet des anticorps, sur l'activité 5'nucléotidase des différentes membranes, est testé.

V - DOSAGES

=====

Les protéines sont déterminées selon la technique de LOWRY *et al.* (1951). L'activité 5'nucléotidase est mesurée selon la méthode décrite par ZACHOWSKI *et al.* (1981).

VI - ULTRACENTRIFUGATION EN GRADIENT CONTINU DE SACCHAROSE

=====

La 5'nucléotidase purifiée à partir des membranes plasmiques du foie de boeuf est déposée sur un gradient continu de saccharose 5-20% poids/volume (Tris 40 mM, NaCl 110 mM, SB 14 0,2%, pH 7,4), en présence de marqueurs : β -galactosidase d'*Escherichia coli* (16 S), catalase de foie de boeuf (11,3 S), alcool deshydrogénase de levure (7,4 S), alcool deshydrogénase de foie de cheval (4,8 S). Après une incubation de l'enzyme avec différentes concentrations d'anticorps (1 heure à 37°C), les échantillons sont déposés au sommet d'un gradient continu de saccharose (5-20%), SB 14 0,2%, Tris 40 mM, NaCl 110 mM, pH 7,4. Les tubes sont ensuite centrifugés pendant 20 heures à 40 000 RPM (rotor Beckman SW 40). Les gradients sont récoltés par le fond du tube, à raison de 250 μ l par fraction. L'activité 5'nucléotidase est déterminée en point final, et exprimée en unités arbitraires (Δ D0/h/ml).

VII - IMMUNOEMPREINTE

=====

L'électrophorèse des membranes plasmiques (foie, lymphocyte, noyau caudé, muscle digastrique) est effectuée selon la technique de LAEMMLI (1970), sur gradient de polyacrylamide (3-20%). Après migration à courant constant (20 mA) pendant 16 heures à 10°C, le gel est mis au contact d'une feuille de nitrate de cellulose, et les protéines membranaires sont transférées électrophorétiquement (1 heure à 30 mA), selon la méthode de TOWBIN *et al.* (1979). La feuille de nitrate de cellulose est immergée pendant

1 heure dans un tampon A (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4) contenant 3% de sérum albumine bovine avant d'être incubée 1 heure à 37°C dans le tampon A contenant 0,5% d'albumine et une dilution 1/50 d'IgG anti-5'nucléotidase. Les IgG fixées non spécifiquement sont éliminées par cinq lavages successifs dans une solution saline (2 M NaCl, 0,5% BSA, 0,2% Tween). La feuille est ensuite immergée dans une solution d'immunoglobulines de chèvre anti-IgG de lapin, marquées à la peroxydase (Gar/IgG (H + L)/Po Nordic Immunology), et diluées au 1/500^e dans un tampon A contenant 0,5% de sérum-albumine. Après lavage pendant 4 heures dans une solution saline, la révélation s'effectue dans une solution 50 mM Tris-HCl, pH 7,60, contenant 1 mg/ml de benzamidine et 3 µl d'H₂O₂ (30%).

VIII- COLONNE D'IMMUNOADSORBANTS

Les immunoglobulines purifiées par chromatographie d'affinité sur colonne de protéine A sont fixées sur des billes d'agarose, activées au glutaraldéhyde, selon la technique de TERNINCK et AVRAMEAS (1972).

L'extrait de membrane plasmique de foie de boeuf, solubilisé par du SB 14 (0,5% poids/volume), est déposé sur une colonne contenant 7 ml de gel immunoadsorbant. Nous avons essayé trois techniques d'élution :

- 1) par la diéthylamine (0,05 M), selon la technique de BAILYES *et al.* (1982).
- 2) par de l'eau distillée (BUREAU et DAUSSANT, 1983).
- 3) par un tampon glycine (0,2 M) pH 2,5.

Les fractions élues sont immédiatement neutralisées avant la détermination de l'activité 5'nucléotidase.

R E S U L T A T S

.....

I - IMMOBILISATION DE L'ANTIGENE

=====

Nous avons fixé 10 µg de 5'nucléotidase, correspondant à une activité de 160 µmoles de phosphore / heure, sur le gel d'agarose activé par le glutaraldéhyde. En effet, après décantation de la suspension, aucune activité 5'nucléotidase n'est détectée dans le surnageant. De plus, des tests d'activité ont permis d'observer que l'enzyme ainsi fixé sur des billes d'agarose conserve la capacité d'hydrolyser le 5'AMP. Cependant, bien que cette mesure ne soit pas très précise, il apparaît que l'activité totale n'est pas retrouvée. Il est probable que l'inactivation partielle (60%), observée après fixation de l'enzyme sur le gel, soit due à la fixation d'une fraction par l'intermédiaire d'acides aminés impliqués dans la catalyse. D'autre part, nous n'avons constaté aucune perte d'activité après stockage du gel à 4°C pendant 2 mois.

II - IMMUNSERUM

=====

L'immunsérum (10 ml environ), de concentration protéique de 78 mg/ml, est recueilli dix jours après la 3e injection. Nous avons déterminé l'activité 5'nucléotidase de l'enzyme purifié en présence de concentrations variables de cet immunsérum. Après une préincubation à 37° pendant 1 heure, nous observons une inhibition de l'activité enzymatique (Figure 1) par rapport au contrôle : sérum non-immun. Nous avons cherché à identifier un

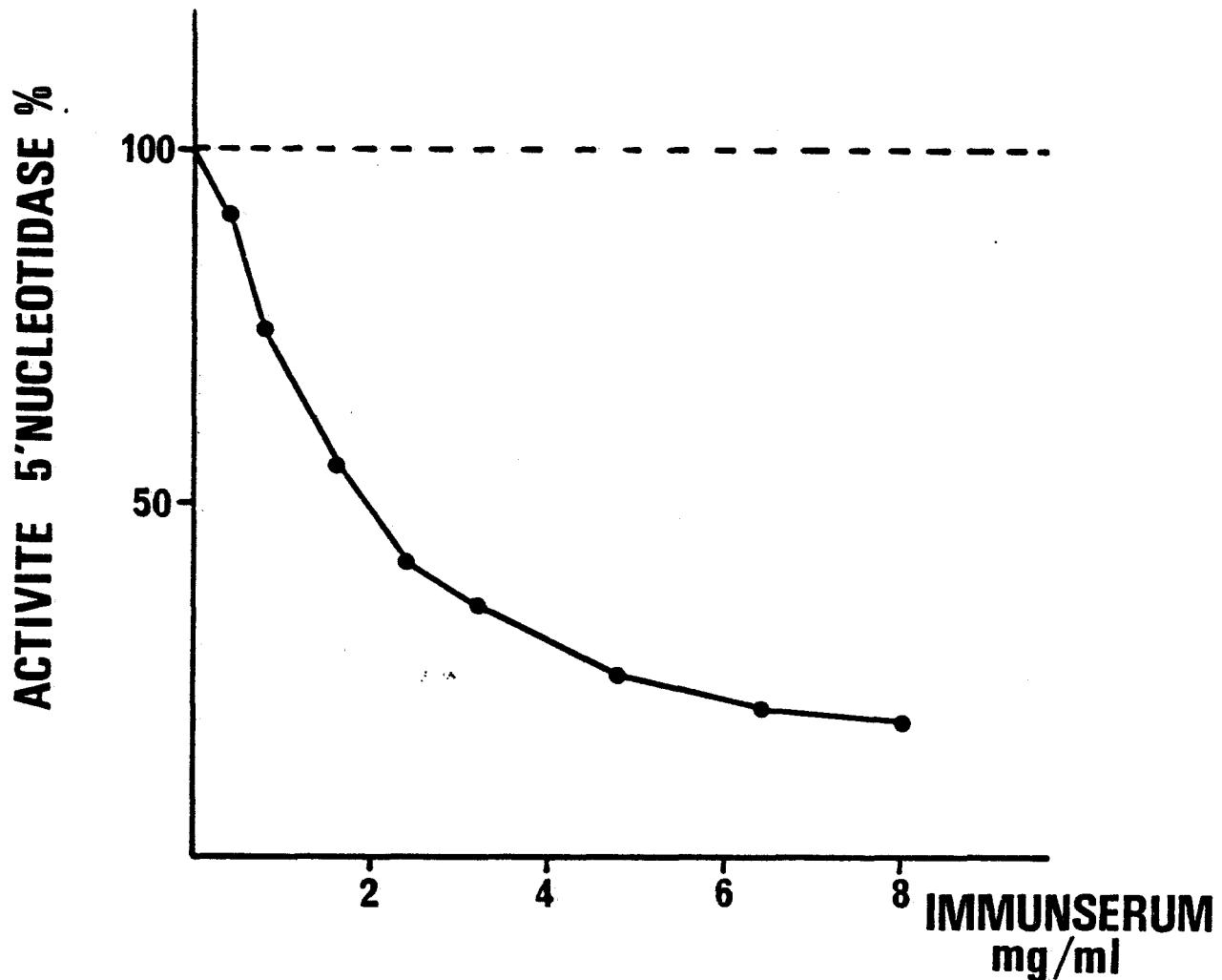


FIGURE 1

Effet de l'immunsérum sur l'activité 5' nucléotidase de l'enzyme purifié (●—●), comparé à l'effet d'un sérum non immun utilisé à la même dilution (-----).

complexe antigène-anticorps, par la méthode d'immunodiffusion d'OUCHTERLONY (1958) et par immunoélectrophorèse en présence de polyéthylène glycol (PM 6000), mais sans résultat, probablement à cause, soit de la faible concentration d'antigènes utilisés (10 à 20 ng) par puits, soit de la présence du détergent lié en quantité relativement importante de la 5'nucléotidase.

III - PURIFICATION DES IMMUNOGLOBULINES G

Nous avons purifié les immunoglobulines G par chromatographie d'échanges d'ions (DEAE Trisacryl), qui permet d'obtenir rapidement une fraction relativement purifiée. Nous observons néanmoins une contamination par de l'albumine (3,7%). Par contre, nous avons obtenu une préparation plus pure par chromatographie d'affinité sur protéine A immobilisée. Les chromatogrammes des protéines de l'immunsérum et des deux préparations d'immunoglobulines montrent que, si la chromatographie sur protéine A Sépharose est moins rapide que celle basée sur l'échange d'ions, elle permet néanmoins l'obtention d'immunoglobulines G très purifiées (Tableau I, figure 2).

En présence d'anticorps de chèvre orientés contre les protéines sériques du lapin, nous observons avec le sérum de nombreux arcs correspondant à une précipitation immune globale (Figure 3, A, 1). Par contre, un seul arc, correspondant aux immunoglobulines G, apparaît avec la préparation IgG purifiée sur protéine A Sépharose (Figure 3, A, 2).

L'activité catalytique de la 5'nucléotidase purifiée est fortement inhibée en présence de concentrations croissantes d'immunoglobulines (Figure 4). Il apparaît que le pouvoir inhibiteur est augmenté d'un facteur 13 par rapport à l'immunsérum. L'incubation avec des quantités similaires d'immunoglobulines G de sérum de lapin non immunisé, ne produit pas d'inhibition.

Tableau I : Répartition des protéines sériques du lapin

	ALBUMINE %	GLOBULINES			
		α_1 %	α_2 %	β %	γ %
Immunosérum	63,5	6	14,8	9,8	5,8
IgG purifiées sur DEAE-Trisacryl	3,7	0	0	0,7	95,6
IgG purifiées sur colonne Ultrogel Protéine A	0	0	0	0	100

La migration est effectuée sur plaque d'acétate de cellulose (SEBIA). Après coloration au rougeponceau, les électrophorèses sont analysées sur densitomètre (SEBIA CELLOSYSTEM).

La répartition en protéines est exprimée en pourcentage.

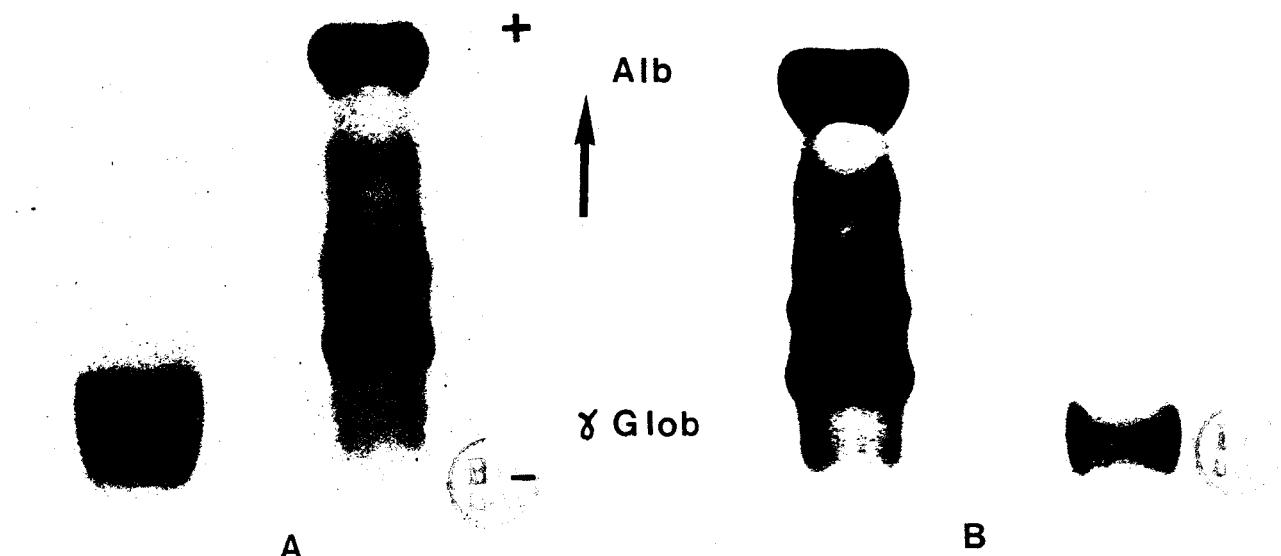


FIGURE 2

Electrophorèse des protéines sériques sur acétate de cellulose
(A) IgG purifiées par double chromatographie Trisacryl GF 05 ;
DEAE Trisacryl
(B) IgG purifiées sur protéine A Ultrogel

1 2

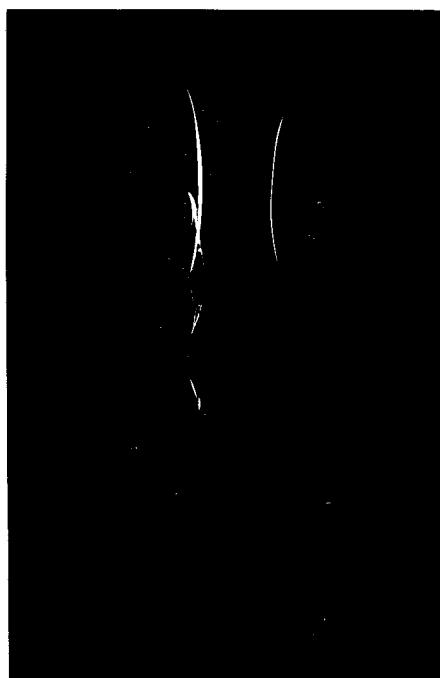


FIGURE 3

Mise en évidence des protéines sériques du lapin
par immunoélectrophorèse

Immunoélectrophorèse du sérum de lapin (1) et
de la préparation d'IgG (2) avec un anti-sérum
de chèvre orienté contre le lapin

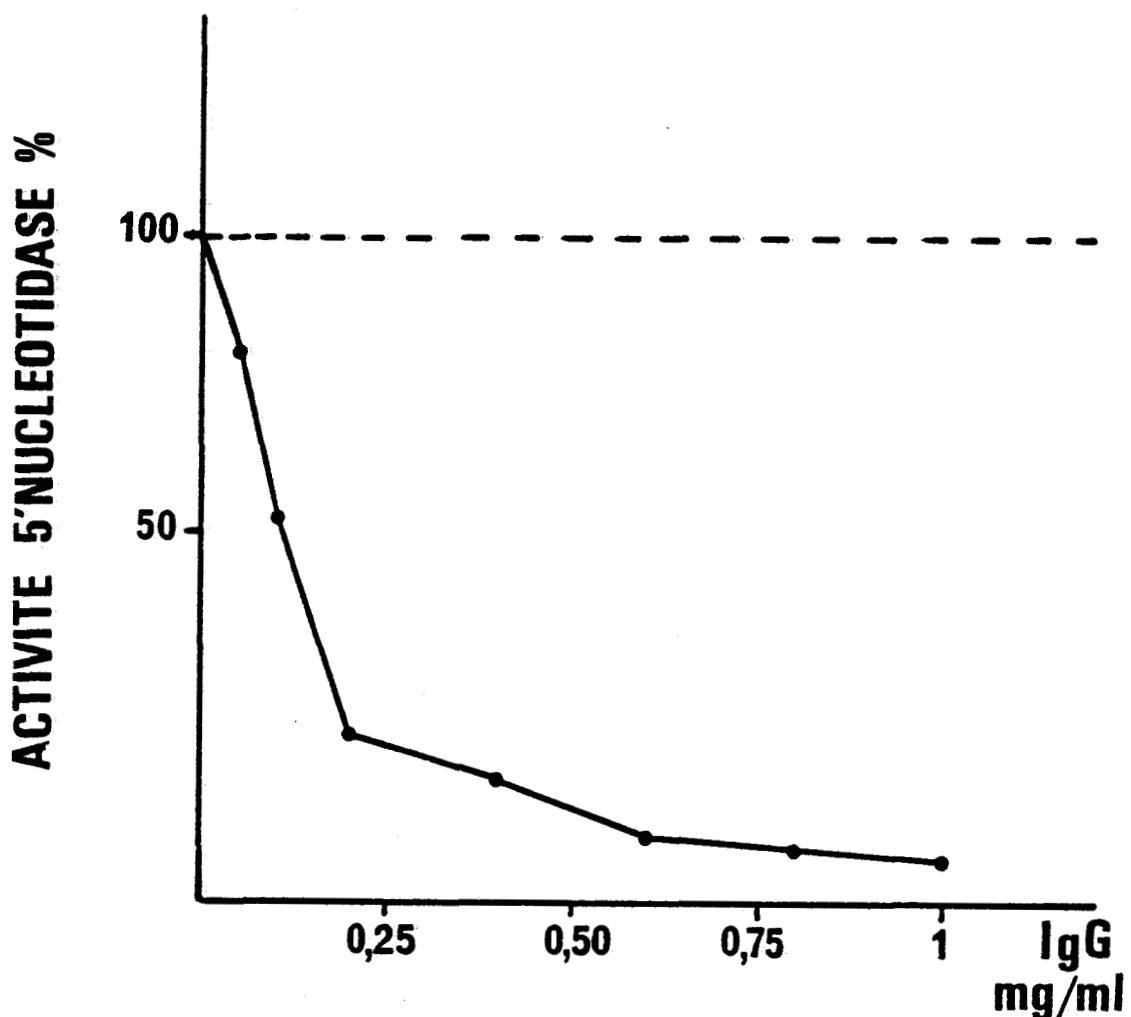


FIGURE 4

Effet des IgG sur l'activité 5' nucléotidase de l'enzyme purifié (●—●) comparé à l'effet des IgG purifiées à partir d'un sérum non immun (-----).

IV - PURIFICATION DES IMMUNOGLOBULINES ORIENTEES CONTRE LA
=====
5'NUCLEOTIDASE
=====

Approximativement, 20 µg de 5'nucléotidase purifiée sont fixés sur 1 ml de gel. La chromatographie de 5 mg d'immunoglobulines G purifiées sur protéine A immobilisée, permet de séparer les immunoglobulines G spécifiques de la 5'nucléotidase. L'activité catalytique d'une préparation de 5'nucléotidase est fortement inhibée par la présence de ces anticorps. En effet, il apparaît que des quantités 8 fois inférieures à celles des IgG globales soient nécessaires pour obtenir 50% d'inhibition. Cependant, les rendements d'une telle chromatographie sont relativement faibles.

V - SEDIMENTATION EN GRADIENT CONTINU
=====

Les techniques d'immunodiffusion sur gel d'agarose n'ont pas permis la révélation d'immunocomplexes. C'est pourquoi nous en avons tenté la caractérisation par ultracentrifugation en gradient continu de saccharose (5-20%).

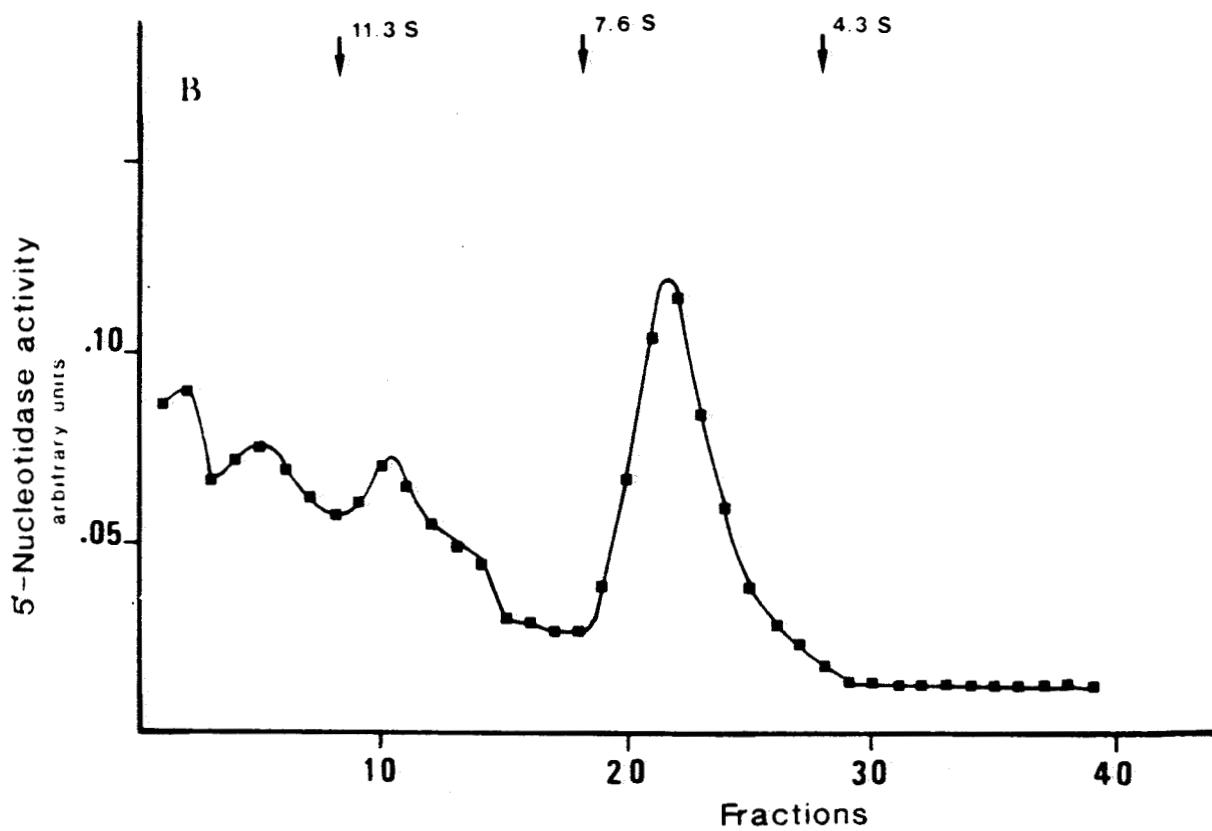
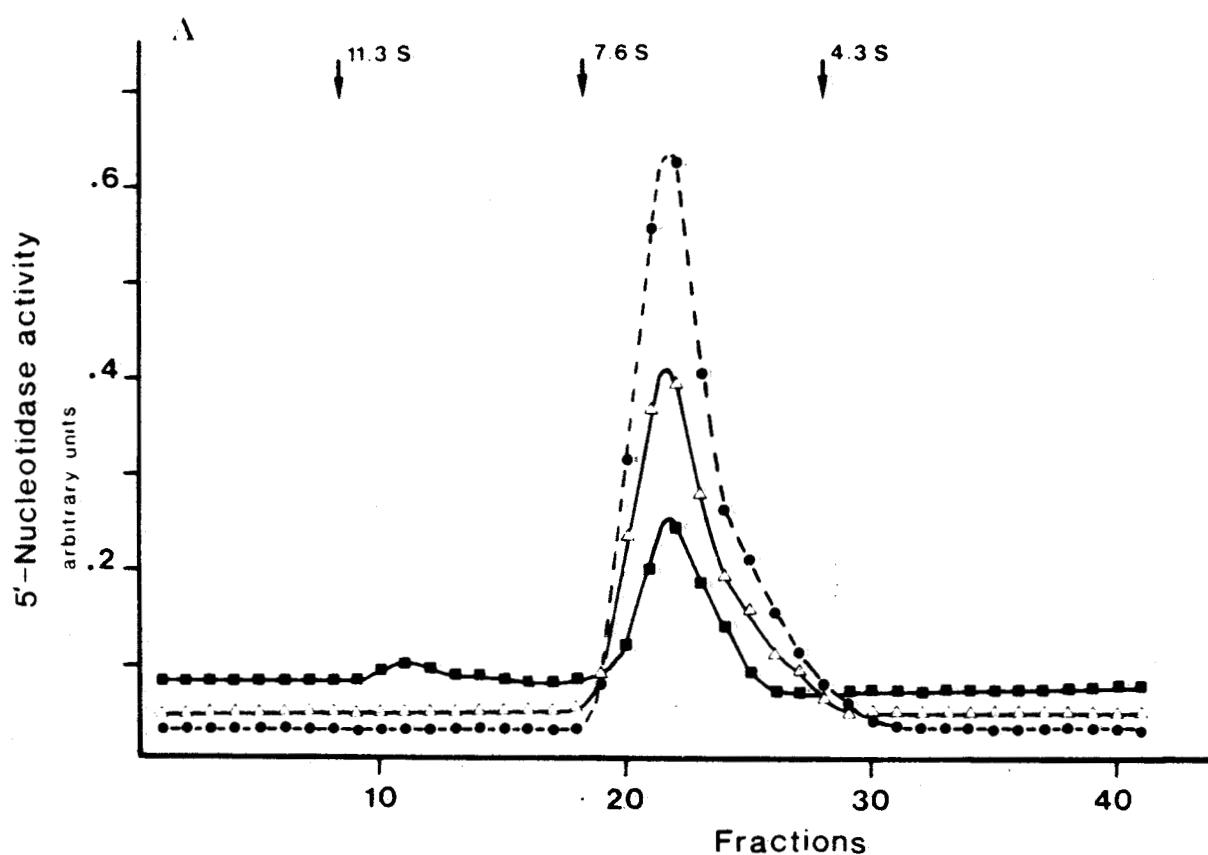
Le profil de sédimentation d'une préparation purifiée de 5'nucléotidase en présence de marqueurs, montre un coefficient de sédimentation de la molécule compris entre 6,9 et 7,1 (Figure 5). L'allure de la courbe de sédimentation n'est pas modifiée par une pré-incubation de l'enzyme avec un sérum non immun (au 1/10). Par contre, la mise en contact de la 5'nucléotidase avec des concentrations croissantes en IgG, met en évidence une diminution du pic d'activité enzymatique. La figure 5 A montre que pour des incubations de l'enzyme avec 80 µg d'IgG, nous observons l'apparition d'un pic d'activité plus lourd de 11,3 S. Lorsque les concentrations en IgG croissent pour atteindre 150 µg, nous mettons en évidence, par les activités 5'nucléotidase résiduelles, des pics de sédimentation à 11,3 S, 13,3 S et 15 S correspondant probablement à la formation d'immunocomplexes solubles (Figure 5 B).

FIGURE 5

Profils des gradients de sédimentation de la 5' nucléotidase purifiée en présence d'IgG.

200 ng d'enzyme sont préincubés en présence de différentes concentrations d'IgG (1 heure à 37°C). Les échantillons sont centrifugés à 40 000 RPM (Rotor SW 41 Beckman) pendant 20 heures à 4°C.

- (A) (●—●) contrôle ; (△—△) enzyme en présence de 15 µg d'IgG ; (■—■) enzyme en présence de 40 µg d'IgG.
- (B) enzyme en présence de 80 µg d'IgG.



VI - REACTIVITE DES ANTICORPS AVEC LA 5'NUCLEOTIDASE

LYMPHOCYTAIRE, HEPATOCYTAIRE ET NERVEUSE

Nous avons examiné l'effet des immunoglobulines sur la 5'nucléotidase solubilisée à partir des membranes plasmiques des différents tissus. La figure 6 montre que dans le cas du lymphocyte et du noyau caudé, on obtient une complète inhibition pour des concentrations en anticorps, de l'ordre de 1 mg d'IgG/ml. Le phénomène n'est pas observé aussi nettement dans le cas de l'enzyme du foie, où il subsiste 25% d'activité résiduelle.

En présence d'anticorps purifiés sur colonne de 5'nucléotidase Ultrogel, l'inhibition de la 5'nucléotidase des différentes membranes plasmiques est de type apparemment non compétitif. Le calcul des constantes d'inhibition montre que l'effet inhibiteur est plus important dans le cas des membranes de noyau caudé (Tableau II).

MEMBRANE PLASMIQUE	LYMPHOCYTE	NOYAU CAUDE	FOIE
K_i 10^{-8} M	5	2	7

Tableau II : Constantes d'inhibition de l'activité 5'nucléotidase par les IgG orientées contre l'enzyme

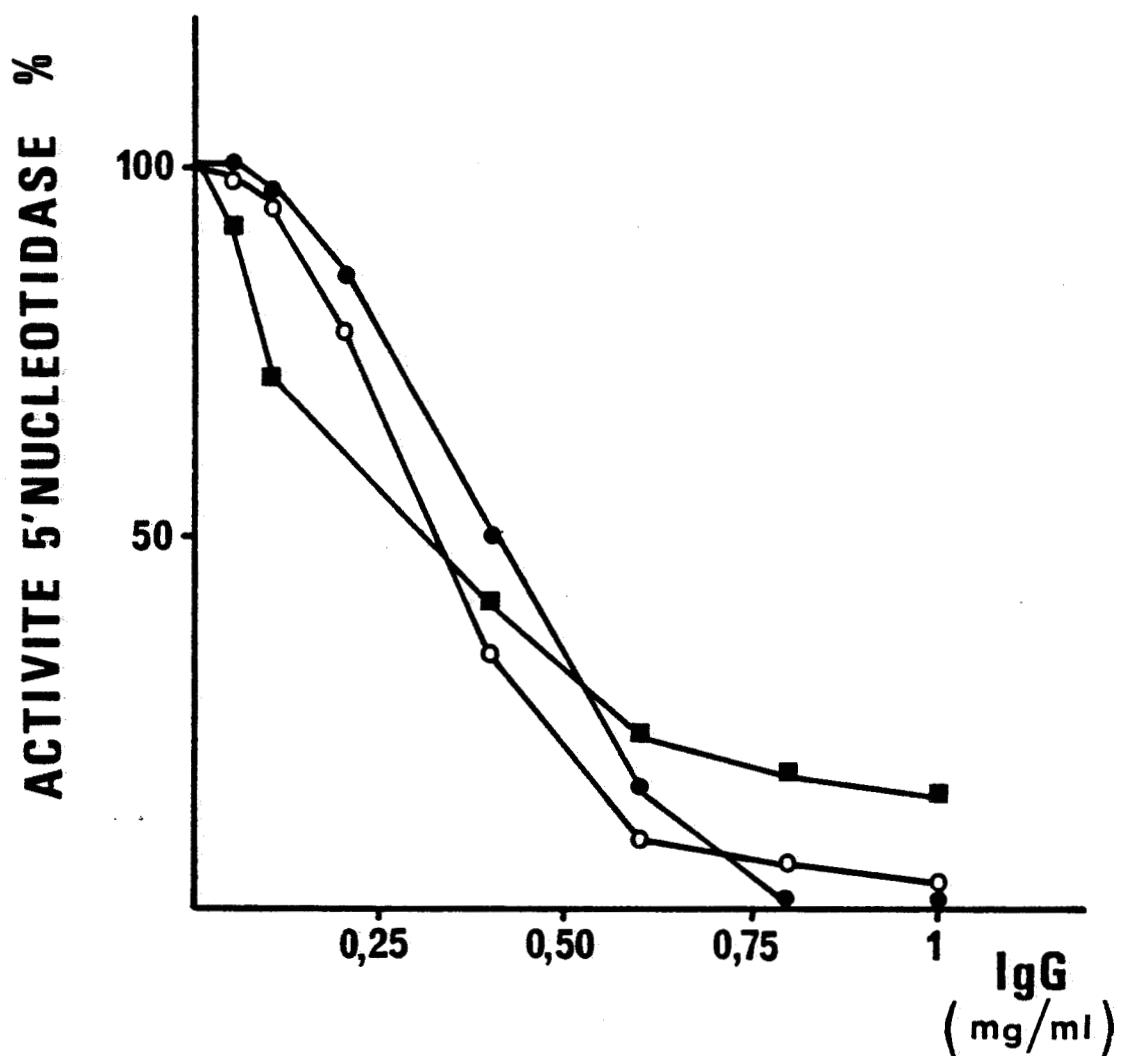


FIGURE 6

Effet des IgG sur l'activité 5'nucléotidase solubilisée à partir des membranes

(—■—) foie ; (○—○) lymphocyte ; (●—●) noyau caudé

VII - IMMUNODETECTION

Après électrophorèse en sodium dodecylsulfate, les protéines transférées sur nitrate de cellulose sont incubées en présence d'anticorps. La révélation effectuée par des anti-IgG marquées à la peroxydase, montre que les 5'nucléotidases, lymphocytaire, nerveuse, et musculaire, reconnaissent les anticorps orientés contre l'enzyme hépatocytaire (Figure 7). En effet, une bande majeure 70 KD correspondant au monomère de la 5'nucléotidase (HARB *et al.*, 1983) apparaît. Ces résultats confirment ceux observés précédemment dans les essais d'inhibition de l'activité catalytique.

VIII - IMMUNOADSORPTION

Après solubilisation par le SB₁₄ (0,5% w/v), les membranes plasmiques de boeuf (4 mg) sont déposées sur une colonne contenant 7 ml de gel immunoadsorbant. Nous avons observé que toute l'activité 5'nucléotidase (60 µmoles/heure) est retenue par la colonne. Les différents essais d'élution ne nous ont pas permis de retrouver l'activité enzymatique dans l'éluat. Après dialyse des fractions recueillies, aucune restauration de l'activité catalytique n'est obtenue. Parallèlement, nous avons observé que la diéthylamine (0,05 M), de même que le tampon glycine (0,2 M) pH 2,5, inactivaient de façon irréversible l'enzyme. Il semble que ces résultats négatifs de purification à partir d'anticorps polyclonaux, ne sont pas particuliers à la 5'nucléotidase. En effet, VOCKLEY et HARRIS (1984) sont confrontés au même problème dans l'isolement de la phosphatase alcaline humaine.

Hep Ly NC Mus

220 kD ►



60 kD ►



36 kD ►



18,5 kD ►



FIGURE 7

Immunodétection de la 5'nucléotidase par des anticorps anti-5'nucléotidase de membranes plasmiques de foie de boeuf
Mus : muscle ; Ly : lymphocyte ; Hep : foie ; NC : noyau caudé

D I S C U S S I O N

.....

L'immunisation des lapins par la 5'nucléotidase purifiée fixée à des billes d'agarose, s'est avérée efficace, avec les concentrations de protéines très faibles dont nous disposions (10 µg). Ce résultat est probablement dû à deux effets conjoints : d'une part, le rôle d'adjuvant des billes d'agarose ; d'autre part, la stabilité accrue de l'enzyme fixé. En effet, l'enzyme fixé et stocké présente une grande stabilité. Ce phénomène a été observé pour d'autres enzymes immobilisés (ENGASSER et COULET, 1977 ; COULET et GAUTHERON, 1980). L'immunsérum obtenu a montré un effet inhibant sur l'activité 5'nucléotidase des membranes plasmiques des différents tissus bovins que nous avons étudiés (foie, noyau caudé, lymphocyte et muscle digastrique). Nous avons purifié les immunoglobulines par deux méthodes : la chromatographie d'échange d'ions et la purification sur protéine A Sépharose. La deuxième méthode, bien que moins rapide, permet une purification plus grande. Cette technique de purification d'immunoglobulines G a permis l'obtention d'une préparation dont l'effet inhibiteur de l'activité 5'nucléotidase est augmenté d'un facteur 13. La purification d'anticorps sur une colonne de 5'nucléotidase immobilisée sur Sépharose 4 B a permis d'augmenter le pouvoir inhibiteur de l'activité catalytique de l'enzyme, d'un facteur 106 fois par rapport à celui de l'immunsérum, et de 8 fois par rapport à celui des IgG totaux. Il semble donc que les anticorps spécifiquement orientés contre la 5'nucléotidase des membranes de foie de boeuf représentent 10% des immunoglobulines G.

Les techniques d'immunoprecipitation et d'immunoélectrophorèse n'ont donné aucun résultat malgré l'utilisation de méthodes favorisant la

formation d'immunocomplexes. Cette observation n'est pas particulière à la 5'nucléotidase des membranes plasmiques de foie de boeuf. En effet, les auteurs (GURD et EVANS, 1974 ; BAILYES *et al.*, 1982) qui se sont intéressés à la production d'anticorps orientés contre la 5'nucléotidase, n'ont pas décrit d'immunoprecipitation, probablement à cause de la formation d'immunocomplexes solubles. Par contre, ils ont caractérisé l'immunsérum par sa capacité d'inhibition de l'activité 5'nucléotidase. Cependant, si la quantité d'antigène peut constituer un facteur limitant, il ne faut pas éliminer totalement le rôle du détergent qui pourrait gêner la formation d'un réseau d'immunocomplexes. La sulfobétaïne (SB₁₄), qui s'est avérée être un détergent très efficace dans la purification de la 5'nucléotidase, présente un inconvénient non négligeable. En effet, il ne nous a pas été possible de l'éliminer, quelque soient les techniques utilisées (dessalage, dialyse, échange d'ions). Aussi, on ne peut exclure que les zones hydrophobes de l'enzyme, masquées par le détergent, ne puissent pas exprimer leur antigénicité. De ce fait, les anticorps anti-5'nucléotidase, produits par le lapin, seraient alors en grande partie orientés contre les sites hydrophyles de l'enzyme.

La sédimentation en gradient de centrifugation montre que le profil de la 5'nucléotidase sédimentant à 7 S, est modifié en présence d'immunoglobulines G orientées contre la 5'nucléotidase. Ceci confirme ainsi l'interaction anticorps - enzyme. Cependant, des concentrations croissantes en anticorps provoquent une formation d'immunocomplexes plus lourds. Cette observation semble en faveur de la formation de complexes solubles et non d'un réseau d'antigène - anticorps précipitant, bien qu'on ne puisse totalement écarter la deuxième éventualité.

L'inhibition de l'activité de la 5'nucléotidase obtenue en présence d'immunoglobulines ne dépend pas d'une précipitation de l'enzyme. La formation d'immunocomplexes solubles est donc suffisante pour induire l'inactivation de l'enzyme (LAWRENCE *et al.*, 1983).

La réactivité croisée, concernant l'inhibition de l'enzyme

d'origine tissulaire différente, montre que les anticorps produits contre la 5'nucléotidase hépatocytaire, reconnaissent des déterminants antigéniques communs aux différentes molécules. Il existe donc des analogies structurales très grandes entre ces molécules. Ces résultats sont confirmés par la technique d'électrophorèse basée sur la révélation par les anticorps, qui montre une bande majeure à 70 000 daltons correspondant au monomère de la 5'nucléotidase.

Si les anticorps reconnaissent la 5'nucléotidase des différents tissus, et ceci quelque soit la nature du glycanne de l'enzyme, nous ne pouvons pas conclure que les sucres ne jouent aucun rôle dans cette reconnaissance antigénique. En effet, les différences observées dans les constantes d'inhibition, relatives à chacun des tissus, montrent que l'effet est plus important dans le cas de la 5'nucléotidase de la membrane plasmique de noyau caudé. Ceci pourrait paraître paradoxal, puisque les anticorps ont été produits à partir d'une immunisation par de la 5'nucléotidase hépatocytaire sur laquelle nous devrions observer une inhibition plus efficace que dans le cas des autres tissus. Les études que nous avons effectuées, ont montré que l'enzyme des trois tissus considérés présentait de grandes analogies cinétiques. En effet, les affinités pour les 5'mononucléotides sont très voisines d'un enzyme à l'autre. Il apparaît que seule la structure glycannique s'avère différente. On ne peut naturellement pas affirmer qu'elle influe dans les interactions anticorps - 5'nucléotidase, mais cette éventualité ne peut être totalement exclue. De plus, les anticorps polyclonaux dont nous disposons ne constituent pas un outil suffisamment précis pour tenter de répondre à cette question.

L'un des objectifs de la production de ces anticorps était la préparation de colonne d'immunadsorbant. Nous pensions que par le biais de cette technique, il nous serait possible de purifier la 5'nucléotidase en quantité suffisante pour en déterminer la structure glycannique. Cependant, si nous avons pu observer une fixation de l'enzyme sur colonne d'anticorps immobilisés, nous n'avons pas réussi à obtenir une élution avec conservation de l'activité catalytique. Cependant, les observations que nous avons

effectuées s'inscrivent dans l'étude comparative de la 5'nucléotidase des membranes plasmiques de différents tissus bovins, et particulièrement celle de l'environnement peptidique de la copule glucidique de la 5'nucléotidase des différents tissus.

Nous poursuivons encore la mise au point d'une méthode d'élution avec conservation des propriétés de l'enzyme, et nous tenterons d'approcher la nature de la glycosylation par des méthodes indirectes. par ailleurs. Dans le chapitre suivant, nous exposerons l'étude de la structure glycannique de l'acétylcholinestérase et de la 5'nucléotidase des membranes plasmiques de noyau caudé.

B I B L I O G R A P H I E

.....

- BAILYES, M., NEWBY, A.C., SIDDLE, K. and LUZIO, J.P. (1982) Biochem. J., 203, 245.
- BUREAU, D. and DAUSSANT, J. (1983) Biochimie, 65, 361.
- COULET, P. and GAUTHERON, D. (1980) Biochimie, 62, 543.
- ENDERSEN, C. (1978) Acta Pathol. Microbiol. Scand., section C, 86, 211.
- ENGASSER, J.M. and COULET, P. (1977) Biochim. Biophys. Acta, 485, 29.
- GURD, J.W. and EVANS, W.H. (1974) Act. Biochém. Biophys., 164, 305.
- HARB, J., MEFLAH, K., DUFLOS, Y. and BERNARD, S. (1983) Eur. J. Biochem., 28, 368.
- LAEMMLI, U.K. (1970) Nature, 227, 680.
- LAURELL, C.B. (1965) Anal. Biochem., 10, 358.
- LAWRENCE, G.M., WALKER, D.G. and TRAYER, I.P. (1983) Biochim. Biophys. Acta, 743, 219.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDALL, R.J. (1951) J. Biol. Chem., 193, 265.
- OUCHTERLONY, O. (1958) Prog. Allergy, 5, 1.
- PARKINSON, A.J., SCOTT, E.N. and MUCHMORE, H.C. (1983) J. Chromatogr., 254, 219
- TERNYNCK, I. and AVRAMEAS, S. (1972) FEBS Lett., 23, 24.
- TOWBIN, H., STAHELIN, T. and GORDON, J. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci., 76, 4350.

- VOCKLEY, J. and HARRIS, H. (1984) Biochem. J., 217, 535.
- ZACHOWSKI, A., SIMONIN, G., AUBRY, J., POMMIER, C., SINGH, S.H., POTTER, M. and PARAF, A. (1981) J. Receptor Res., 2, 97.

CHAPITRE III

ETUDE DE LA 5'NUCLEOTIDASE ET DE L'ACETYLCHOLINESTERASE

DES MEMBRANES PLASMIQUES DE NOYAU CAUDE.

APPROCHE DE LA STRUCTURE GLYCANNIQUE PAR LES GLYCOSIDASES

ET LES LECTINES.

Dans le premier chapitre, nous avons montré que la 5'nucléotidase des membranes nerveuses de noyau caudé est une glycoprotéine, dont la structure glycannique est différente de celle de l'enzyme des membranes lymphocytaires, et pourrait être de type N-acétyl-lactosaminique. Dans ce chapitre, nous nous proposons d'étudier certaines propriétés de la 5'nucléotidase des membranes nerveuses : spécificité pour les substrats, effet des cations et de l'EDTA, conditions de solubilisation.

Afin de caractériser la nature des glycannes de la 5'nucléotidase et de l'acétylcholinestérase, nous analyserons les modifications de leurs interactions avec les lectines, intervenant après traitement séquentiel par les glycosidases.

R E S U L T A T S

.....

I - PREPARATION DES MEMBRANES DE NOYAU CAUDE DE BOEUF

=====

Les membranes sont préparées selon la technique de JONES et MATUS (1974), avec une modification portant sur le mode de lyse cellulaire. La rupture cellulaire par cavitation sous atmosphère d'azote (50 atmosphères pendant 20 minutes) nous a permis d'obtenir des préparations membranaires dont l'activité spécifique en 5'nucléotidase ($0,019 \pm 0,002 \mu\text{mole Pi/mn/mg}$) était sensiblement supérieure à celles isolées après choc hypotonique. De plus, il semble que la lyse par cavitation nous permet d'obtenir une majorité de vésicules membranaires à polarité normale (WALLACH et SCHMIDT-ULRICH, 1977).

L'enrichissement en 5'nucléotidase et en acétylcholinestérase de la préparation cellulaire est respectivement de 9 à 6 fois par rapport à l'homogénat. Ce facteur est inférieur pour l'acétylcholinestérase, probablement parce que seules certaines formes de cet enzyme sont liées aux membranes. On sait par ailleurs que dans les cellules murines en culture (lignées T28), la forme G₁ est intracellulaire, et la forme G₄ membranaire (LAZAR et VIGNY, 1980). Par ailleurs, les trois formes G₁, G₂, G₄ sont présentes dans un extrait total de noyau caudé solubilisé par le Triton X-100 (GRASSI *et al.*, 1982), alors que seule la forme G₄ est membranaire (MEFLAH *et al.*, 1984).

II - CONSTANTES CINETIQUES DE LA 5'NUCLEOTIDASE DE MEMBRANES

NERVEUSES DE NOYAU CAUDE

La 5'nucléotidase des membranes de noyau caudé présente une plus grande affinité pour le 5'IMP et le 5'GMP que pour les autres nucléotides examinés. Cependant, la vitesse maximale V_m , et le rapport V_m/K_m sont plus élevés pour le 5'AMP, qui constitue selon ce critère le meilleur substrat (Tableau I).

III - EFFETS DES CATIONS DIVALENTS ET DES AGENTS CHELATANTS

Contrairement à l'enzyme cytosolique (ITOH, 1981), la 5'nucléotidase des membranes de noyau caudé est active en absence de cations divalents exogènes. Mn^{++} et Mg^{++} augmentent l'activité de l'enzyme, alors que Zn^{++} , Co^{++} et Ni^{++} produisent une inhibition de type apparemment mixte (Figure 1). Les agents chelatants tels que l'EDTA et l'EGTA inactivent fortement l'enzyme (Figure 2). Le phénomène est réversible par addition de cations divalents. A la lumière de ces résultats, nous suggérons que la 5'nucléotidase des membranes nerveuses du noyau caudé de boeuf est probablement un métalloenzyme.

IV - SOLUBILISATION

Un détergent de type zwitterionique, la sulfobétaine 14 (SB_{14}) s'est avéré très efficace dans la solubilisation de la 5'nucléotidase membranaire de noyau caudé : 95% de l'activité se retrouve dans le surnageant 100 000 g d'une suspension membranaire solubilisée en présence de SB_{14} (0,5% w/v), alors que 60% de l'activité acétylcholinestérase y est détectée. Par contre, le triton X-100 (1% v/v) solubilise la totalité de l'acétylcholinestérase et seulement 50% de la 5'nucléotidase.

Tableau I : affinité de la 5'nucléotidase des membranes de noyau caudé pour les différents substrats

Substrat	Km (μ M)	Vm (μ mole/mn/mg)	Vm/Km
5'AMP	97	0,042	4,33
5'GMP	71	0,026	3,66
5'IMP	63	0,022	3,49
5'UMP	145	0,040	2,75
5'CMP	122	0,027	2,21

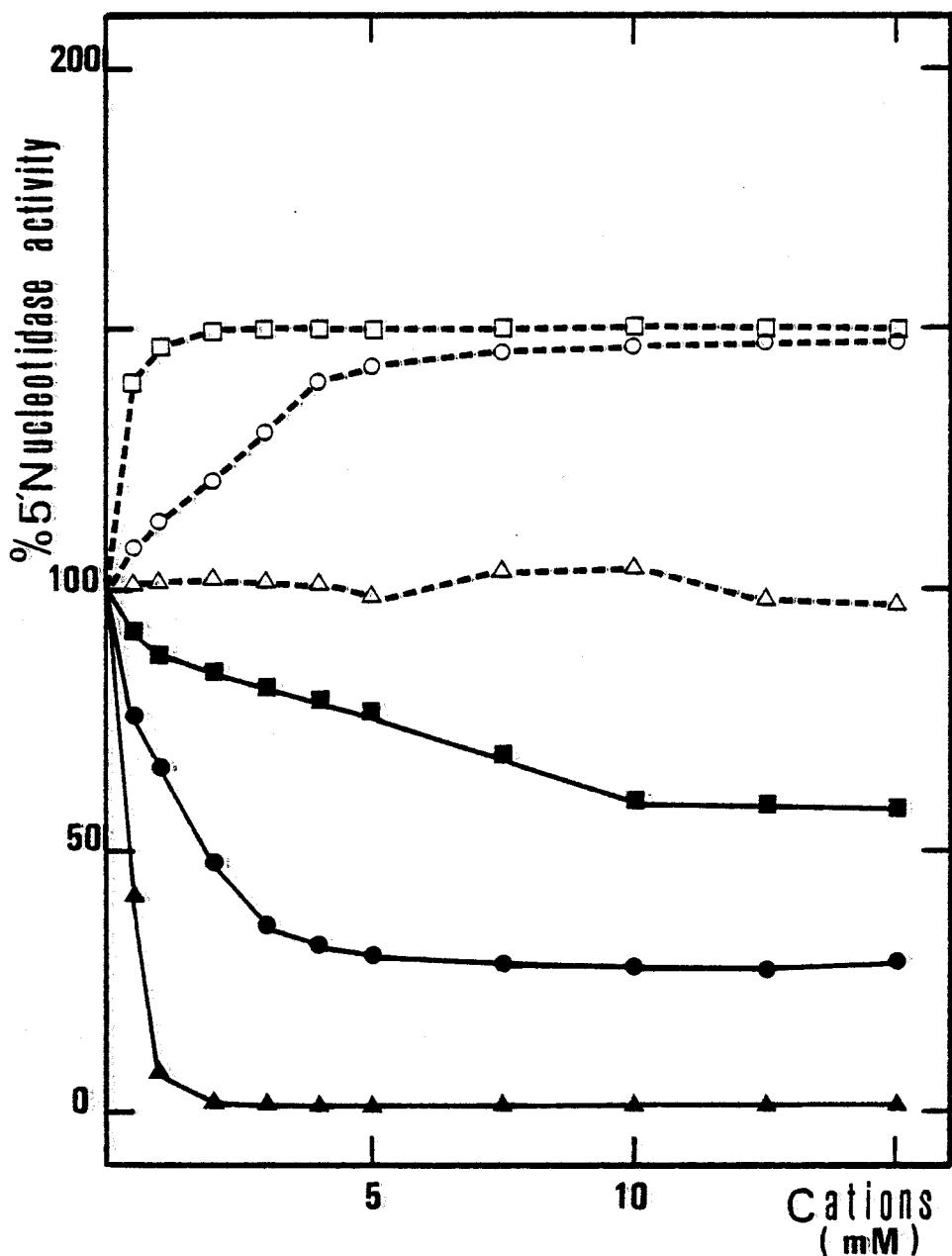


FIGURE 1

Effet de cations divalents sur l'activité de la 5'nucléotidase
de membranes de noyau caudé de boeuf

L'activité est exprimée en pourcentage par rapport
au témoin

(▲) Zn²⁺ ; (●) Ni²⁺ ; (■) Co²⁺ ; (△) Ca²⁺ ; (○) Mg²⁺ ; (□) Mn²⁺

ACTIVITE 5'NUCLEOTIDASE %

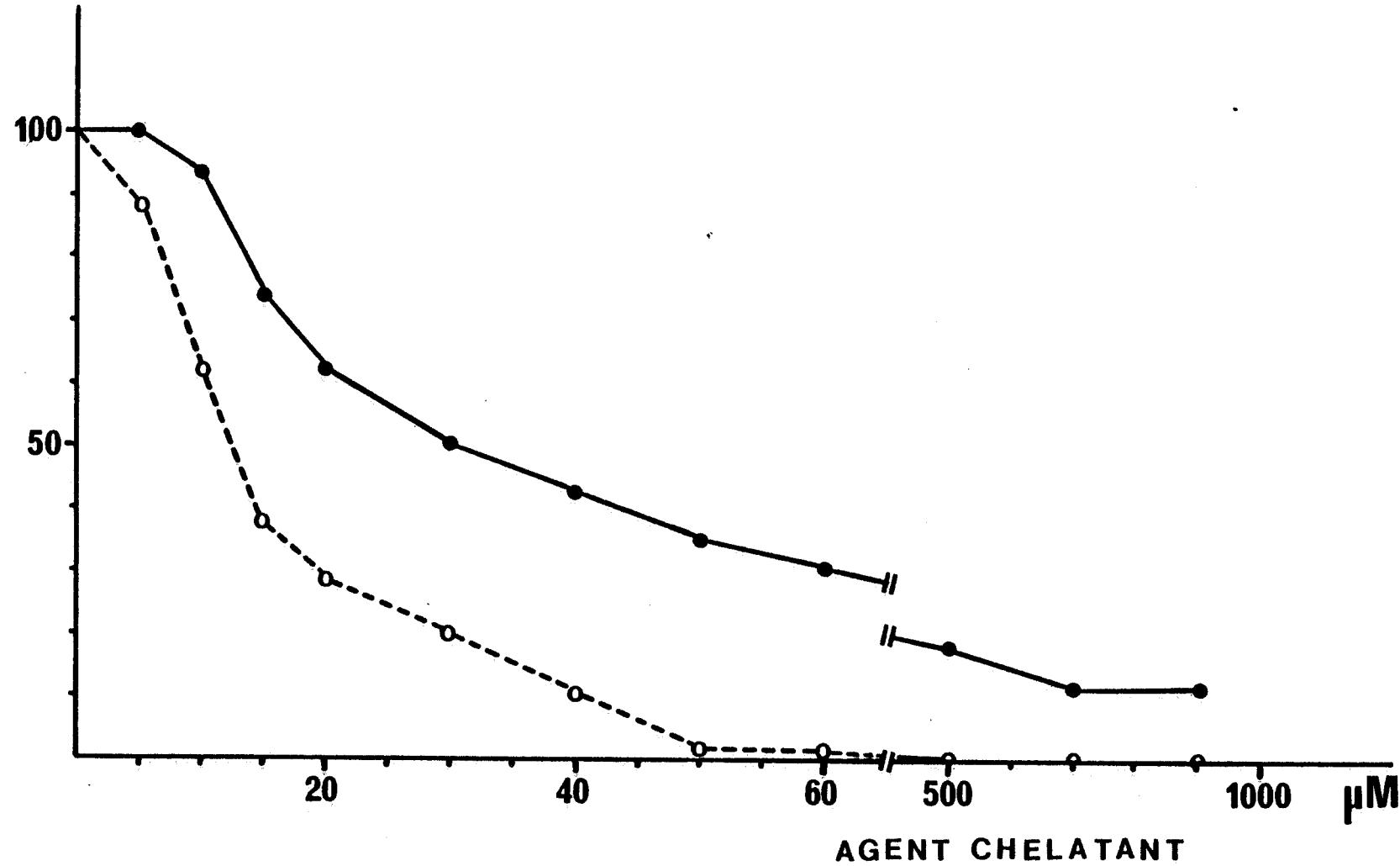


FIGURE 2

Effet des agents chelatants sur l'activité 5'nucléotidase des membranes de noyau caudé

(○---○) EDTA ; (●—●) EGTA

L'effet combiné de ces deux détergents (Triton X-100 0,5 % v/v ; SB₁₄ 0,5% w/v) nous a permis d'obtenir une solubilisation complète des deux enzymes. Les différences observées dans la solubilisation sont peut-être dues à une localisation membranaire et un environnement lipidique particulier à chacune des molécules.

V - EFFET DES LECTINES

Comme nous l'avons observé dans le premier chapitre, l'acétylcholinestérase et la 5'nucléotidase des membranes de noyau caudé sont des glycoprotéines. Les lectines, telles que la Con A, la LCA et la WGA, inhibent l'activité catalytique de la 5'nucléotidase. Le phénomène est réversible en présence de sucres compétiteurs. L'activité acétylcholinestérasique, quant à elle, n'est pas modifiée par les lectines. Cependant, on observe la fixation de ces enzymes sur certaines lectines immobilisées (WGA, Con A, LCA), et l'élution par les sucres compétiteurs. D'autres agglutinines, telles que PNA, RCA 1 et UEA n'interagissent ni avec l'acétylcholinestérase, ni avec la 5'nucléotidase (Tableau II).

La chromatographie d'affinité, sur colonne de WGA immobilisée, d'un extrait solubilisé de membranes de noyau caudé, montre une fixation de l'acétylcholinestérase et de la 5'nucléotidase des membranes de noyau caudé. Après élution par le sucre compétiteur (N-acétyl-glucosamine 68 mM) (Figure 3), on observe un enrichissement de l'activité acétylcholinestérase et 5'nucléotidase de l'éluat, respectivement de six et neuf fois.

VI - TRAITEMENT PAR LES GLYCOSIDASES

Les résultats de la chromatographie d'affinité, sur des lectines immobilisées, montrent que la 5'nucléotidase et l'acétylcholinestérase des membranes de noyau caudé sont reconnues par la Con A, la WGA et la LCA. Ceci

Tableau II : Effect des lectines sur l'activité 5' nucléotidase.

LECTINES	Con A		LCA		WGA		LPA	
	<u>α M.M.</u>		<u>α M.M.</u>		<u>GlcNAc</u>		<u>NeuNAc</u>	
	0	200 mM	0	200 mM	0	200 mM	0	200 mM
MEMBRANES PLASMIQUES	85	10	80	12	80	10	75	5
ENZYME SOLUBILISE	80	5	75	5	75	5	65	5

Les échantillons sont incubés 30 minutes à 37°C, avec ou sans lectines (mg de lectines/mg de protéines membranaires = 2). La réversibilité de l'inhibition est obtenue par addition de sucres compétiteurs. La préparation d'enzyme solubilisé est le surnageant obtenu en traitant la suspension de membranes, avec un mélange de SB 14 (0,5 % w/v) et de Triton X 100 (0,5 % v/v) pendant 1 heure à 4°C, et centrifugée 1 heure à 100 000 g (Rotor SW 50 Beckman). Les valeurs sont exprimées en pourcentage d'inhibition par rapport au témoin.

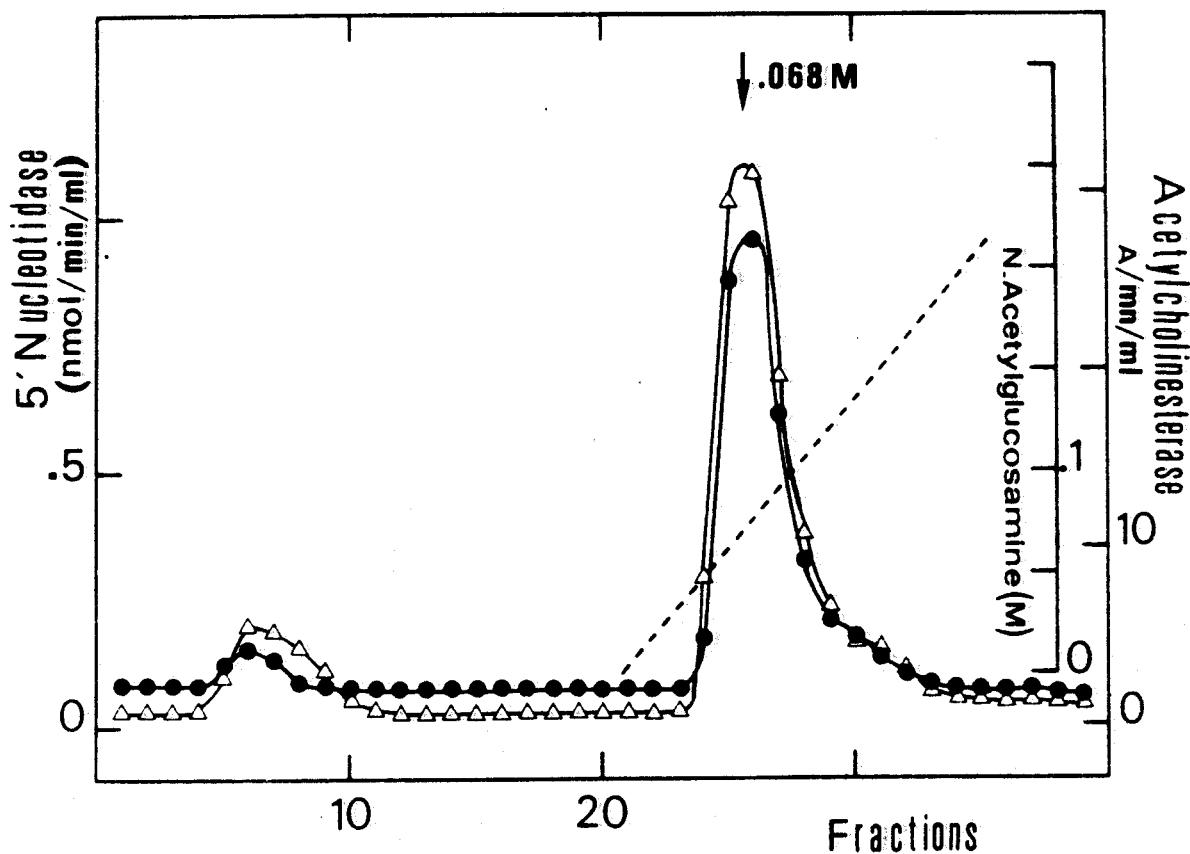


FIGURE 3

Profil d'élution de la 5'nucléotidase et de l'acétylcholinestérase
sur colonne WGA Ultrogel par un gradient continu de N-acétylglucosamine(-----)

(●—●) 5'nucléotidase ; △—△ Acétylcholinestérase)

nous a permis de postuler que le glycanne de ces deux enzymes pouvait avoir de grandes similitudes. Aussi, la grande stabilité de ces deux molécules nous a permis d'envisager une étude de la structure glycannique en hydrolysant de manière séquentielle le glycanne par traitement des membranes du noyau caudé, à l'aide de différentes glycosidases.

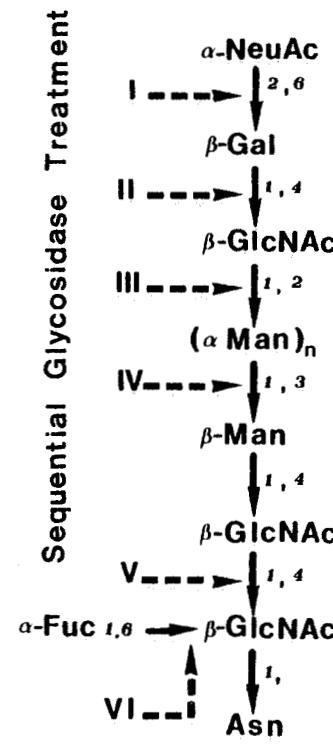
Le traitement des membranes par la neuraminidase ne modifie pas l'interaction de la 5'nucléotidase avec la Con A et la LCA, mais réduit celle avec la WGA (56% d'inhibition de l'activité catalytique). Une nouvelle sensibilité à la PNA apparaît, indiquant ainsi une modification du glycanne. La chromatographie d'affinité, sur PNA immobilisée, des membranes solubilisées, permet d'observer une fixation de la 5'nucléotidase et de l'acétylcholinestérase éluables par le D(+)galactose. Le traitement par la neuraminidase entraîne donc le démasquage d'un galactose qui était auparavant masqué par un résidu N-acétyl-neuraminique. De plus, par les techniques d'élution en gradient continu de N-acétyl-glucosamine, nous avons observé que les deux enzymes sont élués par 34 mM de sucre compétiteur.

Après traitements successifs par la neuraminidase et la β -galactosidase, l'effet inhibiteur de la WGA sur l'activité 5'nucléotidase passe à 63%, alors que la PNA ne produit plus aucune altération de l'activité 5'nucléotidase. Parallèlement, la chromatographie d'affinité sur WGA immobilisée montre que l'élution de l'acétylcholinestérase et de la 5'nucléotidase est obtenue pour une concentration en N-acétylglucosamine de 52 mM.

Les membranes ainsi traitées sont alors soumises à l'action de la β -N-acétylglucosaminidase. Le tableau III montre alors que l'inhibition de la 5'nucléotidase par la WGA est considérablement diminuée (23%). L'élution de la 5'nucléotidase et de l'acétylcholinestérase d'une colonne de WGA immobilisée, est obtenue avec 28 mM de sucre compétiteur.

Ces résultats montrent que les modifications d'affinité de la 5'nucléotidase et de l'acétylcholinestérase, solubilisées à partir des membranes de noyau caudé, sont identiques. Ces deux enzymes pourraient donc avoir

TABLEAU III

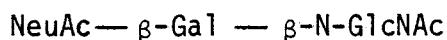


Lectin	W G A		P N A		L C A		U e a f	
Specificity	NeuAC ; GlcNAc.		Gal ; Gal-1,3 GalNAc		Man ; Glc ; GlcNAc.		L-Fuc	
	binding	% inhibition	binding	% inhibition	binding	% inhibition	binding	% inhibition
A	+	80	-	0	+	80	-	0
B	+	56	+	51	+	78	-	0
C	+	63	-	0	+	74	-	0
D	+	24	-	0	+	80	-	0
E	+	53	-	0	+	82	+	0
F	+	77	-	0	+	80	+	0
G	+	72	-	0	+	75	-	0

Effet des lectines sur l'activité 5'nucléotidase des membranes de noyau caudé après traitements séquentiels par les glycosidases. Les échantillons sont incubés avec les lectines (2 mg de lectines/mg de protéines membranaires), 30 minutes à 37°C. Le tableau récapitule les interactions (fixation ; inhibition) de l'enzyme membranaire avec les lectines. (A) témoin non traité ; traitement : (B) neuraminidase ; (C) neuraminidase puis β-galactosidase ; (D) neuraminidase puis β-galactosidase, β-acétylglucosaminidase ; (E) (D) + α-mannosidase ; (F) neuraminidase puis endoglycosidase D.

une structure glycannique semblable.

Le traitement par l'endoglycosidase D entraîne une diminution de l'effet inhibiteur de la Con A sur l'activité 5'nucléotidase, sans modification notable de l'interaction avec la WGA. L'endoglycosidase H, quant à elle, n'entraîne aucune altération de la reconnaissance de la 5'nucléotidase par les différentes lectines utilisées (WGA, Con A, LCA, PNA, UEA). Cependant, après traitements successifs par la neuraminidase, la β -galactosidase et la β -N-acétylglucosaminidase, nous avons observé que l'endoglycosidase H diminue l'effet inhibiteur de la Con A sur la 5'nucléotidase. Le pouvoir inhibiteur des lectines est alors identique à celui observé à la suite du traitement des membranes par l'endoglycosidase D. Ceci indique que l'endoglycosidase H peut reconnaître et hydrolyser des résidus glucidiques, alors que le glycane est amputé séquentiellement du motif trisaccharidique



Les enzymes traités, soit par l'endoglycosidase D, soit par l'endoglycosidase H, se fixent sur UEA-Ultrogel, indiquant la présence d'un résidu α -L-fucose, qui n'est pas accessible par la lectine lorsque la partie glycannique est intacte.

Le traitement par l' α -fucosidase abolit la fixation de l'acétylcholinestérase et de la 5'nucléotidase sur UEA immobilisée, confirmant la présence d'un résidu α -L-fucose. Cependant, la fixation de la lectine UEA sur la 5'nucléotidase n'entraîne aucune inhibition de l'activité. Ceci paraît paradoxal puisque précédemment, toutes les lectines interagissant avec la 5'nucléotidase inhibaient partiellement l'activité catalytique. Il est donc possible que le résidu fucose ne soit pas orienté vers le site catalytique.

Quels que soient les traitements effectués, nous n'avons en aucun cas observé une inhibition de l'activité acétylcholinestérase par les lectines. De plus, les deux enzymes ont des affinités voisines pour les agglutinines qu'ils reconnaissent. Il apparaît donc que la 5'nucléotidase et l'acétylcholinestérase des membranes de noyau caudé ont une structure glyco-

protéique de type N-acétyl-lactosaminique. Une différence notable entre les deux enzymes est néanmoins observée : en effet, dans le cas de la 5'nucléotidase, l'activité catalytique est inhibée par la fixation sur la partie glycannique de ligands spécifiques de types lectines, alors que celle de l'acétylcholinestérase n'est pas affectée.

D I S C U S S I O N

.....

Dans cette étude, nous avons montré que la répartition cellulaire de la 5'nucléotidase du noyau caudé de boeuf est différente de celle observée au niveau du cortex (MONTERO et FES, 1982). Il semble donc qu'au sein d'un même organe, une région anatomique peut avoir une localisation cellulaire de l'enzyme qui lui est particulière, et qui pourrait être liée à une fonction biologique (WOLFF et COOK, 1977). Si nous avons observé que l'activité 5'nucléotidase des membranes de noyau caudé est relativement faible par rapport aux autres tissus étudiés, les affinités pour les substrats sont sensiblement voisines (MEFLAH *et al.*, 1984).

L'effet des agents chélatants sur l'activité 5'nucléotidase, montre que, contrairement à l'enzyme cytosolique, l'apport de cations exogènes n'est pas nécessaire à la fonction catalytique de l'enzyme. Récemment, nous avons mis en évidence le caractère métalloprotéique de la 5'nucléotidase des membranes de foie de boeuf (HARB *et al.*, 1984). Il est probable que l'enzyme membranaire du noyau caudé est également un métalloenzyme.

Les différences observées entre la solubilisation de la 5'nucléotidase et de l'acétylcholinestérase des membranes de noyau caudé peuvent être dues à l'environnement lipidique, de chacune des molécules. Cependant, il faut noter que la localisation transmembranaire de la 5'nucléotidase (ZACHOWSKI *et al.*, 1981) peut aussi être la cause de cette différence. En effet, la solubilisation ne dépend pas uniquement de la concentration en détergent, mais aussi de la nature de celui-ci.

Il paraît évident que la nature des glycannes ne semble pas intervenir dans ce phénomène, puisque les chaînes saccharidiques portées par les deux enzymes ne semblent pas différer sensiblement. Les interactions de ces chaînes exclusivement hydrophiles avec la phase lipidique, doivent d'ailleurs être assez limitées.

Nous avons défini quelques propriétés de ces enzymes. Nous avons montré qu'en de nombreux points, ils sont semblables aux enzymes des membranes des autres tissus.

La 5'nucléotidase et l'acétylcholinestérase des membranes de noyau caudé ont une structure glycoprotéique identique, de type N-acétyl-lactosaminique. L'interaction avec la Con A montre que les glycannes sont probablement biantennées (CUMMINGS et KORNFELD, 1982). De plus, les modifications survenant après traitement des membranes par la neuraminidase indiquent que le glycanne est sialylé.

Les lectines ne provoquent aucune variation d'activité de l'acétylcholinestérase traitée ou non par les glycosidases. Il semblerait donc que la localisation intramoléculaire des glycannes soit telle que les lectines fixées n'exercent aucun encombrement stérique du site catalytique. Ceci montre une différence entre les relations spatiales et les interactions de structure qui existent entre les sites enzymatiques et les copules glucidiques dans la 5'nucléotidase et dans l'acétylcholinestérase des membranes du tissu nerveux.

Même si nos résultats nous incitent à proposer une structure possible pour les chaînes glycanniques de la 5'nucléotidase et de l'acétylcholinestérase des membranes de noyau caudé, il faut aussi considérer qu'il ne peut s'agir que d'une hypothèse indicative, à cause des méthodes indirectes que nous avons utilisées. La purification de ces molécules nous permettrait une étude structurale plus précise, par des techniques spectroscopiques. Cependant, l'obtention de ces molécules en quantité suffisante constitue actuellement la principale difficulté, d'autant plus que l'abondance relative de ces enzymes varie selon le tissu. Par exemple, nous avons

vu que les membranes de foie de boeuf présentent une activité 5'nucléotidase dix fois plus grande que celle rencontrée dans le noyau caudé. La technique de purification de l'enzyme hépatocytaire ne nous a permis l'obtention que de quelques dizaines de microgrammes. Ceci montre les difficultés que nous rencontrerions pour purifier en quantité notable la 5'nucléotidase de membranes de noyau caudé.

B I B L I O G R A P H I E

.....

- CUMMINGS, R.D. and KORNFELD, S. (1982) J. Biol. Chem., 257, 11235.
- GRASSI, J., VIGNY, M. and MASSOULIE, J. (1982) J. Neurochem., 39, 457.
- HARB, J., MEFLAH, K., DUFLOS, Y. and BERNARD, S. (1984) FEBS Lett., 171, 215.
- ITOH, R. (1981) Biochim. Biophys. Acta, 657, 402.
- JONES, D.H. and MATUS, A.I. (1974) Biochim. Biophys. Acta, 356, 276.
- LAZAR, M. and VIGNY, M. (1980) J. Neurochem., 35, 1067.
- MEFLAH, K., HARB, J., DUFLOS, Y. and BERNARD, S. (1984) J. Neurochem., 42, 1107.
- MONTERO, J.M. and FES, B.J. (1982) J. Neurochem., 39, 982.
- WALLACH, D.F.H. and SCHMIDT-ULRICH, R. (1977) Meth. Cell. Biol., 25, 235.
- WOLFF, J. and COOK, G.H. (1977) J. Biol. Chem., 252, 687.
- ZACHOWSKI, A., SIMONIN, G., AUBRY, J., POMMIER, C., SINGH, S.H., POTTER, M. and PARAF, A. (1981) J. Receptor. Res., 2, 97.

Article 3 :

5'Nucleotidase from bovine caudate nucleus synaptic plasma membranes : specificity for substrates and cations ; study of the carbohydrate moiety by glycosidases.

Khaled MEFLAH, Jean HARB, Yves DUFLOS and Serge BERNARD
J. Neurochem. (1984), 42, 1107-1115.

5'-Nucleotidase from Bovine Caudate Nucleus Synaptic Plasma Membranes: Specificity for Substrates and Cations; Study of the Carbohydrate Moiety by Glycosidases

Khaled Meflah, Jean Harb, Yves Duflos, and Serge Bernard

Laboratoire de Biochimie Médicale, U.E.R. de Médecine et Techniques Médicales, Nantes, France

Abstract: We studied 5'-nucleotidase in preparations of synaptic plasma membranes from bovine caudate nucleus. The best substrates for this membrane-bound enzyme were purine nucleotides, particularly 5'AMP. Effects of metal cations and chelating agents suggest that 5'-nucleotidase is a metalloprotein. Optimal conditions for solubilization of the 5'-nucleotidase were found by using a low concentration of the zwitterionic detergent sulfobetaine 14. In contrast, another membrane-bound enzyme, acetylcholinesterase, was not solubilized under these conditions, but only in the presence of Triton X-100. The effects of lectins (concanavalin A, *Lens culinaris* agglutinin, wheat germ agglutinin, and *Limulus poly-*

phemus agglutinin) showed that both enzymes are glycoproteins. Sequential hydrolysis with specific glycosidases produced modifications of the effect of lectins on these enzymes. The results suggest the presence of a complex-type glycosylation, with a fucose residue on the internal N-acetyl-D-glucosamine of the pentasaccharide core. **Key Words:** 5'-Nucleotidase—Acetylcholinesterase—Lectins—Metal cations—Inhibitions—Nucleotides—Solubilization. Meflah K. et al. 5'-Nucleotidase from bovine caudate nucleus synaptic plasma membranes: Specificity for substrates and cations; study of the carbohydrate moiety by glycosidases. *J. Neurochem.* 42, 1107–1115 (1984).

5'-Nucleotidase (EC 3.1.3.5) is an integral glycoprotein of the plasma membrane in numerous cell types (Hayman and Crumpton, 1972; Evans and Gurd, 1974; Gurd and Evans, 1974; Zachowsky et al., 1981a). The active site of the enzyme is located on the outside surface of cells (Gurd et al., 1973; De Pierre and Karnovsky, 1974; Newby et al., 1975). The activity of 5'-nucleotidase controls the level of adenosine, which is thought to be involved in the regulation of biological processes such as cellular proliferation (Carson and Seegmiller, 1976), immunosuppression (Fischer et al., 1976), and hormone liberation (Wolff and Cook, 1977). Banik and Davison (1969) also observed an increase in 5'-nu-

cleotidase activity during myelination. Concanavalin A was demonstrated to be an inhibitor of 5'-nucleotidase activity in rat myelin, revealing that the enzyme is glycosylated (Cammer et al., 1980). However, the structure of its saccharidic moiety is not known.

Cell surface oligosaccharides linked to asparagine residues of glycoproteins are thought to participate in several specific biological interactions (Atkinson and Hakimi, 1980). The involvement of membrane glycoconjugates in recognition and adhesion mechanisms was demonstrated (Heifetz and Lennarz, 1979). In addition, it was shown that some lectins or other sugar-binding factors induced a transmem-

Received August 5, 1983; accepted October 20, 1983.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Khaled Meflah, Laboratoire de Biochimie Médicale, U.E.R. de Médecine et Techniques Médicales, 1, rue Gaston Veil, 44 035 Nantes Cedex, France.

Abbreviations used: Con A, Concanavalin A; GlcNAc, N-

Acetyl-D-glucosamine; ISO, Inside-out plasma membrane vesicle; LCA, *Lens culinaris* agglutinin; LPA, *Limulus polyphemus* agglutinin; NeuNAc, β-N-Acetylneurameric acid; PNA, Peanut agglutinin; RCA I, *Ricinus communis* agglutinin 120; RSO, Right-side-out plasma membrane vesicle; SB₁₄, Sulfobetaine 14; Ueaf, *Ulex europeus* agglutinin; WGA, Wheat germ agglutinin.

branal signal (Albertini and Anderson, 1977; Bourguignon and Singer, 1977).

However, progress in elucidating the structure and distribution of cell surface oligosaccharides has been slow because of two technical problems. The first is the difficulty of fractionating the various oligosaccharide species in a pure form. The second major impediment is that the material is usually available in very limited amounts, and as a consequence, it is difficult to perform detailed structural studies (Kornfeld and Kornfeld, 1980). The aim of this study was to describe some properties of 5'-nucleotidase: solubility in detergents, kinetic parameters, and effect of cations, with a special emphasis on its carbohydrate content. Some of these properties were studied in parallel for acetylcholinesterase to establish a comparison. We investigated the glycosidic moieties of the two enzymes by using lectins (Goldstein et al., 1975; Monsigny et al., 1978; Bhavanandan et al., 1981; Debray et al., 1981) and glycosidases (Strecker and Montreuil, 1979; Baenziger and Fiete, 1979; Kobata, 1979; Yoshima et al., 1980; Gurd and Chun Fu, 1982).

MATERIALS AND METHODS

5'AMP, 5'GMP, 5'UMP, 5'CMP, 5'IMP, neuraminidase (*Clostridium perfringens*), α -D-mannosidase (jack bean), acetylthiocholine iodide, β -galactosidase (beef kidney), and α -L-fucosidase (beef kidney) were obtained from Boehringer Mannheim. 2'AMP, 3'AMP, β -glycerophosphate (grade I), and *Ulex europeus* agglutinin (Ueaf) were purchased from Sigma Chemical (St Louis, MO). Concanavalin A (Con A), *Limulus polyphemus* agglutinin (LPA), peanut agglutinin (PNA), wheat germ agglutinin (WGA), *Ricinus communis* agglutinin 120 (RCA I), *Lens culinaris* agglutinin (LCA), Ultrogel ACA 44, β -N-acetyl-neurameric acid (NeuNAc), and N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) were obtained from I.B.F. Pharmindustrie. Metal salts, D-(+)-galactose, paranitrophenyl phosphate, EDTA, 1,10-phenanthroline, and Triton X-100 were purchased from Merck. β -N-Acetylglucosaminidase D (endoglycosidase D) from *Diplococcus pneumoniae* and β -N-acetylglucosaminidase H (endoglycosidase H) from *Streptomyces plicatus* were purchased from Miles; sulfbetaine 14 (SB₁₄) was from Serva.

Synaptic plasma membrane preparation

Bovine caudate nuclei obtained from the slaughterhouse were carefully dissected within 30 min after the death of the animals. The tissue was immediately frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until used. Synaptic membranes were prepared from caudate nuclei as described by Jones and Matus (1974), except that the 9,000 \times g pellet was lysed under a high nitrogen pressure (50 atm, 20 min) followed by decompression before the usual discontinuous sucrose gradient centrifugation. The plasma membranes were washed twice and suspended in buffer A (40 mM Tris-HCl, 110 mM NaCl, pH 7.40).

Determination of enzyme activities and protein concentration

The activity of 5'-nucleotidase was measured in buffer A at 37°C. The reaction was started by the addition of

5'AMP to the incubation medium (1 mM final concentration). The liberated inorganic phosphate was then determined after different incubation times by the method of Aner and Mossmayer (1975). The activity was expressed as μ mol of liberated phosphate/min/mg protein (Zachowsky et al., 1981b). We verified that the rate of phosphate liberation was not modified in the presence of 20 mM Na⁺ β -glycerophosphate, indicating that the hydrolysis of 5'AMP was due exclusively to 5'-nucleotidase without interference by alkaline phosphatases (Stanley et al., 1980).

Acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7) was assayed by the procedure of Ellman et al. (1961). Protein concentrations were measured by the method of Lowry et al. (1951).

Effects of lectins

Plasma membranes (70 μ g) were preincubated for 30 min at 37°C in the presence of various amounts of lectins before addition of substrate. The effects of lectins were reversed with a competing sugar at a concentration of 100 mM.

Affinity chromatography

Plasma membranes were solubilized in buffer A containing a mixture of two detergents (SB₁₄, 0.5% wt/vol; Triton X-100, 0.5% vol/vol) under constant stirring at 4°C for 1 h, at a final protein concentration of 2 mg/ml. The extract obtained was centrifuged for 1 h at 100,000 \times g and then submitted to affinity chromatography on immobilized lectins. The elution was performed with a linear gradient of N-acetyl-D-glucosamine. The linearity was ascertained with tritiated N-acetyl-D-glucosamine (2 μ Ci/ml corresponding to 10 nmol of sugar). The activities were measured for each fraction and were expressed in arbitrary units.

Glycosidase treatment

Plasma membranes (2 mg protein) were treated with neuraminidase (0.05 U) for 1 h at 37°C in 1 ml of buffer B (50 mM sodium citrate; 5 mM benzaminidine, pH 6.0). Similar digestions were performed with endoglycosidase H or endoglycosidase D in buffer C (50 mM sodium citrate; 5 mM benzaminidine, pH 6.6). Incubations were conducted at 37°C for 6 h. Treatments with β -N-acetylglucosaminidase (1 U/2 mg membrane protein in 1 ml buffer C), α -mannosidase (2.5 U/2 mg membrane protein in 1 ml buffer B), β -galactosidase (6 U/2 mg membrane protein in 1 ml buffer A), and α -L-fucosidase (0.2 U/mg membrane protein in 1 ml buffer B) were performed under a layer of toluene for 14 h at 37°C. Controls were run in the absence of glycosidases. The reactions were stopped by washing the membranes with buffer A.

The activities of 5'-nucleotidase and acetylcholinesterase were measured in the presence or the absence of lectins. In parallel, solubilized membranes were chromatographed on lectin-Ultrogel columns (WGA, PNA, Ueaf, LCA).

RESULTS

Preparation of synaptic plasma membranes from bovine caudate nuclei

The 5'-nucleotidase activity was determined in the different cellular subfractions as defined by Jones and Matus (1974). The activity of the non-

TABLE 1. Substrate specificity of 5'-nucleotidase bound to the plasma membrane

Substrate	K_m	V_{max} (μM Pi/min/mg)	Relative V_{max}/K_m
5'AMP	97	0.042	4.33
5'GMP	71	0.026	3.66
5'IMP	63	0.022	3.49
5'UMP	145	0.040	2.75
5'CMP	122	0.027	2.21
2'AMP	0	0	—
3'AMP	0	0	—
β -Glycerophosphate	0	0	—
<i>p</i> -Nitrophenyl phosphate	0	0	—

Kinetic constants were determined from initial rate data. Concentrations of substrates covered the range 25–1,000 μM , in a total volume 0.4 ml at 37°C.

fractionated homogenate was 0.005 ± 0.001 mol/min/mg protein. Of the total activity (4.28 mol/min) 14% was recovered in nuclear pellet, 84% in 800 $\times g$ supernatant; in this supernatant, 47% of the total activity was measured in crude mitochondrial pellet and 37% in 9,000 $\times g$ supernatant. The plasma membranes prepared from crude mitochondrial pellet contained 21% of the total 5'-nucleotidase activity. This enzyme was enriched six times (0.036 ± 0.005 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ membrane protein) in a preparation of synaptic plasma membranes as compared with a crude homogenate of caudate nuclei. The specific activity was higher than that obtained with the unmodified method: 0.019 ± 0.002 $\mu\text{mol}/\text{Pi}/\text{min}/\text{mg}$ membrane protein. A possible explanation for this may be related to the presence of both right-side-out (RSO) and inside-out (ISO) plasma membrane vesicles. The RSO vesicles are considered to be predominant by the single cavitation lysis method (Wallach and Schmidt-Ulrich, 1977). Indeed, the activity was not changed after addition of detergents to the preparation.

The acetylcholinesterase specific activity was three times higher in the plasma membrane preparation (0.69 ± 0.06 mmol/min/mg membrane protein) than in the homogenate (0.24 ± 0.05 mmol/min/mg protein). Ten percent of the total activity was recovered in the membrane fraction.

Substrate specificity

The plasma membrane 5'-nucleotidase was shown to have a high affinity for 5'IMP and 5'GMP as substrates (Table 1). Phosphorylated compounds such as 2'AMP, 3'AMP, β -glycerophosphate, and *p*-nitrophenyl phosphate were not hydrolyzed at pH 7.40, demonstrating the inactivation of nonspecific phosphatases. Specificity regardless of concentration is best expressed by V_{max}/K_m . By this criterion, 5'AMP was the best substrate.

Effects of cations and chelating agents

5'-Nucleotidase associated with plasma membranes was active in the absence of exogenous di-

valent cations in the incubation media. However, the activity was stimulated (150%) in the presence of either Mn^{2+} (0.5 mM) or Mg^{2+} (10 mM). In the presence of these cations, K_m was decreased and V_{max} increased. The K_a values obtained were: 145 μM for Mg^{2+} ; 250 μM for Mn^{2+} . A strong inhibition was noticed in the presence of Co^{2+} or Ni^{2+} , and the enzyme was completely inhibited with 2 mM Zn^{2+} . The effect of inhibitory ions was reflected by an increase of K_m and a decrease of V_{max} . A mixed type inhibition was observed, with the following K_i values: 188 μM for Zn^{2+} , 235 μM for Ni^{2+} , and 317 μM for Co^{2+} . The enzyme was inhibited by EDTA (Fig. 1A) and by 1,10-phenanthroline (Fig. 1B). This inhibition was partially reversed by the addition of divalent cations.

Enzyme solubilization

The release of 5'-nucleotidase, acetylcholinesterase, and proteins from synaptic plasma membranes was measured in the 100,000 $\times g$ supernatant as shown in Fig. 2. The best solubilization was obtained with 0.5% (wt/vol) of the zwitterionic detergent SB₁₄, which produced a recovery of 80% of the activity of 5'-nucleotidase. Triton X-100 (1% vol/vol) permitted the almost complete solubilization of acetylcholinesterase (95%). Finally, we chose to use a mixture of Triton X-100 (0.5% vol/vol) and SB₁₄ (0.5% wt/vol) that yielded the same result at a lower total detergent concentration.

Effects of lectins

Lectins (Con A, LCA, WGA, LPA) produced a concentration-dependent drop in the activity of membrane-bound 5'-nucleotidase (Table 2). This effect was also observed with solubilized preparations. The inhibitory effect was reversed by the addition of competing sugars. Other lectins such as PNA, Uef, and RCA I produced no effect on either the membrane-bound or the solubilized enzyme. The activity of acetylcholinesterase was not affected by these lectins. In spite of this difference in the sensitivity of their catalytic activity to the effect of lectins, solubilized 5'-nucleotidase and acetylcholinesterase could both be bound to an Ultrogel column containing immobilized WGA, the elution occurring at 0.068 M *N*-acetyl-D-glucosamine (Fig. 3). Eighty-five percent of the 5'-nucleotidase activity (0.097 $\mu\text{mol}/\text{min}$) and 92% of the acetylcholinesterase activity (1.98 mmol/min) were recovered in eluted fractions. 5'-Nucleotidase (specific activity 0.21 $\mu\text{mol}/\text{Pi}/\text{min}/\text{mg}$ protein) and acetylcholinesterase (specific activity 6.32 mmol/min/mg protein) were enriched six- and ninefold, respectively, in the eluted fractions.

Effects of glycosidases

Treatment with neuraminidase had no effect on the interaction of 5'-nucleotidase with Con A and LCA, but reduced the inhibitory effect of WGA.

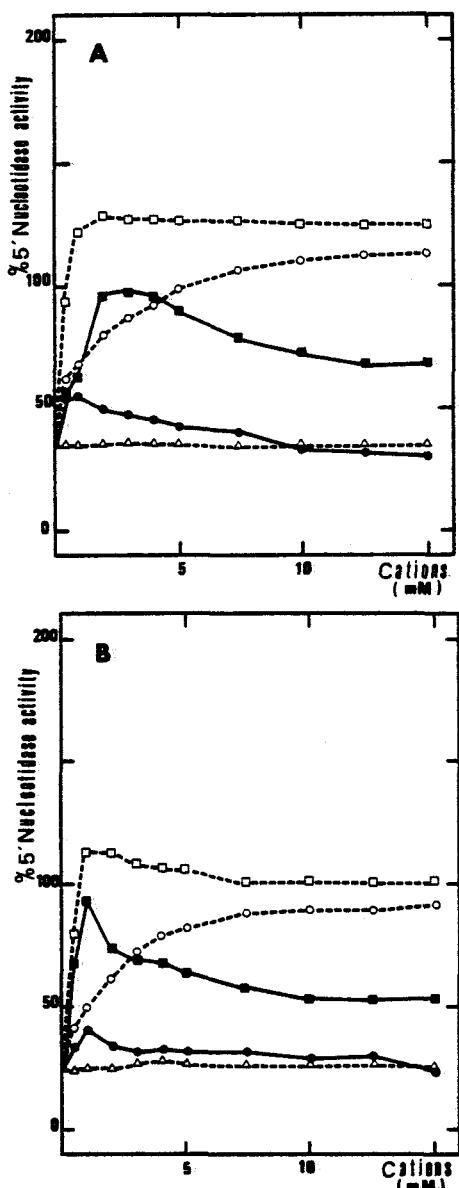


FIG. 1. Effects of chelating agents and subsequent addition of divalent cations on 5'-nucleotidase. Plasma membranes were incubated for 20 min at 37°C with either 20 μM EDTA (A) or 60 μM 1,10 phenanthroline (B) before addition of divalent cations. The reactions were started by AMP 15 min after cation addition; results are expressed as percent of control without EDTA and cations; initial activity represents the residual activity after addition of chelating agents. The values represent the means of at least four determinations: (●), Ni^{2+} ; (■), Co^{2+} ; (Δ), Ca^{2+} ; (\circ), Mg^{2+} ; (\square), Mn^{2+} .

The elution of the treated enzyme from WGA Ultrogel column was obtained with 0.034 M *N*-acetyl-D-glucosamine. After neuraminidase treatment, the enzyme became sensitive to PNA and RCA I (Fig. 4B), indicating an exposure of a galactose residue. The subsequent removal of the terminal galactose with β -galactosidase abolished the sensitivity of 5'-nucleotidase to PNA and RCA 120 (Figs. 4C and

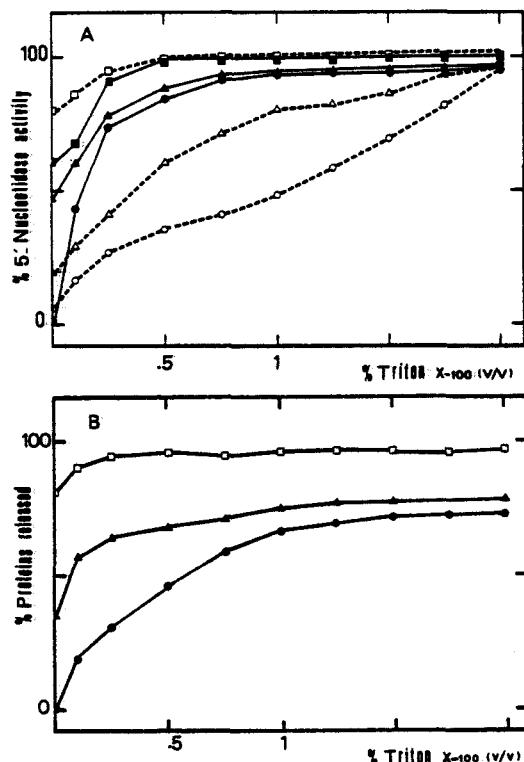


FIG. 2. Effect of the concentration of Triton X-100 and SB₁₄ on solubilization of 5'-nucleotidase and acetylcholinesterase. Synaptic plasma membranes were resuspended at 4°C to 4 mg of proteins/ml in buffer A. Then 100- μl samples were each mixed with 100 μl of detergent solutions to give the indicated concentration. The mixture was incubated 1 h at 4°C and centrifuged at 100,000 $\times g$ in a Beckman Airfuge for 30 min. Supernatants and uncentrifuged mixtures were then assayed for enzymatic activities (A) and protein determinations (B). Percent release of 5'-nucleotidase activity: (○), without SB₁₄; (Δ), 0.1% of SB₁₄; (\square), 0.5% of SB₁₄. Percent release of acetylcholinesterase: (●), without SB₁₄; (\blacktriangle), 0.1% of SB₁₄; (■), 0.5% of SB₁₄. Percent release of proteins: (●), without SB₁₄; (Δ), 0.1% of SB₁₄; (\square), 0.5% of SB₁₄.

5A) and partially restored the binding of 5'-nucleotidase to WGA Ultrogel so that its elution was obtained at 0.052 M *N*-acetyl-D-glucosamine. No modifications of the interactions with Con A and LCA were observed. Subsequent treatment with β -*N*-acetylglicosaminidase resulted in an increase in the inhibition by Con A and LCA and a decrease in the inhibition by WGA (Fig. 4D). The elution of this treated enzyme from WGA Ultrogel column was obtained at 0.028 M *N*-acetyl-D-glucosamine. These observations suggest that these successive treatments lead to an exposure of mannose and β -*N*-acetyl-D-glucosamine residues. A further digestion with α -mannosidase did not modify the interaction with Con A, but increased the inhibitory effect of WGA (Fig. 4E) and the binding to WGA Ultrogel. The elution was obtained at 0.048 M *N*-acetylglucosamine. From these results, we conclude that the

TABLE 2. Percent inhibition of 5'-nucleotidase activity by lectins

Lectin	Con A		LCA		WGA		LPA	
	α -Mannose		α -Mannose		GlcNAc		NeuNAc	
	Competing sugar	0 200 mM	0 200 mM	0 200 mM	0 200 mM	0 200 mM	0 200 mM	0 200 mM
Plasma membrane preparation	85	10	80	12	80	10	75	5
Solubilized enzyme	80	5	75	5	75	5	65	5

A plasma membrane preparation or solubilized enzyme was incubated at 37°C for 30 min in the presence or absence of different lectins (mg lectin/mg membrane protein = 2). The observed inhibitions were reversed by adding a competing sugar. The values are expressed as percent of inhibition and represent the means of five determinations.

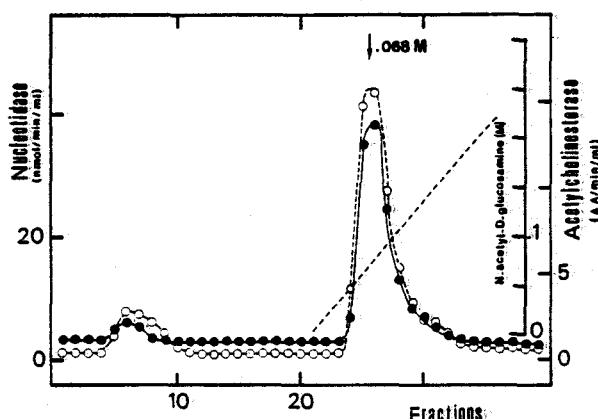


FIG. 3. Elution patterns of 5'-nucleotidase and acetylcholinesterase from WGA Ultrogel. The solubilized plasma membranes were applied to WGA Ultrogel column (8 ml). Fractions (1.2 ml) were collected at a flow rate of 2.4 ml/h. Then both enzymes were eluted with a linear gradient of *N*-acetyl-D-glucosamine (0–0.2 M). (●), 5'-Nucleotidase; (○), acetylcholinesterase.

treatment with β -*N*-acetylglucosaminidase unmasked α -mannose and/or β -mannose residues.

We also analyzed the action of endoglycosidases on the membrane-bound enzyme. A plasma membrane preparation was submitted to the action of endoglycosidase D. We observed a decrease of the effect of Con A (Fig. 4F), but no modification of the inhibitory effect of WGA on 5'-nucleotidase. 5'-Nucleotidase was adsorbed to WGA Ultrogel and elution was obtained at 0.060 M *N*-acetyl-D-glucosamine. These results suggest that endoglycosidase D digestion exposed an *N*-acetyl-D-glucosamine residue. Desialylated plasma membranes, successively digested with β -galactosidase and β -*N*-acetylglucosaminidase, were finally treated with endoglycosidase H. The interactions with lectins observed after this treatment were similar to those obtained after treatment of the membrane with endoglycosidase D (Fig. 4F). After this digestion, the enzyme could be fixed on immobilized Ueaf, but this lectin did not affect its activity. Further treatment with α -L-fucosidase abolished the affinity of

5'-nucleotidase for immobilized Ueaf (Fig. 5B), but did not modify the effect of Con A or LCA on its activity. These results are summarized in Table 3.

Acetylcholinesterase

Acetylcholinesterase activity was tested simultaneously with that of 5'-nucleotidase. The interactions with immobilized lectins were shown to be identical to those obtained with 5'-nucleotidase (Figs. 3 and 5C, D). However, we did not observe any inhibition of the catalytic activity of the native or the treated enzyme.

DISCUSSION

The cavitation lysis method permitted us to obtain a majority of RSO vesicles in which the active sites of acetylcholinesterase and 5'-nucleotidase were accessible to the medium. The cellular distribution of 5'-nucleotidase from caudate nucleus was similar to that observed by Withy et al. (1982). By contrast, it appeared somewhat different from that observed in the bovine cortex, where 94.5% of the activity occurs in the cytoplasm (Montero and Fes, 1982). The cellular localization of 5'-nucleotidase therefore appears to differ among brain regions. We obtained a better enrichment in 5'-nucleotidase than in acetylcholinesterase when purifying plasma membranes. This could be attributed to the cellular distribution of the latter enzyme. Grassi et al. (1982) showed that different molecular forms of the enzyme were present in caudate nuclei: G₁ (monomeric), G₂ (dimeric), and G₄ (tetrameric). However, we previously found only the hydrophobic G₄ form in a plasma membrane fraction from the same tissue (Meflah et al., in preparation).

The affinity of 5'-nucleotidase for mononucleotide phosphate observed in our preparation was close to the values obtained with membrane-bound enzymes from different tissues (Tanaka et al., 1973; Evans and Gurd, 1974; Nakamura, 1976; Dornand et al., 1978). On the other hand, it appeared sixfold lower than the affinity observed with the cytoplasmic enzyme (Montero and Fes, 1982).

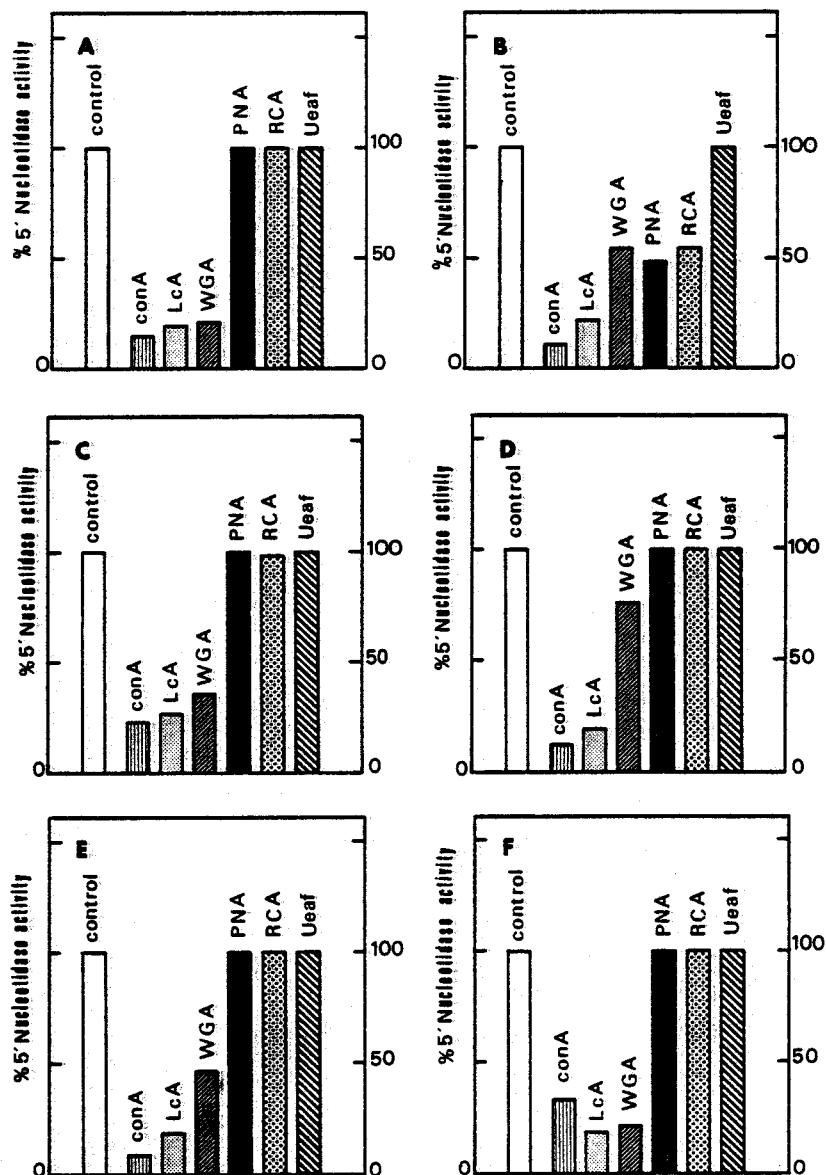


FIG. 4. Effects of lectins on the 5'-nucleotidase activity after sequential glucosidase digestion of the synaptic plasma membrane. The plasma membranes were incubated with different lectins for 30 min at 37°C before addition of substrate (mg lectin/mg membrane protein = 2). The histograms indicate the lectin's effect on the synaptosomal plasma membrane 5'-nucleotidase activity: (A) untreated sample; (B) neuraminidase treatment; (C) subsequent treatment of neuraminidase and β -galactosidase; (D) neuraminidase, β -galactosidase, β -N-acetylglucosaminidase treatments; (E) as (D) plus α -mannosidase treatments; (F) neuraminidase and endoglycosidase D treatments.

The enzyme remained active in the absence of exogenous divalent cations, in contrast with the cytoplasmic enzyme (Itoh, 1981). It has been previously established that the 5'-nucleotidase activity from bovine brain (Tanaka et al., 1973) from rat glioma cells (Stephanovic et al., 1975), and from rat heart (Naito and Lowenstein, 1981) is very sensitive to the presence of metal cations. The membrane-bound 5'-nucleotidase from bovine caudate nucleus was stimulated by Mg^{2+} and Mn^{2+} , but its activity was decreased by Zn^{2+} , Co^{2+} , and Ni^{2+} . A possible explanation for the activation is that either AMP-Mg or AMP-Mn is the preferred substrate, and that the Zn^{2+} and Co^{2+} cations produce an inactive complex. The inhibition produced by EDTA or 1,10-phenanthroline was reversed by addition of

cations (Mn^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+}) to the incubation media. Moreover, the activity of 5'-nucleotidase in EDTA-treated plasma membranes was also restored simply by washing the membranes in EDTA-free buffer (data not shown). These observations suggest that essential metal cations may not be removed during this experimental procedure. We propose that the formation of a ternary complex between 5'-nucleotidase, a divalent cation, and AMP must be formed during catalysis. Armant and Rutherford (1982) consider as a zinc metalloprotein the 5'-nucleotidase from *Dictyostelium discoideum*.

It has been proposed that 5'-nucleotidase is a transmembrane protein in plasma membranes from a lymphoma cell line (Zachowsky et al., 1981b), and

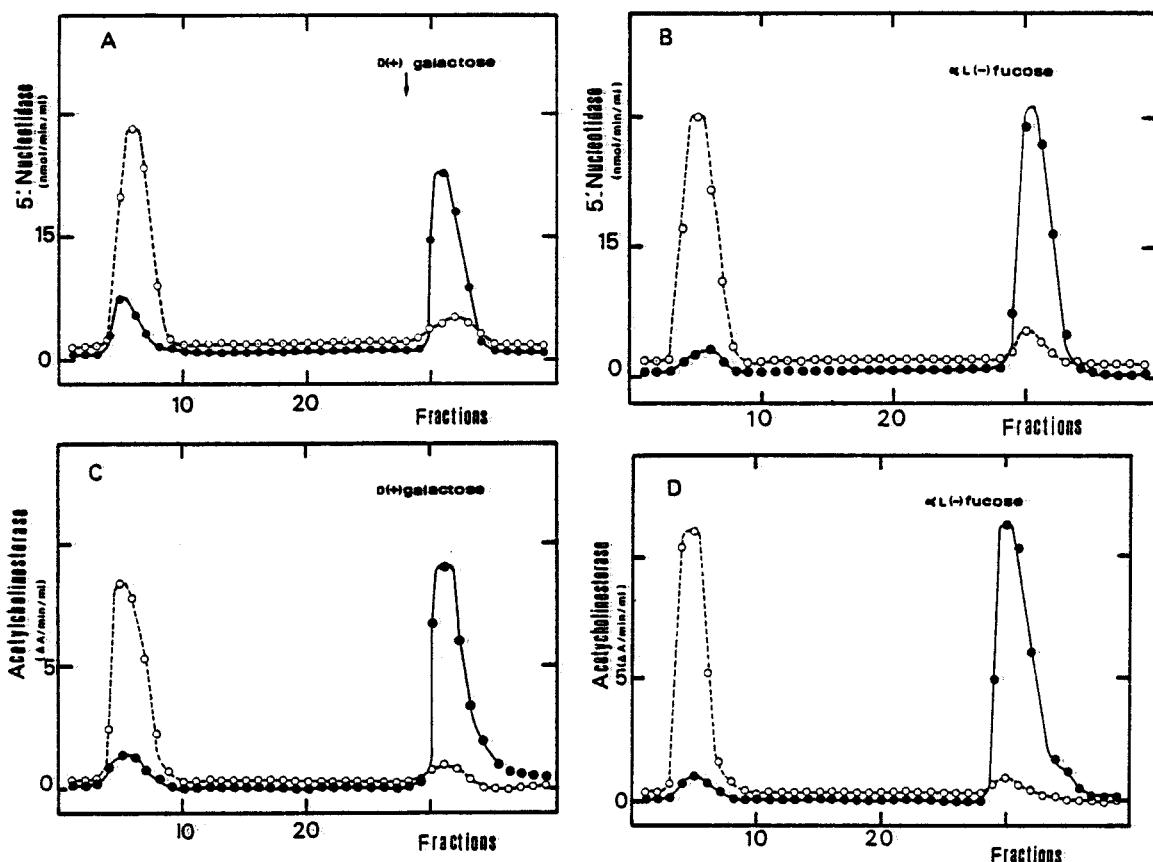


FIG. 5. Elution pattern of 5'-nucleotidase and acetylcholinesterase from lectin Ultrogel (PNA, Uleaf). PNA Ultrogel column (7 ml): the elution was performed with $D(+)$ -galactose (0.2 M). (A) 5'-Nucleotidase, (C) acetylcholinesterase: (●), desialylated plasma membrane; (○), treated with neuraminidase and β -galactosidase. Uleaf Ultrogel column (7 ml): the elution was performed with α -L-fucose (0.2 M). (B) 5'-Nucleotidase, (D) acetylcholinesterase: (●), desialylated membranes treated with endoglycosidases; (○), membranes successively treated with endoglycosidase D and α -L-fucosidase.

this may explain that it is not readily solubilized by Triton X-100 alone, in contrast with acetylcholinesterase. However, SB₁₄ was more efficient for 5'-nucleotidase solubilization, as previously noted by Baillyes et al. (1982). We therefore used a mixture of Triton X-100 and of the zwitterionic detergent SB₁₄. This difference in detergent solubilization between the two enzymes may be due to their binding specificities for hydrophobic compounds which may be related to different lipidic environments.

5'-Nucleotidase was inhibited by some plant lectins (LCA, Con A, WGA, LPA). 5'-Nucleotidase from plasma membranes was described as a glycoprotein in pig lymphocyte (Hayman and Crumpton, 1972; Dornand et al., 1976); mouse liver (Evans and Gurd, 1974), and rat liver (Slavik et al., 1977). In the present study we found that both 5'-nucleotidase and acetylcholinesterase interacted with WGA, in contrast with the situation occurring with the same enzymes originating from bovine lymphocyte plasma membrane (Meflah et al., in preparation). A similar effect was observed with 5'-

nucleotidase from plasma membrane of mammary glands (Carraway et al., 1976) and rat liver (Slavik et al., 1977). The acetylcholinesterase activity was not inhibited by lectins, although its affinity for immobilized lectins was similar to that of 5'-nucleotidase, demonstrating its glycoprotein nature. Treatment with neuraminidase showed the presence of terminal neuraminic acid(s) in the two molecules. The affinity that appeared for RCA I and PNA, and the results of a digestion with α -galactosidase, revealed the presence of β -D-galactose. Sequential hydrolysis successively unmasked β -N-acetyl-D-glucosamine and mannose residues. The latter was insensitive to the action of α -mannosidase, probably indicating that it is engaged in a β -linkage. On the other hand, endoglycosidase H could remove these residues, unmasking a β -N-acetyl-D-glucosamine.

Finally, the interaction of both enzymes with Uleaf and the abolition of this effect after treatment with α -L-fucosidase indicated the presence of a α -L-fucose residue. While 5'-nucleotidase that had

TABLE 3. Summary of procedures and results for the glycosylation type determination of synaptic plasma membrane 5'-nucleotidase

Sequential glycosidase treatment	Figure 4	WGA NeuNAc; GlcNAc		PNA Gal; Gal-1,3 GlcNAc		LCA Man; Glc; GlcNAc		UEAF α-L-Fucose		
		Binding	% Inhibition	Binding	% Inhibition	Binding	% Inhibition	Binding	% Inhibition	
I	α-NeuNAc 2,6	A	+	80	-	0	+	80	-	0
II	β-Gal 1,4	B	+	56	+	51	+	78	-	0
III	β-GlcNAc 1,2	C	+	63	-	0	+	74	-	0
IV	(α-Man) _n 1,3	D	+	24	-	0	+	80	-	0
V	β-Man 1,4	E	+	53	-	0	+	82	+	0
α-Fucose 1,6	β-GlcNAc 1,4	F	+	77	-	0	+	80	+	0
VI	Asn	G	+	72	-	0	+	75	-	0

A, B, C, D, E, and F correspond to the effects of lectins on the 5'-nucleotidase activity after glycosidase treatment: (I) neuraminidase; (II) β-galactosidase; (III) β-N-acetylglucosaminidase; (IV) α-D-mannosidase; (V) endoglycosidase D; (VI) α-L-fucosidase. (See legend Fig. 4.) G, Subsequent digestion with endoglycosidases and α-L-fucosidase.

been solubilized from endoglycosidase-treated membranes did bind to immobilized Ueaf, this lectin did not inhibit the enzyme activity. This appears paradoxical because the internal position of a fucose residue that is thought to explain such binding would be expected to allow a stronger interaction between lectin and enzyme, and therefore a more complete inhibition, than observed with more external sugar residues. However, inhibition may depend on a critical conformation of the carbohydrate chain, which may allow an interaction between lectins and specific sites, probably the active site, of the protein surface.

Moreover, we observed in the present study that while Con A binds quantitatively both native and treated 5'-nucleotidase, probably interacting respectively with external and internal residues, it is less inhibitory after endoglycosidase treatment. 5'-Nucleotidase and acetylcholinesterase from caudate nucleus synaptic plasma membranes therefore appear to present N-glycosylation of the complex oligolactosaminic type, carrying a fucose residue on the internal N-acetyl-D-glucosamine of the pentasaccharidic core. The polysaccharidic chain structure might be similar to that known for glycoproteins such as human β-lactotransferrin glycoprotein I (Strecker and Montreuil, 1979).

Since glycosylation is restricted to the hydrophilic surface of the protein, we do not expect any correlation with solubility properties; in addition acetylcholinesterase and 5'-nucleotidase-bound synaptic plasma membrane from bovine caudate nucleus appear to possess similar polysaccharidic moieties but differ in their detergent solubilization properties. It does not seem possible to obtain more precise information about the structure of the glu-

cidic moieties of these membrane-bound enzymes, and about their influences on the protein conformation and catalytic activity, by indirect methods such as we used here. A more complete understanding will require a complete purification of the enzymes and a subsequent elucidation of their carbohydrate chains, e.g., by nuclear magnetic resonance analysis (Dorland et al., 1977).

Acknowledgments: We are grateful to Dr. Jean Massoulie and Dr. Jean Menanteau for very helpful comments and discussions, Mrs. Danielle Lassort for excellent technical assistance, and Mrs. Annie Combalot for the preparation of the manuscript. We thank INSERM Unité 211 for its material assistance.

REFERENCES

- Albertini D. F. and Anderson E. (1977) Microtubule and microfilament rearrangements during capping of concanavalin A receptors on cultured ovarian granulosa cells. *J. Cell Biol.* 73, 111-127.
- Anner B. and Mossmayer M. (1975) Rapid determination of inorganic phosphate in biological systems by a highly sensitive photometric method. *Anal. Biochem.* 65, 305-309.
- Armant D. R. and Rutherford C. L. (1982) Properties of 5'AMP specific nucleotidase which accumulates in one cell type during development of *Dictyostelium discoideum*. *Biochem. J.* 216, 485-494.
- Atkinson P. H. and Hakimi J. (1980) Alterations in glycoproteins of the cell surface, in *The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans* (Lennarz W. J., ed), pp. 191-239. Plenum Press, New York.
- Baenziger J. U. and Fiete D. (1979) Structural determinants of concanavalin A specificity for oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* 254, 2400-2407.
- Bailyes E. M., Newby A. C., Siddle K., and Luzio J. P. (1982) Solubilization and purification of rat liver 5'-nucleotidase by use of a zwitterionic detergent and a monoclonal antibody immunoabsorbant. *Biochem. J.* 203, 245-251.

- Banik N. L. and Davison A. N. (1969) Enzyme activity and composition of myelin and subcellular fractions in developing rat brain. *Biochem. J.* 115, 1051-1062.
- Bhavanandan V. P., Katlic A. W., Banks J., Kemper J. G., and Davidson E. A. (1981) Partial characterization of sialoglycopeptides produced by cultured human melanoma cells and melanocytes. *Biochemistry* 20, 5586-5594.
- Bourguignon L. Y. N. and Singer S. J. (1977) Transmembrane interactions and the mechanism of capping of surface receptors by these specific ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5031-5035.
- Cammer W., Sirota S. R., Zimmerman T. R. Jr., and Norton W. T. (1980) 5'-Nucleotidase in rat brain myelin. *J. Neurochem.* 35, 367-373.
- Carraway K. L., Fogle D. D., Chesnut R. W., Huggins J. W., and Carraway C. A. C. (1976) Ecto-enzymes of mammary gland and its tumors. Lectin inhibition of 5'-nucleotidase of the 13762 rat mammary ascites carcinoma. *J. Biol. Chem.* 251, 6173-6178.
- Carson D. A. and Seegmiller J. E. (1976) Effect of adenosine desaminase inhibition upon human lymphocytes blastogenesis. *J. Clin. Invest.* 57, 274-282.
- Debray H., Decout D., Strecker G., Spick G., and Montreuil J. (1981) Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycopeptides related to *N*-glycosylproteins. *Eur. J. Biochem.* 117, 41-45.
- De Pierre J. W. and Karnovsky M. L. (1974) Ecto-enzymes of the guinea pig polymorphonuclear leucocyte. I. Evidence for an ecto-adenosine monophosphatase, adenine triphosphatase and *p*-nitrophenyl phosphatase. *J. Biol. Chem.* 249, 7111-7120.
- Dorland L., Haverkamp J., Schut B. L., Vliegenthart J. F. G., Spik G., Strecker G., Fournet B., and Montreuil J. (1977) The structure of the asialo-carbohydrate units of human serotransferrin as proven by 360 MHz proton magnetic resonance spectroscopy. *FEBS Lett.* 77, 15-20.
- Dornand J., Bonnafous J. C., and Mani J. C. (1978) Purification and properties of 5'-nucleotidase from lymphocyte plasma membranes. *Eur. J. Biochem.* 87, 459-465.
- Ellman G. L., Courtney K. D., Andres V., and Featherstone R. M. (1961) A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95.
- Evans W. H. and Gurd J. W. (1974) Properties of a 5'-nucleotidase purified from mouse liver plasma membranes. *Biochem. J.* 133, 189-199.
- Fischer D., Van Der Weyden M. B., Snyderman R., and Kelley W. N. (1976) A role for adenosine deaminase in human monocyte maturation. *J. Clin. Invest.* 58, 399-407.
- Goldstein I. J., Hammarstrom S., and Sundblad S. (1975) Precipitation and carbohydrate-binding specific studies on wheat germ agglutinin. *Biochim. Biophys. Acta* 405, 53-61.
- Grassi J., Vigny M., and Massoulié J. (1982) Molecular forms of acetylcholinesterase in bovine caudate nucleus and superior cervical ganglion: solubility properties and hydrophobic character. *J. Neurochem.* 38, 457-469.
- Gurd J. W. and Evans W. H. (1974) Distribution of liver plasma membrane 5'-nucleotidase as indicated by its reaction with anti-plasma membrane serum. *Biochim. Biophys. Acta* 164, 305-311.
- Gurd J. W. and Chun Fu S. (1982) Concanavalin A receptors associated with rat brain synaptic junctions are high mannose-type oligosaccharides. *J. Neurochem.* 39, 719-725.
- Gurd J. W., Evans W. H., and Perkins H. R. (1973) Immunological characterization of proteins from mouse liver plasma membranes. *Biochem. J.* 135, 827-832.
- Hayman M. J. and Crumpton M. J. (1972) Isolation of glycoproteins from pig lymphocyte plasma using *Lens culinaris*, PHA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 47, 923-930.
- Heifetz A. and Lennarz W. J. (1979) Biosynthesis of *N*-glycosidically linked glycoproteins during gastrulation of sea urchin embryos. *J. Biol. Chem.* 254, 6119-6127.
- Itoh R. (1981) Purification and some properties of cytosol 5'-nucleotidase from rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* 657, 402-410.
- Jones D. H. and Matus A. I. (1974) Isolation of synaptic plasma membrane from brain by combined flotation-sedimentation density gradient centrifugation. *Biochim. Biophys. Acta* 356, 276-287.
- Kobata A. (1979) Use of endo and exoglycosidases for structural studies of glycoconjugates. *Anal. Biochem.* 100, 1-14.
- Kornfeld R. and Kornfeld S. (1980) Structure of glycoproteins and oligosaccharide units, in *The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans* (Lennarz W. J., ed), pp. 1-34. Plenum Press, New York.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., and Randall R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Monsigny M., Delmotte F., and Helene C. (1978) Ligands containing heavy atoms: perturbations of phosphorescence of tryptophan residue in the binding site of wheat germ agglutinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 1324-1328.
- Montero J. M. and Fes B. J. (1982) Purification and characterization of bovine brain 5'-nucleotidase. *J. Neurochem.* 39, 982-989.
- Naito Y. and Lowenstein J. M. (1981) 5'-Nucleotidase from rat heart. *Biochemistry* 20, 5188-5194.
- Nakamura S. (1976) Effect of sodium deoxycholate on 5'-nucleotidase. *Biochim. Biophys. Acta* 426, 339-347.
- Newby A. C., Luzio J. P., and Hales C. N. (1975) The properties and extracellular localisation of 5'-nucleotidase of the rat fat-cell plasma membrane. *Biochem. J.* 146, 625-633.
- Riemer B. L. and Widnell C. C. (1975) The demonstration of a specific 5'-nucleotidase activity in rat tissues. *Arch. Biochem. Biophys.* 171, 343-347.
- Slavik M., Kartner N., and Riordan J. R. (1977) Lectin-induced inhibition of plasma membrane 5'-nucleotidase: sensitivity of purified enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 75, 342-349.
- Stanley K. K., Edwards M. R., and Luzio J. D. (1980) Subcellular distribution and movement of 5'-nucleotidase in rat cells. *Biochem. J.* 186, 59-69.
- Stephanovic, V., Mandel, P., and Rosenberg, A. (1975) Concanavalin A inhibition of ecto 5'-nucleotidase of intact cultured C6 glioma cells. *J. Biol. Chem.* 250, 7081-7083.
- Strecker G. and Montreuil J. (1979) Glycoprotéines et glycoprotéinas. *Biochimie* 61, 1199-1246.
- Tanaka R., Morita H., and Teruya A. (1973) Isolation and properties of 5'-nucleotidase from a membrane fraction of bovine cerebral cortex. *Biochim. Biophys. Acta* 298, 842-849.
- Wallach D. H. F. and Schmidt-Ulrich R. (1977) Isolation of plasma membranes vesicles from animal cells. *Methods Cell Biol.* 15, 235-276.
- Withy R. M., Mayer R. J., and Strange P. G. (1982) The distribution of radioligand binding activity and 5'-nucleotidase activity in bovine caudate nucleus subcellular fractions. *J. Neurochem.* 38, 1348-1355.
- Wolff J. and Cook G. H. (1977) Activation of steroidogenesis and adenylate cyclase by adenosine in adrenal and Leydig tumor cells. *J. Biol. Chem.* 252, 687-693.
- Yoshima H., Furthmayr H., and Kobata A. (1980) Structures of the asparagine-linked sugar chains of glycophorin A. *J. Biol. Chem.* 255, 9713-9718.
- Zachowsky A., Evans W. H., and Paraf A. (1981a) Immunological evidence that plasma membrane 5'-nucleotidase is a transmembrane protein. *Biochim. Biophys. Acta* 644, 121-126.
- Zachowsky A., Simonin G., Aubry J., Pommier P., Singh S. H., Potter M., and Paraf A. (1981b) Plasma membrane enzymes in *balb/C* lymphomas with either T or B cell properties. I. 5'-Nucleotidase. *J. Receptor Res.* 2, 97-118.

CONCLUSION GENERALE

La membrane plasmique constitue une barrière biologique qui régit le phénomène d'échange et de régulation nécessaires à la vie de la cellule.

Parmi les constituants membranaires, les glycoconjugués interviennent dans des processus fondamentaux, tels que les réactions immuno-logiques, le contrôle de la division cellulaire, la mobilité et l'adhésion cellulaire. Le glycanne est intimement impliqué dans ces fonctions. Il est donc évident que la connaissance de la structure et du rôle des glycoconjugués est indispensable à la compréhension de nombreux phénomènes biologiques dans lesquels la membrane intervient.

La résonance magnétique nucléaire s'avère être un outil précieux dans la détermination de la structure des glycannes. Cependant, cette méthodologie exige l'obtention de molécules purifiées en quantité relativement importante. Par ailleurs, les lectines par leur capacité de reconnaître des sucres, apparaissent très efficaces dans l'approche des structures osidiques des glycoconjugués. En effet, par leur propriété de se lier spécifiquement à des oses ou des oligosaccharides sans en modifier la structure covalente, elles permettent l'étude et la purification des glycoprotéines. De plus, grâce aux progrès qui ont été effectués dans leur caractérisation et leur mode d'utilisation, les glycosidases constituent un moyen d'approche complémentaire des structures glycanniques.

Dans notre travail, nous nous sommes basés sur les propriétés respectives des lectines et des glycosidases, pour tenter de caractériser les

glycannes de deux glycoprotéines membranaires : la 5'nucléotidase et l'acétylcholinestérase des membranes plasmiques de différents tissus bovins.

Le choix de ces deux enzymes a été guidé par deux critères : le premier est la présence de ces deux glycoprotéines dans les cellules de nombreux tissus ; le second découle du fait que dans certains cas, aucune signification biologique précise n'a pu leur être attribuée. En effet, dans l'état actuel de nos connaissances, le rôle de l'acétylcholinestérase lymphocytaire n'est pas élucidé. Des études en cours nous ont permis de mettre en évidence qu'en présence d'inhibiteur de l'acétylcholinestérase (ésérine 10^{-5} M), les lymphocytes ne sont plus stimulables par des lectines mitogènes (PHA, Con A). Cette observation ne constitue pas obligatoirement la preuve que l'enzyme puisse être impliqué dans un processus de différentiation cellulaire. Cependant, il n'est pas exclu que par sa fixation, l'ésérine affecte l'intégralité fonctionnelle de la membrane plasmique, entraînant ainsi l'inhibition de la réponse mitogénique.

Dans notre mémoire, nous avons montré que l'acétylcholinestérase et la 5'nucléotidase membranaires possèdent un glycane qui peut varier d'un tissu à l'autre. Quel que soit le type de glycosylation, l'affinité de ces deux enzymes pour leurs substrats respectifs, n'est pas affectée. Il apparaît donc que la nature du glycane n'intervient pas dans ce paramètre cinétique. Par contre, si l'activité enzymatique est testée en présence de lectines spécifiques du glycane de ces deux enzymes, on observe que :

- 1) La 5'nucléotidase est toujours inhibée.
- 2) Seule l'acétylcholinestérase lymphocytaire est inhibée par une lectine spécifique du fucose (UEA).

Bien que pour un même type de membrane les glycannes de ces deux enzymes soient apparemment très semblables, il est certain qu'ils exercent, par l'intermédiaire de ligands spécifiques, des influences différentes sur leur activité enzymatique. Ce phénomène est probablement dû à une conformation particulière du glycanne de chacun des enzymes par rapport au site catalytique.

Lorsque le glycanne est modifié par l'action des glycosidases, nous n'observons aucune variation dans les constantes d'affinité des enzymes pour leurs substrats respectifs. Ceci indique que l'intégralité de la structure saccharidique n'est apparemment pas nécessaire à l'activité catalytique de l'acétylcholinestérase et de la 5'nucléotidase.

Dans la caractérisation des formes moléculaires de l'acétylcholinestérase, nous observons qu'au sein d'un même tissu peuvent coexister des formes moléculaires différentes, non seulement par leur masse molaire mais aussi par la nature du glycanne qu'elles portent. C'est le cas de la membrane du muscle digastrique où, bien qu'immunologiquement semblables, les formes tétramériques G_4 et monomériques G_1 possèdent des glycannes différents.

Dans le but de caractériser par la résonance magnétique nucléaire le glycanne de la 5'nucléotidase des membranes plasmiques de foie, nous avons purifié l'enzyme. Cependant, les quantités obtenues se sont avérées trop faibles pour une telle étude. C'est ainsi, que dans un premier temps, nous avons produit des anticorps par immunisation de lapin. Après fixation de ces anticorps sur des billes d'agarose, nous avons tenté de purifier la 5'nucléotidase, en une seule étape, par une technique d'immunoadsorption. Si nous avons observé une fixation de l'enzyme, quelque soient les techniques d'élution, nous n'avons pas pu obtenir une 5'nucléotidase active. Il semble que les modes d'élution que nous avons testés inactivent de manière irréversible l'enzyme.

Les anticorps obtenus réagissent avec la 5'nucléotidase membranaire des différents tissus que nous avons étudiés (muscle digastrique, noyau caudé, lymphocyte). Nous observons donc, comme dans le cas de l'acétylcholinestérase, que la nature du glycanne de chacune des molécules n'intervient apparemment pas dans les reconnaissances antigéniques de la 5'nucléotidase.

Devant les résultats peu satisfaisants de la purification par immunoadsorption, nous avons entrepris l'étude du glycanne de la 5'nucléotidase et de l'acétylcholinestérase des membranes de noyau caudé. Par l'action combinée des lectines et des glycosidases, nous avons pu montré que le glycanne de ces deux enzymes est probablement identique et serait de type N-acétyllactosaminique. Ce type d'étude indirecte s'avère très utile lorsque la glycoprotéine ne peut être isolée en quantité suffisante. Cependant, les résultats obtenus ne sont qu'indicatifs.

La variabilité tissulaire de la structure glycannique de chacun des enzymes nous incite à nous poser une série de questions qui rejoignent celles qui ont été récemment énoncées par SHARON (1984).

1) Dans l'hypothèse qui suggère que les glycannes des glycoconjugués membranaires sont impliqués dans les phénomènes de reconnaissance intercellulaire, ce qui semble être confirmé par de nombreux arguments, peut-on considérer que leur hétérogénéité est responsable du maintien de la diversité et de l'intégralité tissulaire ?

2) Au cours de l'embryogénèse, l'apparition des territoires présumptifs, destinés à constituer des tissus spécifiques, est-elle liée à l'expression de structures glycanniques particulières des glycoconjugués de surface ?

Si nous considérons les deux enzymes que nous avons étudiés comme des sondes représentatives, il nous est possible d'extrapoler à l'échelle cellulaire et d'observer que dans le cas du lymphocyte, qui a une origine mésoblastique, nous avons caractérisé un glycanne de type oligomannosidique pour la 5'nucléotidase et l'acétylcholinestérase. Par contre, dans le noyau caudé qui dérive du neuroectoblaste, les enzymes ont des glycannes de type N-acétyl-lactosaminique. Il est clair que cette observation ne suffit pas pour établir l'hypothèse proposée puisque tous les glycoconjugués de la surface d'une même cellule ne sont peut-être pas glycosylés de la même façon. Aussi, il serait intéressant de savoir si les glycosylations sont suffisamment élaborées dans les premiers stades du développement embryonnaire ou bien si elles évoluent avec la maturation par la synthèse de glycosyl-transférases capables de catalyser l'insertion du glycanne sur la protéine et son élaboration.

Les interactions sucres-protéines au niveau des membranes impliquent l'existence de récepteurs membranaires des glycoconjugués. Pour expliquer les reconnaissances spécifiques basées sur la présence des glycoconjugués, il est nécessaire de supposer l'existence de structures membranaires complémentaires qui seraient en quelque sorte des lectines membranaires (MONSIGNY *et al.*, 1983). Celles-ci pourraient intervenir dans les mécanismes de phagocytoses, mettant en jeu des structures glycoprotéiques dont le rôle dans l'embryogénèse (ZANETTA *et al.*, 1984) et le transport des glycoconjugués, quoique peu connus, semblent importants.

Sur la base des résultats que nous décrivons dans le présent mémoire, nous pouvons suggérer, entre autres, deux axes de recherche :

1) Une étude de la glycosylation de la 5'nucléotidase et de l'acétylcholinestérase.

Il nous paraît intéressant de comparer le métabolisme de ces enzymes dans deux types de cellules (lymphocyte et hépatocyte) où ces

deux molécules diffèrent pas la nature de leur glycanne, en étudiant particulièrement la glycosylation de ces deux enzymes et leur insertion dans les membranes.

2) Une étude de la nature du glycanne de ces enzymes au niveau de cellules tumorales.

Il serait par exemple intéressant d'étudier les lymphocytes, en recherchant si dans certaines pathologies, les glycannes des enzymes membranaires sont modifiés. Ce type d'étude pourrait ouvrir des perspectives de recherche dans la connaissance des interactions cellulaires. La caractérisation d'éventuelles lectines membranaires peut constituer un moyen d'approche dans la compréhension des phénomènes d'adhésivité des cellules, telles que la dissociation de cellules tumorales au niveau d'organe lymphoïde et la migration de ces cellules malignes, vers un autre organe responsable des processus métastasiques.



N O M : M E F L A H

Prénom : Khaled

Titre de Thèse :

APPROCHE PAR LES LECTINES ET LES GLYCOSIDASES DE LA STRUCTURE GLYCANNIQUE
DE L'ACÉTYLCHOLINESTERASE ET DE LA 5'NUCLEOTIDASE BOVINES.

R E S U M E

Dans notre mémoire, nous avons étudié les interactions de diverses lectines, avec deux enzymes membranaires, la 5'nucléotidase et l'acétylcholinestérase, obtenues à partir de divers tissus bovins. Nous observons des différences qui indiquent que les structures glycanniques de chacune de ces protéines varient selon les tissus. L'effet des glycosidases nous a permis de montrer que l'acétylcholinestérase et la 5'nucléotidase membranaires du lymphocyte ont une structure identique de type oligomannosidique, alors que celle du noyau caudé est de type N-acétyl-lactosaminique. Nous avons aussi observé que les différentes formes d'acétylcholinestérase présentes dans un même tissu peuvent différer dans leurs interactions avec les lectines. C'est ainsi que dans le muscle, la forme G₄ porte des carbohydrates de type complexe, alors que G₁ a une structure glycannique de type oligomannosidique. Les anticorps produits contre la 5'nucléotidase des membranes de foie de boeuf réagissent avec l'enzyme membranaire des différents tissus bovins (foie, lymphocyte, muscle digastrique, noyau caudé). Nous avons donc montré que la nature du glycanne n'intervient pas dans la reconnaissance antigénique de la 5'nucléotidase et de l'acétylcholinestérase des membranes des différents tissus bovins.

Mots-clés :

Acétylcholinestérase ; 5'nucléotidase ; lectines , glycosidases ; anticorps ; polymorphisme cellulaire.