

MÉMOIRE

présenté à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE 3ème CYCLE

EN BIOCHIMIE

par

Thierry BAUSSANT

ETUDE DES PREMIERES ETAPES DU CATABOLISME LYSOSOMAL DES GLYCOPROTEINES

- **SPÉCIFICITÉ D'ACTION DE L'ASPARTYL-N-ACÉTYLGLUCOSAMINIDASE DE FOIE DE RAT VIS-À-VIS DE DIFFERENTS TYPES DE N-GLYCO-ASPARAGINES.**
- **CARACTÉRISATION D'UNE ENDO-N-ACÉTYL- β -D-GLUCOSAMINIDASE LYSOSOMALE.**



Présenté le 12 Décembre 1985 devant la Commission d'Examen

Président :	J.	MONTREUIL
Rapporteur :	G.	SPIK
Examineurs :	G.	STRECKER
	R.J.	PIERCE
	S.	BOUQUELET

A mes parents

A Cécile

Ce travail a été réalisé sous la direction de Messieurs Gérard STRECKER, Maître de Recherches au C.N.R.S., et Jean-Claude MICHALSKI, chargé de recherches à l'I.N.S.E.R.M., dans le Laboratoire de Chimie Biologique dirigé par Monsieur le Professeur Jean MONTREUIL, à l'Université des Sciences et Techniques de LILLE (Laboratoire associé au C.N.R.S. N°217 : "Relations Structures-Fonctions des Constituants Membranaires").

Il a bénéficié d'une aide de l'I.N.S.E.R.M. (C.R.L. N°78.1.0523) et du Ministère de la Recherche et de la Technologie (contrat d'allocataire de recherche N°453).

A Jean-Claude MICHALSKI,

au cours de ces trois années, tu m'as guidé et fait partager ton goût pour la recherche avec enthousiasme et bonne humeur.

Sois assuré de ma sincère amitié.

A Gérard STRECKER,

par tes conseils avisés, tu m'as guidé dans le travail que tu m'avais confié. Ta passion pour la recherche restera toujours un exemple pour moi.

Je tiens à t'exprimer toute ma reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Jean MONTREUIL,

en m'acceptant au sein de votre Laboratoire, vous m'avez permis d'accéder aux joies de la recherche.

Soyez assuré de ma profonde gratitude et de mon respectueux attachement.

A Mademoiselle le Professeur Geneviève SPIK,

votre collaboration a été particulièrement précieuse pour la réalisation de ce travail. Je vous remercie d'avoir bien voulu accepter d'être le rapporteur de cette thèse.

Soyez assurée de ma sincère gratitude.

A Monsieur le Professeur Stéphane BOUQUELET,

je tiens à vous remercier de l'aide que vous avez apporté à la réalisation de ce travail. Je vous suis reconnaissant d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail.

Soyez assuré de ma reconnaissance.

A Monsieur Raymond John PIERCE,

je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail.
Soyez assuré de ma profonde sympathie.

Mes remerciements s'adressent également à

Monsieur Jean-Michel WIERUSZESKI pour la réalisation des analyses RMN.

Monsieur Yves LEROY pour ses très précieux conseils dans la réalisation des analyses de chromatographie en phase gazeuse.

Monsieur Philippe APPOURCHEAU pour sa collaboration à la réalisation des dosages de l'endo.

Madame Jocelyne CELEN qui, avec gentillesse et compétence, s'est chargée des travaux photographiques et de la réalisation matérielle de ce document.

A tous mes camarades et amis du Laboratoire de Chimie Biologique et notamment du "Labo 110".

Que tous ceux qui, à des titres divers, m'ont accordé leur aide et leur amitié soient ici remerciés.

ABREVIATIONS

Asn : L-asparagine

FAB-MS : "Fast atom bombardment-Mass spectrometry"

DTT : dithiotréitol

Endo : Endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase

Fuc : L-fucose

Gal : D-galactose

Glc : D-glucose

GlcNAc : N-acétyl-D-glucosamine

Man : D-mannose

MOPS : acide morpholino-propane-sulfonique

NeuAc : acide N-acétylneuraminique

RMN : résonance magnétique nucléaire

PNP : para-nitro-phényl

INTRODUCTION

GENERALITES

I- LES LYSOSOMES	P.3
A- ORIGINE	P.3
B- CARACTERISTIQUES GENERALES	P.3
1- Perméabilité de la membrane lysosomale	P.5
2- Le pH intralysosomal	P.5
C- ROLE DES LYSOSOMES	P.6
1- Hétérophagie	P.6
2- Autophagie	P.7
II- CATABOLISME DES GLYCOPROTEINES-	
LES GLYCOPROTEINOSES	P.10
A- LES GLYCOPROTEINES	P.10
1- Les N-glycosylprotéines	P.10
a- Chaînes oligosaccharidiques de type oligomannosidique	P.12
b- Chaînes oligosaccharidiques de type N-acétyllactosaminique	P.12
c- Chaînes oligosaccharidiques de type mixte	P.13
B- CATABOLISME DES GLYCOPROTEINES	P.13
1- Reprise spécifique des glycoprotéines par la cellule	P.13
2- Dégradation enzymatique	P.16
3- Les glycosidases lysosomales	P.17
a- Caractéristiques générales des hydrolases acides	P.17
b- Spécificité des glycosidases et formes multiples	P.19
c- Biosynthèse et transport intracellulaire des glycosidases	P.20
4- Glycosidases et protéases : rôles respectifs et ordre d'action au cours du catabolisme des glycoprotéines	P.23

C- LES GLYCOPROTEINOSES	P.26
1- Définition des glycoprotéinoses	P.26
2- Nature et origine du matériel accumulé dans les cas de glycoprotéinoses	P.27
a- Glycoprotéinoses humaines et glycoprotéinoses animales	P.27
b- Rôles de l'aspartyl-N-acétylglucosaminidase et de l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase	P.30
c- Les sialidoses : hypothèse de l'existence d'une endoglucosaminidase adaptative	P.34
III- L'ASPARTYL-N-ACÉTYLGLUCOSAMINIDASE (E.C. 3.5.1.26)	P.36
A- HISTORIQUE	P.36
B- MECANISME D'ACTION	P.38
C- LOCALISATION CELLULAIRE	P.38
D- PROPRIETES ENZYMATIQUES	P.40
1- pH Optimum	P.40
2- Spécificité	P.40
3- Inhibiteurs	P.42
E- PROPRIETES STRUCTURALES ET STABILITE	P.44
IV- L'ENDO-N-ACÉTYL- β -D-GLUCOSAMINIDASE (EC 3.2.1.96)	P.45
A- HISTORIQUE	P.45
B- LOCALISATION CELLULAIRE	P.46
C- PROPRIETES ENZYMATIQUES	P.47
1- pH optimum	P.47
2- Spécificité	P.47
3- Action des effecteurs	P.50

V- CONCLUSION : HYPOTHESES CONCERNANT L'INITIATION DU CATABOLISME DU GLYCANNE DES N-GLYCOSYLPROTEINES	P.51
--	------

TRAVAUX PERSONNELS

Ière partie :	P.54
ESSAIS DE CARACTERISATION D'UNE ACTIVITE "SIALYL" ENDO-N-ACETYL- β -D-GLUCOSAMINIDASE DANS LES CELLULES LYMPHOBLASTOIDES TRANSFORMEES PAR LE VIRUS D'EPSTEIN-BARR DE PATIENT ATTEINT DE SIALIDOSE	
I- INTRODUCTION	P.54
II- MATERIEL ET METHODES	P.55
A- PREPARATION DES SUBSTRATS	P.55
B- CULTURE CELLULAIRE	P.56
C- DOSAGE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE	P.57
1- Préparation de la solution enzymatique	P.57
2- Dosage à pH neutre	P.58
3- Dosage en fonction du pH	P.58
4- Dosage en "concentration supérieure" du substrat	P.58
III- RESULTATS	P.59
IV- CONCLUSION	P.59
IIème partie :	
CARACTERISATION ET SPECIFICITE DE L'ASPARTYL-N- ACETYLGLUCOSAMINIDASE DU FOIE DE RAT	P.60
I- INTRODUCTION	P.60

II-	MATERIELS ET METHODES	P.60
A-	PREPARATION DES SUBSTRATS	P.60
1-	Glycoasparagines urinaires	P.60
	- méthodes de marquage radioactif	P.61
2-	Glycopeptide de type N-acétyllactosaminique biantenné disialylé	P.61
3-	GPA : $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{Asn}$	P.62
4-	Glycoasparagines de type oligomannosidique et type mixte	P.62
B-	FRACTIONNEMENT CELLULAIRE	P.63
C-	METHODES DE DOSAGE	P.64
1-	Dosage par colorimétrie	P.64
2-	Dosage par mesure de radioactivité	P.64
3-	Dosage par chromatographie en phase gazeuse	P.65
4-	Spectrométrie de masse par bombardement à l'aide d'atomes accélérés (FAB-MS)	P.65
5-	Chromatographie sur couche mince de silice	P.66
D-	INFLUENCE DU pH	P.67
E-	STABILITE A LA CHALEUR	P.67
F-	DETERMINATION DES PARAMETRES CINETIQUES	P.68
III-	RESULTATS	P.69
A-	LOCALISATION CELLULAIRE	P.69
B-	INFLUENCE DU pH	P.69
C-	STABILITE A LA CHALEUR	P.69
D-	SPECIFICITE	P.73
1-	Action sur le GlcNAc (β 1-)Asn acétylé	P.73
2-	Action sur les glycoasparagines d'ovalbumine	P.73
3-	Action sur les glycoasparagines GP4 et GP5	P.73
4-	Action sur le glycopeptide de type N-acétyl- lactosaminique biantenné disialylé	P.73
E-	DETERMINATION DES PARAMETRES CINETIQUES	P.76
IV-	CONCLUSION	P.79

IIIème Partie	P.81
CARACTERISATION D'UNE ENDO-N-ACETYL- β -D-GLUCOSA- MINIDASE LYSOSOMALE SPECIFIQUE DES OLIGOSACCHARIDES POSSEDANT LE RESIDU N,N'-DI-N-ACETYLCHITOBIOSE	
I- INTRODUCTION	P.81
II- MATERIELS ET METHODES	P.82
A- PREPARATION DES SUBSTRATS	P.82
B- FRACTIONNEMENT CELLULAIRE	P.82
C- DOSAGE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE	P.83
D- INFLUENCE du pH	P.84
E- ANALYSE DES PRODUITS DE REACTION PAR RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE DU PROTON A 400 MHz	P.84
III- RESULTATS	P.85
A- LOCALISATION CELLULAIRE	P.85
B- INFLUENCE DU pH	P.85
C- DOSAGE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE AVEC LES SUBSTRATS GPA et OLB	P.85
D- ANALYSE DES PRODUITS DE REACTION PAR RESONANCE MAGNETIQUE DU PROTON A 400 MHz	P.88
IV- CONCLUSION	P.94
- CONCLUSION GENERALE	P.95
- BIBLIOGRAPHIE	

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

S'il est établi depuis longtemps que le catabolisme des glycoprotéines est lié à l'action des protéases et des glycosidases lysosomales, peu de renseignements ont pu être obtenus jusqu'à présent sur le déroulement exact des différentes étapes de ce processus.

Nous savons que les glycosidases sont plus actives sur de courts motifs oligosaccharidiques que sur des glycopeptides ou des glycoprotéines. Cette observation avait conduit à l'hypothèse d'une action successive des protéases, puis des glycosidases sur le substrat glycoprotéinique.

Les recherches sur les glycoprotéinoses effectuées en particulier au laboratoire ont apporté d'autres informations intéressantes. Ces maladies lysosomales, dues à des déficits en glycosidases, sont caractérisées par l'accumulation dans les tissus d'oligosaccharides qui possèdent en position terminale non réductrice le monosaccharide correspondant à l'enzyme déficient. Autre élément essentiel, ces oligosaccharides ne possèdent plus qu'un seul résidu de N-acétylglucosamine en position terminale réductrice, au lieu du chaînon di-N-acétylchitobiose caractéristique de toutes les structures N-glycosidiques.

D'où l'hypothèse d'un catabolisme du glycanne des glycoprotéines débutant par l'action d'une endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase, responsable de l'hydrolyse du chaînon di-N-acétylchitobiose.

Les travaux réalisés au laboratoire par le groupe de G. SPIK sur les endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidases de mammifères et plus particulièrement du foie de rat, devaient aller à l'encontre des hypothèses proposées.

En effet, l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase active vis-à-vis de glycopeptides est essentiellement cytosolique, ce qui est difficilement conciliable avec sa participation dans le catabolisme lysosomal des glycoprotéines.

D'autre part, dans certains cas de glycoprotéinoses animales, telle la mannosidose bovine, les oligosaccharides accumulés dans les tissus possèdent intact le chaînon di-N-acétylchitobiose en position terminale réductrice.

Chez ces espèces, l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase n'interviendrait pas dans le catabolisme des N-glycosylprotéines. Seule agirait l'aspartyl-N-acétyl-glucosaminidase, responsable de la coupure de la liaison asparaginyln-acétylglucosamine.

Ces faits nous ont amené à proposer l'hypothèse selon laquelle le catabolisme du glycanne des N-glycosylprotéines débiterait par l'action de l'aspartyl-N-acétylglucosaminidase suivie par l'action d'une endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase lysosomale spécifique des oligosaccharides libérés par l'aspartyl-N-acétylglucosaminidase.

Nous nous sommes donc intéressé à la spécificité de l'aspartyl-N-acétylglucosaminidase et avons recherché au sein du lysosome une activité endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase s'exprimant vis à vis d'oligosaccharides.

GENERALITES

I- LES LYSOSOMES

En 1955, DE DUVE et al. (1) attribuent le terme de lysosomes à un groupe de particules cytoplasmiques contenant près de 40 enzymes hydrolytiques dont l'activité optimale se situe à pH acide, d'où leur dénomination d'hydrolases acides. Ces petits "sacs digestifs" sont limités par une membrane destinée à empêcher l'attaque du cytoplasme environnant.

A- ORIGINE

Dans les cellules à activités macrophagiques, tels les granulocytes, les macrophages ou les monocytes, les lysosomes dérivent directement de l'appareil de Golgi suivant la voie classique de synthèse et d'emballage des protéines (PALADE 1975 (2)).

Dans les autres types cellulaires, les lysosomes semblent se former par vésiculation d'une région spécifique de l'appareil de Golgi nommé le "GERL" (Golgi associated smooth Endoplasmic Reticulum that forms Lysosomes) (NOVIKOFF et al. 1971 (3)).

La relation Golgi-lysosomes a en particulier été mise en évidence par cytochimie, en utilisant des enzymes marqueurs, telle la phosphatase acide (PINO et al. 1981 (4)).

Les différents types de lysosomes dérivant du GERL sont représentés dans la figure I.

B- CARACTERISTIQUES GENERALES

Les lysosomes peuvent être préparés à partir d'homogénats cellulaires par les méthodes d'ultracentrifugation préparative. Les détails méthodologiques pourront être trouvés dans la monographie de DINGLE 1977 (5).

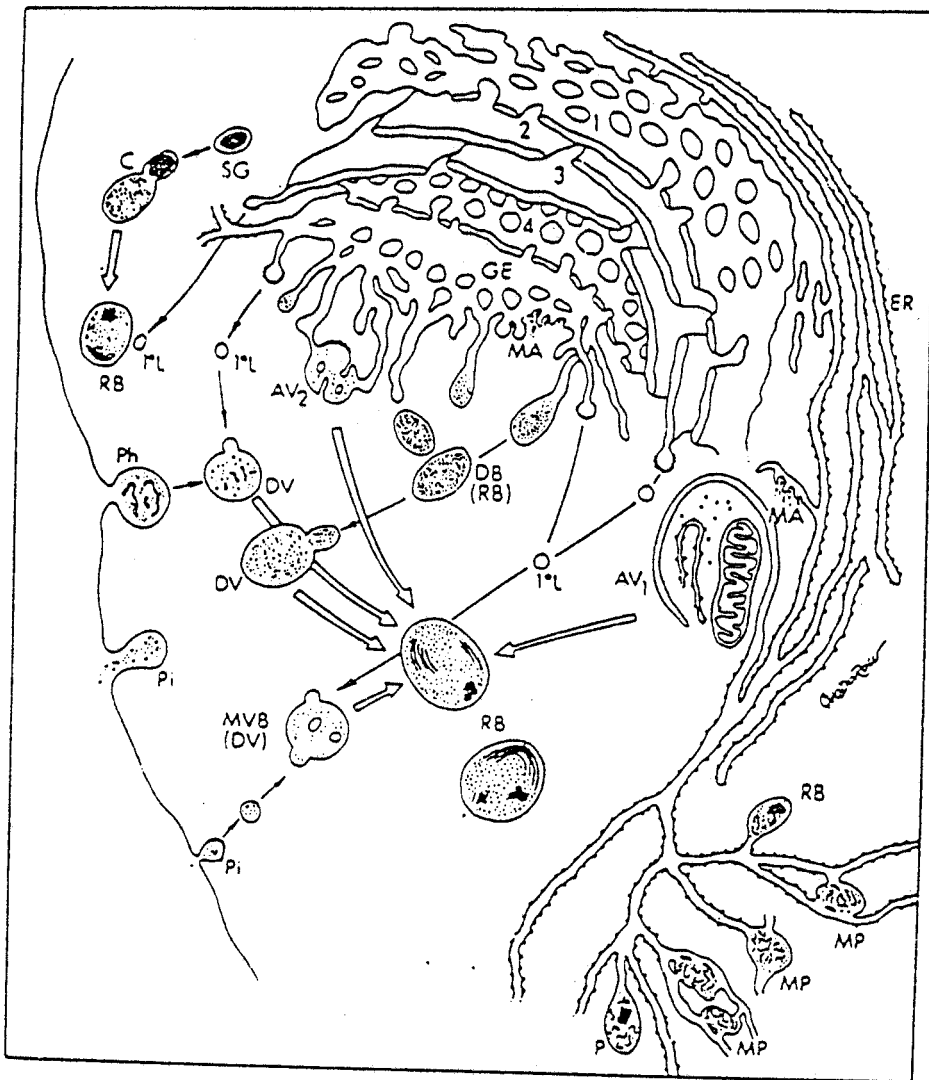


FIGURE 1

Origine et rôle des lysosomes (d'après NOVIKOFF 1973 (6))

- 1°L : Lysosomes primaires
- AV₁ : Vacuole autophagique de type I
- AV₂ : Vacuole autophagique de type II
- C : Crinophagie
- DB : Corps denses
- DB : Vacuole digestive
- ER : Réticulum ergastoplasmique
- GE : GERL
- MA : Microantophagie
- MP : Microperoxyosome
- P : Peroxyosome
- Ph : Vacuole de phagocytose
- P : Vacuole de pinocytose
- RB : Corps résiduel
- SG : Granule de sécrétion



La caractéristique essentielle permettant d'identifier une population d'organites comme étant des lysosomes est évidemment la cosédimentation des hydrolases acides (DE DUVE et al. 1955 (7)).

Une autre caractéristique des préparations lysosomales sera la "latence enzymatique" : la membrane lysosomale est généralement imperméable aux substrats enzymatiques, l'activité de ces enzymes ne peut se manifester qu'après rupture préalable de la membrane par des méthodes physiques ou chimiques telles la sonication ou l'emploi de détergents.

1- PERMEABILITE DE LA MEMBRANE LYSOSOMALE

Les propriétés de la membrane lysosomale ont fait l'objet d'une revue par REIJNGOUD et TAGER 1977 (8).

La membrane lysosomale est perméable aux acides et bases faibles et imperméable aux ions monovalents (K^+ , Cl^-). Concernant les autres types de molécules, les résultats sont plus fragmentaires. La membrane lysosomale est notamment perméable aux monosaccharides (EHRENREICH et COHN 1969 (9)), par contre elle est relativement imperméable aux oligosaccharides. La perméabilité semble être plus élevée vis à vis des amino-acides ou des peptides.

L'accumulation intralysosomale de certains composés, tel l'acide sialique dans la maladie de SALLA (RENLUND et al. 1983 (10)) ou de la cystéine dans la cystinose (SCHNEIDER et SCHULMAN 1982 (11)) semble être en faveur de mécanismes de transport actif qui permettent, dans des conditions physiologiques normales, leur passage dans le cytosol.

2- LE pH INTRALYSOSOMAL

La plupart des enzymes lysosomales ont un pH optimum acide et sont en majorité inactives à pH neutre. Cette observation a conduit COFFEY et DE DUVE 1968 (12) à émettre

l'hypothèse que les lysosomes maintenaient un pH interne très bas en comparaison du cytosol environnant.

La question se posait donc de savoir comment ce pH acide était formé et comment il était régulé. Ce sujet a fait l'objet d'une revue générale de REEVES 1984 (13).

Deux mécanismes ont été proposés. Le premier invoque l'existence d'un équilibre acide-base de type DONNAN. Les charges négatives des glycoprotéines intralysosomales sont équilibrées par les charges positives des protons. L'état d'équilibre est atteint (équilibre de DONNAN) lorsque le potentiel transmembranaire est compensé par le gradient de concentration des protons (REIJNGOUD et TAGER 1977 (14)).

Le second mécanisme d'acidification du lysosome fait intervenir une pompe à protons ATP-dépendante (MEGO et al. 1972 (15)). C'est cette dernière hypothèse qui est généralement retenue.

C- ROLE DES LYSOSOMES

Grâce aux hydrolases acides, les lysosomes ont une fonction hétérophagique vis à vis des substances extracellulaires, et une fonction autophagique sur les constituants intracellulaires.

1- HETEROPHAGIE

Le matériel extracellulaire pénètre dans la cellule grâce au phénomène d'endocytose, à la faveur d'une invagination de la membrane plasmique qui enveloppe totalement la substance à ingérer. La vacuole ainsi formée fusionne ensuite avec les lysosomes primaires conduisant aux lysosomes secondaires, au sein desquels s'effectue la digestion.

L'endocytose peut être divisée en deux types de phénomène :

- la phagocytose, qui concerne l'internalisation de particules de taille supérieure ou égale à 0,1 μ m.

Ce processus permet notamment l'élimination des bactéries et des virus par les cellules leucocytaires.

- la pinocytose, qui se traduit par l'internalisation de molécules. Il pourra s'agir de pinocytose en phase fluide, lorsque la molécule demeure en suspension ou de pinocytose adsorptive, lorsque la molécule est liée à un récepteur membranaire.

La pinocytose en phase fluide permet un approvisionnement continu de la cellule en micromolécules issues de la dégradation de macromolécules. En particulier BESTERMAN et al. 1982 (16) ont montré le rôle joué par la pinocytose des protéines exogènes couplée à leur dégradation lysosomale en tant que source d'acides aminés.

La pinocytose adsorptive permet l'internalisation rapide de substances en des endroits déterminés de la membrane plasmique, limitant ainsi l'internalisation de composés membranaires. Ce processus est rendu possible par le déplacement latéral des complexes ligand-récepteur vers des régions spécialisées de la membrane tapissées d'une protéine particulière, la clathrine (PEARSE 1976 (17)).

Ces zones membranaires sont nommées "coated pits". Les ligands liés aux récepteurs sont ensuite transférés dans un autre type de vésicules, les "réceptosomes" (PASTAN et WILLINGHAM 1981 (18)), qui sont eux-mêmes guidés vers l'appareil de Golgi et de là les protéines sont dirigées vers leur destination finale.

La pinocytose adsorptive est impliquée dans les processus de recapture des enzymes lysosomales (WILLINGHAM et al. 1981 (19)) ou des asialoprotéines plasmatiques (WALL et al. 1980 (20)).

L'ensemble des processus impliqués dans les phénomènes de pinocytose est schématisé dans la figure 2.

2- AUTOPHAGIE

La cellule est capable de détruire certains de ses organites "usagés", comme les mitochondries ou le reticulum endoplasmique (ERICSSON 1969 (21)). Les processus sont similaires

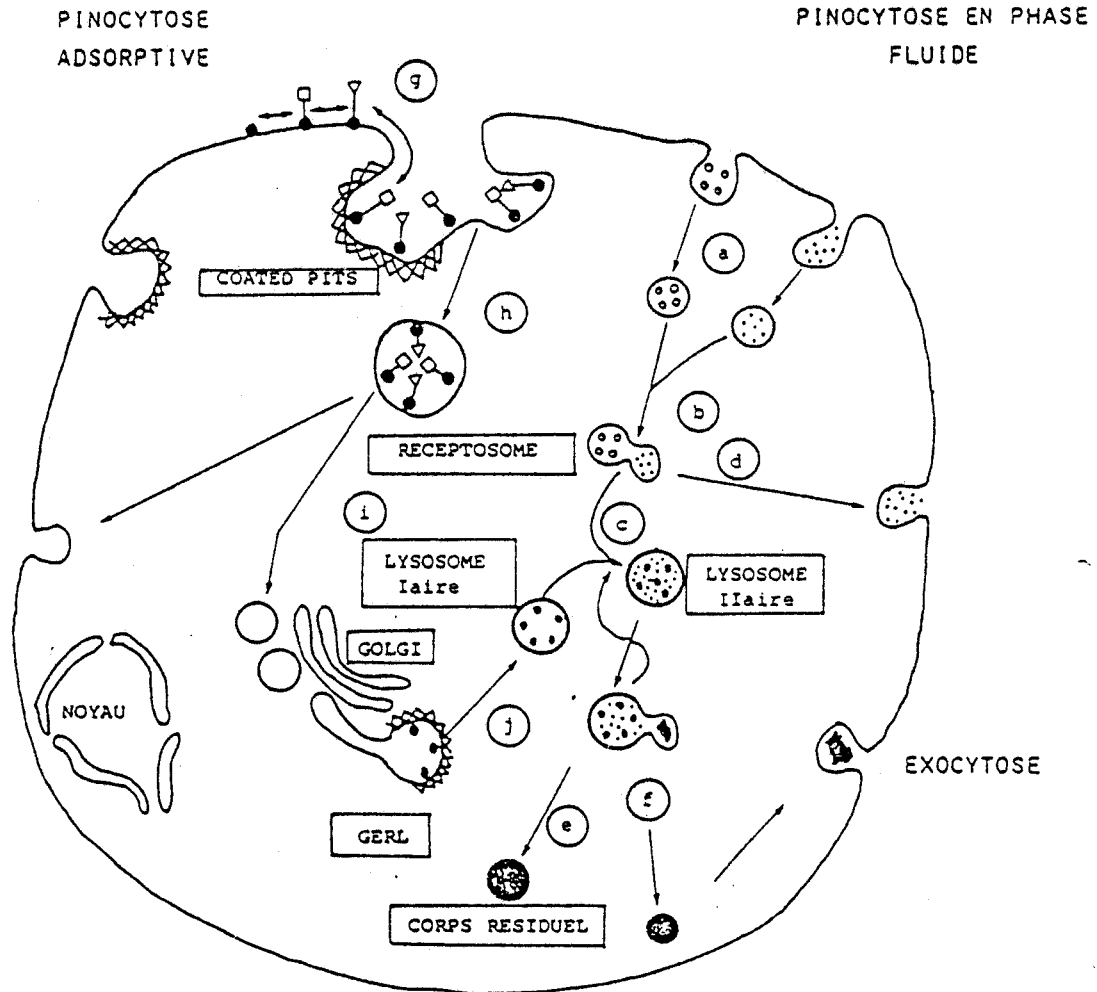


FIGURE 2

Représentation schématique des différents mouvements membranaires accompagnant la pinocytose

xxxxx Clathrine

• Récepteur

o Δ Ligands

PINOCYTOSE EN PHASE FLUIDE

PINOCYTOSE ADSORPTIVE

- a - formation de pinosomes par invagination
- b - fusion des pinosomes entre-eux
- c - fusion des pinosomes avec le lysosome primaire pour donner le lysosome secondaire
- d - circuit court. Fusion de la vésicule de pinocytose avec la membrane plasmique et exocytose
- e - formation de corps résiduels après digestion
- f - exocytose
- g - rassemblement des complexes ligands-récepteurs dans des puits de la membrane plasmique recouverts de clathrine
- h - formation de vésicules spécialisées, les réceptosomes
- i - transfert des réceptosomes vers le Golgi
- j - formation de lysosomes primaires à partir du GERL



à ceux impliqués dans l'hétérophagie et la particule à détruire est circonscrite par une membrane pour donner une vacuole nommée "autophagosome" ou vacuole autophagique. Cette dernière fusionnera avec un lysosome primaire ou secondaire afin de permettre la digestion de l'organite (figure I).

MARZELLA et al. en 1980 (23) ont observé, "in vitro", un phénomène de "microautophagie" au niveau des lysosomes. La membrane lysosomale est capable de s'invaginer et de former des vésicules englobant des particules de Percoll. "In vivo", ce processus pourrait être impliqué dans la dégradation des protéines cytosoliques.

II- CATABOLISME DES GLYCOPROTEINES - LES GLYCOPROTEINOSES

A- LES GLYCOPROTEINES

Les glycoprotéines résultent de l'association covalentielle d'un oligosaccharide (ou glycanne) avec une protéine. D'une façon générale, les glycoprotéines sont classées en fonction de la nature de la liaison glycanne-protéine (figure 3). Les glycannes sont conjugués aux chaînes peptidiques par deux types principaux de liaisons :

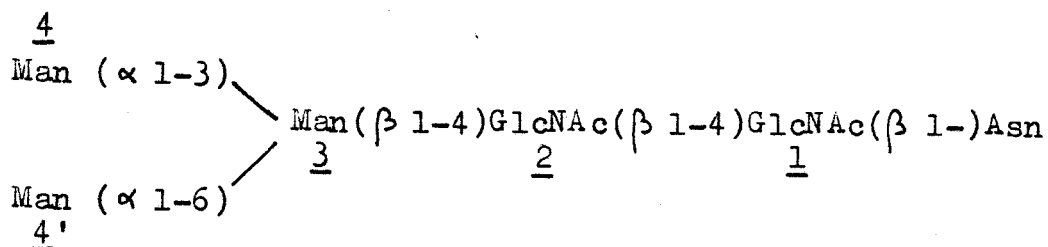
- les liaisons O-glycosidiques entre un monosaccharide et un résidu de sérine, thréonine ou hydroxylysine conduisant aux O-glycosylprotéines.

- les liaisons N-glycosidiques entre la N-acétylglucosamine et l'asparagine conduisant aux N-glycosylprotéines.

Cette dernière classe de glycoprotéines retiendra plus particulièrement notre attention.

1- N-GLYCOSYLPROTEINES

Tous les glycannes de type N-glycosidique possèdent en commun le noyau trimannosyl-N,N'-diacétylchitobiose :



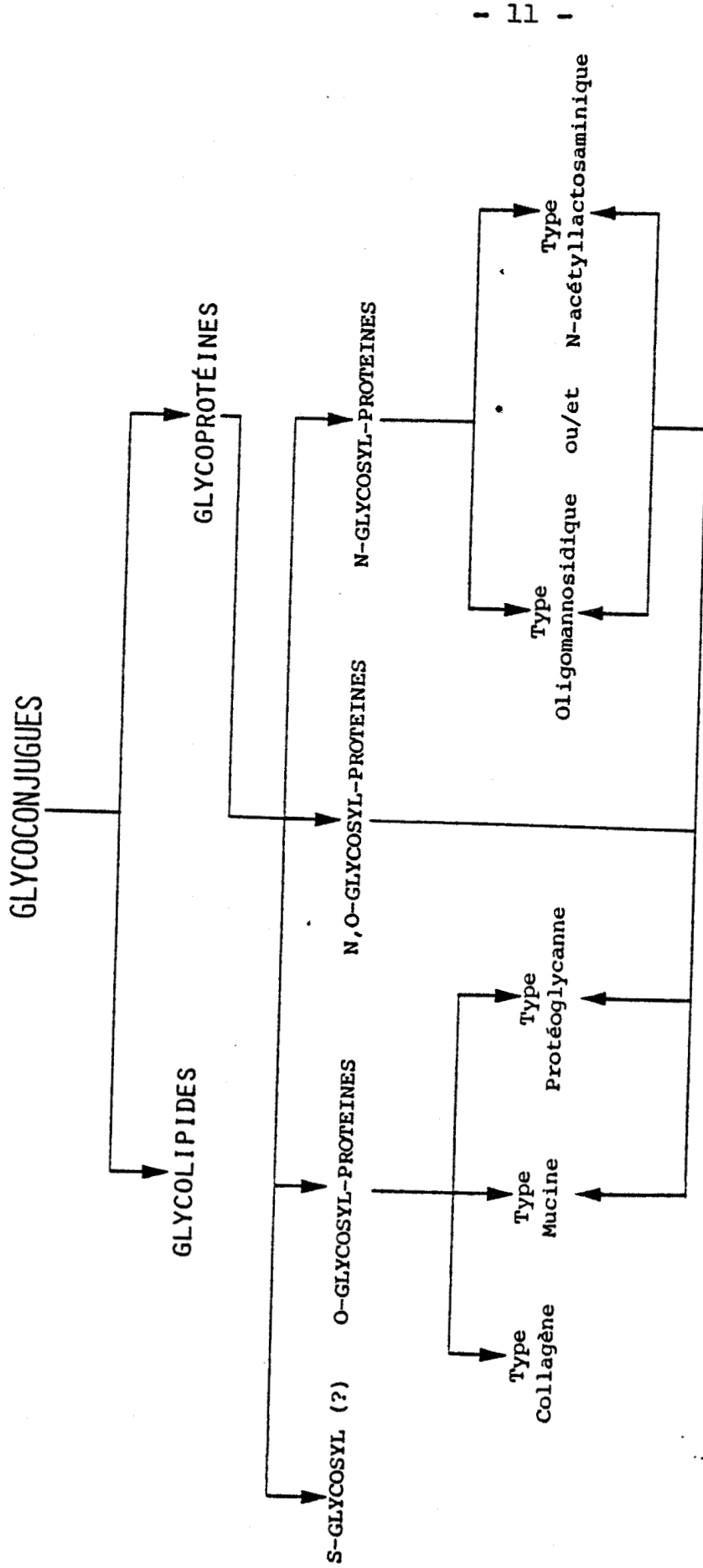


FIGURE 3

Classification des glycoconjugués (d'après STRECKER et MONTREUIL
1979 (24))



Cette structure oligosaccharidique commune ou fraction invariable (inv) (MONTREUIL 1975 (25)), pourra être substituée par des motifs oligosaccharidiques variables (var) qui sont le support de la spécificité des chaînes glycaniques des N-glycosylprotéines.

En fonction de la nature des chaînes oligosaccharidiques "var" les glycannes peuvent se diviser en trois types fondamentaux :

- le type oligomannosidique
- le type N-acétyllactosaminique
- le type mixte oligomannosido-N-acétyllactosaminique

a- Chaînes Oligosaccharidiques de Type Oligomannosidique

Les structures de type oligomannosidique résultent de la substitution du noyau pentasaccharidique "inv" par des résidus de mannose en nombre variable (figure 4).

La molécule précurseur de toutes les chaînes glycaniques est constituée par le motif $(\text{Glc})_3(\text{Man})_9(\text{GlcNAc})_2$ (REARICK et al. 1981 (26)).

La biosynthèse des chaînes glycaniques, que nous n'aborderons pas ici, a fait l'objet de revues récentes (SCHACHTER et ROSEMAN 1980 (27), MONTREUIL 1982 (28), HOFACK 1982 (29)).

b- Chaînes Oligosaccharidiques de Type N-Acétyllactosaminique

Les glycannes de type N-acétyllactosaminique résultent de la substitution du noyau "inv" par un nombre variable de chaînons N-acétyllactosaminiques $\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$.

En fonction du nombre de résidus de N-acétyllactosamine, on obtiendra des structures dites bi-, tri-, tétra- et pentaantennées (tableau I).

Ces structures peuvent être substituées par un nombre variable de résidus d'acide sialique et /ou de fucose, ce qui leur confère une grande hétérogénéité et des rôles biologiques différents.

c- Chaînes oligosaccharidiques de type mixte

Dans ce type de glycanne, le noyau trimannosyl-N,N'-diacétylchitobiose est substitué à la fois par des résidus de mannose, sur le mannose 4' et par des résidus de N-acétyllactosamine sur le mannose 4 (figure 5).

B- CATABOLISME DES GLYCOPROTEINES

1- REPRISE SPECIFIQUE DES GLYCOPROTEINES PAR LA CELLULE

Les travaux du groupe d'ASHWELL ont montré que les asialoglycoprotéines circulantes sont spécifiquement reconnues par des récepteurs des membranes plasmiques de l'hépatocyte pour être ensuite pinocytées par la cellule et dégradées. Ce mécanisme met en jeu d'une part les glycannes des glycoprotéines et d'autre part des lectines membranaires reconnaissant spécifiquement des monosaccharides ou des motifs oligosaccharidiques (voir les revues de ASHWELL et HARFORD 1982 (30), MONTREUIL 1982 (31), NEUFELD et ASHWELL 1980 (32)).

En effet, le groupe d'ASHWELL a montré que la demi-vie de l'asialoorosomucoïde marquée à l'¹²⁵I était beaucoup plus courte que la demi-vie de l'orosomucoïde native.

Lorsque les résidus externes de galactose étaient modifiés ou éliminés, la glycoprotéine marquée retrouvait une demi-vie normale.

TABLEAU I: Exemples de structures de glycanes de type N-acétyllactosaminique

STRUCTURE	ORIGINE	REFERENCES
<p><i>Bi-antenne</i></p> <p> $\text{HexAc}(\alpha 2-6)-\text{Gal}(\beta 1-4)-\text{GlcNAc}(\beta 1-2)-\text{Man}(\alpha 1-3)$ $\text{HexAc}(\alpha 2-6)-\text{Gal}(\beta 1-4)-\text{GlcNAc}(\beta 1-2)-\text{Man}(\alpha 1-4)$ </p> <p> $\text{HexAc}(\alpha 2-6)-\text{Gal}(\beta 1-4)-\text{GlcNAc}(\beta 1-2)-\text{Man}(\alpha 1-3)$ $\text{Gal}(\beta 1-4)-\text{GlcNAc}(\beta 1-2)-\text{Man}(\alpha 1-6)$ Puc </p> <p> $\text{HexAc}(\alpha 2-6)-\text{Gal}(\beta 1-4)-\text{GlcNAc}(\beta 1-2)-\text{Man}(\alpha 1-3)$ $\text{GlcNAc}(\beta 1-4)$ $\text{Gal}(\beta 1-4)-\text{GlcNAc}(\beta 1-2)-\text{Man}(\alpha 1-6)$ </p>	<p>Sérotransferrine Humaine</p> <p>Lactotransferrine Humaine</p> <p>Immunoglobuline A₁ Humaine</p>	<p>SPIK <i>et al.</i> (36)</p> <p>SPIK <i>et al.</i> (37)</p> <p>BAEZINGER <i>et al.</i> (38)</p>
<p><i>Tri-antenne</i></p> <p> $\text{Gal}(\beta 1-4)-\text{GlcNAc}(\beta 1-2)-\text{Man}(\alpha 1-3)$ $\text{HexAc}(\alpha 2-6)-\text{Gal}(\beta 1-4)-\text{GlcNAc}(\beta 1-2)$ $\text{HexAc}(\alpha 2-6)-\text{Gal}(\beta 1-4)-\text{GlcNAc}(\beta 1-6)$ </p>	<p>Orosomucoïde Humaine</p>	<p>FOURNET <i>et al.</i> (39)</p>
<p><i>Tétra-antenne</i></p> <p> $\text{Gal}(\beta 1-4)-\text{GlcNAc}(\beta 1-4)$ $\text{Gal}(\beta 1-4)-\text{GlcNAc}(\beta 1-2)$ </p> <p> $\text{Gal}(\beta 1-4)-\text{GlcNAc}(\beta 1-2)$ $\text{Gal}(\beta 1-4)-\text{GlcNAc}(\beta 1-6)$ </p>	<p>Asialo-orosomucoïde Humaine</p>	<p>SCHMID <i>et al.</i> (40)</p>
<p><i>Penta-antenne</i></p> <p> $\text{HexAc}(\alpha 2-6)-\text{Gal}(\beta 1-4)-\text{GlcNAc}(\beta 1-4)$ $\text{Gal}(\alpha 1-4)-\text{Gal}(\beta 1-4)-\text{GlcNAc}(\beta 1-2)$ $\text{GlcNAc}(\beta 1-4)$ $\text{Gal}(\alpha 1-4)-\text{Gal}(\beta 1-4)-\text{GlcNAc}(\beta 1-2)$ $\text{Gal}(\beta 1-4)-\text{GlcNAc}(\beta 1-4)$ $\text{Gal}(\beta 1-4)-\text{GlcNAc}(\beta 1-6)$ </p>	<p>Ovomucoïde de Tourterelle</p>	<p>FRANÇOIS-GERARD <i>et al.</i> (41)</p>



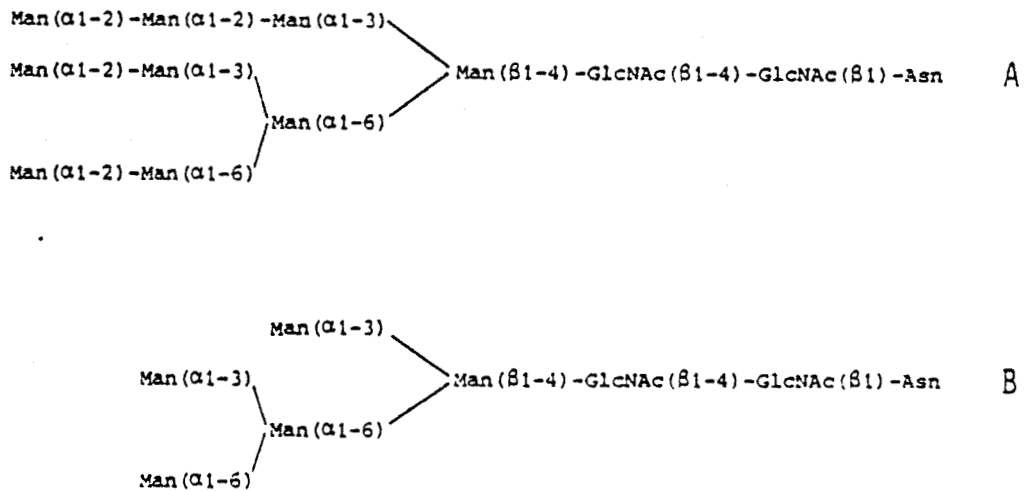


FIGURE 4

Exemples de structures de glycannes de type oligomannosidique :
(A) glycopeptide B-1 de cellules ovariennes de Hamster chinois (LI et KORNFEELD 1979 (33)) (B) Glycopeptide GP-V de l'ovalbumine (CONCHIE et STRACHAN (34))

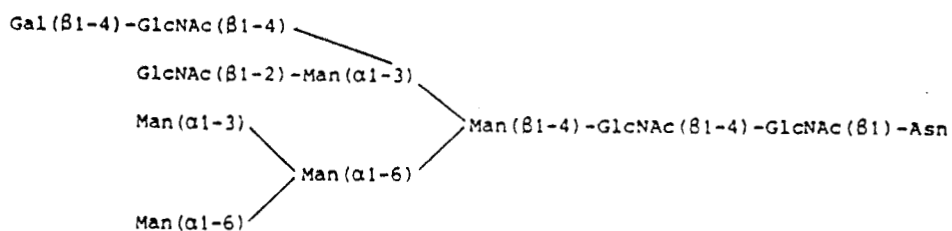


FIGURE 5

Exemple de structure de glycanne de type mixte : glycopeptide GP-I de l'ovalbumine (YAMASHITA et al. 1978 (35))



Le galactose terminal des glycanes de l'orosomucoïde constitue donc le signal de reconnaissance puis d'internalisation de cette dernière par pinocytose adsorptive.

Ces observations ont été étendues à de nombreuses glycoprotéines, notamment la prothrombine pour laquelle la demi-vie est dépendante du degré de sialylation .

Plusieurs récepteurs ont été mis en évidence au niveau de différents types cellulaires, d'autres monosaccharides que le galactose pouvant être reconnus (voir la revue de NEUFELD et ASHWELL 1980 (42)).

2- DEGRADATION ENZYMATIQUE

Près de trente ans nous séparent de la découverte des lysosomes et plus d'une cinquantaine d'hydrolases acides ont été décrites à ce jour (voir la revue de BARRETT et HEATH 1977 (43)).

Une fois reconnues et endocytées par les processus que nous venons de décrire, les glycoprotéines sont soumises à l'action des différentes enzymes hydrolytiques du lysosome : glycosidases et protéases.

La dégradation de la chaîne protéique par les protéases lysosomales semble être un évènement préalable à l'action des exoglycosidases, nettement plus actives sur des glycopeptides que sur la glycoprotéine native, dans des conditions "in vitro" (MAHADEVAN et al. 1969 (44)).

De même, dans des conditions "in vivo", l'inhibition des protéases par la leupeptine se traduit par une diminution considérable de la dégradation des chaînes glycaniques comme l'ont montré ARONSON et DOCHERTY en 1983 (45).

Les exoglycosidases dégradent les chaînes glycaniques de manière récurrente à partir de l'extrémité terminale non réductrice. C'est ainsi qu'agissent tour à tour la fucosidase, la neuraminidase, la β -galactosidase, l'hexosaminidase et enfin les α -et β -mannosidases.

Parallèlement aux exoglycosidases, des endoglycosidases coupant à l'intérieur des chaînes glycaniques ont été caractérisées. L'endo-N-Acétyle- β -D-Glucosaminidase est capable d'hydrolyser le motif N,N'-di-N-acétylchitobiose de la chaîne glycanique des glycoprotéines. Son rôle dans le catabolisme des glycoprotéines sera longuement abordé dans la suite de cet exposé.

La liaison entre l'hexosamine en position réductrice terminale du glycanne et l'asparagine est hydrolysée par l'aspartyl-N-acétylglucosaminidase. Il s'agit d'une amidase catalysant l'hydrolyse de la liaison entre la fonction amine et la fonction carbonyle de l'asparagine liée au glycanne.

L'aspartyl-N-acétylglucosaminidase n'agit que sur des glycoasparagines, la substitution des fonctions amine ou carboxyle libres de l'asparagine entraînant la disparition de l'activité enzymatique. Son action est donc postérieure à celle des protéases.

L'étude des propriétés de l'aspartyl-N-Acétyleglucosaminidase fera l'objet d'un chapitre de notre mémoire.

3- LES GLYCOSIDASES LYSOSOMALES

a) - Caractéristiques générales des hydrolases acides

- Dépendance vis à vis du pH et stabilité

Le pH optimum des enzymes lysosomales peut varier avec la nature du substrat, le tampon utilisé, la force ionique du milieu et la présence éventuelle d'activateurs. Toujours est-il

que la majorité des hydrolases acides présentent un maximum d'activité dans une zone de pH allant de 3,5 à 5,5 à l'exception toutefois de l'aspartylglucosaminidase qui présente un pH optimum d'environ 7,5 (MAHADEVAN et TAPPEL 1967 (46)), de même pour la cathepsine G (BARRET et HEATH 1977 (47)).

"In vivo", les enzymes lysosomales sont rassemblées dans un milieu de pH allant de 4,5 à 6,5 suivant le type cellulaire et la catégorie de vacuole lysosomale étudiés (voir la revue de REEVES 1984 (48)). Ces enzymes sont environnées d'un grand nombre d'enzymes protéolytiques mais semblent échapper à la dégradation protéasique, en raison de leur stabilité en milieu acide (GOLDBERG et ST JOHN 1976 (49)). En effet, la dénaturation acide pourrait être une étape préalable à la dégradation protéolytique. Cette résistance à la dénaturation acide pourrait être due à la stabilisation apportée par la chaîne glycanique, comme il l'a été démontré pour la ribonucléase B ou la carboxypeptidase Y (CHU et MALEY 1982 (50), TASHIRO et TREVITHICK 1977 (51)).

Les informations concernant le "turnover" des enzymes "in vivo" restent fragmentaires. BARTON et NEUFELD 1971 (52), à l'aide d'expériences de "recapture" enzymatique par des lignées fibroblastiques ont trouvé des demi-vies respectives de 3 à 9 jours pour la β -glucuronidase et l' α -L-iduronidase. VANDIGGELLEN et al. 1981 (53), en travaillant également sur des lignées fibroblastiques, ont trouvé des demi-vies de 10 jours pour la β -galactosidase et de 7 jours pour la β -glucosidase.

- Propriétés structurales

Les hydrolases acides représentent une population de protéines très hétérogène dont le poids moléculaire s'étend de 15.000 à 280.000 pour la β -glucuronidase. Ces enzymes sont souvent constituées de sous-unités pouvant être dissociées après traitement au sodium dodécyl sulfates ou au chlorhydrate de guanidine.

Toutes les glycosidases étudiées à ce jour sont des glycoprotéines. Peu d'informations structurales relatives aux chaînes glycaniques sont disponibles à l'heure actuelle, en raison des difficultés rencontrées dans la purification.

Récemment des études plus poussées ont été réalisées quant à la détermination structurale exacte de ces chaînes glycaniques, au regard du rôle primordial dans les phénomènes de ségrégation subcellulaire ; ces résultats seront évoqués dans la rubrique biosynthèse des glycosidases.

b- Spécificité des glycosidases et formes multiples

Il est admis que les glycosidases sont plus spécifiques d'un type de liaison plutôt que d'un substrat oligosaccharidique déterminé. Un exemple significatif est celui des α -mannosidases : si les mannosidases lysosomales sont capables d'hydrolyser les liaisons α 1-6 et α 1-3 du mannose rencontrées dans les chaînes glycaniques des N-glycosylprotéines (OPHEIM et TOUSTER 1978 (54)), les mannosidases microsomales sont quant à elles plutôt spécifiques des liaisons α 1-2 du mannose dans les chaînes glycaniques en cours de maturation (TULSIANI et al. 1982 (55)).

La spécificité vis-à-vis du substrat dépendra quant à elle des monosaccharides avoisinants qui, dans certains cas, exerceront un empêchement stérique, déterminant l'ordre d'action des différentes exoglycosidases (GATHMANN et AMINOFF 1981 (56)).

Les glycosidases présentent une certaine hétérogénéité au niveau de leur distribution cellulaire. Si la majorité de ces enzymes ont une localisation lysosomale, d'autres

formes isoenzymatiques sont généralement présentes dans les différents compartiments cellulaires. Ainsi, outre l'exemple des mannosidases cité précédemment, les sialidases sont également présentes au niveau des membranes plasmiques, de l'appareil de Golgi, ou du cytosol (CORFIELD et al. 1981 (57), ZIEGLER et BACH 1981 (58)).

C- BIOSYNTHESE ET TRANSPORT INTRACELLULAIRE DES GLYCOSIDASES

En 1971, NEUFELD et CANTZ (59) montraient que les déficits enzymatiques en glycosidases des cellules pathologiques pouvaient être corrigés par adjonction dans le milieu de culture d'enzymes provenant de cellules normales, ou par co-culture avec ces mêmes cellules. Ce phénomène dit de "sécrétion recapture" suggérait un mécanisme d'adsorption par pinocytose des glycosidases.

Depuis, un grand nombre de travaux ont permis de mettre l'accent sur le rôle essentiel joué par les chaînes glycaniques des glycosidases dans la détermination de leur destination cellulaire (voir la revue de CREEK et SLY 1984 (60)).

- Le signal à mannose-6-phosphate (Man-6-P)

Des études cinétiques ont montré que la pinocytose des hydrolases acides était un phénomène faisant intervenir un récepteur membranaire (SANDO et NEUFELD 1977 (61)). KAPLAN et al. en 1977 (62) montrèrent que le processus de pinocytose des enzymes lysosomales était fortement inhibé par le Man-6-P.

D'autre part, plusieurs laboratoires s'attachèrent à déterminer la structure des glycannes des enzymes lysosomales. VARKI et KORNFELD 1980 (63) et HASILIK et al. 1980 (64) montrèrent que les glycannes étaient de nature polymannosidique et que des résidus de phosphate étaient engagés dans des liaisons monoesters. Cinq sites de phosphorylation ont été proposés (figure 6).

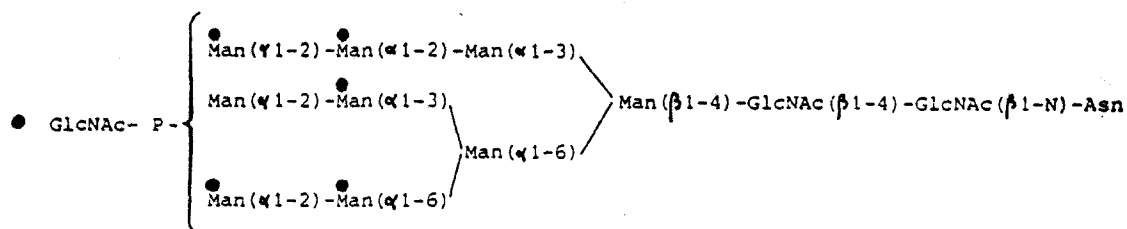
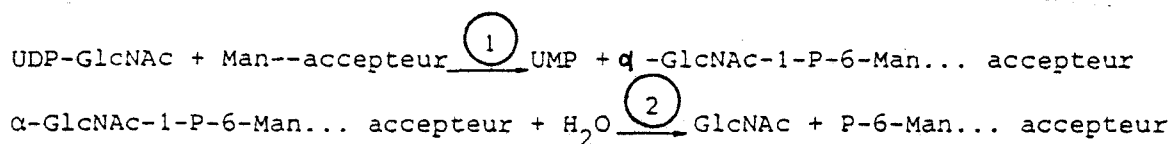


FIGURE 6

Localisation des résidus de phosphate sur les glycanes oligo-mannosidiques des enzymes lysosomales (d'après VARKI et KORNFIELD 1980 (65))



① : UDP-N-acétylglucosamine : glycoprotéine N-acétylglucosamine transférase

② : α-N-acétylglucosamine phosphodiesterase

FIGURE 7

Biosynthèse du signal mannose-6-phosphate des enzymes lysosomales

- Le récepteur à mannose-6-phosphate

Plus de 80% des récepteurs des fibroblastes sont localisés au niveau des systèmes membranaires intracellulaires (FISCHER et al. 1980 (66)). Cette observation est en accord avec la théorie de SLY et al. 1979 (67) selon laquelle ces récepteurs jouent un rôle dans le transport intracellulaire des hydrolases acides nouvellement synthétisées, en les dirigeant vers le lysosome.

GONZALEZ-NORIEGA et al. 1980 (68) ont montré que le nombre de molécules enzymatiques pinocytées était supérieur au nombre maximum de sites de reconnaissance sur la surface cellulaire et ont calculé que les récepteurs devaient être remplacés ou réutilisés toutes les cinq minutes. Ces mêmes auteurs ont également observé que la pinocytose des enzymes lysosomales pouvait être maintenue plusieurs heures en présence de cycloheximide, un inhibiteur de la synthèse protéique. Les récepteurs à man-6-P sont donc constamment recyclés par la cellule.

- Biosynthèse et maturation des enzymes lysosomales

Les études de HASILIK et al. 1981 (69) et de REITMAN et KORNFELD 1981 (70) ont montré que les hydrolases acides sont phosphorylées par transfert d'un résidu de N-acétylglucosamine-1-P à partir de l'UDP-N-acétylglucosamine sur l'hydroxyle en position 6 du mannose du glycanne oligomannosidique. La N-acétylglucosamine est ensuite hydrolysée par une phosphodiesterase (WAHEED et al. 1981 (71), VARKI et KORNFELD 1981 (72))(figure 7). Ces réactions sont localisées au niveau de l'appareil de Golgi et ont lieu après action des α -glucosidases spécifiques sur le précurseur glycanne nouvellement synthétisé (KRAG et ROBBINS 1982 (73)).

La question se posait de savoir comment était déterminée la phosphorylation des enzymes lysosomales, permettant leur ségrégation à partir de l'ensemble des autres glycoprotéines synthétisées par le réticulum endoplasmique.

HASILIK et NEUFELD 1980 (74) ont montré que les enzymes lysosomales sont synthétisées sous forme de pro-enzymes de haut poids moléculaire, la maturation protéique ne s'effectuant qu'au sein du lysosome. Un signal peptidique spécifique pourrait déterminer la phosphorylation d'une manière analogue au phénomène décrit par BLOBEL et DOBBERSTEIN 1975 (75) pour la ségrégation entre protéines de sécrétion et protéines membranaires. Un tel signal de reconnaissance a en effet été mis en évidence pour la β -glucuronidase par ROSENFELD et al. 1982 (76).

Les différentes étapes de biosynthèse et de transfert des enzymes lysosomales sont schématisées dans la figure 8.

4- GLYCOSIDASES ET PROTEASES : ROLES RESPECTIFS ET ORDRE D'ACTION AU COURS DU CATABOLISME DES GLYCOPROTEINES

Comme nous l'avons signalé précédemment, le catabolisme des glycoprotéines semble débiter par la dégradation de la partie protéique par les protéases.

En effet, MAHADEVAN et al. 1969 (77) ont montré que dans des conditions "in vitro", les exoglycosidases étaient beaucoup plus actives sur les glycopeptides de la fétuine que sur la glycoprotéine native. ARONSON et DOCHERTY 1983 (78), KURANDA et ARONSON 1985_a (79) ont également remarqué, dans des conditions "in vivo" cette fois, que l'inhibition des thiol-cathepsines par la leupeptine entraînait une nette diminution de la dégradation des chaînes glycaniques de l'asialoorosomucoïde au niveau des lysosomes du foie de rat. En outre, lors d'expériences d'inhibition des β -galactosidases "in vivo" par un inhibiteur

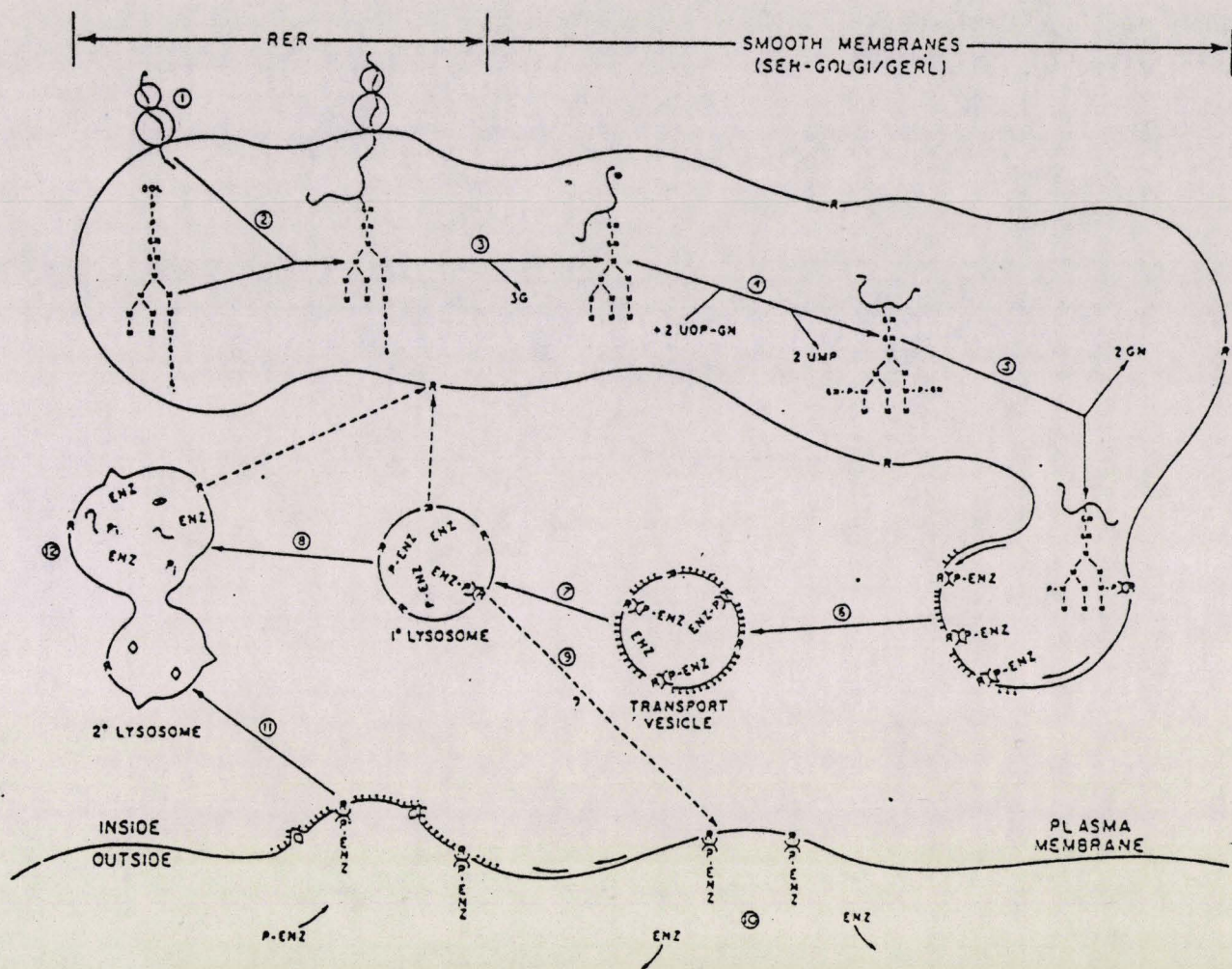


FIGURE 8

Différentes étapes de transfert des hydrolases acides vers le lysosome

M : Mannose

P : Phosphate

G : Glucose

ENZ : Enzyme

GN : N-acétylglucosamine

R : Récepteur phosphomannosyl

Dol : Dolichol



irréversible - le β -galactopyranosyl-méthyl-p-nitrophényl-triazène (β -GalMNT) - la vitesse de dégradation de la chaîne protéique de l'asialoorosomucoïde restait identique à celle observée en absence d'inhibiteur des β -galactosidases (KURANDA et ARONSON 1985a (80) 1985b (81)).

ARONSON et DE DUVE en 1968 (82) avaient déjà montré "in vitro" la nécessité d'une attaque protéolytique préalable à la dégradation des chaînes glycaniques de l'asialoorosomucoïde et de l'asialofétuine. Cependant, ces mêmes auteurs avaient constaté que la digestion des chaînes peptidiques des mucines sous-maxillaires de porc (O-glycosylprotéines) n'était possible qu'après dégradation partielle des chaînes glycaniques.

Les glycanes assurent donc, dans ce cas précis, une protection contre l'attaque protéolytique.

Il est également admis que les glycanes des glycoprotéines sériques garantissent celles-ci contre l'attaque par les protéases. C'est le cas pour l'orosomucoïde dont les glycanes tétraantennés possèdent une conformation dite en "parapluie" permettant le "recouvrement" de la protéine. Ainsi pourrait être expliquée la résistance de la glycoprotéine aux protéases (voir les revues de MONTREUIL 1982 (83), 1984 (84)).

Or, comment expliquer dans ces conditions, que l'orosomucoïde soit un si bon modèle dans la démonstration de la nécessité d'une protéolyse préalable à la dégradation des glycanes ?

La glycoprotéine dénaturée par le pH acide du lysosome pourrait voir la conformation de sa chaîne peptidique modifiée. Les interactions hydrophobes possibles entre certains fragments des glycanes et les peptides hydrophobes de la protéine (MONTREUIL 1982 (85), 1984 (86)) pourraient alors être rompues, entraînant une modification de la conformation des glycanes, dès lors incapables d'assurer une protection efficace contre les protéases. Le rôle protecteur des glycanes des séroglycoprotéines semblerait donc se limiter à la prévention de l'attaque par les protéases sériques agissant dans un milieu de pH neutre.

L'enchaînement des différentes étapes du catabolisme des glycoprotéines dépend donc de la conformation des glycanes et de la protéine ainsi que de leurs interactions mutuelles.

Cette première étape de dégradation par les protéases est probablement suivie de l'action de l'aspartyl-N-acétylglucosaminidase et/ou de l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase. En effet, les travaux de BEARPARK et al. 1977 (87), ont montré que les β -hexosaminidases étaient beaucoup plus actives sur des structures de type oligosaccharidique que sur un glycopeptide.

Nous reviendrons plus longuement sur ce point dans la suite de notre exposé.

C- LES GLYCOPROTEINOSES

Les glycoprotéinoses font partie du groupe des maladies héréditaires de surcharge du lysosome. Ces maladies métaboliques sont dues au dysfonctionnement d'une ou plusieurs hydrolases acides, qui a pour conséquence une accumulation excessive des molécules non dégradées.

Ces déficits enzymatiques peuvent être dus à la mutation d'un gène structural ou régulateur (voir les revues de DREYFUS 1972 (88), PAIGEN 1981 (89), VON FIGURA et HASILIK 1984 (90)).

1- DEFINITION DES GLYCOPROTEINOSES

Le terme de glycoprotéinose recouvre un ensemble d'affections résultant d'un déficit en glycosidases. Le matériel accumulé dans les tissus et excrété dans les urines est donc constitué par des oligosaccharides ou des glycopeptides résultant de la dégradation incomplète des chaînes glycaniques des glycoprotéines. La symptomatologie majeure

de ces affections réside dans une dysmorphie faciale et squelettique ainsi qu'un retard mental prononcé.

L'absence d'activité glycosidasique peut être due, soit à une modification transcriptionnelle de l'enzyme, soit à une modification post-transcriptionnelle affectant les signaux de reconnaissance qui permettent de l'intégrer au site cellulaire spécifique, comme c'est le cas dans la mucopolidose de type II (I cell disease) (HASILIK et al. 1981 (91)).

A chaque glycosidase sera associé un type de glycoprotéinose. Ainsi nous pouvons citer les déficits en fucosidase (fucosidose), en mannosidase (mannosidose), en β -galactosidases (gangliosidose à GM1 et maladie de Morquio B), en N-acétyl-hexosaminidase (Maladie de Sandhoff), en aspartyl-N-acétylglucosaminidase (aspartylglucosaminurie), en neuraminidase (sialidose) -(figure 9).

Les oligosaccharides et glycopeptides isolés des urines des malades atteints de ces affections ont fait l'objet de travaux d'un grand nombre de laboratoires (voir les revues de STRECKER et MONTREUIL 1979 (92), MICHALSKI 1984 (93)).

Ces études ont permis de dresser un catalogue exhaustif des structures glycaniques envisageables pour les glycoprotéines cellulaires (STRECKER et MONTREUIL 1979 (94)), et ont permis d'appréhender les mécanismes et les différentes étapes de dégradation des chaînes oligosaccharidiques.

2- NATURE ET ORIGINE DU MATERIEL ACCUMULE DANS LES CAS DE GLYCOPROTEINOSES

a- Glycoprotéinoses humaines et glycoprotéinoses animales

Comme nous venons de le signaler, les glycoprotéinoses se caractérisent d'un point de vue biochimique, par l'accumulation dans les tissus et l'excrétion dans les urines de glycoasparagines et d'oligosaccharides. En fait c'est cette

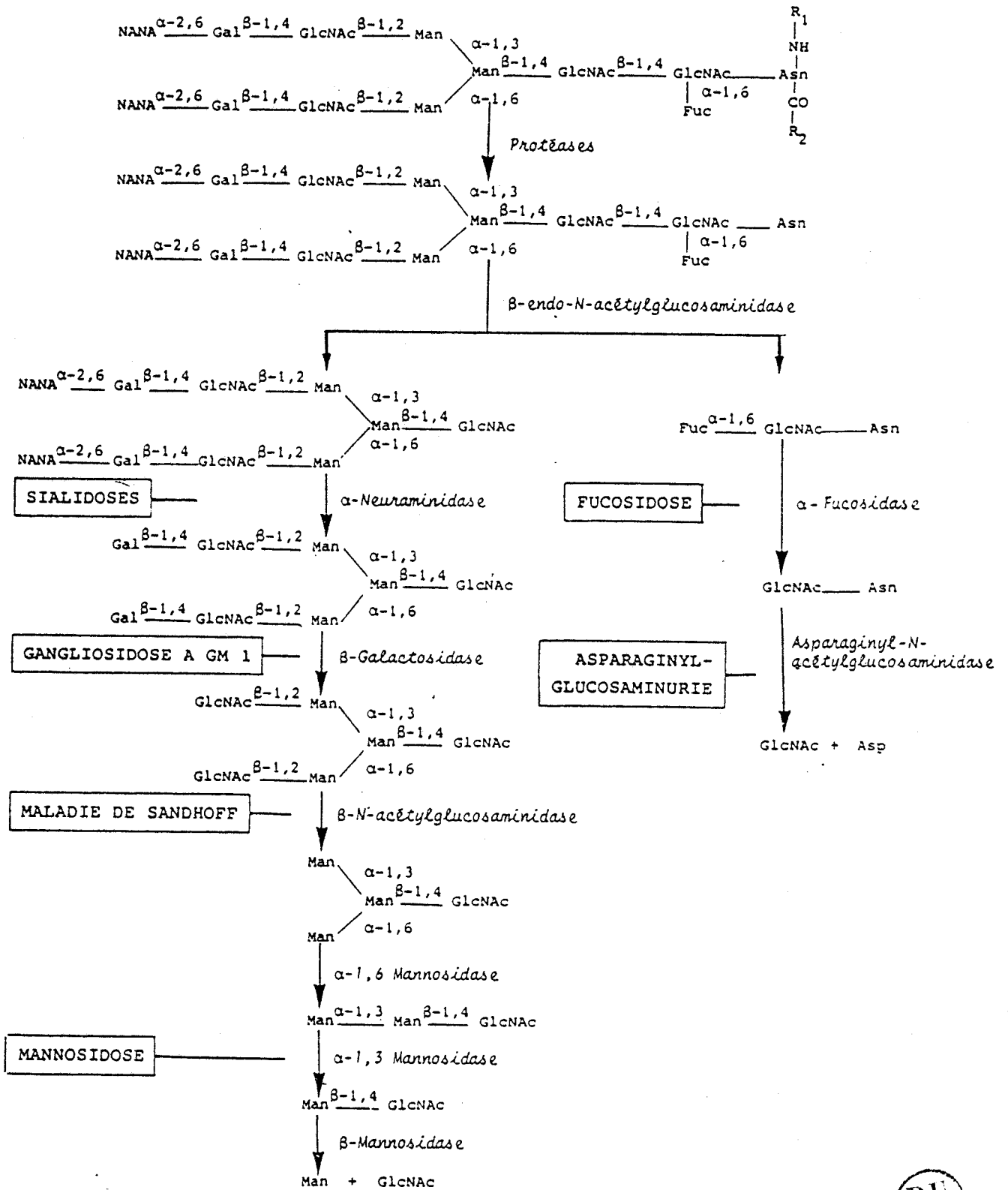


FIGURE 9

Schéma du catabolisme des glycannes des N-glycosylprotéines



dernière classe de composés qui est la plus largement répandue, les glycoasparagines ne s'accumulent que dans les cas de fucosidose (lorsque le fucose est lié en α 1-6 à l'hexosamine du point d'attache) et d'aspartylglucosaminurie (figure 10).

Les oligosaccharides accumulés dans les urines de patients atteints de glycoprotéinoses retiendront plus particulièrement notre attention.

Dans les cas de glycoprotéinoses humaines, tous les oligosaccharides isolés ont comme caractéristique commune de ne posséder qu'un seul résidu de N-acétylglucosamine en position terminale réductrice (voir la revue de STRECKER et MONTREUIL 1979 (96)). L'exemple choisi figure 11 est celui de la sialidose, dûe, rappelons-le, à une déficience en neuraminidases.

Les glycoprotéinoses animales ont également fait l'objet d'un grand nombre de travaux (voir les revues de WINCHESTER 1982 (97) et DORLING 1984 (98)).

La mannosidose bovine a été très étudiée, notamment par les groupes de DORLING en Australie et de WINCHESTER en Grande Bretagne.

Cette affection peut en effet être induite par la swainsonine, un alcaloïde présent chez plusieurs espèces végétales, qui possède un pouvoir inhibiteur sur les α -mannosidases (COLEGATE et al. 1979 (99), DORLING et al. 1980 (100)).

L'étude de la structure des oligosaccharides accumulés dans les cas de mannosidoses animales génétique ou induite permet de classer les espèces en deux catégories. La première catégorie est constituée par les espèces accumulant des oligosaccharides possédant, comme chez l'homme, un seul résidu de N-acétylglucosamine en position terminale réductrice : le rat et le porc (ABRAHAM et al. 1983a (101)). La seconde catégorie regroupe des espèces accumulant des oligosaccharides possédant le chaînon N,N'-diacétylchitobiose intact en position terminale réductrice : le mouton (ABRAHAM et al. 1983a (102)), le chat et

le veau (ABRAHAM et al. 1983b (103)). Ajoutons le chien dont les oligosaccharides possèdent également deux résidus de N-acétylglucosamine en position terminale réductrice dans les cas de déficit en galactosidase (GM1 gangliosidose), (WARNER et O'BRIEN 1982 (104)).

Signalons enfin le cas de la chèvre, qui accumule à la fois des oligosaccharides possédant un ou deux résidus de N-acétylglucosamine en position terminale réductrice (MATSUURA et al. 1981 (105), 1983 (106)).

Ces données sont rassemblées dans le tableau II.

Nous pouvons, à la lumière de ces faits, dégager deux groupes d'espèces : les espèces dont le catabolisme est de type humain, et les espèces dont le catabolisme est de type bovin.

b- Rôles de l'aspartyl-N-acétylglucosaminidase et de l'Endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase

L'étude de la structure des oligosaccharides accumulés dans les cas de glycoprotéinoses humaines et animales nous apporte de précieux renseignements sur l'ordre des événements intervenant dans l'initiation du catabolisme des glycoprotéines et a été à l'origine des hypothèses avancées à son propos.

Deux enzymes, rappelons le, sont impliquées dans l'initiation du catabolisme des glycoprotéines. L'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase hydrolyse la liaison β 1-4 entre les deux résidus N-acétylglucosamine du point d'attache du glycanne à l'asparagine. Elle libère donc un oligosaccharide possédant un seul résidu de N-acétylglucosamine en position terminale réductrice. L'aspartyl-N-acétylglucosaminidase, quant à elle, est responsable de la coupure entre l'asparagine et la N-acétylglucosamine en position terminale réductrice de la chaîne glycanne.

Dans les cas de glycoprotéinoses humaines, les oligosaccharides possédant une glucosamine en position terminale réductrice pourraient résulter de l'action de l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase sur des glycopeptides.

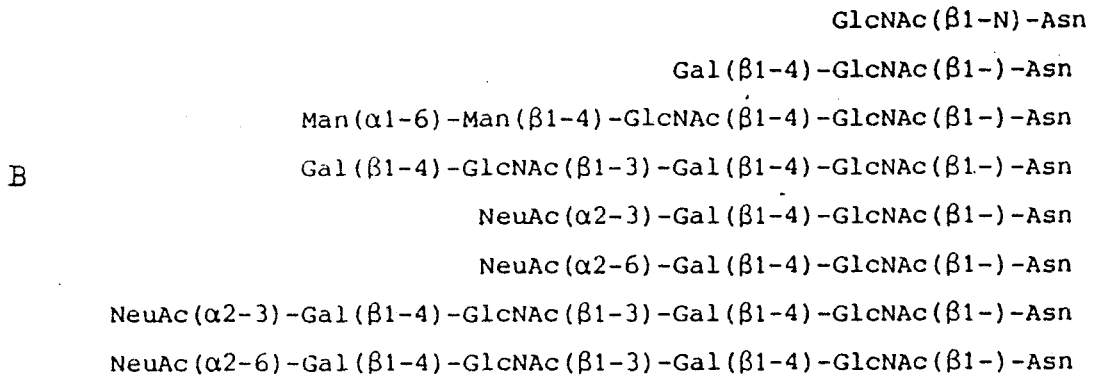
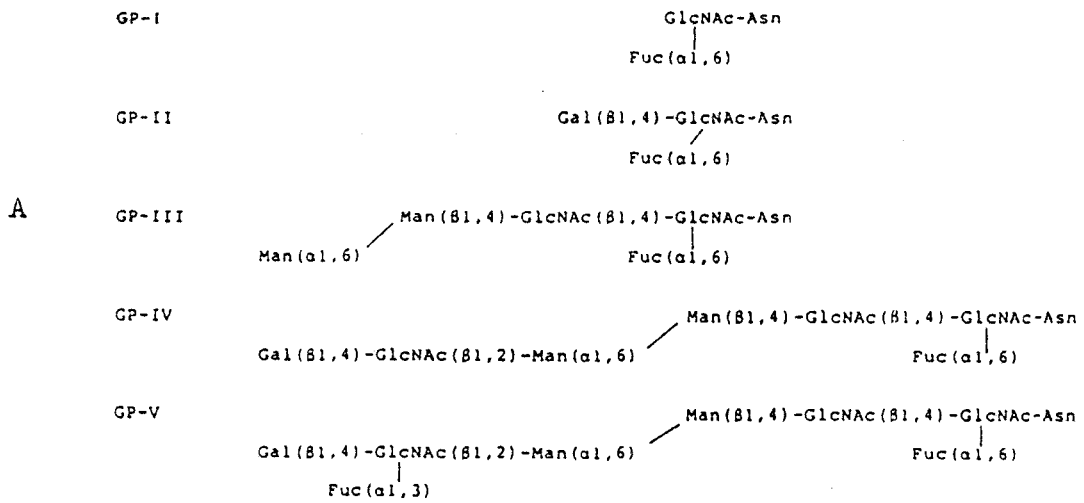


FIGURE 10

Structure des glycopeptides isolés de deux types de glycoprotéinoses :

A : fucosidose

B : aspartylglucosaminurie (AGU)



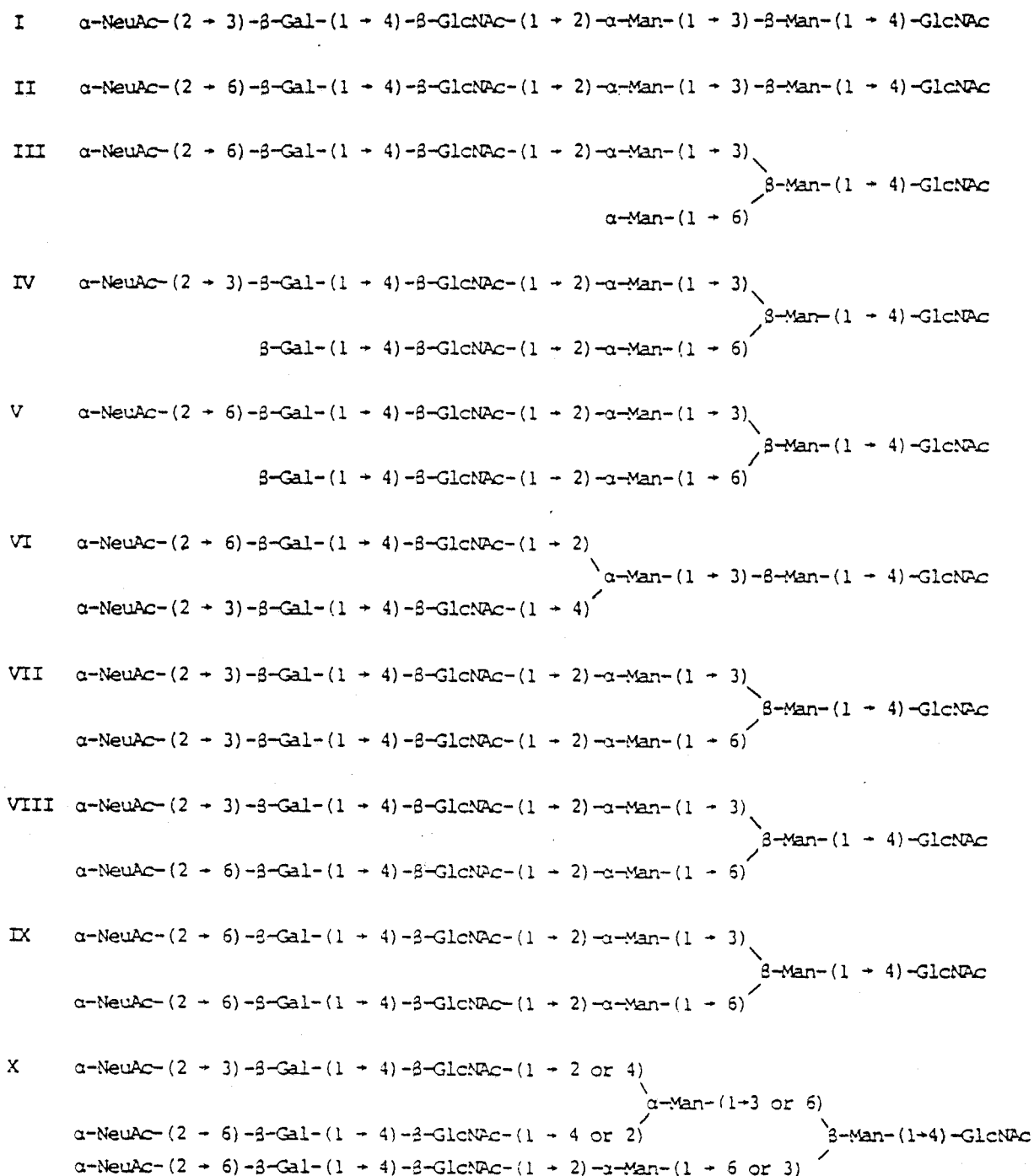


FIGURE 11

Structure des oligosaccharides majeurs isolés de l'urine de patient atteint de sialidose (MICHALSKI et al. 1977 (107))



Espèces	Nombre de résidus de N-acétylglucosamine en position terminale réductrice des oligosaccharides accumulés	
	1 GlcNAc	2 GlcNAc
Homme	+	
Rat	+	
Porc	+	
Veau		+
Mouton		+
Chat		+
Chien		+
Chèvre	+	et +

TABLEAU II

Classification de quelques espèces animales en fonction de la structure des oligosaccharides accumulés dans les cas de glycoprotéinoses



(NISHIGAKI et al. 1974 (108), MONTREUIL 1975 (109), 1981 (110)).

L'action de l'aspartyl-N-acétyl-glucosaminidase se limiterait dans ce cas à l'hydrolyse du chaînon GlcNAc(β 1-)Asn libéré par l'endo.

Cependant aucune activité endoglucosaminidase vis-à-vis de substrats glycopeptidiques n'a pu être mise en évidence dans les lysosomes (PIERCE et al. 1979 (111), 1980 (112)), l'enzyme ayant une localisation essentiellement cytosolique.

Dans les cas de glycoprotéinoses de type bovine, les oligosaccharides possédant le chaînon N,N'-diacétylchitobiose intact seraient les produits de réaction de l'aspartyl-N-acétyl-glucosaminidase sur des glycoasparagines ; l'activité endoglucosaminidase serait alors absente des lysosomes de ces animaux (ABRAHAM et al. 1983b (113)).

L'aspartyl-N-acétylglucosaminidase, quant à elle, est localisée dans les lysosomes et présente des activités très élevées. Il est possible que l'initiation du catabolisme des chaînes glycaniques se déroule en deux étapes : action de l'aspartyl-N-acétylglucosaminidase puis d'une endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase. Cette dernière étape n'aurait pas lieu chez les espèces dont le catabolisme est de type bovin.

c- Les sialidoses : hypothèse de l'existence d'une endoglucosaminidase adaptative

Les sialidoses sont des glycoprotéinoses ayant pour origine un déficit génétique en neuraminidase (voir les revues de STRECKER et MONTREUIL 1979 (114), MICHALSKI 1984 (115)).

Les oligosaccharides excrétés dans l'urine des malades sont sialylés, et ne possèdent qu'un seul résidu de N-acétylglucosamine en position terminale réductrice comme dans les autres cas de glycoprotéinoses humaines (MICHALSKI et al. 1977 (116), STRECKER et al. 1977 (117)), (figure 11).

Comme nous l'avons signalé, ce fait est en faveur de l'action de l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase sur des glycopeptides sialylés. Cependant, les endoglucosaminidases de mammifères étudiées jusqu'à présent sont inactives vis-à-vis de ce type de substrat (PIERCE et al. 1980 (118)).

Selon une hypothèse de G. STRECKER (MONTREUIL 1981 (119)), l'accumulation intracellulaire de glycopeptides sialylés protégés de l'action des exoglycosidases pourrait induire l'apparition d'une endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase adaptative, habituellement absente des cellules des individus sains.

III- L'ASPARTYL-N-ACÉTYLGLUCOSAMINIDASE
(EC 3.5.1.26)

L'aspartyl-N-acétylglucosaminidase (ou aspartamidase) est responsable de l'hydrolyse de la liaison N-acétylglucosamine-asparagine entre les chaînes glycaniques et la chaîne peptidique des N-glycosylprotéines.

L'activité aspartamidase a été dosée chez de nombreuses espèces animales (CONCHIE et STRACHAN 1969 (120)), et dans la plupart des tissus (MAHADEVAN et TAPPEL 1967 (121), OHGUSHI et YAMASHINA 1968 (122)).

Les propriétés de l'aspartamidase ont fait l'objet d'une revue de YAMASHINA 1972 (123).

A- HISTORIQUE

En 1964, LEE et al. (124) mettent en évidence la libération d'acide aspartique à partir de glycoasparagines d'ovalbumine incubés en présence d'émulsine d'amande douce.

MURAKAMI et EYLAR (125), en 1965, caractérisent dans l'épididyme de mouton, la première aspartamidase de mammifère, active sur l'asparaginyln-acétylglucosamine (GlcNac(β 1-)Asn).

Le mécanisme d'action de l'enzyme est élucidé en 1966 par MAKINO et al. (126) qui utilisent le sérum de porc comme source enzymatique. Ces mêmes auteurs montrent que l'aspartamidase est distincte de l'asparaginase (TOWER et al. 1963 (127)), qui catalyse la conversion de l'asparagine en acide aspartique.

Le premier cas d'aspartylglucosaminurie (AGU), caractérisé par l'excrétion massive dans les urines de glycoasparagines est décrit par JENNER et POLLITT en 1967 (128). Le déficit en aspartamidase, à l'origine de cette maladie, est mis en évidence par ces mêmes auteurs dès 1968 (POLLITT et al. 1968 (129), POLLITT et JENNER 1969 (130)).

MAHADEVAN et TAPPEL en 1967 (131), ainsi que OHGUSHI et YAMASHINA en 1968 (132), montrent que dans le foie de rat, l'enzyme est localisée dans le compartiment lysosomal.

De 1968 à 1972, le groupe de YAMASHINA a été à l'origine d'une importante série de travaux sur la purification et les propriétés enzymatiques de l'aspartamidase du sérum et du rein de porc (voir la revue de YAMASHINA 1972 (133)).

Dès 1968, l'aspartamidase est utilisée à des fins d'étude structurale, notamment dans la mise en évidence de la liaison entre l'osamine en position terminale réductrice du glycanne et l'asparagine. Ces études sont menées sur l'ovalbumine (MAKINO et al. 1968 (134)) ainsi que sur un mélange de glycopeptides désialylés préparés à partir d'orosomucoïde (YAMAUCHI et al. 1968 (135)).

A partir de 1974, l'aspartamidase est, en quelque sorte, supplantée par l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase, considérée dès lors comme seule responsable de la première étape du catabolisme du glycanne des N-glycosylprotéines. Le rôle de l'aspartamidase est cantonné à l'hydrolyse du GlcNAC(β 1-)Asn libéré après action de l'endoglucosaminidase sur des glycopeptides.

Les travaux sur l'aspartamidase se limiteront alors au dosage de l'enzyme chez les individus atteints d'aspartylglucosaminurie (AULA et al. 1973 (136), 1976 (137), SOMER et al. 1975 (138), DUGAL 1977 (139)).

L'aspartamidase de foie humain est purifiée en 1977 par DUGAL (140), DUGAL et STROMME (141). Mac GOVERN et al. en 1983 (142) isolent l'enzyme et en déterminent la composition en acides aminés.

Signalons enfin que deux N-glycopeptidases végétales ont été isolées par TAKAHASHI en 1977 (143), TAKAHASHI et NISHIBE 1978 (144), 1981 (145) dans l'émulsine d'amande et par SUGIYAMA et al. en 1983 (146) dans la fève. Leur large spectre d'activité en font des outils précieux pour l'étude structurale

des glycoprotéines. Leur mécanisme d'action est identique à celui de l'aspartamidase mais ces enzymes sont inactives sur des glycoasparagines, d'où leur dénomination de glycopeptidases.

B- MECANISME D'ACTION

Comme l'ont montré MAKINO et al. en 1966 (147), l'aspartyl-N-acétylglucosaminidase est en fait une amidase dont l'action sur le $\text{GlcNAc}(\beta 1-)\text{Asn}$ se traduit par la libération d'un résidu d'acide aspartique (et non d'asparagine) et d'un résidu l-amino-N-acétylglucosamine. Ces auteurs ont pu isoler ce dernier composé qui, en milieu acide, est très rapidement dégradé par voie chimique, libérant ainsi une molécule d'ammoniac et de N-acétylglucosamine (figure 12).

Le dosage de l'ammoniaque produit après dégradation du l-amino-N-acétylglucosamine intermédiaire constitue une méthode de dosage de l'activité enzymatique. Deux méthodes de dosage de l'ammoniaque ont été utilisées : la méthode de LUBOCHINSKI et ZALTA 1954 (148) et, plus récemment, la méthode de dosage par fluorimétrie de TAYLOR et al. 1974 (149).

C- LOCALISATION CELLULAIRE

Les travaux de MAHADEVAN et TAPPEL 1967 (150) et OHGUSHI et YAMASHINA 1968 (151) ont montré que l'activité aspartamidase du foie de rat était localisée au niveau du compartiment lysosomal et plus précisément dans la fraction soluble du lysosome.

En utilisant la méthode de fractionnement par centrifugation différentielle de DE DUVE et al. 1955 (152), ces auteurs ont trouvé des profils de distribution cellulaire identiques pour l'aspartamidase et la phosphatase acide, une des enzymes marqueurs du lysosome. En outre, l'aspartamidase est

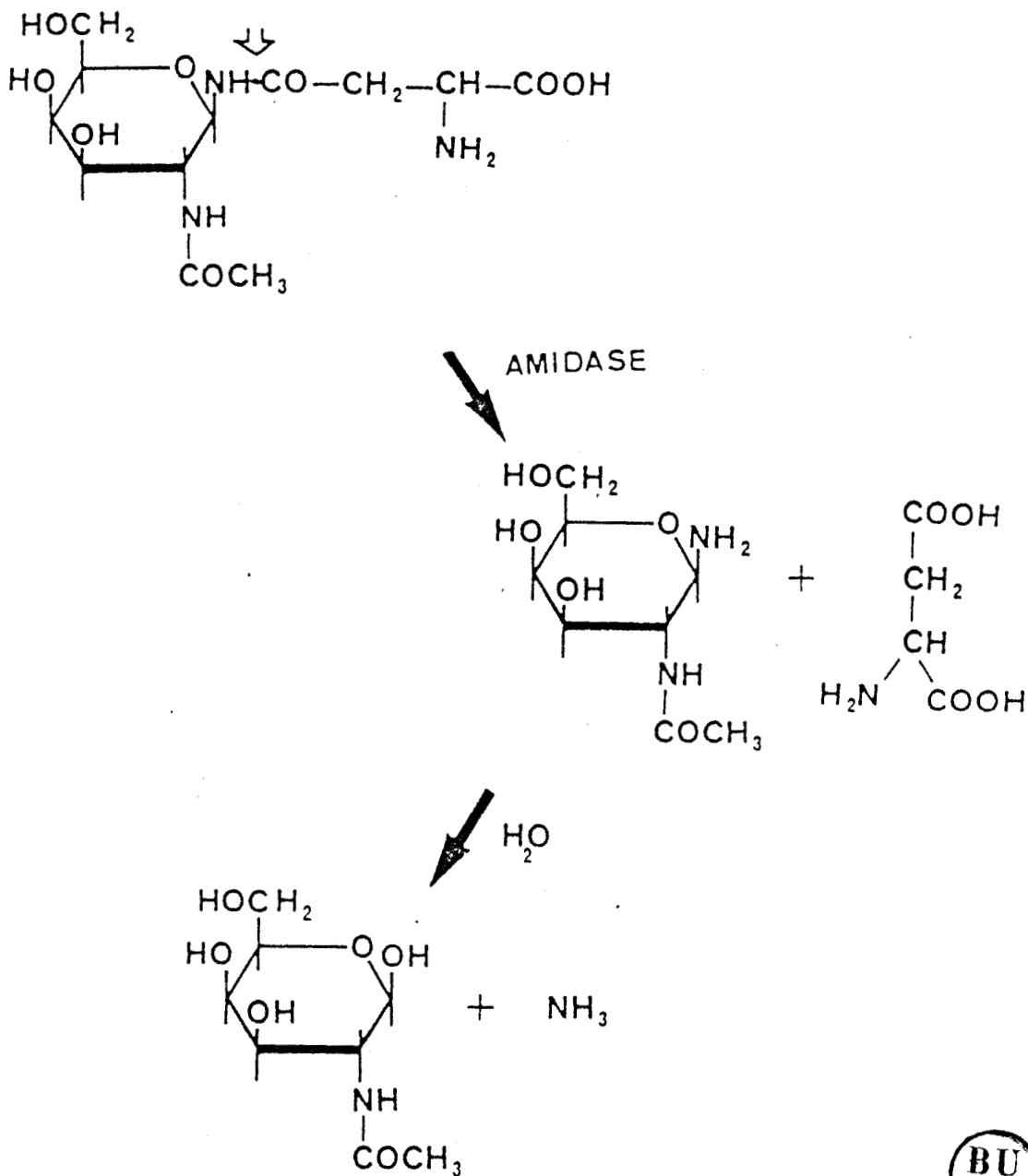


FIGURE 12

Mécanisme d'action de l'aspartyl-N-acétylglucosaminidase
(d'après DUGAL 1977 (153))

soumise au phénomène de latence déjà mentionné à propos des hydrolases acides lysosomales.

MAHADEVAN et TAPPEL 1967 (154) ont par ailleurs montré que la localisation cellulaire de l'aspartamidase était différente de l'asparaginase localisée dans le cytosol.

D- PROPRIETES ENZYMATIQUES

1- pH OPTIMUM

L'activité aspartamidase présente un optimum d'activité pour les valeurs de pH allant de pH 7,0 à pH 8,0 suivant les espèces et les organes étudiés (voir la revue de YAMASHINA 1972 (155)). Des valeurs de pH optimum plus basses ont été mesurées pour l'aspartamidase de foie de porc (pH 5,5) (KOHNO et YAMASHINA 1972 (156)), de sérum de porc (pH 5,6) (MAKINO et al. 1968 (157)) et de sperme humain (pH 5,7) (POLLITT et JENNER 1969 (158)).

Deux valeurs de pH optimum ont été proposées pour l'aspartamidase de foie humain : pH 7,7 à 9,0 d'après DUGAL et STROMME 1977 (159), pH 6,7 d'après Mac GOVERN et al. 1983 (160).

Le pH optimum semblerait être dépendant du degré de purification, Mac GOVERN et al. étant parvenus à isoler l'enzyme, à la différence de DUGAL et STROMME qui ont travaillé sur une fraction purifiée.

2- SPECIFICITE

Il a fallu attendre 1974 pour que la structure primaire du glycanne des N-glycosylprotéines soit élucidée. Les connaissances antérieures à cette période restent fragmentaires (voir les revues de MONTREUIL 1975 (161), 1982 (162)).

Les études portant sur la spécificité de l'aspartamidase étant antérieures à 1974, la plupart des renseignements en notre possession concernent la spécificité de l'enzyme

vis-à-vis de la partie peptidique des glycopeptides. Les travaux concernant la spécificité vis-à-vis du fragment glucidique ont été réalisés sur des mélanges de glycopeptides de structure mal définie.

L'aspartamidase n'agit que sur des glycoasparagines, la substitution des fonctions amine ou carboxyle en α de l'asparagine entraînant la disparition de l'activité enzymatique.

Ainsi, l'aspartamidase de sérum de porc est inactive sur le GlcNAc(β 1-)Asn substitué par un résidu de thréonine lié sur la fonction amine ou carboxyle de l'asparagine (MAKINO et al. 1968 (163)). Des résultats identiques ont été obtenus avec l'aspartamidase d'oviducte de poule en utilisant des glycopeptides d'ovalbumine possédant plusieurs résidus d'acide aminé, alors que l'enzyme est active sur les glycoasparagines correspondant (PLUMMER et al. 1968 (164)).

De même, l'aspartamidase d'épididyme de mouton est inactive sur le dérivé dinitrophényl du GlcNAc(β 1-)Asn (EYLAR et MURAKAMI 1966 (165)). La dansylation de l'asparagine du même substrat, entraîne également la disparition de l'activité enzymatique de l'oviducte de poule (PLUMMER et al. 1968 (166)).

L'aspartamidase de diverses espèces dégrade les glycoasparagines de type oligomannosidique et mixte préparés à partir de l'ovalbumine (MAKINO et al. 1966 (167), PLUMMER et al. 1968 (168)), et de la ribonucléase B (PLUMMER et al. 1968 (169)). Les travaux de KOHNO et YAMASHINA 1972 (170) sur l'aspartamidase de sérum de porc montrent que l'affinité pour un mélange de glycoasparagines d'ovalbumine est identique à l'affinité pour le GlcNAc(β 1-)Asn. Par contre, la vitesse maximale d'hydrolyse est légèrement supérieure pour les glycoasparagines d'ovalbumine.

En ce qui concerne l'activité vis-à-vis des substrats de type N-acétyllactosaminique, les résultats publiés sont contradictoires. En 1966, EYLAR et MURAKAMI (171) constatent que l'aspartamidase d'épididyme de mouton est inactive vis-à-vis de glycopeptides obtenus par digestion pronasique de l'orosomucoïde, à la différence de YAMAUCHI et al. 1969 (172) qui observent

une libération d'acide aspartique à partir d'asialoglycoasparagines d'orosomucoïde incubés en présence d'aspartamidase de sérum de porc.

L'aspartamidase semble inactive sur les glycoasparagines fucosylés en α 1-6 sur l'osamine du point d'attache. En effet, dans les cas de fucosidose, le matériel accumulé est constitué par des glycoasparagines (figure 10).

A titre d'information, nous citerons les travaux de TANAKA et al. 1973 (173) qui ont étudié la spécificité de l'aspartamidase vis-à-vis de différents composés monosaccharide-asparagines obtenus par synthèse chimique. Ces auteurs ont observé que le Man(β 1-)Asn et le Glc(β 1-)Asn étaient plus rapidement hydrolysés que le GlcNAc(β 1-)Asn par l'aspartamidase de rein de porc.

Nous terminerons par la spécificité des glycopeptidases isolées de la fève et de l'émulsine d'amande. Toutes deux sont inactives sur des glycoasparagines.

La N-glycopeptidase d'émulsine d'amande est capable, au moins pour une des trois formes enzymatiques, de détacher les glycannes de l'ovalbumine, de la taka-amylase et de l'asialosérotroferrine, à partir de la glycoprotéine native (TAKAHASHI et NISHIBE 1981 (174)). Des résultats analogues vis-à-vis des IgM ont été publiés par PLUMMER et TARENTINO 1981 (175), TARENTINO et PLUMMER 1982 (176).

La glycopeptidase de fève, quant à elle, est capable d'hydrolyser des glycopeptides biantennés disialylés, préparés à partir de fibrinogène humain et possédant plus de trois acides aminés ; de même pour des glycopeptides d'ovalbumine (SUGIYAMA et al. 1983 (177)).

3- INHIBITEURS

L'aspartamidase de rein de rat est inhibée par le p-chloromercuribenzoate. Les ions Cu^{2+} et Ni^{2+} inhibent également l'activité enzymatique alors que les ions Ca^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} ,

Zn^{2+} et Mn^{2+} restent sans effet (MAHADEVAN et TAPPEL 1967 (178)).

L'aspartamidase de rein de porc est peu affectée par le p-chloromercuribenzoate à des concentrations suffisantes pour inhiber l'aspartamidase de rein de rat. Les ions Cu^{2+} , Ni^{2+} et Mn^{2+} inhibent l'activité enzymatique ainsi que l'EDTA ; cependant, aucune étude visant à déterminer la nature des ions éventuellement impliqués n'a été réalisée. L'acide aspartique et l'asparagine inhibent également l'activité enzymatique de rein de porc (KOHNO et YAMASHINA 1972 (179)), ainsi que l'aspartamidase de mollusque *Limnea stagnalis* (KAVERZNEVA et al. 1974 (180)).

Quant à l'aspartamidase de sérum de porc, elle est inhibée de manière compétitive par l'aspartylcyclohexylamine et l'aspartylaniline (TANAKA et al. 1973 (181)).

TARENTINO et MALEY 1969 (182) ont montré que l'aspartamidase d'oviducte de poule était inhibée de façon non compétitive par la 5-diazo-4-oxo-L-norvaline (DONV), un inhibiteur de l'asparaginase.

L'aspartamidase de foie humain est inhibée par la N-acétylcysteine alors que l'activité reste inchangée en présence de p-hydroxymercuribenzoate. Les ions Cu^{2+} inhibent l'enzyme ainsi que les ions Zn^{2+} , Ni^{2+} et Mn^{2+} dont le pouvoir inhibiteur est néanmoins beaucoup plus faible. Les ions Fe^{2+} , Mg^{2+} , et Ca^{2+} sont sans effet sur l'activité aspartamidase de foie humain (DUGAL et STROMME 1977 (183)).

Certains dérivés monosaccharidiques inhibent également l'aspartamidase. Citons la 2-acétamido-2-déoxy-D-glucono-1,5-lactone inhibant l'aspartamidase d'épididyme de taureau (CLAMP et al. 1966 (184)) et le benzylidène-1-amino-N-acétylglucosamine inhibant l'aspartamidase de *Limnea stagnalis* (KAVERZNEVA et al. 1974 (185)). Notons que le benzylidène-N-acétylglucosamine reste sans effet dans ce dernier cas.

E- PROPRIETES STRUCTURALES ET STABILITE

Les aspartamidases de rein de rat (MAHADEVAN et TAPPEL 1967 (186)), de rein de porc (KOHNO et YAMASHINA 1972 (187)) et d'oviducte de poule (TARENTINO et MALEY 1969 (188)) ont, respectivement, des masses moléculaires de 30.000, 70.000 et 110.000. Ces résultats ont été obtenus par gel filtration, à partir de solutions enzymatiques partiellement purifiées.

Mac GOVERN et al. 1983 (189) ont isolé l'aspartamidase de foie humain et estimé sa masse moléculaire à 70.000. Il s'agit d'une glycoprotéine monomérique.

Quelle qu'en soit l'origine, l'aspartamidase est stable plusieurs mois à -20°C .

Cette enzyme présente une étonnante stabilité à la chaleur. Ainsi, Mac GOVERN et al. en 1983 (190) ont montré que l'aspartamidase isolée de foie humain a une demi-vie de 3 heures à 60°C . A un degré de purification moindre, la demi-vie de l'enzyme est portée à 24 heures à 60°C , ce qui suggère l'influence de protéines stabilisatrices de l'enzyme.

IV- L'ENDO-N-ACÉTYL- β -D-GLUCOSAMINIDASE
(EC 3.2.1.96)

L'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase catalyse l'hydrolyse de la liaison (β 1-4) du motif N,N'-di-N-acétylchitobiose du glycanne des N-glycosylprotéines.

Cette enzyme présente une répartition très large puisqu'elle a été décrite chez de nombreux microorganismes, chez les végétaux et chez les animaux (tableau III).

A) HISTORIQUE

L'activité endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase est décrite pour la première fois en 1971 par MURAMATSU (191) chez *Diplococcus pneumoniae*.

En 1974, NISHIGAKI et al. (192) mettent en évidence une activité endo chez les mammifères, en l'occurrence dans le foie de rat et de porc.

BOERSMA et al. en 1975 (193) détectent l'activité endo dans le foie humain.

La première étude de localisation cellulaire de l'enzyme est réalisée par PIERCE et al. (194) en 1979.

Ces auteurs ont montré qu'au niveau du foie et du rein de rat, l'activité vis-à-vis d'un substrat oligomannosidique (activité "manno" endoglucosaminidase) est essentiellement cytosolique. En 1980, les mêmes auteurs (PIERCE et al. (195)) aboutissent à la même conclusion en ce qui concerne l'activité vis-à-vis d'un substrat de type N-acétyllactosaminique désialylé (activité "galacto"endoglucosaminidase). Il s'agit de la première description de cette activité chez les mammifères.

BOUQUELET et al. (195b) caractérisent en 1980 une activité endoglucosaminidase chez le Basidiomycète (*Sporotrium dimorphosporum*). La spécificité très large de cette enzyme en fait un outil de choix pour l'étude du glycanne des N-glycosylprotéines

(KOL 1983 (196)). Plusieurs endoglucosaminidases de microorganismes ou de végétaux ont été également utilisées à des fins d'étude structurale (tableaux III et IV).

En 1981, OVERDIJK et al. (197) étudient les propriétés de l'endo de foie et de rein humain.

La spécificité de l'enzyme de foie de rat a fait l'objet d'une étude de TACHIBANA et al. 1982 (198) qui posent l'hypothèse de l'existence d'une seule forme enzymatique pour les deux activités "manno" et "galacto" endoglucosaminidase, tout comme LISMAN et al. 1983 (199).

Par contre, EL BATTARI et al. en 1983 (200) postulent l'existence de plusieurs isoenzymes dont l'une serait spécifique de l'activité "manno" endoglucosaminidase. Le groupe de G. SPIK poursuit actuellement des travaux dans le but de vérifier cette hypothèse. Les paramètres cinétiques des deux activités endo ont été déterminés en 1983 par APPOURCHEAU (201).

L'endo de foie de rat est partiellement purifiée par LISMAN et al. en 1985 (202). Ces auteurs ont également étudié l'influence des glycopeptides et des glycoprotéines sur l'activité enzymatique.

LI et al. 1985 (203) caractérisent une activité endo dans l'urine humaine. Celle-ci a la particularité de présenter une activité optimale à pH 4-4,5, ce qui la différencie des autres endoglucosaminidases de mammifères et notamment de foie humain, dont l'activité est optimale à pH neutre.

B- LOCALISATION CELLULAIRE

PIERCE et al. 1979 (204), 1980 (205) ont montré que les activités "manno" et "galacto" endoglucosaminidase de foie de rat sont localisées au niveau du compartiment cytosolique. Ces résultats ont été confirmés par LISMAN et al. 1983 (206), 1985 (207).

L'endo cytosolique pourrait intervenir dans le catabolisme des glycoprotéines intracellulaires ainsi que dans la régulation de la biosynthèse des N-glycosylprotéines (PIERCE et al. 1980 (208), MONTREUIL 1981 (209)). Dans le cadre de cette dernière hypothèse, l'endo pourrait dégrader les dolichol-oligosaccharides précurseurs en excès (CACAN et al. 1980 (210)).

Aucune activité endo n'a pu être mise en évidence au niveau des lysosomes. Des macrophages activés et stimulés par des IgE et des anticorps anti-IgE sécrètent l'endo en faible quantité. Cependant, conjointement à l'endo, est sécrétée la lactate deshydrogénase, typiquement cytosolique (EL BATTARI 1983 (211)).

C- PROPRIETES ENZYMATIQUES

1- pH OPTIMUM

Les endoglucosaminidases de mammifères présentent un maximum d'activité pour des valeurs de pH proche de la neutralité, à l'exception toutefois de l'endo d'urine humaine qui possède un pH optimum de 4-4,5 (LI et al. 1985 (212)).

Le pH optimum de l'endo d'oviducte de poule est de 5,2. La localisation cellulaire de l'enzyme n'a pas été étudiée dans ce cas précis (TARENTINO et MALEY 1976 (213)).

2- SPECIFICITE

Les études de spécificité des endoglucosaminidases animales ont surtout porté sur l'enzyme de foie de rat (TACHIBANA et al. 1982 (214), PIERCE et al. 1979 (215), 1980 (216)) (tableau IV).

La spécificité des endos de mammifères vis-à-vis de la partie peptidique des substrats glycopeptidiques n'a pas fait l'objet d'études systématiques. L'enzyme est active sur des

ORIGINE	DENOMINATION	REFERENCES
- Streptomyces griseus	H	TARENTINO et MALEY 1974 (217)
- Diplococcus pneumoniae	D	KOIDE et MURAMATSU 1974 (218)
- Clostridium perfringens	C _I , C _{II}	ITO <u>et al.</u> 1975 (219)
- Fibrobacterium meningosepticum		ELDER et ALEXANDER 1982 (220)
- Basidiomycète	B	BOUQUELET <u>et al.</u> 1980 (221)
- Dictyostellum discoideum	S	FREEZE et ETCHISON 1983 (222)
- Figue	F _I , F _{II}	CHIEN <u>et al.</u> 1977 (223)
- Foie de porc		NISHIGAKI <u>et al.</u> 1974 (224)
- Foie de rat		PIERCE <u>et al.</u> 1979 (225) 1980 (226) TACHIBANA <u>et al.</u> 1982 (227)
- Oviducte de poule		TARENTINO et MALEY 1976 (228)
- Foie humain		BOERSMA <u>et al.</u> 1975 (229) OVERDIJK <u>et al.</u> 1981 (230)
- Fibroblastes humains en culture		TACHIBANA <u>et al.</u> 1981 (231)
- Urine Humaine		LI <u>et al.</u> 1985 (231 b)

TABLEAU III



Principales activités endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidases
décrites jusqu'en 1985

Substrat	Foie de rat	H	D,C _I	C _{II}	B	S
Man ₉ R	+	+	-	+	+	
Man ₈ R	+	+	-	+	+	
Man ₇ R	+	+	-	+	+	+
Man ₆ R	+	+	-	+	+	+
Man ₅ R	+	+	+	+	+	+
Man ₄ R	+	+	+	+	+	+
Man ₃ R	+	-	+	-	+	
Man ₂ R	-					
Man ₁ R	-					
R	-					
Gal ₂ GN ₂ Man ₃ R	+	-	-	-	+	
-- monosialylé	-	-	-	-	+	
-- disialylé	-	-	-	-	-	
-- fucosylé	-	-	-	-	+	
Gal ₁ GN ₂ M ₅ R (GPI)	-	+	-	-	-	
Gal ₁ GN ₂ M ₄ R (GPII)	-	+	-	-	-	
GN ₂ M ₄ R (GPIIIC)		+	-	-	-	
GN ₂ M ₅ R (GPIIA)	+	+	-	+	+	

TABLEAU IV

Spécificité des différentes activités endo-N-acétyl-β-D-gluco-
saminidases (d'après S. BOUQUELET)

+ : activité

- : absence d'activité

(M : mannose ; GN : GlcNac ; R : GlcNac₂Asn)



glycopeptides dont la fonction amine libre en α de l'asparagine est substituée par un groupement acétyl. Ceci autorise le marquage radioactif du substrat à l'aide d'anhydride acétique marquée au ^{14}C . L'asparaginyln-N-acétylglucosamine (marquée au ^{14}C) libérée par l'endo est ainsi facile à doser (KOIDE et MURAMATSU 1974 (232)).

L'endo dégrade des glycopeptides de type N-acétyllactosaminique et oligomannosidique, ces derniers étant plus rapidement dégradés (NISHIGAKI et al. 1974 (233), PIERCE et al. 1979 (234), 1980 (235), TACHIBANA et al. 1982 (236)). Néanmoins l'endo est inactive sur des substrats N-acétyllactosaminiques sialylés (PIERCE et al. 1980 (237)), de même lorsque ce type de substrat est fucosylé en $\alpha 1-6$ sur l'osamine du point d'attache (TACHIBANA et al. 1982 (238)).

Ces mêmes auteurs ont constaté que la structure limite dégradée par l'endo de foie de rat était le glycopeptide $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{Asn}$, l'enzyme étant très peu active sur les glycopeptides $\text{Man}_2\text{GlcNAc}_2\text{Asn}$ et $\text{Man}_1\text{GlcNAc}_2\text{Asn}$.

Le glycopeptide $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{Asn}$ est le substrat pour lequel l'endo présente la plus grande vitesse d'hydrolyse. L'endo cytosolique du foie de rat agit également sur des oligosaccharides possédant deux osamines en position terminale réductrice (TACHIBANA et al. 1982 (239)).

3- ACTION DES EFFECTEURS

L'activité endoglucosaminidase du foie de rat est stabilisée par le dithiotréitol (DTT) (PIERCE et al. 1979 (240)).

Les ions divalents (Fe^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+}) ainsi que l'EDTA n'ont aucun effet sur l'activité enzymatique, mis à part le cation Cu^{2+} qui inhibe les activités "manno" et "galacto" endoglucosaminidase et le cation Zn^{2+} qui n'inhibe que l'activité "manno" endoglucosaminidase (EL BATTARI, 1983 (241)).

V- CONCLUSION : HYPOTHESES CONCERNANT L'INITIATION DU
CATABOLISME DU GLYCANNE DES N-GLYCOSYLPROTEINES

Depuis 1974, il est couramment admis que l'action de l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase constitue la première étape de dégradation du glycanne des N-glycosylprotéines, après action des protéases. Ceci expliquerait l'accumulation d'oligosaccharides possédant un seul résidu de N-acétylglucosamine en position terminale réductrice dans les tissus et les urines de patients atteints de glycoprotéinoses (NISHIGAKI et al. 1974 (242), MONTREUIL 1975 (243), 1981 (244)).

Par contre, l'activité endoglucosaminidase serait absente chez certaines espèces animales qui accumulent des oligosaccharides possédant le chaînon di-N-acétylchitobiose, dans les cas de glycoprotéinoses de "type bovine" (ABRAHAM et al. 1983b (245)). Dans ce cas, la première étape de dégradation du glycanne des N-glycosylprotéines se limiterait à l'action de la seule aspartamidase.

La figure 13 représente les différentes voies envisageables dans l'initiation du catabolisme des N-glycosylprotéines. Les voies 1 et 2 supposent l'intervention directe des activités "manno" et "galacto" endoglucosaminidase. Les endoglucosaminidases étant inactives sur les glycopeptides sialylés, l'hypothèse de l'existence d'une "sialyl" endoglucosaminidase adaptative active vis-à-vis de ce type de substrat a été proposée par STRECKER (in MONTREUIL 1981 (246)), pour expliquer l'accumulation d'oligosaccharides sialylés dans les urines de patients atteints de sialidose. Cette hypothèse est schématisée par la voie 5 (figure 13).

L'argument majeur à opposer à l'hypothèse d'une action directe des endoglucosaminidases, est constitué par l'échec de la mise en évidence d'une activité endoglucosaminidase lysosomale vis-à-vis de glycopeptides.

Les observations effectuées dans les cas de glycoprotéinoses animales de "type bovine", nous ont amené à proposer

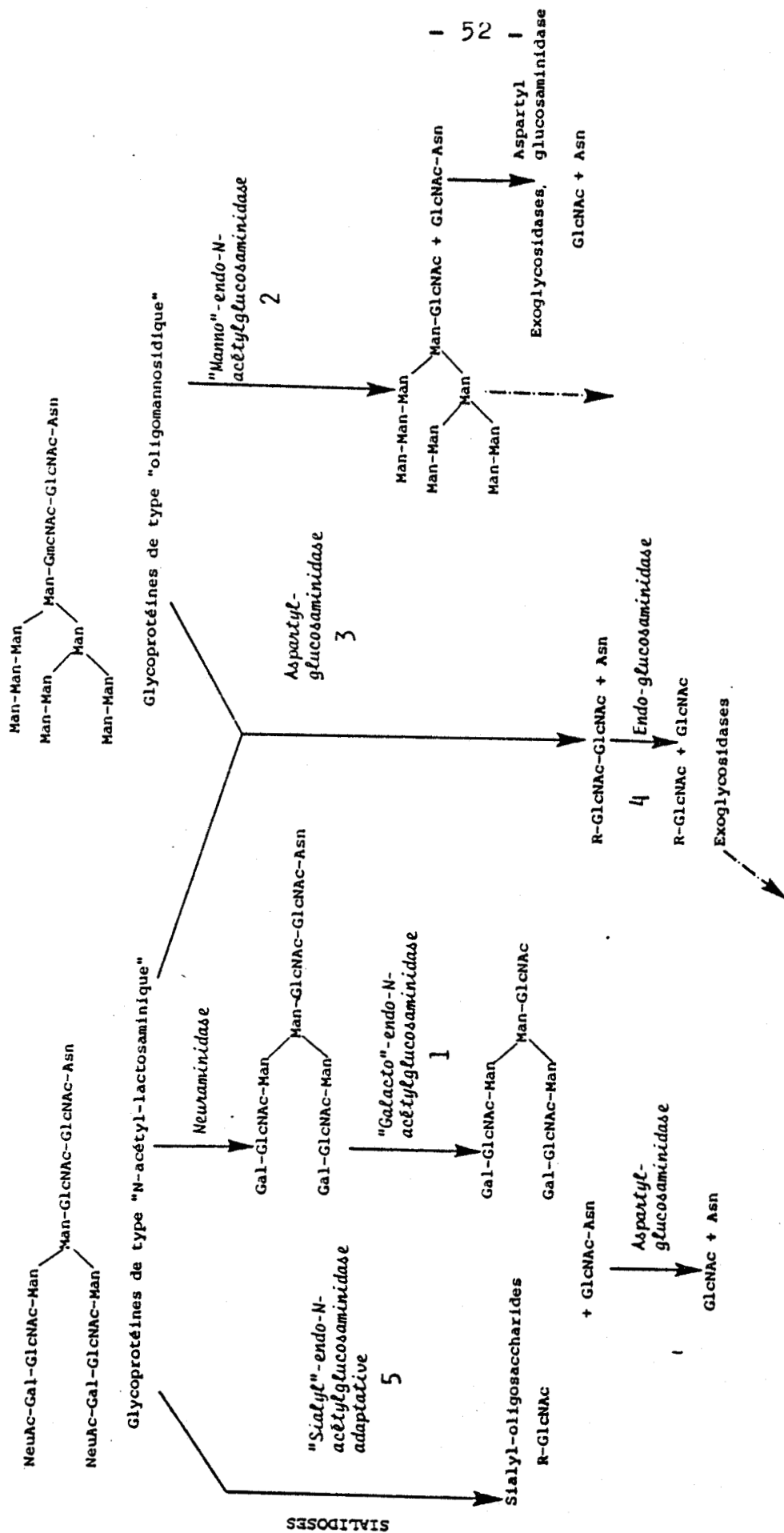


FIGURE 13

Hypothèses concernant les premières étapes du catabolisme des N-glycannes (d'après MICHALSKI 1984 (247))



une voie de dégradation faisant intervenir l'aspartamidase puis une endoglucosaminidase active sur l'oligosaccharide ainsi libéré. Cette hypothèse est schématisée par les voies 3 et 4 de la figure 13.

La vérification de cette dernière hypothèse a constitué l'essentiel de nos travaux.

Dans un premier chapitre, nous exposerons les tentatives effectuées quant à la caractérisation d'une activité "sialyl" endoglucosaminidase adaptative.

T R A V A U X

P E R S O N N E L S

Ière PARTIE :

ESSAIS DE CARACTERISATION D'UNE ACTIVITE "SIALYL"
ENDO-N-ACETYL- β -D-GLUCOSAMINIDASE DANS LES CELLULES
LYMPHOBLASTOIDES TRANSFORMEES PAR LE VIRUS D'EPSTEIN-
BARR DE PATIENT ATTEINT DE SIALIDOSE

ESSAIS DE CARACTERISATION D'UNE ACTIVITE "SIALYL"
ENDO-N-ACÉTYL- β -D-GLUCOSAMINIDASE DANS LES CELLULES
LYMPHOBLASTOÏDES TRANSFORMÉES PAR LE VIRUS
D'EPSTEIN-BARR DE PATIENT ATTEINT DE SIALIDOSE

I- INTRODUCTION

Les sialidoses sont des glycoprotéinoses dûes à une déficience en neuraminidase. Les oligosaccharides excrétés dans l'urine des patients sont sialylés et ne possèdent qu'un seul résidu de N-acétylglucosamine en position terminale réductrice (voir les revues de STRECKER et MONTREUIL 1979 (247), MICHALSKI 1984 (248)).

Ce fait semble en faveur de l'action de l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase sur des glycopeptides sialylés. Cependant, les endoglucosaminidases de mammifères sont inactives vis-à-vis de ce type de substrat (PIERCE et al. 1980 (249)).

Selon une hypothèse de G. STRECKER (MONTREUIL 1981 (250)), l'accumulation intracellulaire de glycopeptides sialylés protégés de l'action des exoglycosidases pourrait induire l'apparition d'une endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase adaptative, habituellement absente des cellules des individus sains.

Nous nous sommes proposés de vérifier cette hypothèse en utilisant comme modèle des cellules lymphoblastoïdes humaines, obtenues par transformation des lymphocytes B par le virus d'EPSTEIN-BARR.

NILSSON 1979 (251) a consacré une revue aux propriétés générales de ces lignées cellulaires. Ces cellules présentent de nombreux avantages par rapport aux lignées fibroblastiques : possibilité de culture pendant de longues périodes sans phénomène de sénescence, production rapide de matériel cellulaire en grande quantité, stabilité des activités enzymatiques, croissance en suspension, ce qui évite les "chocs" dus aux méthodes mécaniques ou enzymatiques durant le prélèvement des cellules.

Les lignées lymphoblastoïdiques obtenues par transformation de lymphocytes B par le virus d'EPSTEIN-BARR ont servi de modèle pour l'étude des glycosidases chez les patients atteints de glycoprotéinoses et chez les sujets sains (GLADE et BERATIS 1975 (252), MINAMI et al. 1978 (253), DREYFUS et al. 1980 (254), 1984 (255), SALVAYRE et al. 1981 (256), 1983 (257)).

II- MATERIELS ET METHODES

A) PREPARATION DES SUBSTRATS

Le substrat utilisé pour la recherche de l'activité "sialyl"endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase est un glycopeptide N-acétyllactosaminique biantenné, disialylé, correspondant au glycanne de la sérotransferrine humaine (voir tableau I). Il a été préparé à partir d'un mélange de glycopeptides qui nous a été aimablement fourni par G. SPIK que nous remercions. Les glycopeptides résultant de l'hydrolyse pronasique des glycoprotéines de la fraction IV de Cohn du sérum humain sont déposés sur une colonne de résine échangeuse d'anions AG 1x2 (400 mesh minus, forme HCOO⁻ ; Bio-Rad, Richmond, USA).

Après lavage et élution des glycopeptides monosialylés, les glycopeptides disialylés sont élués par une solution d'acétate de pyridine 250 mM. Après neutralisation, l'éluat obtenu est évaporé sous pression réduite puis repris par du méthanol et à nouveau évaporé, ceci trois fois.

Le résidu est repris par de l'eau et les sels sont éliminés par tamisage moléculaire sur biogel P4 (Bio-Rad, Richmond, USA). Les fractions contenant les glycopeptides sont collectées et évaporées à siccité après neutralisation. Le résidu est repris par quelques ml d'eau, neutralisé puis lyophilisé.

La détermination des rapports molaires en monosaccharides est réalisée par méthanolyse puis trifluoroacétylation

(ZANETTA et al. 1972 (258)).

Le glycopeptide biantenné disialylé est marqué sur la partie peptidique par de l'anhydride acétique [^{14}C] (0,5 mCi, 7mCi/mole, CEA, Saclay, FRANCE) par la méthode de KOIDE et MURAMATSU 1974 (259).

L'activité "manno"endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase est dosée à l'aide de glycopeptides de type oligomannosidique marqués de manière identique. Ils sont obtenus par digestion pronasique de l'ovalbumine.

L'activité "galacto"endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase est dosée à l'aide de glycopeptides de type N-acétyllactosaminique biantenné désialylé, marqués de manière identique.

Ces substrats nous ont été confiés par G. SPIK que nous remercions.

B- CULTURE CELLULAIRE

Les cellules ont été obtenues par transformation de lymphocytes B de patient atteint de sialidose par le virus d'EPSTEIN-BARR. La transformation a été réalisée dans le laboratoire du Professeur G. LENOIR, du Centre International de Recherche contre le Cancer de LYON, qui nous a également fourni une souche de cellules témoins établie par transformation des lymphocytes B d'un individu sain.

Les cellules lymphoblastoïdes sont cultivées en suspension dans des flacons de culture (NUNC) de 250 cm³ contenant 30 ml de milieu RPMI 1640, comportant 15 % de sérum de veau foetal, 0,3 g/l de glutamine, 0,1 % de kanamycine, dans une atmosphère contenant 5 % de CO₂ et à une température de 37°C.

Les cellules sont divisées tous les 3 ou 4 jours de la manière suivante : le contenu d'un flacon est réparti en trois flacons puis complété à 30 ml par du milieu neuf.

C- DOSAGE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE

1- PREPARATION DE LA SOLUTION ENZYMATIQUE

Le contenu cellulaire de trois flacons est centrifugé à 1500 tr/mn pendant 5 mn et lavé 3 fois par une solution de NaCl 9 % .

Les cellules sont reprises par 500 μ l de tampon Tris/HCl 200 mM, pH 7,4, dithiotréitol (DTT) 2mM, puis homogénéisées à l'aide d'un Dounce (Kontes Glass, Vineland USA) par 30 coups de piston B, en bain de glace.

L'homogénat obtenu constitue la solution enzymatique.

Les protéines sont dosées par la méthode de LOWRY et al. 1951 (260), en utilisant la sérum albumine bovine comme témoin.

Le milieu d'incubation comprend 10 μ l de solution enzymatique, 10 μ l du tampon d'incubation approprié, 10 μ l de substrat à la concentration voulue. Après 15 heures d'incubation à 37°C, le milieu d'incubation est déposé en totalité sur papier Whatman N°3.

Après une nuit de migration dans le solvant pyridine/acétate d'éthyle/acide acétique/eau (5:5:1:3 en volume), le chromatogramme est séché puis examiné au scanner (NUMELEC, France). La zone comprenant le fragment GlcNAc-Asn [¹⁴C] libéré par l'endoglucosaminidase est repérée puis découpée en bandes de 1 cm de large, de même pour la zone comprenant les glycopeptides non dégradés et n'ayant pas migrés.

Les bandes de papier sont éluées par 200 μ l d'eau puis sont ajoutés 2 ml de liquide scintillant ("AQUALYTE", J.T. BAKER Chemical B.V., Deventer, Pays Bas).

Après agitation, la radioactivité est mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation liquide (Beckman LS 9000 - LS 1800).

Le pourcentage d'hydrolyse des glycopeptides est déterminé par le rapport : cpm dus au GlcNAc(β 1-)Asn [¹⁴C] libéré, sur le total des cpm mesurés.

L'activité enzymatique est exprimée en nmoles de GlcNAc(β 1-)Asn libérées par mg de protéine pour 15 heures d'incubation.

2- DOSAGE A pH NEUTRE

Le tampon d'incubation est un tampon MOPS/NaOH 100 mM pH 7,4, DTT 2mM. La concentration finale en substrat sialylé est de 0,2 mM (soit 6 nmoles/30 μ l) avec une radioactivité spécifique d'environ 2700 cpm/nmole (soit 16.000 cpm par incubation).

Le substrat N-acétyllactosaminique désialylé est utilisé à une concentration finale de 0,1 mM (soit 3nmoles/30 μ l) avec une radioactivité spécifique d'environ 1500 cpm/nmole (soit 4500 cpm par incubation).

Le substrat oligomannosidique est utilisé à une concentration de 0,1 mM (soit 3 nmoles/30 μ l) avec une radioactivité spécifique d'environ 3000 cpm/nmole (soit 9000 cpm par incubation).

3- DOSAGE EN FONCTION DU pH

Les cellules sont homogénéisées dans le tampon KG1 0,15M, Tris/HCl 10 mM pH 7,4, DTT 2 mM. Le tampon d'incubation est un tampon Citrate-Phosphate 0,1M de pH 4,0 à pH 7,0 avec des intervalles de 0,4 unités pH, contenant du DTT 2 mM.

Seul le substrat disialylé a été incubé, aux mêmes concentration et radioactivité spécifique que précédemment .

4- DOSAGE EN "CONCENTRATION SUPERIEURE" DU SUBSTRAT

Le tampon d'incubation est identique à celui utilisé lors du dosage à pH neutre. Le substrat disialylé est utilisé

à une concentration finale de 2 mM (au lieu de 0,2 mM) avec une radioactivité spécifique d'environ 500 cpm/nmole (soit 30.000 cpm par incubation).

III- RESULTATS

Aucune activité endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase vis-à-vis du glycopeptide de type N-acétyllactosaminique biantenné disialylé n'a été détectée dans les conditions utilisées dans les lignées normale et pathologique.

De même, nous n'avons pu mettre en évidence une activité "galacto"endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase vis-à-vis du glycopeptide de type N-acétyl lactosaminique biantenné désialylé.

Seule l'activité "manno"endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase vis-à-vis des glycopeptides de type oligomannosidique a pu être mesurée (l'activité s'élève à 21nmoles/mg/15 h pour les cellules de patient atteint de sialidose et 14 nmoles/mg/15h pour les cellules normales).

IV - CONCLUSION

L'absence d'activité "sialyl"endoglucosaminidase dans les cellules lymphoblastoïdes issues de patient atteint de sialidose est difficile à interpréter dans la mesure où l'activité "galacto"endoglucosaminidase est également absente des cellules issues d'individu sain et de patient atteint de sialidose.

Il est possible que les lignées lymphoblastoïdiques soient dénuées d'activité "sialyl" et "galacto" endogluco-saminidase, mais plus probablement l'ordre d'activité de ces enzymes est trop faible pour être mesuré dans les conditions expérimentales utilisées.

Ces résultats négatifs sont néanmoins en défaveur de l'hypothèse avancée par STRECKER quant à l'existence d'une activité "sialyl" endoglucosaminidase adaptative.

IIème PARTIE :

CARACTERISATION ET SPECIFICITE DE

L'ASPARTYL-N-ACETYL GLUCOSAMINIDASE DU FOIE DE RAT

CARACTERISATION ET SPECIFICITE DE L'ASPARTYL-N-ACÉTYLGLUCOSAMINIDASE DU FOIE DE RAT

I- INTRODUCTION

Dans les cas de glycoprotéinoses de type bovine, les oligosaccharides accumulés dans les tissus et les urines possèdent intact le chaînon di-N-acétylchitobiose. Ce fait est en faveur de l'action de l'aspartyl-N-acétylglucosaminidase lors de la première étape du catabolisme du glycanne des N-glycosylprotéines. Cette enzyme est en effet responsable de l'hydrolyse de la liaison asparaginy-N-acétylglucosamine.

L'aspartyl-N-acétylglucosaminidase n'agit que sur des glycoasparagines ; son action est donc postérieure à celle des protéases. S'il est établi que l'aspartyl-N-acétylglucosaminidase dégrade le motif GlcNAc(β 1-)Asn et les glycoasparagines oligomannosidiques de l'ovalbumine, son action sur des glycoasparagines sialylés et fucosylés n'a fait l'objet d'aucune étude publiée à ce jour.

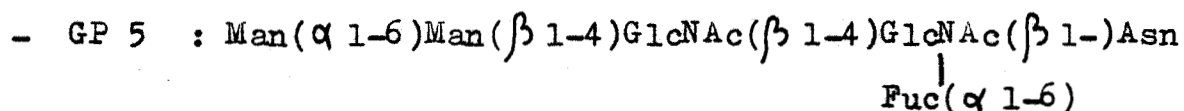
Nous avons vérifié la localisation cellulaire et le pH optimum d'action de l'aspartyl-N-acétylglucosaminidase du lysosome de foie de rat et avons étudié l'action de l'enzyme vis-à-vis de glycoasparagines neutres et sialylés.

II- MATERIELS ET METHODES

A- PREPARATION DES SUBSTRATS

1- GLYCOASPARAGINES URINAIRES

- GP 1 : GlcNAc(β 1-)Asn
- GP 1b : GlcNAc(β 1-)Asn-Ac
- GP 2 : Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-)Asn
- GP 3 : NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-)Asn
- GP 4 : Man(α 1-6)Man(β 1-4)GlcNAc(β 1-4)GlcNAc(β 1-)Asn



Ces glycoasparagines ont été isolés des urines de patients atteints d'aspartylglucosaminurie (GP1 , GP2, GP3, GP4) et de fucosidose (GP5) (MICHALSKI 1984 (261)). Le glycoasparagine GP1b est obtenu par acétylation de l'asparagine du GP1 . L'acétylation est réalisée à l'aide d'anhydride acétique (Merck, Darmstadt, R.F.A.) dans une solution saturée de bicarbonate de sodium.

- METHODES DE MARQUAGE RADIOACTIF

Le GP2 est marqué au tritium sur le résidu de galactose terminal. Le glycoasparagine est soumis à l'action de la galactose oxydase (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) (GATHMAN et AMINOFF 1981 (262)).

Le GP2 est ensuite réduit à l'aide de borohydrure de potassium tritié (KB^3H_4 ; 60 ci/mmole ; 5 mCi ; CEA, Saclay, France) puis de borohydrure de potassium froid (Merck). La radioactivité spécifique est d'environ 300.000 cpm/nmole.

Le GP 3 est marqué au tritium sur le résidu d'acide sialique terminal.

Le glycoasparagine est soumis à une oxydation periodique douce suivie d'une réduction au borohydrure de potassium tritié puis au borohydrure de potassium froid suivant la méthode de VAN LENTEN et ASHWELL 1973 (263). La radioactivité spécifique est d'environ 200.000 cpm/nmole.

2- GLYCOPEPTIDE DE TYPE N-ACETYLLACTOSAMINIQUE BIANTENNE DISIALYLE

Ce substrat est le même que celui utilisé lors de la recherche de la "sialyl"endoglucosaminidase.

3- GPA : Man₃GlcNAc₂Asn

Il s'agit du glycopeptide constituant le noyau pentasaccharidique du glycanne des N-glycosylprotéines :
Man(α 1-3) [Man(α 1-6)] Man(β 1-4)GlcNAc(β 1-4)GlcNAc(β 1-)Asn.

Les glycopeptides obtenus par digestion pronasique de la fraction IV de COHN (concentration de 10 mg/ml) sont incubés 24 h. à 37°C avec un mélange de glycosidases bactériennes fournies par S. BOUQUELET, que nous remercions. La solution enzymatique contient les activités α -neuraminidase α -fucosidase, β -galactosidase et β -N-acétylglucosaminidase. L'activité mannosidase étant absente, nous obtenons, à l'issue de la digestion enzymatique, des glycopeptides trimannosyl di-N-acétylchitobiose.

Les incubats sont rassemblés et les protéines sont précipitées lh. à 4°C par de l'éthanol à une concentration finale de 50% (V/V). Après centrifugation, le surnageant est concentré sous pression réduite et déposé sur une colonne de Biogel P4 (400 Mesh minus; Bio-Rad, Richmond, USA) de 1,5_mx 1cm. Après élution de la colonne avec de l'eau, les fractions contenant le glycopeptide majeur sont collectées.

Le glycoasparagine est séparé des glycopeptides par chromatographie descendante sur papier Whatman N°3 dans le système solvant acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau (5:5:1:3) durant 4 jours. La bande contenant le glycoasparagine est découpée, celui-ci est élué avec de l'eau, concentré sous pression réduite et lyophilisé.

4- GLYCOASPARAGINES DE TYPE OLIGOMANNOSIDIQUE
ET DE TYPE MIXTE

Nous avons fait agir l'aspartyl-Nacétylglucosaminidase sur un mélange de glycoasparagines obtenus par digestion pronasique de l'ovalbumine.

B- FRACTIONNEMENT CELLULAIRE

Des rats femelles Wistar (150-200 g) sont maintenus à jeun pendant 16 heures et sont tués par décapitation. Les foies sont rapidement prélevés et transférés dans le tampon d'homogénéisation maintenu à 0°C (Saccharose 0,25M ; MgCl₂ 5mM ; Hepes 10mM pH 7,5).

Les foies sont finement découpés et homogénéisés à l'aide d'un homogénéiseur de Potter (Elvehjem, R.F.A.) par 3 aller-retours de piston tournant à 500 trs/mn. L'homogénat est filtré sur gaze et complété à 25% (P/V) par le tampon d'homogénéisation.

Les fractions cellulaires sont obtenues suivant la méthode de DE DUVE et al. 1955 (264) à l'aide des rotors Beckman SW-27-1 et 60 TI sur une ultracentrifugeuse Beckman L5-65 (Beckman instruments inc., Palo Alto, USA).

Les différentes fractions cellulaires sont identifiées à l'aide des enzymes marqueurs suivantes : la 5' nucléotidase pour la membrane plasmique (SONG et BODANSKI 1967 (265)), la succinate deshydrogénase pour les mitochondries (PENNINGTON 1961 (266)), la glucose -6-phosphatase pour la fraction microsomale (SWANSON 1955 (267)), la N-acétyl- β -D-glucosaminidase pour les lysosomes. Le protocole de dosage est le suivant : 20 μ l de solution enzymatique, 20 μ l de tampon citrate-phosphate 0,1M pH 4,5, 20 μ l de PNP-N-acétyl- β -D-glucosamine 5mM (Koch Light laboratories, G.B.) dissous dans le tampon d'incubation. Après 20 mn d'incubation à 37°C, la réaction est arrêtée par 0,5 ml de carbonate de sodium 0,5 M. La densité optique est lue à 400 nm.

Le culot enrichi en lysosomes est obtenu après centrifugation du surnageant post-mitochondrial à la vitesse de 10.000 tr/mn pendant 15 mn à l'aide du rotor Beckman SW-27-1. Ce culot est repris par le tampon d'homogénéisation contenant 0,5 % de triton X 100 et constitue la solution enzymatique.

Les protéines sont dosées par la méthode de LOWRY et al. 1951 (268) en utilisant la sérum albumine bovine comme témoin.

C- METHODES DE DOSAGE

1- DOSAGE PAR COLORIMETRIE

Cette méthode s'applique aux substrats GP1 et GP1b. La N-acétylglucosamine libérée après incubation est dosée par colorimétrie par la méthode de REISSIG et al. 1955 (269) modifiée par LEVY et Mc. ALLAN 1959 (270).

2- DOSAGE PAR MESURE DE RADIOACTIVITE

Cette méthode s'applique aux substrats GP2 et GP3 marqués au tritium.

Après incubation, la réaction est arrêtée par chauffage à 100°C pendant 5 mn. Après centrifugation, une aliquote du surnageant est déposée sur couche mince de silice (Gel de silice 60 ; Merck, Darmstadt , R.F.A.) soumise à migration ascendante dans le solvant n-butanol/acide acétique/eau (2:1:1). Après séchage, le gel de silice des zones correspondant aux témoins oligosaccharidiques libérés, est gratté et élué par 500 μ l de tétra-éthyl-ammonium bromure (TEAB) (Merck) à 1% dans une solution de méthanol/eau (80:20), durant 1 heure (PAZ PARENTE 1984 (271)), de même pour les zones correspondant au substrat non dégradé.

Après centrifugation, 250 μ l de surnageant sont prélevés et séchés à l'étuve sous pression réduite afin d'éliminer le méthanol. Le résidu sec est repris par 250 μ l d'eau auxquels sont ajoutés 2,5 ml de liquide scintillant (Aqualyte ; J.T. Baker Chemicals B.V., Deventer, Pays-Bas) avant comptage en scintillation liquide.

Le pourcentage d'hydrolyse est donné par le rapport :
cpm dus à l'oligosaccharide libéré sur le total des
cpm mesurés.

3- DOSAGE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

Cette méthode s'applique au substrat GPA.

A l'issue du temps d'incubation, la réaction est arrêtée par chauffage à 100°C durant 5 mn. 1 µg de meso-inositol (Koch Light Laboratories, G.B.) est ajouté à chaque incubat en tant que témoin interne. Après centrifugation, le surnageant est déposé sur mini-colonne de 1 ml de résine échangeuse de cations AG 50 x 2 (400 mesh minus, forme H⁺ ; Bio Rad) ensuite lavée par 3 ml d'eau.

L'éluat contenant l'oligosaccharide libéré est concentré sous pression réduite pour être déposé sur une mini-colonne de 1 ml de résine échangeuse d'anion AG 1 x 2 (400 mesh minus, forme HCOO⁻ ; Bio-Rad) ensuite lavée par 3 ml d'eau.

L'éluat est concentré sous pression réduite puis lyophilisé. Le résidu est soumis à une méthanolyse acide (ZANETTA et al. 1972 (272)).

Les produits de méthanolyse sont silylés suivant la méthode de CHAMBERS et CLAMP 1971 (273) modifiée par GERWIG et al. 1984 (274). Le réactif de silylation utilisé est le BSTFA (bis-(triméthyl-silyl)trifluoroacétamide) (PIERCE ; Rockford, U.S.A.). Les échantillons sont analysés sur un chromatographe GIRDEL 300 (France) équipé d'une colonne capillaire de type CPTM Sil 5CB 0,22 mm Ø ,25 m. (Chrompack ; Pays Bas). Les conditions chromatographiques sont les suivantes : température du détecteur et de l'injecteur : 240°C ; gradient de température : 120 à 240°C, 2°C/mn ; gaz vecteur : hélium 0,6 bar.

Le nombre de nmoles libérées est calculé à partir de la quantité de mannose mesurée par référence au témoin interne.

4- SPECTROMETRIE DE MASSE PAR BOMBARDEMENT A L'AIDE D'ATOMES ACCELERES (FAB-MS)

Cette technique a été utilisée pour mettre en

évidence la libération d'un oligosaccharide disialylé après action de l'aspartyl-N-acétylglucosaminidase sur le glycopeptide de type N-acétyllactosaminique biantenné disialylé.

Le milieu d'incubation est constitué par 40 μ l de solution enzymatique, 40 μ l de tampon phosphate 0,1M pH 7,5 et 40 μ l de substrat (5 mg dissous dans 1 ml d'eau).

Après 16 heures d'incubation à 37°C, les incubats sont rassemblés et les lipides et les protéines sont extraits par une solution de chloroforme/méthanol (2:1), ceci trois fois.

La fraction aqueuse est concentrée sous pression réduite et soumise à une chromatographie de tamisage moléculaire sur Biogel P₄ (1,5 m x 1 cm ; Bio Rad). Les fractions contenant respectivement les glycopeptides et les oligosaccharides sont rassemblées, concentrées sous vide et lyophilisées.

Les oligosaccharides sont méthylés en utilisant la méthode de FINNE et al. 1980 (275) et analysés par spectrométrie de masse par bombardement à l'aide d'atomes accélérés (FAB-MS). L'analyse a été conduite au laboratoire du Professeur H. EGGE (Institut Für Physiologische Chemie, Universität Bonn, R.F.A.) sur un spectromètre de masse à géométrie inversée ZAB HF (VG analytical, Manchester, G.B.).

Les oligosaccharides perméthylés (3 à 5 μ g) sont dissous dans du méthanol (1 μ l) et déposés sur une matrice de thioglycérol avant bombardement par des atomes de Xénon.

5- CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE DE SILICE

Cette méthode a été utilisée pour l'étude qualitative de l'action de l'aspartyl-N-acétyl glucosaminidase sur les glycoasparagines GP4 et GP5, ainsi que sur les glycoasparagines d'ovalbumine.

Le milieu d'incubation est constitué par 20 μ l de solution enzymatique préincubée 5 h à 60°C (voir paragraphe "stabilité à la chaleur"), 20 μ l de tampon phosphate 0,1 M pH 7,5, 20 μ l de substrat GP4 ou GP 5 (3mg/ml).

Après incubation 16 h à 37°C, la réaction est arrêtée

par chauffage à 100°C durant 5 mn. Les incubats sont centrifugés et une aliquote du surnageant (10 μ l) est déposée sur couche mince de silice (silicagel 60 ; Merck). Après migration ascendante dans le solvant *n*-butanol/acide acétique/eau (20:10:15) la plaque de couche mince est séchée puis révélée au réactif orcinol sulfurique. Pour l'étude de l'activité enzymatique vis-à-vis des glycoasparagines d'ovalbumine, la migration a lieu dans le solvant *n*-butanol/acide acétique/eau (2:1:1) et est répétée 3 fois.

D - INFLUENCE DU pH

Le milieu d'incubation comprend 20 μ l de solution enzymatique, 20 μ l de tampon de pH 4,5 à pH 10 (citrate phosphate 0,1M pH 4,5 à pH 7,0 ; phosphate 0,1M pH 7,0 à pH 8,0 ; glycolle NaOH 0,1M pH 8,5 à pH 10), 20 μ l de substrat GP1 (10 mg/ml). L'incubation dure 20 mn, à 37°C.

L'activité aspartamidase est dosée par la méthode colorimétrique.

E- STABILITE A LA CHALEUR

L'activité aspartyl-N-acétylglucosaminidase est dosée dans des solutions enzymatiques ayant subi une préincubation à 60°C durant des temps allant de 1 à 6 heures. Les conditions d'incubation et de dosage sont identiques à celles utilisées pour l'étude de l'influence du pH. Le pH du tampon d'incubation est de 7,5. Parallèlement à l'aspartyl-N-acétylglucosaminidase, nous avons dosé l' α -mannosidase. Le protocole de dosage est le même que celui utilisé pour la N-acétyl- β -D-glucosaminidase, en utilisant le PNP- α -D-mannose comme substrat (voir paragraphe "fractionnement cellulaire").

F- DETERMINATION DES PARAMETRES CINETIQUES

Nous avons déterminé les K_m et V_m de l'aspartyl-N-acétylglucosaminidase pour les substrats GP1, GP2, GP3 et GPA.

La composition du milieu d'incubation est la suivante : $20 \mu\text{l}$ de solution enzymatique (concentration en protéines de 10 mg/ml environ), $20 \mu\text{l}$ de tampon phosphate 0,1M pH 7,5, $20 \mu\text{l}$ de substrat à la concentration adéquate.

Dans le cas de l'étude des paramètres cinétiques pour le substrat GP2, le tampon d'incubation contient de la L-galactono-1,4-lactone (Sigma), un inhibiteur de la β -galactosidase, à la concentration de 30 mM.

Dans le cas de l'étude des paramètres cinétiques pour le substrat GPA, l'utilisation d'inhibiteur de mannosidase pouvait gêner l'analyse en chromatographie en phase gazeuse, aussi avons nous choisi d'utiliser une solution enzymatique préincubée 6 h à 60°C.

Le culot enrichi en lysosomes est ici lavé deux fois par une solution de KCl 0,15M avant d'être repris par la même solution contenant 0,5% de triton X100. Le saccharose est ainsi éliminé, ceci afin d'éviter toute interférence au cours des différentes méthodes de dosage.

L'incubation dure 20 mn à 37°C et la réaction est arrêtée par chauffage à 100°C pendant 5 mn.

L'activité aspartyl-N-acétylglucosaminidase est dosée par les méthodes adaptées à chaque type de substrat (colorimétrie pour GP1, dosage de radioactivité après chromatographie sur couche mince pour GP2 et GP3, chromatographie en phase gazeuse pour GPA).

Les activités sont exprimées en nmoles/h/mg de protéines, les K_m et V_m pour les différents substrats sont déterminés par la méthode graphique de LINEWEAVER et BURK 1934 (276).

III- RESULTATS

A- LOCALISATION CELLULAIRE

Les résultats sont exposés dans la figure 14, présentant les profils de distribution de l'aspartyl-N-acétylglucosaminidase et de la PNP- β -hexosaminidase ainsi que dans le tableau V présentant les pourcentages d'activité des deux enzymes dans les différentes fractions cellulaires.

L'activité aspartyl-N-acétylglucosaminidase présente une activité spécifique relative optimale dans la fraction enrichie en lysosomes, le profil de distribution subcellulaire de l'activité enzymatique étant du même type que le profil de distribution subcellulaire de l'activité PNP- β -hexosaminidase, enzyme marqueur de la fraction lysosomale.

Ce résultat confirme les observations de MAHADEVAN et TAPPEL 1967 (277) et OHGUSHI et YAMASHINA 1968 (278)).

B- INFLUENCE du pH

Les résultats sont exposés dans la figure 15. L'activité est optimale à pH 7,5-8 dans le tampon phosphate 0,1M. MAHADEVAN et TAPPEL 1967 (279) ont trouvé un pH optimum de 7,5.

C- STABILITE A LA CHALEUR

L'aspartyl-N-acétylglucosaminidase de foie de rat présente une grande stabilité à la chaleur, en regard des exoglycosidases. A l'issue de 6 heures de préincubation à 60°C, l'activité résiduelle correspond à 92% de l'activité initiale, à pH 7,5. En comparaison, l'activité PNP- α -mannosidase ne correspond plus qu'à 9% de l'activité initiale, à pH 4,5, ce qui suppose une activité négligeable à pH 7,5. Ces résultats sont schématisés dans la figure 16.

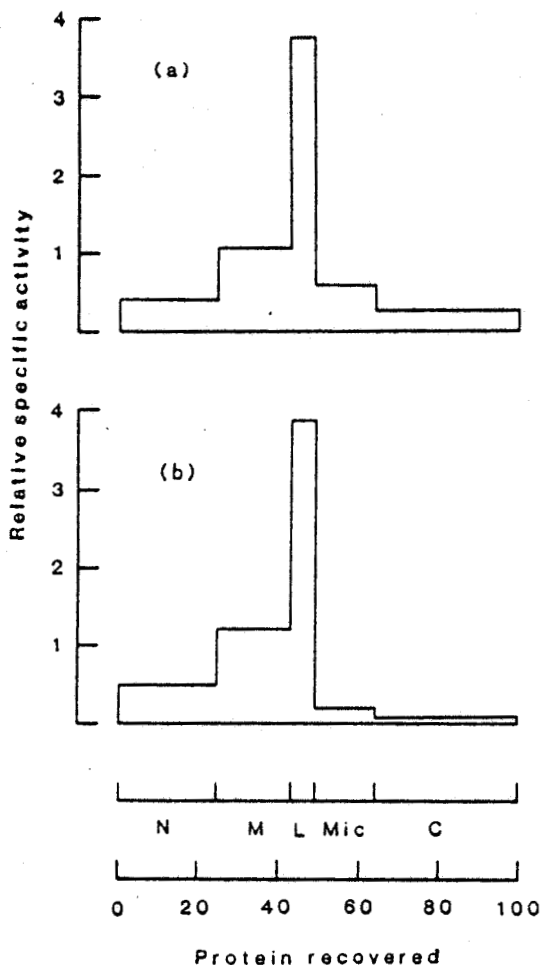


FIGURE 14

Profils de distribution cellulaire des activités : (a) aspartyl-N-acétylglucosaminidase, (b) PNP- β -hexosaminidase (N : fraction nucléaire ; M : fraction mitochondriale ; L : fraction lysosomale ; Mic : fraction microsomale ; C : fraction cytosolique).

	N	M	L	Mic	C	Total
- Aspartyl-N-acétylglucosaminidase	14	28	29	15	9	95
- PNP- β -hexosaminidase	17	33	36	2	4	92

TABLEAU V

Répartition des activités enzymatiques dans les différentes fractions cellulaires. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à l'activité dans l'homogénat.

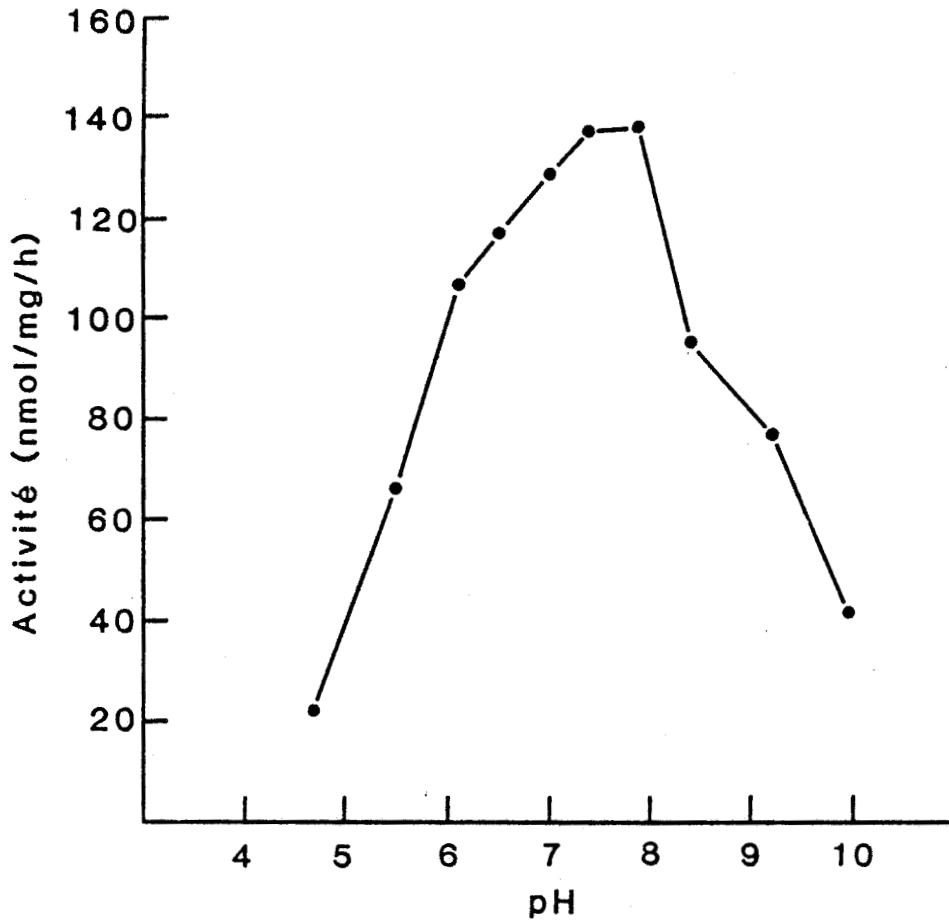


FIGURE 15

Influence du pH sur l'activité aspartyl-N-acétylglucosaminidase



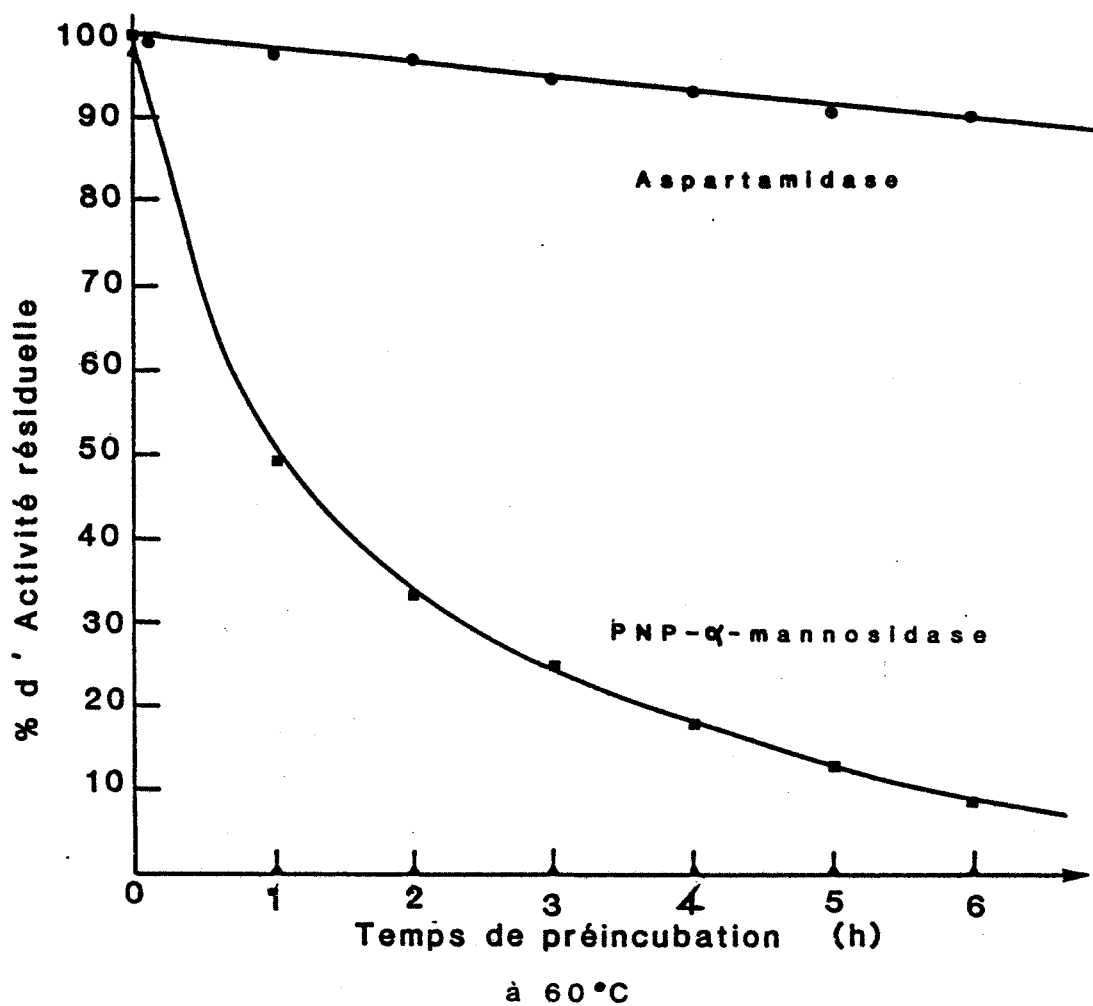


FIGURE 16

Stabilité à la chaleur des activités aspartyl-N-acétylglucosaminidase et PNP- α -mannosidase



D- SPECIFICITE DE L'ASPARTYL-N-ACETYL GLUCOSAMINIDASE

1- ACTION SUR LE GlcNAc(β 1-)Asn ACETYLE

Aucune activité n'a été mesurée à l'issue de 2 heures d'incubation à 37°C. Ce résultat confirme que la fonction NH₂ en α de l'asparagine doit être libre pour que la réaction enzymatique puisse s'effectuer.

2- ACTION SUR LES GLYCOASPARAGINES D'OVALBUMINE

A l'issue de 16 heures d'incubation à 37°C, la quasi totalité des glycoasparagines ont été dégradés comme le montre la figure 17.

Les α -mannosidases étant dénaturées par la chaleur, le déplacement observé en chromatographie sur couche mince ne peut être imputé qu'à l'action de l'aspartyl-N-acétylglucosaminidase.

3- ACTION SUR LES GLYCOASPARAGINES GP4 ET GP5

Le glycoasparagine GP4 (Man₂GlcNAc₂Asn) est totalement dégradé par l'enzyme à l'issue de 16 heures d'incubation à 37°C. Par contre, le même glycoasparagine fucosylé en α 1-6 sur l'osamine du point d'attache (GP5 : Man₂GlcNAc₂FucAsn) reste intact, comme le montre la figure 18.

4- ACTION SUR LE GLYCOPEPTIDE DE TYPE
N-ACETYLLACTOSAMINIQUE BIANTENNE DISIALYLE

Après action de l'aspartyl-N-acétylglucosaminidase, deux oligosaccharides ont pu être mis en évidence par FAB-MS (figure 19).

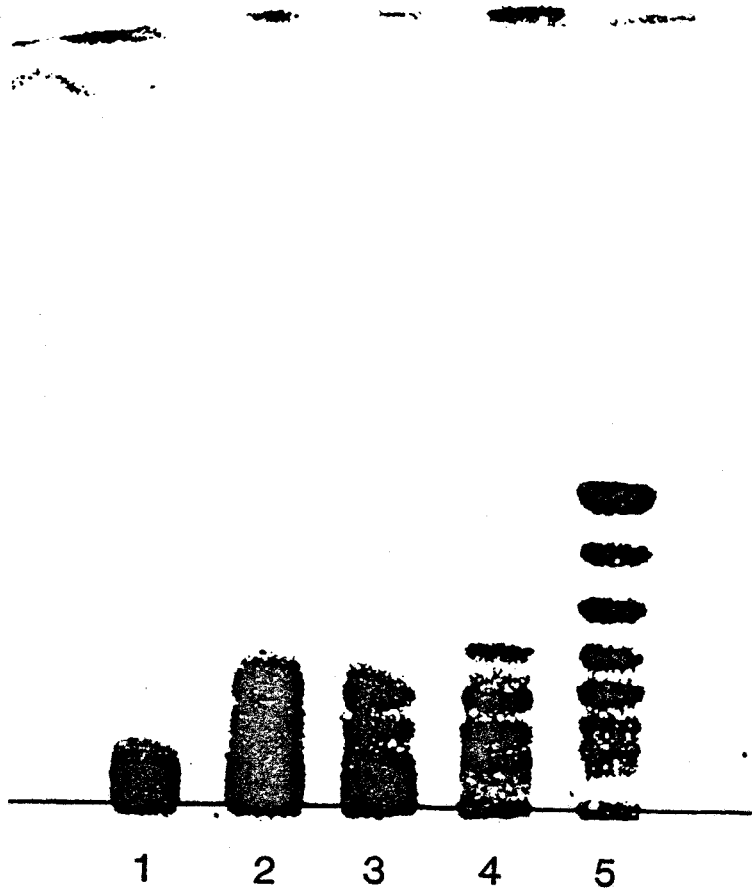


FIGURE 17

Action de l'aspartyl-N-acétylglycosaminidase sur les glycopeptides de l'ovalbumine (1 : témoin substrat; 2-3-4 : incubation 2 h, 4 h et 16 h à 37°C ; 5 : témoins mannosides urinaires (Man₂GlcNAc à Man₉GlcNAc))

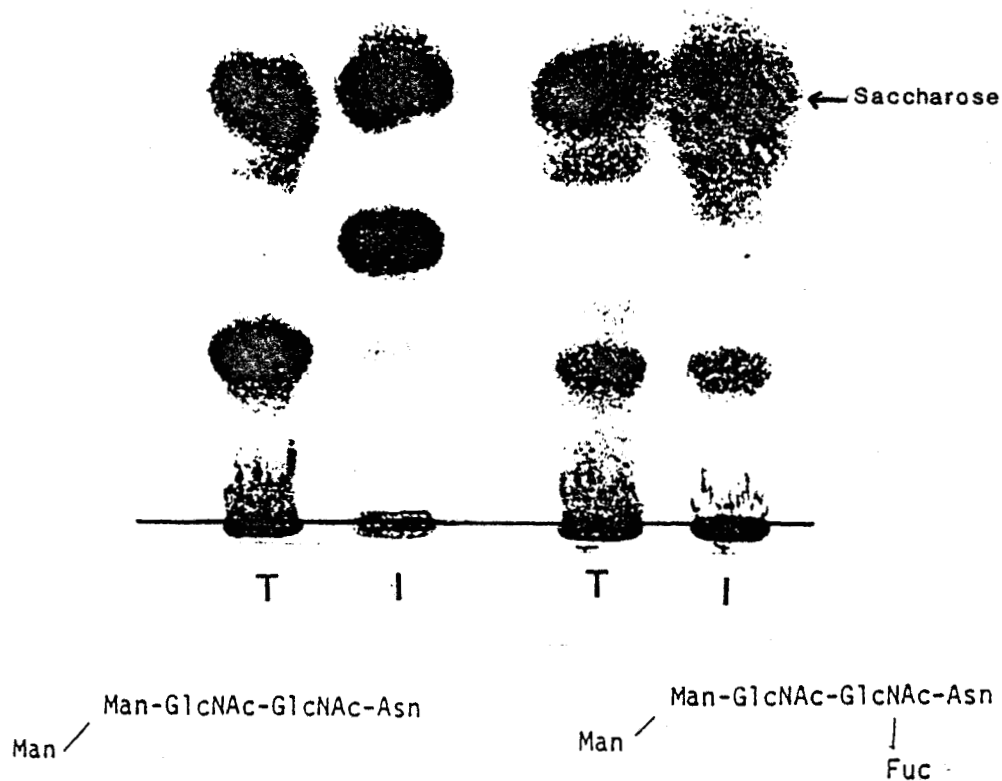


FIGURE 18

Action de l'aspartyl-N-acétylglucosaminidase sur les glycoasparagines $\text{Man}_2\text{GlcNAc}_2\text{Asn}$ et $\text{Man}_2\text{GlcNAc}_2\text{FucAsn}$.
(T : témoin substrat, I : incubation)



L'ion moléculaire m/z 2791 ($M+Na^+$) correspond à l'oligosaccharide biantenné disialylé perméthylé possédant intact le chaînon di-N-acétylchitobiose. L'ion moléculaire adjacent m/z 2792 ($M+Na^+$) est dû à l'effet isotopique du ^{13}C .

L'ion moléculaire m/z 2777 ($M+Na^+$) résulte du départ d'un radical méthyl.

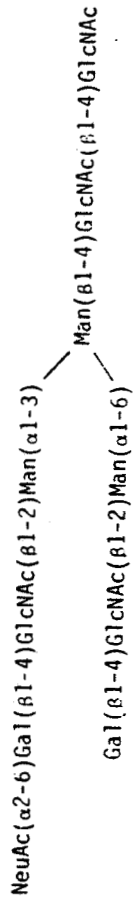
L'ion moléculaire m/z 2430 ($M+Na^+$) correspond à un oligosaccharide biantenné monosialylé perméthylé.

Ces résultats montrent sans ambiguïté que l'aspartyl-N-acétylglucosaminidase est capable de dégrader des structures de type N-acétyllactosaminique mono et disialylées.

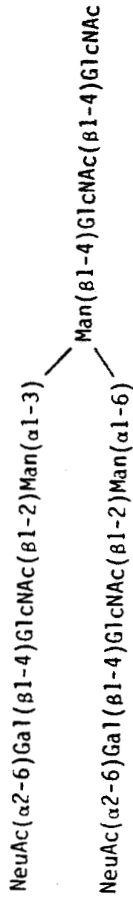
E- DETERMINATION DES PARAMETRES CINETIQUES

Les K_m et V_m de l'aspartyl-N-acétylglucosaminidase pour les différents substrats étudiés sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Substrats		K_m (mM)	V_m (nmoles/mg/h)
GlcNAc(β 1-)Asn	(GP1)	1,1	145
Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-)Asn	(GP2)	0,083	67
NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-)Asn	(GP3)	0,51	198
$\begin{array}{l} \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \diagdown \\ \text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-)\text{Asn} \\ \diagup \\ \text{Man}(\alpha 1-6) \end{array}$	(GPA)	0,82	91



$M + Na^+ = 2430$



$M + Na^+ = 2791$

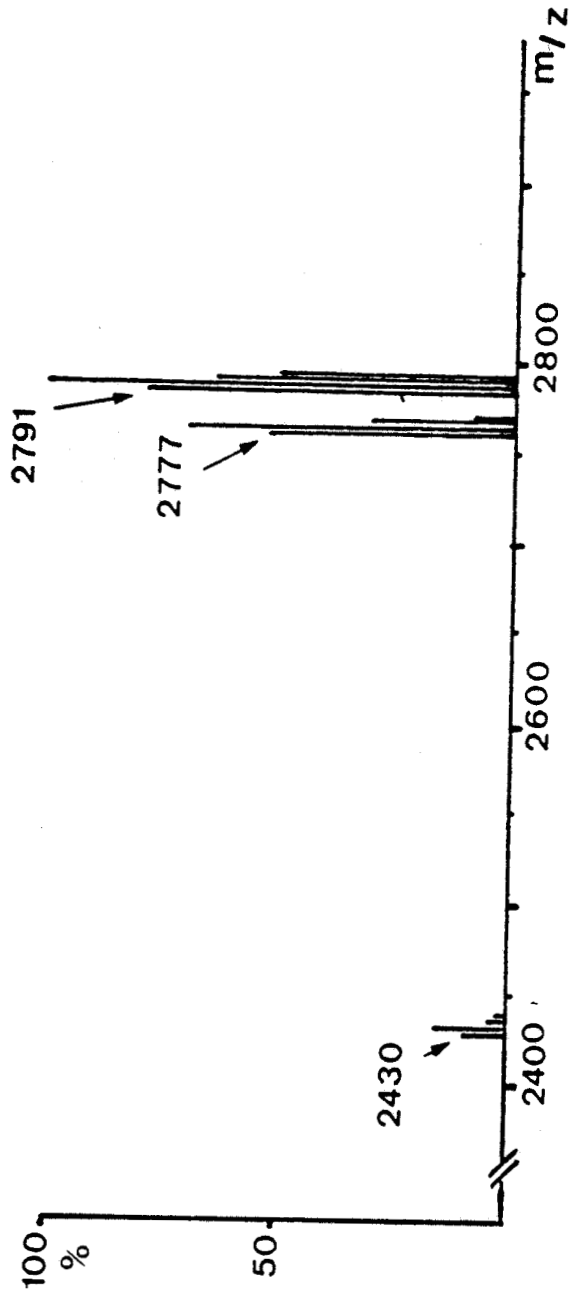


FIGURE 19

Spectre FAB-MS des produits de réaction de l'aspartyl-N-acétyl-
 glucosaminidase sur un glycopeptide sialylé



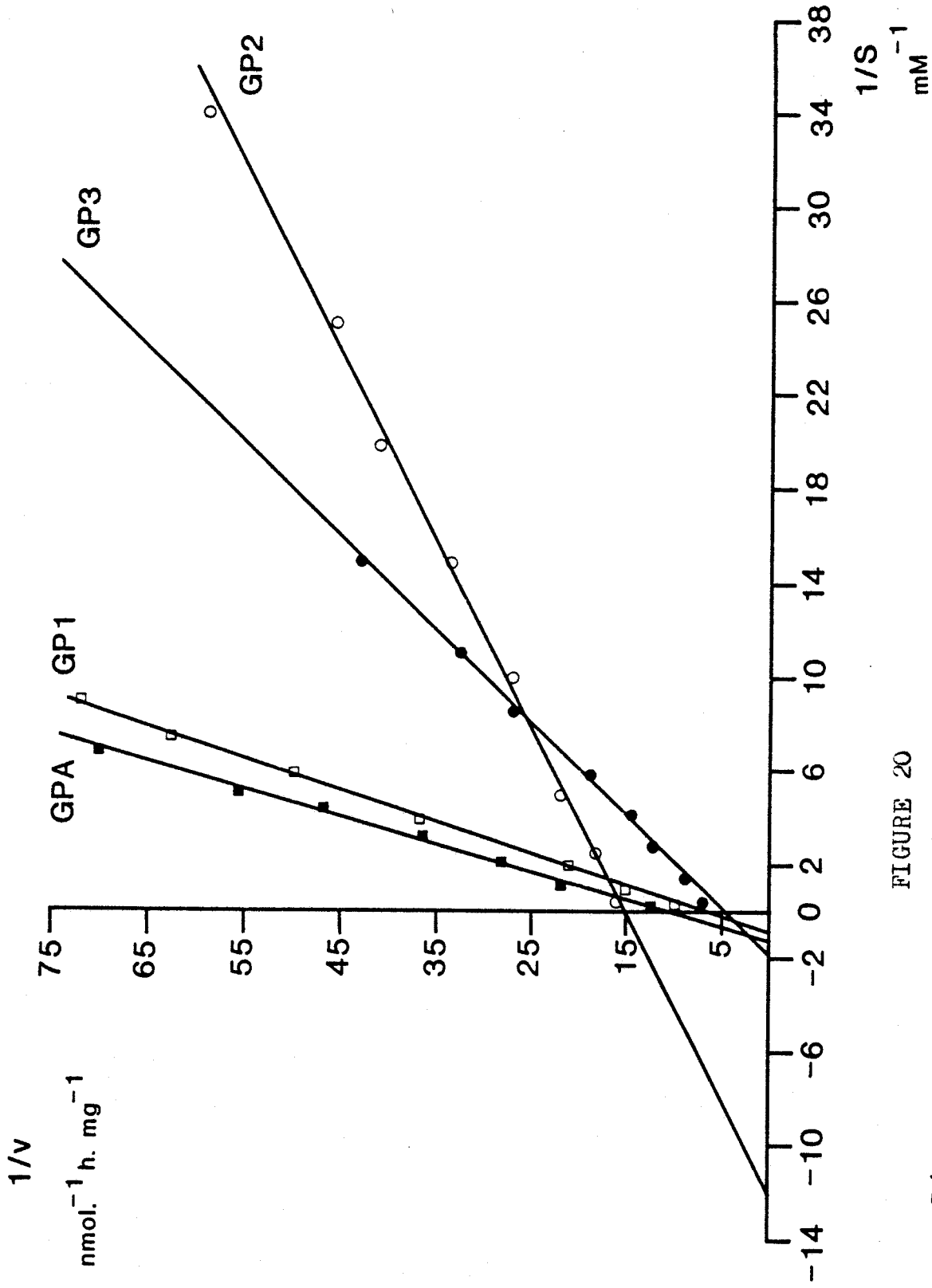


FIGURE 20
Détermination des paramètres cinétiques de l'aspartyl-N-acétyl-
glucosaminidase selon la représentation de LINEWEAVER et BURK



Ces valeurs ont été déterminées à partir de la représentation graphique de LINEWEAVER et BURK 1934 (280) (figure 20). Nos observations montrent que l'aspartyl-N-acétylglucosaminidase est une enzyme Michaelienne.

La présence d'acide sialique n'affecte pas, semble-t-il, l'activité aspartyl-N-acétylglucosaminidase, la valeur du V_m la plus élevée ayant été trouvée pour le glycoasparagine sialylé GP3. Néanmoins, l'affinité de l'enzyme est supérieure pour le substrat GP2, correspondant au GP3 désialylé.

Le glycoasparagine GP2 constitue un très bon substrat pour l'aspartyl-N-acétylglucosaminidase qui présente l'activité la plus élevée en présence de ce type de substrat, lorsqu'il est utilisé à de faibles concentrations (de l'ordre de 0,05mM).

L'aspartyl-N-acétylglucosaminidase possède une affinité légèrement plus importante pour le substrat GPA que pour le substrat GP1. Par contre, le GP1 est plus rapidement hydrolysé. Rappelons que KHONO et YAMASHINA 1972 (281) trouvaient des vitesses d'hydrolyse plus élevées pour les glycoasparagines d'ovalbumine.

Il ne semble pas y avoir de liens entre, d'une part, les paramètres cinétiques, et d'autre part, la taille et l'encombrement de la partie glucidique des glycoasparagines.

IV- CONCLUSION

Nous avons confirmé les résultats déjà publiés concernant la localisation lysosomale de l'enzyme et son pH optimum d'action (MAHADEVAN et TAPPEL 1967 (282), OHGUSHI et YAMASHINA 1968 (283)).

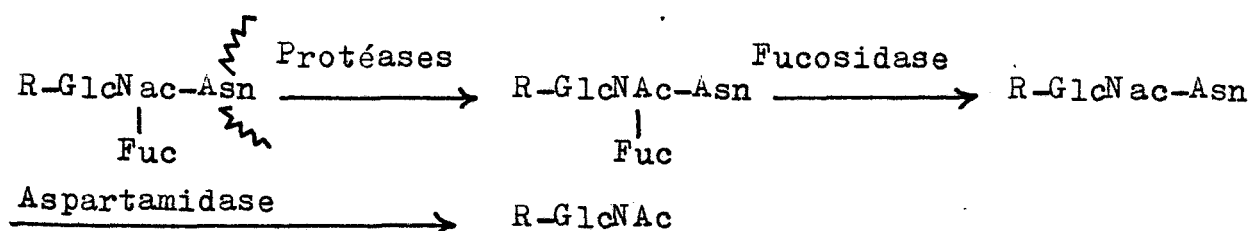
Nous savons que l'aspartyl-N-acétylglucosaminidase n'agissait que sur des glycoasparagines, la substitution des fonctions NH_2 et $COOH$ en α de l'asparagine entraînant la disparition de l'activité enzymatique. Ceci est confirmé par le fait que l'acétylation de la fonction NH_2 en α de l'asparagine se traduit par l'absence d'activité enzymatique.

L'ordre d'activité de l'aspartyl-N-acétylglucosaminidase est très supérieur à l'ordre d'activité des

exoglycosidases. Ainsi, la neuraminidase du lysosome de foie humain présente une activité de l'ordre de 0,5 nmole/h/mg de protéines (MICHALSKI 1984 (284)). L'aspartyl-N-acétylglucosaminidase agit donc vraisemblablement avant les exoglycosidases.

L'enzyme dégrade tous les types de glycoasparagines, y compris les sialylglycoasparagines. La seule exception concerne les glycoasparagines fucosylés en α 1-6 sur l'osamine du point d'attache.

La fucosidase semble donc jouer un rôle essentiel dans les premières étapes du catabolisme du glycanne des N-glycosylprotéines. La séquence des événements intervenant dans les premières étapes de dégradation des glycanne peut être schématisée ainsi :



L'aspartyl-N-acétylglucosaminidase joue donc un rôle primordial dans le déclenchement du catabolisme du glycanne des N-glycosylprotéines alors qu'elle a été longtemps considérée comme responsable de la dernière étape de dégradation des glycanne, son rôle étant limité à l'hydrolyse du chaînon GlcNAc(β 1-)Asn (figure 9).

L'aspartyl-N-acétylglucosaminidase, en étant capable de dégrader des structures sialylées, possède un rôle plus important dans le catabolisme des N-glycosylprotéines que celui de l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase cytosolique, dont l'action se limite à la dégradation de structures désialylées.

III^{ème} PARTIE :

CARACTERISATION D'UNE ENDO-N-ACETYL- β -D-GLUCOSAMINIDASE
LYSOSOMALE SPECIFIQUE DES OLIGOSACCHARIDES POSSEDANT
LE RESIDU N,N'-DI-N-ACETYLCHITOBIOSE

CARACTERISATION D'UNE ENDO-N-ACÉTYL- β -D-GLUCOSAMINIDASE
LYSOSOMALE SPECIFIQUE DES OLIGOSACCHARIDES POSSEDANT LE
RESIDU N,N'-DI-N-ACÉTYLCHITOBIOSE

I- INTRODUCTION

L'étude structurale des oligosaccharides excrétés dans les urines des patients atteints de glycoprotéinoses a montré que tous les oligosaccharides possédaient un seul résidu de N-acétylglucosamine en position terminale réductrice (STRECKER et MONTREUIL 1979 (285)).

Cette observation a conduit à l'hypothèse de l'action de l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase lors de la première étape du catabolisme du glycanne des N-glycosylprotéines (NISHIGAKI et al. 1974 (286), MONTREUIL 1975 (287)). Cependant, l'activité endoglucosaminidase vis-à-vis de glycopeptides est essentiellement localisée au niveau du compartiment cytosolique (PIERCE et al. 1979 (288), 1980 (289)).

Dans les lysosomes, la libération d'oligosaccharides à partir de glycopeptides est catalysée par l'aspartyl-N-acétylglucosaminidase.

Nous avons caractérisé dans le compartiment lysosomal du foie de rat, une nouvelle activité endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase qui hydrolyse spécifiquement le résidu N,N'-di-N-acétylchitobiose des oligosaccharides libérés après action de l'aspartyl-N-acétylglucosaminidase. L'existence d'une telle activité au sein du lysosome peut expliquer la présence d'oligosaccharides possédant un seul résidu de N-acétylglucosamine en position terminale réductrice dans l'urine et les tissus des patients atteints de glycoprotéinoses.

II- MATERIELS ET METHODES

A- PREPARATION DES SUBSTRATS

Le glycoasparagine $\text{Man}(\alpha 1-3) [\text{Man}(\alpha 1-6)] \text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-)\text{Asn}$ (GPA) est préparé comme indiqué dans l'étude sur l'aspartyl-N-acétylglucosaminidase.

Le GPA est marqué par acétylation de la fonction NH_2 libre de l'asparagine à l'aide d'anhydride acétique [^{14}C] ($0,1\text{mCi}$, 7mCi/nmole ; CEA, Saclay, France) (KOIDE et MURAMATSU 1974 (290)).

L'oligosaccharide $\text{Man}(\alpha 1-3) [\text{Man}(\alpha 1-6)] \text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$ (OLB) est préparé par action de l'aspartyl-N-acétylglucosaminidase du foie de rat sur le glycopeptide GPA. Les conditions d'incubation sont les mêmes que celles utilisées pour la dégradation du glycopeptide biantenné disialylé par l'aspartyl-N-acétylglucosaminidase.

Après arrêt de la réaction enzymatique, l'incubat est centrifugé et le surnageant est déposé sur résine échangeuse de cations AG 50x2 (400 mesh minus, forme H^+ ; Bio-Rad, Richmond, USA). L'oligosaccharide OLB est élué par de l'eau ; les sels et les protéines résiduelles sont éliminés par tamisage moléculaire sur Biogel P_4 (Bio-Rad). Le substrat OLB marqué au ^{14}C est obtenu après hydrazinolyse et réacétylation à l'anhydride acétique [^{14}C] du GPA selon la méthode de BAYARD et al. 1979 (291).

B- FRACTIONNEMENT CELLULAIRE

Le protocole est identique à celui utilisé dans l'étude de l'aspartyl-N-acétylglucosaminidase.

La fraction enrichie en lysosomes est préparée de

manière identique. Elle est reprise par le tampon d'incubation contenant 0,5% de triton X 100 et constitue la solution enzymatique.

C- DOSAGE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE

Le milieu d'incubation est constitué par 20 μ l de solution enzymatique dans le tampon d'incubation 0,5% de triton X 100, 20 μ l de tampon d'incubation, 20 μ l du substrat OLB [^{14}C] 3,3mM (environ 140 cpm/nmole, 9000 cpm par incubation) Le milieu d'incubation contient de la L-mannono-1,4-lactone à une concentration finale de 10mM afin d'inhiber les mannosidases. En dosage de routine, le tampon d'incubation est un tampon citrate-phosphate 0,1M pH 3,5.

L'activité endoglucosaminidase vis-à-vis de l'OLB [^{14}C] est dosée de la manière suivante :

après deux heures d'incubation à 37°C, la réaction est arrêtée par chauffage à 100°C pendant 5 mn. Après centrifugation, le surnageant est déposé sur papier Whatman N°3, soumis à migration descendante dans le solvant butanol/acide acétique/eau (4:1:5) pendant une nuit. La zone contenant le GlcNAc [^{14}C] est découpée en bandes d'un cm de large et la radioactivité est mesurée par comptage en scintillation liquide après avoir ajouté 1 ml de liquide scintillant ("Lipoluma", J.T. BAKER, Deventer, Pays Bas).

L'activité endoglucosaminidase vis-à-vis du GPA [^{14}C] est dosée suivant la méthode utilisée dans la recherche de l'activité "sialyl"endoglucosaminidase.

L'activité est exprimée en nmoles/h/mg de protéines. Ces dosages ont été réalisés en collaboration avec P. APPOURCHEAU du groupe de G. SPIK.

Les produits de la réaction enzymatique sont également soumis à une chromatographie sur couche mince de silice (silicagel 60 ; Merck, Darmstadt, R.F.A.) dans le solvant n-butanol/acide acétique/eau (2:1:1,5) puis révélés par le réactif orcinol-sulfurique.

D- INFLUENCE DU pH

La fraction enrichie en lysosomes est reprise par les tampons d'incubation aux pH adéquats. Les tampons d'incubation suivants ont été utilisés : pH 2,2 et 2,5 Gly-HCl 0,1M ; pH 3,0 à 7,0 citrate-phosphate 0,1M.

E- ANALYSE DES PRODUITS DE REACTION PAR RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE DU PROTON A 400 MHz

2,5 mg d'OLB sont soumis à l'action de l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase lysosomale à pH 3,5 pendant 2 heures à 37°C.

L'oligosaccharide libéré par réaction enzymatique (OLC) est ensuite séparé de l'oligosaccharide OLB non dégradé par tamisage moléculaire sur une colonne de Biogel P₄ (1,5 m x 1 cm); 1,5 mg d'OLC ont été ainsi obtenus.

Nous avons comparé les spectres RMN des composés GPA, OLB et OLC.

Les solutions de glycopeptides et d'oligosaccharides sont échangées plusieurs fois dans de l'eau deutériée D₂O (CEA, France) avec des étapes intermédiaires de lyophilisation. L'analyse spectrale des solutions (environ 3mM) des composés dans D₂O (99,95%, CEA) est réalisée sur un spectromètre Bruker AM-400 WB, opérant en transformée de Fourier avec une température de sonde de 300°K.

Les glissements chimiques sont mesurés par rapport au sodium-2,2-diméthyl-2-silapentane-5-sulfonate (indirectement par rapport à l'acétone dans D₂O : $\delta = 2,225$ ppm). L'interprétation des spectres a été réalisée selon VLIEGENTHART et al. 1983 (292).

III- RESULTATS

A- LOCALISATION CELLULAIRE

Le profil de distribution de l'activité endoglucosaminidase vis-à-vis du substrat OLB à pH 3,5 est analogue au profil de distribution de la PNP- β -hexosaminidase, enzyme marqueur du lysosome (figure 21, Tableau VI).

Ceci différencie cette enzyme de l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase préalablement décrite dans le foie de rat (PIERCE et al. 1979 (293), 1980 (294)).

B- INFLUENCE DU pH

Les résultats sont présentés dans la figure 22. L'activité est optimale à pH 3,5 dans le tampon d'incubation citrate-phosphate 0,1M.

Ce résultat distingue également l'enzyme de l'endoglucosaminidase du cytosol dont le pH optimum d'activité est de 7,5 et qui est inactive à pH 3,5.

C- DOSAGE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE AVEC LES SUBSTRATS GPA ET OLB

Nos résultats sont rassemblés dans le Tableau VII.

L'activité spécifique de l'endoglucosaminidase lysosomale mesurée à pH 3,5 est de 61 nmoles/h/mg pour une concentration finale en substrat de 1,1mM. En chromatographie sur couche mince, l'oligosaccharide libéré migre comme le témoin Man₃GlcNAc purifié d'urine de patient atteint de mannosidose (STRECKER et al. 1976 (295)) (figure 23). Dans les mêmes conditions, l'endoglucosaminidase lysosomale est inactive sur le substrat GPA [¹⁴C]. Le substrat GPA froid

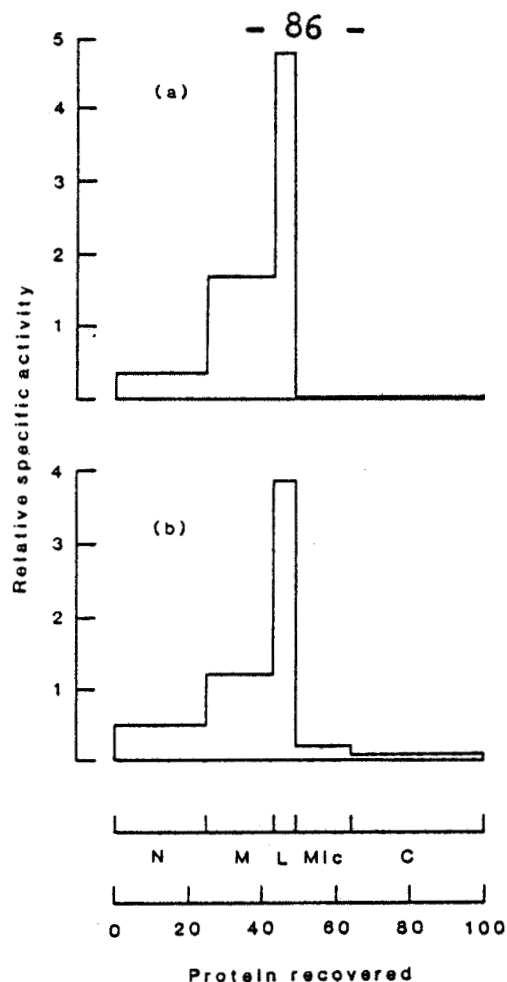


FIGURE 21

Profil de distribution cellulaire des activités : a) endo-N-acétyl-β-D-glucosaminidase, b) PNP-β-hexosaminidase. (N : fraction nucléaire ; M : fraction mitochondriale ; L : fraction lysosomale ; Mic : fraction microsomale ; C : fraction cytosolique)

	N	M	L	Mic	C	Total
-Endo-N-acétyl-β-D-glucosaminidase	18	38	35	-	-	91
-PNP-β-hexosaminidase	17	33	36	2	4	92



TABLEAU VI

Répartition des activités enzymatiques dans les différentes fractions cellulaires. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à l'activité dans l'homogénat.

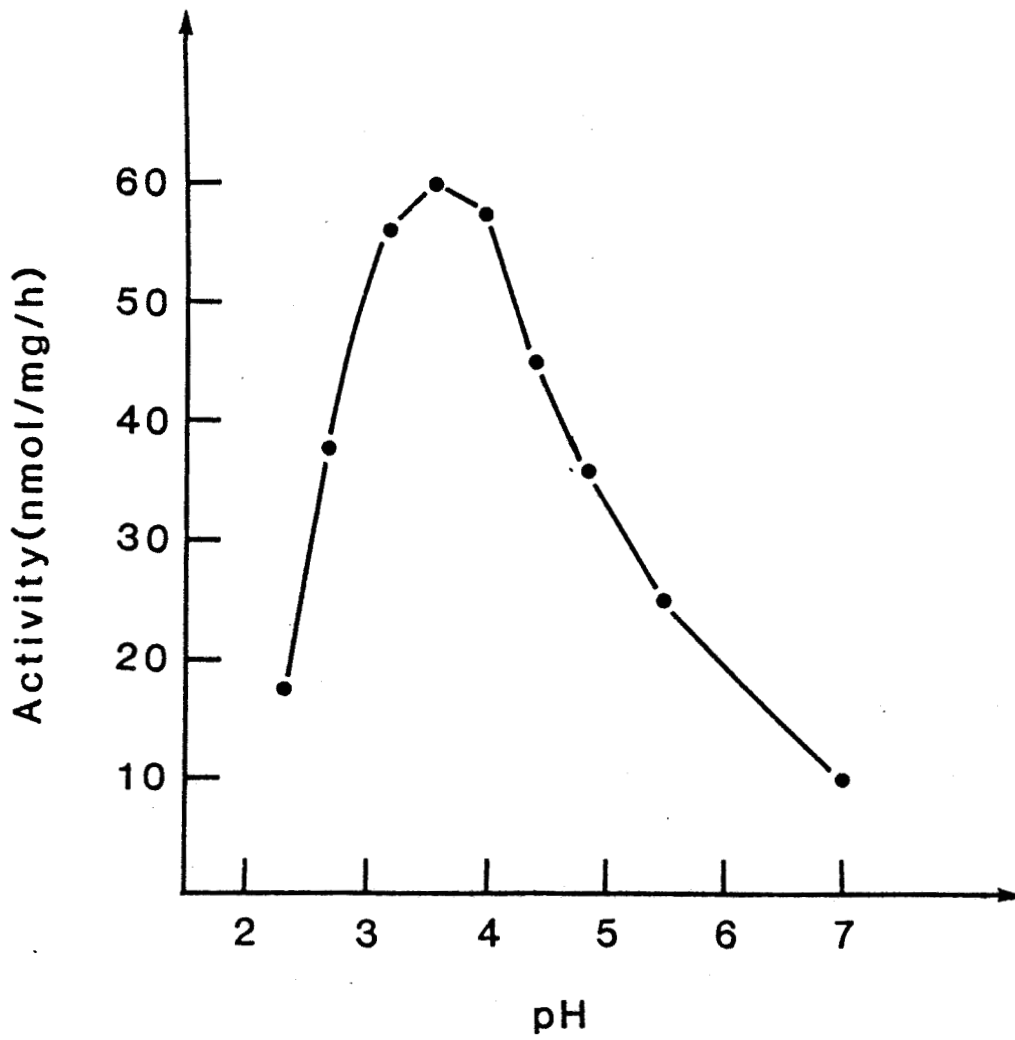


FIGURE 22

Influence du pH sur l'activité endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase lysosomale.

n'est pas non plus dégradé comme le montre la chromatographie couche mince (figure 23).

Dans la fraction cytosolique, aucune activité endoglucosaminidase n'est détectée à pH 3,5 en utilisant les substrats GPA et OLB. Par contre à pH 7,5 (tampon d'incubation phosphate 0,1M) l'oligosaccharide OLB est dégradé à la vitesse de 33 nmoles/h/mg de protéines pour une concentration finale en substrat de 1,1mM. Ceci confirme les observations de TACHIBANA et al. 1982 (296) en faveur de l'action de l'endoglucosaminidase cytosolique sur des oligosaccharides possédant le chaînon di-N-acétylchitobiose.

L'activité endoglucosaminidase cytosolique a également été mesurée à pH 7,5 en utilisant le substrat GPA [¹⁴C]. L'activité spécifique s'élève à 11 nmoles/h/mg pour une concentration finale en substrat de 0,1 mM. A titre de comparaison, dans les mêmes conditions d'incubation et de concentration en substrat, les activités endoglucosaminidases vis-à-vis des glycopeptides d'ovalbumine et du glycopeptide biantenné de l'asialosérototransferrine s'élèvent respectivement à 4 nmoles/h/mg et 1 nmole/h/mg.

Le glycopeptide GPA se révèle donc être un excellent substrat pour l'endoglucosaminidase cytosolique comme l'ont montré TACHIBANA et al. 1982 (297).

L'inactivité de l'endoglucosaminidase lysosomale vis-à-vis du glycopeptide GPA constitue un argument supplémentaire pour l'existence de deux enzymes distinctes pour les activités endoglucosaminidases lysosomale et cytosolique.

D- ETUDE DES PRODUITS DE REACTION PAR
RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE DU
PROTON A 400 MHZ

Nous avons comparé les spectres du glycopeptide GPA, de l'oligosaccharide OLB et de l'oligosaccharide OLC résultant de la dégradation de OLB par l'endoglucosaminidase lysosomale.

	Fraction Lysosomale		Fraction Cytosolique	
	pH 3,5	pH 7,5	pH 3,5	pH 7,5
GPA (0,1mM)	0	0	0	11
OLB (1,1mM)	61	0	0	33

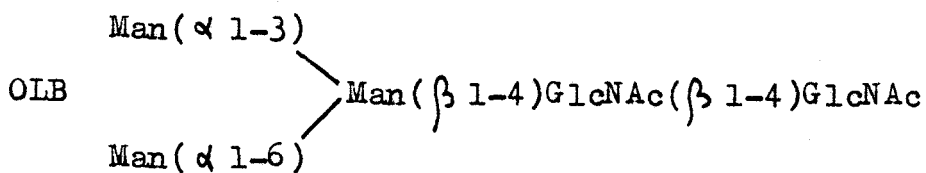
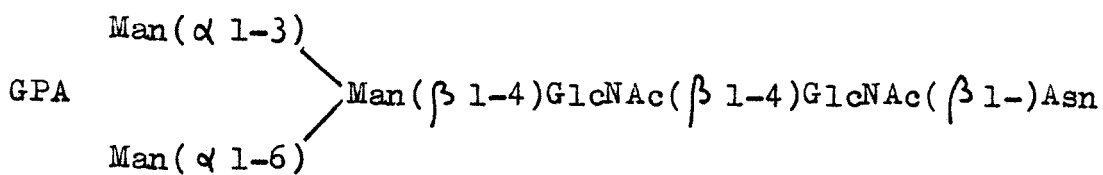


TABLEAU VII : activités des endoglucosaminidases lysosomale et cytosolique vis-à-vis des substrats GPA et OLB. Les activités sont exprimées en nmoles/h/mg de protéines.

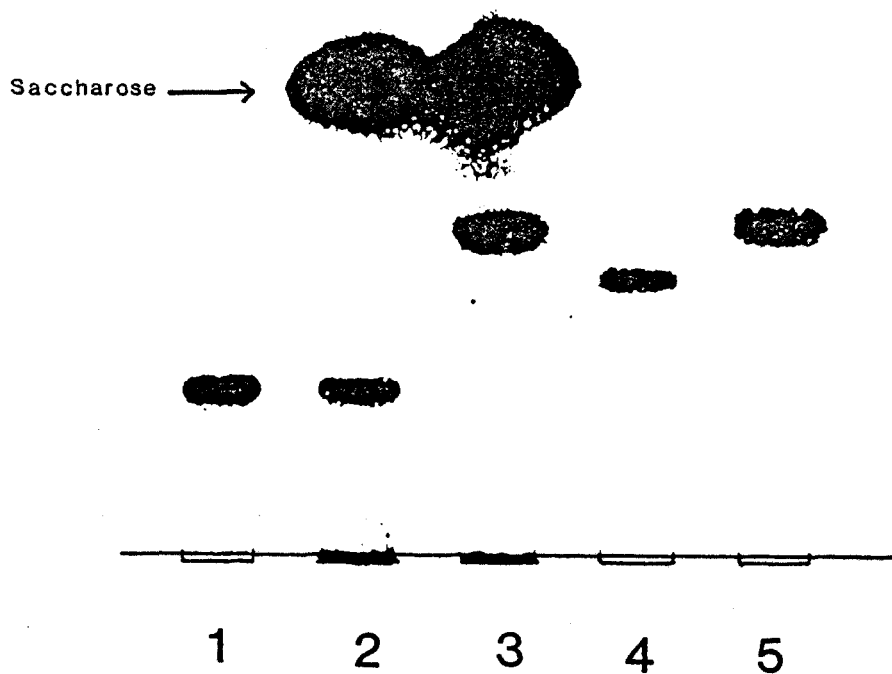


FIGURE 23

Spécificité de l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase lysosomale vis-à-vis des substrats GPA ($\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{Asn}$) et OLB ($\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$) (1 : témoin GPA ; 2 : incubation GPA ; 3 : incubation OLB ; 4 : témoin OLB ; 5 : témoin $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$).

GPA : la portion du spectre correspondant aux déplacements chimiques des protons anomériques, du proton H-2 du mannose et des protons des groupements N-acétyl du glycopeptide GPA est représentée dans la figure 24. Les valeurs des déplacements chimiques des protons sont représentées dans le tableau VIII.

OLB : le spectre montre que le résidu de GlcNAc 1 est présent sous forme pyranique α et β (rapport $\alpha:\beta = 2:1$) alors que le signal dû au groupement CH_2 en β de l'asparagine disparaît totalement (non représenté sur le spectre).

Un effet d'anomérisation est également reconnaissable dans le dédoublement du signal du proton H-1 du résidu de GlcNAc 2.

Un incrément de déplacement chimique est observé pour les protons du groupement N-acétyl du résidu de GlcNAc 1 alors que les déplacements chimiques des protons des résidus de mannose 3, 4 et 4' ne sont pas sensiblement modifiés.

OLC : le spectre confirme la perte du résidu de GlcNAc 1 alors que le noyau trimannoside reste intact.

Un effet d'anomérisation est observé pour les protons du groupement N-acétyl du résidu de GlcNAc 2 et les protons H-1 et H-2 du résidu Man 3.

Le produit de réaction de l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase sur l'oligosaccharide OLB est donc bien un oligosaccharide ne possédant qu'un résidu de N-acétylglucosamine en position terminale réductrice. Ce résultat confirme ceux obtenus par analyse en chromatographie couche mince où le produit de réaction comigrait avec un témoin $\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3)\text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$ isolé d'urine de patient atteint de mannosidose.

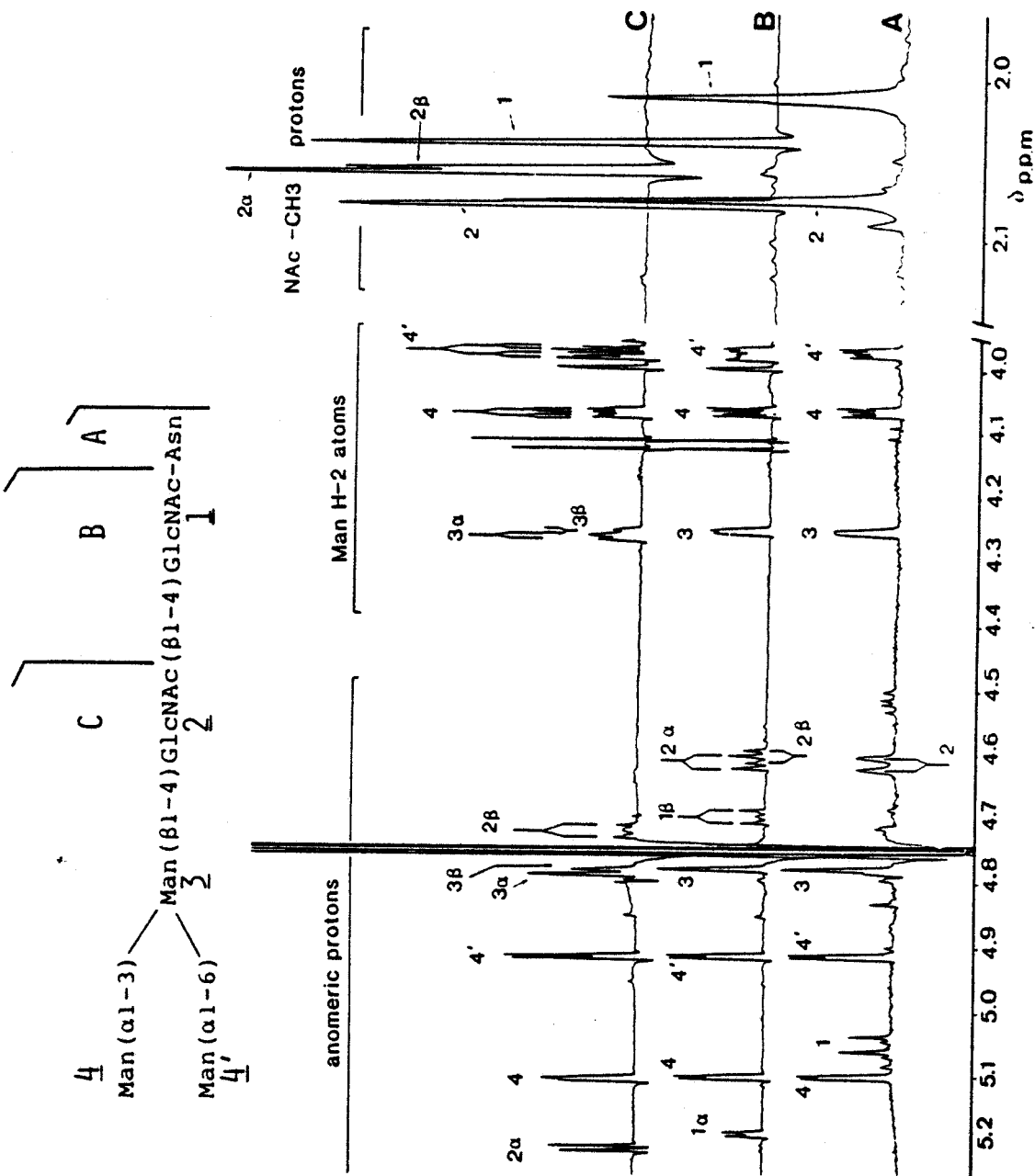


FIGURE 24

Spectres RMN des produits de réaction de l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase lysosomale et de l'aspartyl-N-acétylglucosaminidase (A : GPA ; B : OLB ; C : OLC)



Déplacements chimiques

		GPA	OLB	OLC
H-1 de	GlcNAc- <u>1</u>	5,047	5,187 (α) 4,695 (β)	- -
	GlcNAc- <u>2</u>	4,612	4,610 (α) 4,602 (β)	5,212 (α) 4,721 (β)
	Man- <u>3</u>	4,779	4,779	4,789 (α) 4,782 (β)
	Man- <u>4</u>	5,099	5,097	5,104
	Man- <u>4'</u>	4,913	4,913	4,915
H-2 de	Man- <u>3</u>	4,252	4,252	4,263 (α) 4,256 (β)
	Man- <u>4</u>	4,065	4,065	4,069
	Man- <u>4'</u>	3,970	3,972	3,972
NAc de	GlcNAc- <u>1</u>	2,008	2,038	-
	GlcNAc- <u>2</u>	2,073	2,077	2,058 (α) 2,055 (β)

Tableau VIII

Déplacements chimiques des protons anomériques, du proton H-2 du mannose et des protons des groupements N-acétyl pour les oligosaccharides obtenus par digestion enzymatique du GPA (Man₃GlcNAc₂Asn)



IV- CONCLUSION

L'existence dans le foie de rat d'une activité endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase s'exprimant vis-à-vis d'oligosaccharides possédant le chaînon N,N'-di-N-acétylchitobiose a été démontrée dans les lysosomes de foie de rat à la fois par caractérisation du résidu N-acétylglucosamine libéré et par analyse en spectroscopie RMN de l'oligosaccharide résultant de la réaction enzymatique.

La localisation cellulaire, le pH optimum acide et le fait que l'enzyme soit incapable de dégrader les glycopeptides la différencie clairement de l'endoglucosaminidase préalablement décrite dans la fraction cytosolique (PIERCE et al. 1979 (298), 1980 (299)).

Cette dernière activité doit probablement intervenir dans la régulation de la biosynthèse des glycoprotéines comme l'ont suggéré PIERCE et al. 1980 (300) et MONTREUIL 1981 (301).

L'action de l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase que nous avons caractérisée s'exerce sur des oligosaccharides résultant de l'action préalable de l'aspartyl-N-acétylglucosaminidase sur des glycoasparagines. L'existence de cette activité enzymatique explique l'excrétion urinaire d'oligosaccharides possédant un seul résidu de N-acétylglucosamine en position terminale réductrice dans les cas de glycoprotéinoses.

Les différences observées entre espèces animales (excrétion d'oligosaccharides possédant un ou deux résidus de N-acétylglucosamine en position terminale réductrice) laissent suggérer que le processus catabolique que nous venons de décrire est restreint à certaines espèces ; chez les autres, l'initiation du catabolisme se limiterait à l'action de la seule aspartyl-N-acétylglucosaminidase. Des études sont actuellement menées au laboratoire afin de vérifier cette dernière hypothèse.

C O N C L U S I O N

G E N E R A L E

Nous avons étudié la spécificité de l'aspartyl-N-acétylglucosaminidase du lysosome de foie de rat vis-à-vis de glycoasparagines neutres et sialylés.

L'enzyme hydrolyse les structures de type oligomannosidique et N-acétyllactosaminique. La présence de résidus d'acide sialique n'inhibe pas l'activité enzymatique. Ces résultats, ajoutés à la localisation lysosomale de l'enzyme, permettent d'attribuer à l'aspartyl-N-acétylglucosaminidase un rôle plus important que celui de l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase cytosolique dans le catabolisme du glycanne des N-glycosylprotéines.

Seule la présence d'un résidu de fucose lié en α 1-6 sur l'osamine du point d'attache inhibe l'activité enzymatique, ce qui implique que l'action de la fucosidase est un événement préalable à l'hydrolyse du glycopeptide par l'aspartyl-N-acétylglucosaminidase. Le résidu de fucose pourrait exercer un empêchement stérique à l'action de l'enzyme ou inhiber celle-ci de par son caractère hydrophobe.

L'enzyme n'agit que sur des glycoasparagines : son action est donc postérieure à celle des protéases. Elle intervient très probablement dans la première étape du catabolisme des N-glycannes (après la fucosidase). En effet, les exoglycosidases hydrolysent préférentiellement les oligosaccharides puis les glycopeptides, les glycoprotéines constituant les moins bons substrats. Ces différences dans les activités exoglycosidases pourraient être attribuées aux modifications éventuelles de la conformation de la chaîne glycanique inhérentes à l'hydrolyse de la liaison asparaginyln-acétylglucosamine.

Nous avons par ailleurs mis en évidence une nouvelle activité endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase. Sa localisation dans le compartiment lysosomal, son pH optimum d'action de 3,5 et son inactivité sur des structures glycopeptidiques la différencient de l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase du cytosol. En effet, cette dernière possède un pH optimum d'action de 7,5

et agit préférentiellement sur des structures glycopeptidiques. Il est possible que l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase du cytosol de foie de rat ne soit pas impliquée dans le processus catabolique. Elle pourrait exercer un rôle de régulation dans la biosynthèse des glycoprotéines, en dégradant les précurseurs oligosaccharidiques en excès ou les glycoprotéines immatures.

L'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase agit sur les structures oligosaccharidiques libérées après hydrolyse des glycoasparagines par l'aspartyl-N-acétylglucosaminidase. Des études sont actuellement en cours au laboratoire afin de préciser la spécificité de l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase vis-à-vis de différents types d'oligosaccharides.

Il convient de s'interroger sur l'intérêt de l'existence d'une telle activité enzymatique au sein du lysosome. Tout comme pour l'aspartamidase, il est possible que les modifications éventuelles de conformation du glycanne induites par l'hydrolyse du disaccharide N,N'-di-N-acétylchitobiose se traduisent par une augmentation des activités exoglycosidases. A ce titre, il serait nécessaire de doser les activités exoglycosidases vis-à-vis de glycopeptides, d'oligosaccharides possédant intact le chaînon N,N'-di-N-acétylchitobiose et d'oligosaccharides ne possédant plus qu'un seul résidu de N-acétylglucosamine en position terminale réductrice.

KURANDA et ARONSON 1985b (302) ont récemment mis en évidence une activité endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase identique à celle que nous avons caractérisée. En inhibant l'aspartyl-N-acétylglucosaminidase et les exoglycosidases, ces auteurs ont montré, "in vivo", que le matériel accumulé dans les lysosomes était constitué par des glycoasparagines. En l'absence d'inhibiteur d'aspartyl-N-acétylglucosaminidase, le matériel accumulé est constitué par des oligosaccharides ne possédant plus qu'un seul résidu de N-acétylglucosamine.

L'ordre d'activité très élevé de l'aspartyl-N-acétylglucosaminidase et de l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase lysosomale comparativement à celui des exoglycosidases laisse supposer que la voie catabolique débutant du côté terminal réducteur du glycanne s'effectue antérieurement à la voie

catabolique séquentielle par les exoglycosidases.

L'action de l'aspartyl-N-acétylglucosaminidase et de l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase lysosomale accélère donc le catabolisme des N-glycannes en libérant des oligosaccharides qui constituent de meilleurs substrats pour les exoglycosidases. Cependant, la déficience en aspartyl-N-acétylglucosaminidase n'abolit pas le catabolisme des glycopeptides, puisque l'urine des patients atteints d'aspartylglucosaminurie ne renferme que quelques milligrammes de glycoasparagines dérivant du catabolisme des N-glycannes, accompagnant les quelques 400 mg/24 h de GlcNAc(β 1-)Asn accumulé. Les exoglycosidases ont donc dégradé le matériel glycopeptidique à une vitesse qui reste à déterminer.

Les résultats obtenus quant à la spécificité de l'aspartyl-N-acétylglucosaminidase et la caractérisation d'une activité endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase ont permis de mettre en évidence un nouveau schéma du catabolisme du glycanne des N-glycosylprotéines faisant intervenir l'action synergique de trois enzymes, à savoir la fucosidase, l'aspartyl-N-acétylglucosaminidase et l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase lysosomale. Le nouveau schéma proposé est présenté dans la figure 25.

Ce schéma du catabolisme des N-glycannes permet d'interpréter les observations réalisées quant à la structure des oligosaccharides accumulés dans les cas de glycoprotéinoses. Chez l'homme, le rat et le porc, les oligosaccharides accumulés ne possèdent qu'un seul résidu de N-acétylglucosamine et résultent très probablement de l'action de l'aspartyl-N-acétylglucosaminidase puis de l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase. Chez le chien, le chat, le mouton et le veau, l'activité endoglucosaminidase serait probablement absente des lysosomes de ces animaux ; en effet, les oligosaccharides accumulés possèdent intact le chaînon N,N'-di-N-acétylchitobiose.

Les études menées sur les oligosaccharides et les glycopeptides accumulés dans l'urine de patients atteints de glycoprotéinoses permettent en outre de proposer certaines lois régissant le catabolisme des N-glycannes.

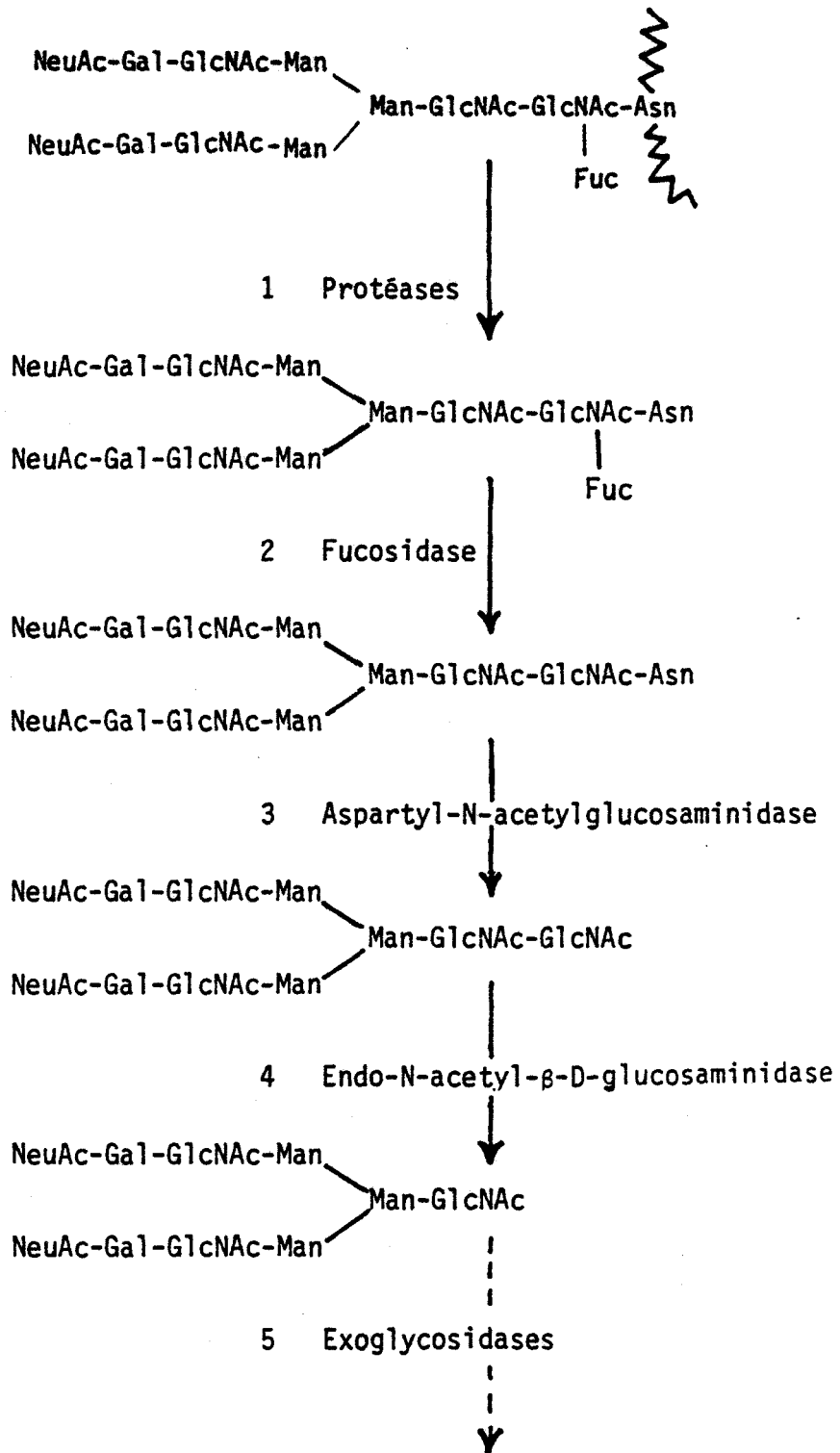


FIGURE 25
Schéma du catabolisme des N-glycosylprotéines

En effet, il est intéressant de noter que les oligosaccharides "limites" trouvés dans les urines correspondent à des structures monoantennées liées sur le résidu de mannose α 1-3 (voir figure 11). Par contre, dans les cas de déficit en fucosidase (fucosidose) ou en aspartyl-N-acétylglucosaminidase (aspartylglucosaminurie), on constate une excrétion urinaire de glycoasparagines dont certaines structures correspondent à des structures monoantennées liées sur le résidu de mannose α 1-6. Ces constatations permettent d'avancer deux hypothèses :

1- La dégradation des glycannes s'effectue antenne par antenne.

2- L'action de l' α -mannosidase α 1-6 est dépendante de la présence du résidu d'asparagine, l'action préalable de l'aspartyl-N-acétylglucosaminidase étant favorable à l'action de l' α -mannosidase α 1-6.

Le chaînon trimannosidique semble donc être un important carrefour de régulation lors du catabolisme du glycanne des N-glycosylprotéines.

La figure 26 schématise les différentes étapes hypothétiques que nous venons d'évoquer à propos de la dégradation des N-glycannes.

Il convient cependant d'insister sur le fait que les deux voies dégradatives (aspartylglucosaminidase-endoglycosaminidase et exoglycosidases) s'effectuent de façon concomittente et que le schéma proposé reste un schéma "figé" des étapes du processus catabolique des N-glycannes.

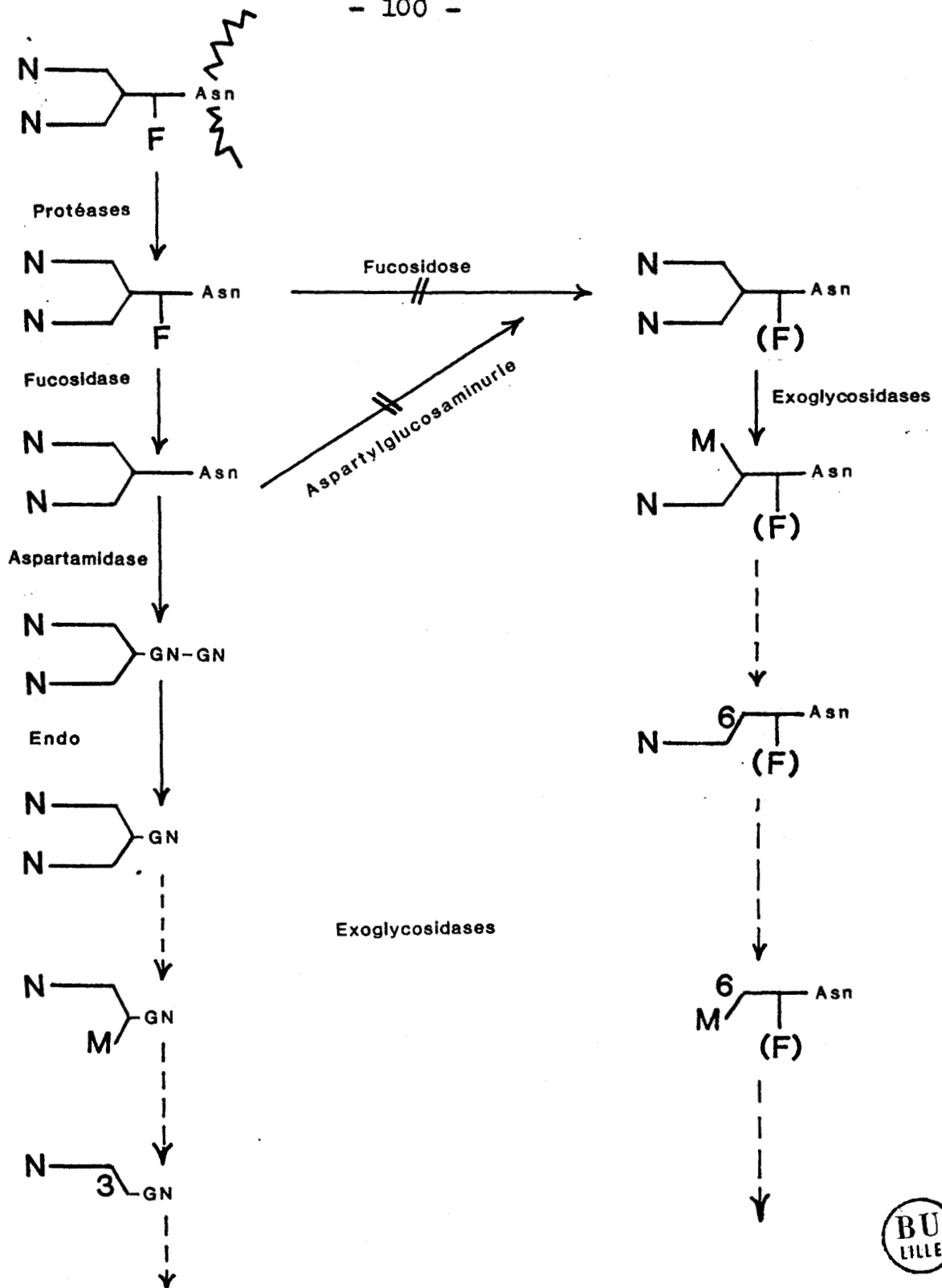


FIGURE 26

Hypothèses concernant la dégradation séquentielle "antenne par antenne" des N-glycannes.

(GN : GlcNAc ; F : Fuc ; M : Man ; N : NeuAc)

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

ABRAHAM, D.J., SIDEBOTHAM, R., WINCHESTER, B.G., DORLING, P.R. DELL, A. (1983a) FEBS Letters 163, 110-113 (101,102)

ABRAHAM, D.J., BLAKEMORE, W.F., JOLLY, R.D., SIDEBOTHAM, R. & WINCHESTER, B.G. (1983b) Biochem. J. 215, 573-579 (103, 113, 245)

APPOURCHEAU, P. (1983) mémoire de DEA, Lille (201)

ARONSON Jr., N.N. & DE DUVE, C. (1968) J. Biol.Chem. 243, 4564-4573 (82)

ARONSON Jr., N.N. & DOCHERTY, P.A. (1983) J. Biol. Chem. 258, 4266-4271 (45, 78)

ASHWELL, G. & HARFORD, J. (1982) Annu.Rev. Biochem. 51, 531-554 (30)

AULA, P., NANTO, V., LAIPIO, M.L. & AUTIO, S. (1973) Clin. Genet. 4, 279-300 (136)

AULA, P., RAIVIO, K. & AUTIO, S. (1976) Pediatr. Res. 10, 625-629 (137)

BAEZINGER, J. & KORNFELD, S. (1974) J. Biol. Chem. 249, 7260-7269 (38)

BARRETT, A.J. & HEATH, M.F. (1977) in "Lysosomes, à laboratory handbook" (J.T. DINGLE ed.) North Holland Pub. Co., 19-145 (43,47)

BARTON, R.W. & NEUFELD, E.F. (1971) J. Biol. Chem. 246, 773-7779 (52)

BAYARD, D., KERCKAERT, J.P., ROUX, D. & STRECKER, G. (1979) in "Protides of Biological fluids" Pergamon Press, Oxford, 153-156 (291)

BEARPARK, T., BOUQUELET, S., FOURNET, B., MONTREUIL, J., SPIK, G., STIRLING, J. & STRECKER, G. (1977) FEBS Letters 84, 379-384 (87)

BESTERMAN, J.M., AIRHART, J.A. & LOW, R.B. (1982) Am. J. Physiol. 242, C339-C346 (16)

BLOBEL, G. & DOBBERSTEIN, B. (1975) J. Cell. Biol. 67, 835-851 (75)

BOERSMA, A., LAMBLING, G., ROUSSEL, P., DEGURD, P. & BISERTE, G. (1975) c.r. Acad. Sci. Paris, 281, 1269-1272 (193, 229)

BOUQUELET, S., STRECKER, G., MONTREUIL, J. & SPIK, G. (1980) Biochimie 62, 43-49 (195b, 221)

- CACAN, R., HOFACK, B. & VERBERT, A. (1980) Eur. J. Biochem. 106, 473-479 (210)
- CHAMBERS, R.E. & CLAMP, J.R. (1971) Biochem. J. 125, 1009-1018 (273)
- CHIEN, S.F., WEINBURG, R., LI, S.C. & LI, Y.T. (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 76, 317-323 (223)
- CHU, F.K. & MALEY, F. (1982) Arch. Biochem. Bioph. 214, 134-139 (50)
- CLAMP, J.R., DAWSON, G., HOUGH, L. & KHAN, M.Y. (1966) Carbohydr. Res. 3, 254-255 (184)
- COFFEY, J.M. & DE DUVE, C. (1968) J. Biol. Chem. 243, 3255-3263 (12)
- COLEGATE, S.M., DORLING, P.R. & HUXTABLE, C.R. (1979) Aust. J. Chem. 32, 2257-2264 (99)
- CONCHIE, J. & STRACHAN, I. (1969) Biochem. J. 115, 709-715 (120)
- CONCHIE, J. & STRACHAN, I. (1978) Carbohydr. Res. 63, 193-213 (34)
- CORFIELD, A.P., MICHALSKI, J.C. & SCHAUER, R. (1981) Perspectives in Inherited metabolic diseases 4, 3-70 (57)
- CREEK, K.E. & SLY, W.S. (1984) in "Lysosomes in Biology and Pathology" (DINGLE, J.T., DEAN, R.T. & SLY, W. eds) Elsevier Science publishers B.V., 63-82 -60)
- DE DUVE, C., PRESSMAN, B.C., GIANETTO, R., WATTIAUX, R. & APPELMANS, F. (1955) Biochem. J. 60, 604-617 (1,7,152,264)
- DINGLE, J.T. (1977) in "Lysosomes, a laboratory handbook" (DINGLE, J.T. ed.) North Holland publishing Co., 1-16 (5)
- DORLING, P.R., HUXTABLE, C.R. & COLEGATE, S.M. (1980) Biochem. J. 191, 649-651 (100)
- DORLING, P.R. (1984) in "Lysosomes in biology and pathology" (DINGLE, J.T., DEAN, R.T. & SLY, W.) Elsevier Science Publishers B.V. (1984), 347-379 (98)
- DREYFUS, J.C. (1972) Biochimie 54, 559-571 (88)
- DREYFUS, J.C., POENARU, L. & LENOIR, G. (1980) Biomedicine 33, 78-82 (254)
- DREYFUS, J.C., BELON, J.P., GAUTRON, S., LENOIR, G. & POENARU, L. (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 119, 841-849 (255)
- DUGAL, B. (1977) Biochem. J. 163, 9-14 (139, 140, 153)

- DUGAL, B. & STROMME, K. (1977) *Biochem. J.* 165, 497-502 (141, 159, 183)
- EHRENREICH, B.A. & COHN, Z.A. (1969) *J. Exp. Med.* 129, 227-243 (9)
- EL BATTARI, A. (1983) Thèse de 3e cycle, Lille (211, 241)
- EL BATTARI, A., APPOURCHEAU, P., MONTREUIL, J. & SPIK, G. (1983) *Proc. VII th inter. Symp. on Glycoconj.* (CHESTER, A., HEINEGARD, D., LUNBLAD, A. & SWENSON, S. eds.), Lund-Sweden, 480 (200)
- ELDER, L. & ALEXANDER, H. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 79, 4540-4544 (220)
- ERICSSON, J.L. E. (1969) in "Lysosomes in Biology and Pathology" (DINGLE, J.T. & FELL, H.B. eds) North Holland pub. Co. 2, 345-394 (21)
- EYLAR, E.H. & MURAKAMI, M. (1966) *Methods in Enzymology* 8, 597-600 (165-171)
- FINNE, J., KRUSIUS, T. & RAUVALA, H. (1980) *Carbohydr. Res.* 80, 336-339 (275)
- FISCHER, H.D., GONZALEZ-NORIEGA, A., SLY, W.S. & MORRE, D.J. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 9608-9615 (66)
- FOURNET, B., MONTREUIL, J., STRECKER, G., DORLAND, C., HAVERKAMP, J., Vliegenthart, J.P.K., BINETTE, J.P. & SCHMID, K. (1978) *Biochemistry* 17, 5206-5214 (39)
- FRANCOIS-GERARD, CH., BROCTEUR, J., ANDRE, A., GERDAY, C., PIERCE-CRETEL, A., MONTREUIL, J. & SPIK, G. (1980) *Blood transfusion and Immunohaematology* 23, 579-588 (41)
- FREEZE, H.H. & ETCHISON, J.R. (1983) *Proc. VII th inter. Symp. on Glycoconj.* (CHESTER, A., HEINEGARD, D., LUNBLAD, A. & SWENSON, S. eds) Lund - Sweden, 481 (222)
- GATHMANN, W.D. & AMINOFF, D. (1981) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 103, 6876 (56, 262)
- GERWIG, G.J., KAMERLING, J.P. & Vliegenthart, J.F.G. (1984) *Carbohydr. Res.* 129, 149-157 (274)
- GLADE, P.R. & BERATIS, N.G. (1975) *Progr. Med. Genet.* 1, 1-48 (252)
- GOLDBERG, A.L. & SAINT JOHN, A.C. (1976) *Annu. Rev. Biochem.* 45, 747-803 (49)

- GONZALEZ-NORIEGA, A., GRUBB, J.M., TALKAD, V. & SLY, W.S. (1980) J. Cell, Biol. 85, 839-852 (68)
- HASILIK, A. & NEUFELD, E.F. (1980) J. Biol. Chem. 255, 4937-4945 (74)
- HASILIK, A., KLEIN, V., WAHEED, A., STRECKER, G. & VON FIGURRA, G. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77, 7074-7078 (64)
- HASILIK, A. WAHEED, A. & VON FIGURA, K. (1981) Biochem. Biophys. Res. Commun. 98, 761-767 (69, 91)
- HOFACK, B. (1982) Thèse de doctorat d'état, Lille. (29)
- ITO, S., MURAMATSU, T. & KOBATA, A. (1975) Arch. Biochem. Biophys. 171, 78-86 (219)
- JENNER, F.A. & POLLITT, R.J. (1967) Biochem. J. 103, 48p-49p (128)
- KAPLAN, A., ACHORD, D.T. & SLY, S.W. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 74 : 2026-2030 (62)
- KAVERZNEVA, E.D., BOGDANOV, V.P. & TCHUCHROVA, A.I. (1974) in "methodologie de la structure et du métabolisme des glycoconjugués" Villeneuve d'Ascq, France, 20-27 juin 1973 CNRS ed., p.283-288 (180, 185)
- KOHNO, M. & YAMASHINA, I. (1972) Biochim. Biophys. Acta 258, 600-617 (156, 170, 179, 187, 281)
- KOIDE, N. & MURAMATSU, T. (1974) J. Biol. Chem. 249, 4897-4904 (218, 232, 259, 290)
- KOL, O. (1983) Thèse de 3e cycle, Lille (196)
- KRAG, S. & ROBBINS, A.R. (1982) J. Biol. Chem. 257, 8424-8431 (73)
- KURANDA, M.J. & ARONSON Jr, N.N. (1985a) J. Biol. Chem. 260, 1858-1866 (79, 80)
- KURANDA, M.J. & ARONSON Jr, N.N. (1985b) Proc. VIII th inter. Symp. on Glycoconj., Houston, p.148 (81, 302)
- LEE, Y.C., WU, Y.C. & MONTGOMERY, R. (1964) Biochem. J. 91, 9c-10c (124)
- LEVY, G.A. & Mc ALLAN, A. (1959) Biochem. J. 73, 127 (270)
- LI, E. & KORNFELD, S. (1979) J. Biol. Chem. 254, 1600-1605 (33)

- LI, Y.T., DE GASPERI, R., TOWNSEND, R.R., COUSINS, J.C., LEE, Y.C. & LI, S.C. (1985) Proc. VII th intern. Symp. on glycoconj. Houston, 71-72 (203, 212, 231b)
- LINEWEAVER, H. & BURK, D.J. (1934) J. Amer. Chem. Soc. 56, 658-666 (276, 280)
- LISMAN, J.J.W., VAN DER WAL, C.J. & OVERDIJK, B. (1983) Proc. VII th inter. Symp. on Glycoconj., Lund-Sweden, 478 (199, 206)
- LISMAN, J.J.W., VANDER WAL, C.J. & OVERDIJK, B. (1985) Biochem. J. 229, 379-385 (202, 207)
- LOWRY, H.O., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. & RANDALL, R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275 (260-268)
- LUBOCHINSKI, B. & ZALTA, J. (1954) Bull. Soc. Chim. Biol. 36 : 1363 (148)
- Mc GOVERN, M.M., AULA, P. & DESNICK, R.J. (1983) J. Biol. Chem. 258, 10743-10747 (142, 160, 189, 190)
- MAHADEVAN, S. & TAPPEL, AL. (1967) J. Biol. Chem. 242, 4568-4576 (46, 121, 131, 150, 154, 178, 186, 277, 279, 282)
- MAHADEVAN, S., DILLARD, C.J. & TAPPEL, A.L. (1969) Arch. Biochem. Biophys. 129, 525-533 (44,77)
- MAKINO, M., TOJIMA, T. & YAMASHINA, I. (1966) Biochem. Biophys. Res. Commun. 24, 961-966 (126, 147, 167)
- MAKINO, M., TOJIMA, T., OHGUSHI, T. & YAMASHINA, I. (1968) J. Biochem. 63, 186-192 (134, 157, 163)
- MARZELLA, L., AHLBERG, J. & GLAUMANN, H. (1980) Exp. Cell. Res. 129, 460-466 (23)
- MATSUURA, F., LAINE, R.A. & JONES, M.Z. (1981) Arch. Biochem. Biophys. 211, 485-493 (104)
- MATSUURA, F., JONES, M.Z. & FRAZIER, S.E. (1983) Biochim. Biophys. Acta 759, 67-73 (106)
- MEGO, J.L., FARB, R.M. & BARNES J. (1972) Biochem. J. 128, 763-769 (15)
- MICHALSKI, J.C., STRECKER, G., FOURNET, B., CANTZ, M. & SPRANGER, J. (1977) FEBS Letters 79, 101-104 (107, 116)
- MICHALSKI, J.C. (1984) Thèse de doctorat d'état, Lille (93, 115, 247, 248, 261, 284)

- MINAMI, R., WATANABE, Y., DUDOH, T., SUZUKI, M., OYANAGI, K.,
ORII, T. & NAKAO, T. (1978) Hum. Genet. 44, 79-87 (253)
- MONTREUIL, J. (1975) Pure Appl. Chem. 42, 431-477 (25, 109, 161,
243, 287)
- MONTREUIL, J. (1981) Compt. rend. Soc. Biol. 175, 694-708
(95, 110, 119, 209, 244, 246, 250, 301)
- MONTREUIL, J. (1982) in Comprehensive Biochemistry (NEUBERGER, A.
& VANDEENEN, L.L.M. eds) Elsevier Pub. Co., Amsterdam, 19B,
1-188 (28, 31, 83, 85, 162)
- MONTREUIL, J. (1984) Biol. Cell 51, 115-132 (84, 86)
- MURAKAMI, M. & EYLAR, E.H. (1965) J. Biol. Chem. 240, pc556-
pc558 (125)
- MURAMATSU, T. (1971) J. Biol. Chem. 246, 5535-5537 (191)
- NEUFELD, E.F. & CANTZ, M.J. (1971) Ann. N.Y. Acad. Sci. 179,
580-587 (59)
- NEUFELD, E.F. & ASHWELL, G. (1980) in "The Biochemistry of
glycoproteins and proteoglycans" (LENNARZ, W.J. et.) Plenum Press
N.Y., 241-266 (32, 42)
- NILSSON, K. (1979) in "The Epstein-Barr Virus" (EPSTEIN, M.A. &
ACHONG, B.G. eds.) Springer-Verlag, 225-281 (251)
- NISHIGAKI, M., MURAMATSU, T. & KOBATA, A. (1974) Biochem. Bioph.
Res. Commun. 59, 638-645 (108, 192, 224, 233, 242, 286)
- NOVIKOFF, P.M., NOVIKOFF, A.B., QUINTANA, N. & HAUW, J.J. (1971)
J. CELL. BIOL. 50, 859-886 (3)
- NOVIKOFF, A.B. (1973) in "Lysosomes and storage Diseases"
(HERS, H.G. & VAN HOOF, F. eds.) Academic Press N.Y., 2-37 (6)
- OHGUSHI, T. & YAMASHINA, I. (1968) Biochim. Biophys. Acta 156,
417-419 (122, 132, 151, 278, 283)
- OPHEIM, D.J. & TOUSTER, O. (1978) J. Biol. Chem. 253 : 1017-1023
(54)
- OVERDIJK, B., VANDER KROEFF, W.H., LISMAN, J.J.W., PIERCE, R.J.,
MONTREUIL, J. & SPIK, G. (1981) FEBS Letters 128, 364-366
(197, 230)
- PAIGEN, K. (1981) in "Lysosomes and lysosomal storage diseases"
(CALAHAN, J.W. & LOWDEN, J.A. eds) Raven Press N.Y., 1-15
(89)

- PALADE, G.E. (1975) *Science* 189, 347-358 (2)
- PASTAN, H.H. & WILLINGHAM, M.C. (1981) *Annu. Rev. Physiol.* 43, 239-250 (18)
- PAZ PARENTE, J. (1984) *Communication personnelle* (271)
- PEARSE, B.M.F. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci(USA)* 73, 1255-1259 (17)
- PENNINGTON, R.J. (1961) *Biochem. J.* 80, 649-655 (266)
- PIERCE, R.J., SPIK, G. & MONTREUIL, J. (1979) *Biochem. J.* 180, 673-676 (111, 194, 204, 215, 225, 234, 240, 288, 293, 298)
- PIERCE, R.J., SPIK, G. & MONTREUIL, J. (1980) *Biochem. J.* 185, 261-264 (112, 118, 195, 205, 208, 216, 226, 235, 237, 249, 289, 294, 299, 300)
- PINO, R.M., PINO, L.C. & BANKSTON (1981) *J. Histochem. Cytochem.* 29, 1061-1070 (4)
- PLUMMER, J.R., TARENTINO, A. & MALEY, F. (1968) *J. Biol. Chem.* 243 : 5158-5164 (164, 166, 169)
- PLUMMER, J.R. & TARENTINO, A. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 10243-10246 (175)
- POLLITT, R.J., JENNER, F.A. & MERSKEY, H. (1968) *Lancet* 2, 253-255 (129)
- POLLITT, R.J. & JENNER, F.A. (1969) *Clin. Chim. Acta* 25, 413-416 (130, 158)
- REARICK, J.I., CHAPMAN, A. & KORNFELD, S. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 6255-6261 (26)
- REEVES, J.P. (1984) in "lysosomes in biology and pathology" (DINGLE, J.T., DEAN, R.T. & SLY W.S. eds.) Elsevier Science Pub. Co., B.V., 175-199 (13,48)
- REIJNGOUD, D.J. & TAGER, J.M. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 472, 419-449 (8,14)
- REISSIG, J.L., STROMINGER, J.L. & LELOIR, L.F. (1955) *J. Biol. Chem.* 217, 959 (269)
- REITMAN, M. & KORNFELD, S. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 4275-4281 (70).
- RENLUND, M., CHESTER, M.A., LUNDBLAD, A., PARKKINEN J. & DRUSIUS, T. (1983) *Eur. J. Biochem.* 130, 39-45 (10)

- ROSENFELD, M.G., KREIBICH, G., POPOV, D., KATO, K. & SABATINI, D.D. (1982) *J. Cell. Biol.* 92, 135-143 (76)
- SALVAYRE, R., NEGRE, A. MARET, A., LENOIR, G. & DOUSTE-BLAZY, L. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 659, 445-456 (256)
- SALVAYRE, R., MARET, A., LENOIR, G., VUILLAUME, M., ICART, J., DIDIER, J. & DOUSTE-BLAZY, L. (1983) *Eur. J. Biochem.* 133, 627-633 (257)
- SANDO, G.N. & NEUFELD, E.F. (1977) *Cel.* 12, 619-627 (51)
- SCHACHTER, R. & ROSEMAN, S. (1980) in "The biochemistry of glycoproteins and proteoglycans" (LENNARZ, W.J. ed.) Plenum Press N.Y., 85-160 (27)
- SCHMID, K., BINETTE, J.D., DORLAND, L., Vliegenthart, J.F.G., FOURNET, B. & MONTREUIL, J. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 581, 356-359 (40)
- SCHNEIDER, J.A. & SCHULMAN, J.D. (1982) in "The metabolic basis of inherited diseases" (STANBURY, J.B. ed.) Mc Graw Hill N.Y., 1844-1866 (11)
- SLY, W.S., GONZALEZ-NORIEGA, A., NATOWICZ, M., FISCHER, H.D. & CHAMBERS, J.P. (1979) *Fed. Proc.* 38, 467 (67)
- SOMER, H., PALO, J., SAVOLAINEN, H. & KONTTINEN, A. (1975) *Clin. Chimic. Acta* 60, 219-221 (138)
- SONG, C.S. & BODANSKI, O. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 694 (265)
- SPIK, G., BAYARD, B., FOURNET, B., STRECKER, G., BOUQUELET, S. & MONTREUIL, J. (1974) *FEBS Letters* 50, 269-299 (36)
- SPIK, G., STRECKER, G., FOURNET, B., BOUQUELET, S., MONTREUIL, J., DORLAND, L., VAN HALBEEK, H. & Vliegenthart, J.F.G. (1982) *Eur. J. Biochem.* 121, 413-419 (37)
- STRECKER, G., FOURNET, B., BOUQUELET, S., MONTREUIL, J., DHONDT, J.L. & FARRIAUX, J.P. (1979) *Biochimie* 58, 579-586 (295)
- STRECKER, G., PEERS, M.C., MICHALSKI, J.C., HONDI-ASSAH, T., FOURNET, B., SPIK, G., MONTREUIL, J., FARRIAUX, J.P., MAROTEAUX, P. & DURAND, P. (1977) *Eur. J. Biochem.* 75, 391-403 (117)
- STRECKER, G. & MONTREUIL, J. (1979) *Biochimie* 61, 1199-1246 (24, 92, 94, 96, 114, 247, 285)

- SUGIYAMA, K., ISHIHARA, H., TEJIMA, S. & TAKAHASHI, N. (1983) Biochem. Bioph. Res. Commun. 112, 155-160 (146, 177)
- SWANSON, M.A. (1955) Methods in Enzymology 2, 541 (267)
- TACHIBANA, Y., YAMASHITA, K., KAWAGUCHI, M., ARASHIMA, S. & KOBATA, A. (1981) J. Biochem. 90, 1291-1296 (231)
- TACHIBANA, Y., YAMASHITA, K. & KOBATA, A. (1982) Arch. Biochem. Bioph. 214, 199-210 (198, 214, 227, 236, 238, 239, 296, 297)
- TAKAHASHI, N. & NISHIBE, H. (1978) J. Biochem. 84, 1467-1473 (144)
- TAKAHASHI, N. & NISHIBE, H. (1981) Biochim. Biophys. Acta 657, 457-467 (145, 174)
- TANAKA, M., KOHNO, M. & YAMASHINA, I. (1973) J. Biochem. 73, 1285-1289 (173, 181)
- TARENTINO, A.L. & MALEY, F. (1969) Arch. Biochem. Biophys. 130, 295-303 (182, 188)
- TARENTINO, A.L. & MALEY, F. (1974) J. Biol. Chem. 249, 811-817 (217)
- TARENTINO, A.L. & MALEY, F. (1976) J. Biol. Chem. 251, 6537-6544 (213, 228)
- TARENTINO, A.L. & PLUMMER, J.R. (1982) J. Biol. Chem. 257, 10776-10780 (176)
- TASHIRO, Y. & TREVITHICK, J.R. (1977) Can. J. Biochem. 55, 249-256 (51)
- TAYLOR, S. NINJOOR, V., DOWD, D.M. & TAPPEL, A.L. (1974) Anal. Biochem. 60, 153-162 (149)
- TOWER, D.B., PETERS, E.L. & CURTIS, W.C. (1963) 238, 983-993 (127)
- TULSIANI, D.R.P., HUBBARD, S.C., ROBBINS, P.W. & TOUSTER, O. (1982) J. Biol. Chem. 257, 3660-3668 (55)
- VAN DIGGELEN, O.P., SCHRAM, A.W., SINNOTT, M.L., SMITH, P. ROBINSON, D. & GALJAARD, H. (1981) Biochem. J. 200, 143-151 (53)
- VAN LENTEN, L. & ASHWELL, G. (1973) Methods in enzymology 28 B, 209-211 (263)

- VARKI, A. & KORNFELD, S. (1980) J. Biol. Chem. 255, 10847-10858 (63, 65)
- VARKI, A. & KORNFELD, S. (1981) J. Biol. Chem. 256, 9937-9943 (72)
- VLIEGENTHART, J.F.G., DORLAND, L. & VAN HALBEEK, H. (1983) Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 41, 209-374 (292)
- VON FIGURA, K. & HASILIK, A. (1984) TIBS 9, 29-31 (90)
- WAHEED, A., POHLMANN, R., HASILIK, A. & VON FIGURA, K. (1981) J. Biol. Chem. 256, 4150-4152 (71)
- WALL, D.A., WILSON, G. & HUBBARD, A.L. (1980) Cell. 21, 79-93 (20)
- WARNER, T.G. & O'BRIEN, J.S. (1982) J. Biol. Chem. 257, 224-232 (104)
- WILLINGHAM, M.C., KEEN, J.G. & PASTAN, I.H. (1981) Exp. Cell. Res. 132, 329-338 (19)
- WINCHESTER, B. (1982) TIBS 7, 71-74 (97)
- YAMASHINA, I. (1972) in "Glycoproteins" (GOTTSCHALK ed.) Elsevier pub. Co. 5 B, 1189-1200 (123, 133, 155)
- YAMASHITA, K., TACHIBANA, Y. & KOBATA, A. (1978) J. Biol. Chem. 253, 3862-3869 (35)
- YAMAUCHI, T., MAKINO, M. & YAMASHINA, I. (1968) J. Biochem. 64, 683-689 (135, 172)
- ZANETTA, J.P., BRECKENBRIDGE, W.C. & VINCENTON, G. (1972) J. Chromatogr. 69, 291-304 (258, 272)
- ZIEGLER, M. & BACH, G. (1981) Biochem. J. 198, 505-508 (58)



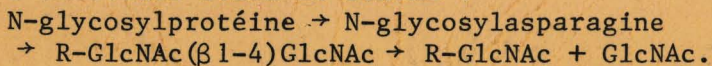
RESUME

Les déficits génétiques en exoglycosidases spécifiques du catabolisme des N-glycosylprotéines sont responsables de l'accumulation de glycannes incomplètement dégradés dans les tissus et l'urine des patients. Les oligosaccharides excrétés ne possèdent qu'un seul résidu de GlcNAc en position terminale réductrice et devraient donc résulter de l'action d'une endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase selon le schéma : $R\text{-GlcNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc-Asn} \rightarrow R\text{-GlcNAc} + \text{GlcNAc-Asn}$. De telles enzymes ont été caractérisées dans le foie de rat et les tissus humains et localisées dans le cytosol.

Toutefois, des glycoprotéinoses ont également été observées chez diverses espèces animales ou induites à l'aide d'inhibiteurs enzymatiques. Les oligosaccharides accumulés possèdent soit un résidu terminal de N-acétylglucosamine (rat, porc), soit un résidu de di-N-acétylchitobiose (boeuf, chat, chien, mouton). Dans ce dernier groupe d'animaux, le glycanne a donc été libéré en bloc de la protéine ou du glyco-asparagine résultant de l'action des protéases. Nous avons étudié l'action de l'aspartyl-N-acétylglucosaminidase du lysosome de foie de rat vis-à-vis de glyco-asparagines neutres et sialylés et avons montré que le glycanne était libéré dans la plupart des cas, les exceptions étant liées à la présence de fucose lié en ($\alpha 1-6$) sur le premier résidu de GlcNAc.

Nous avons, en outre, caractérisé une activité endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase lysosomale de pH optimal 3,5 et n'agissant que sur des N-glycannes préalablement détachés par l'aspartylglucosaminidase.

Les premières étapes du catabolisme des N-glycosylprotéines semblent donc s'effectuer selon le schéma :



MOTS-CLES

Aspartyl-N-acétylglucosaminidase, catabolisme, endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase, catabolisme, glycoprotéines, glycoprotéinoses.