

d'ordre : 165

50376
1987
359

THÈSE

50376
1987
359

présentée à :

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES-ARTOIS

pour obtenir le titre de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE

spécialité : **BIOCHIMIE**

par

Dominique BRASSART



CATABOLISME LYSOSOMIQUE DES N-GLYCOSYLPROTEINES

* **Mise en évidence d'une endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase lysosomique humaine**

* **Mise en évidence d'une activité sialyl-endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase lysosomique**

* **Etude du catabolisme IN VITRO des N-glycannes**

Exemplaire corrigé après avis du jury

Soutenue, le 6 novembre 1987 devant la Commission d'Examen :

Président :	Professeur Jean MONTREUIL
Rapporteurs :	Professeur Geneviève SPIK Professeur Bryan WINCHESTER
Examineurs :	Professeur Jean KREMBEL Docteur Raymond John PIERCE Docteur Gérard STRECKER

à Nicole,

à François,

à Thibaut...

à mes Parents.

Monsieur MONTREUIL, en m'intégrant pendant deux ans au sein de votre Laboratoire, vous m'avez permis de réaliser ce travail. Je vous en remercie.

Monsieur WINCHESTER. Ce fut pour moi un grand honneur et un grand plaisir que de vous compter parmi les membres de ce Jury. J'ai pu y apprécier vos grandes qualités scientifiques et humaines. Soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

Mademoiselle SPIK. Ce fut un grand plaisir pour moi que de vous voir participer à ce jury. Je vous en remercie.

Monsieur STRECKER.Gérard, au cours de ces deux années passées au sein de ton équipe, j'ai pu apprécier ta gentillesse et ta grande compétence scientifique, qui restera pour moi un exemple. Aussi, sois assuré de toute ma reconnaissance et de toute mon amitié.

Monsieur KREMBEL. Vous avez été le premier à me témoigner votre confiance en m'accueillant pendant un an dans votre Laboratoire. Ce bref passage au sein de votre équipe restera pour moi l'un des meilleurs souvenirs de ces trois années passées au C9. Aussi, c'est avec un grand plaisir que je vous remercie d'avoir jugé ce travail. Soyez assurés, vous et toute votre équipe de toute mon amitié et de ma profonde et sincère gratitude.

Monsieur PIERCE. Votre participation à ce jury a été pour moi l'occasion d'apprécier votre grande valeur scientifique ainsi que votre gentillesse. Soyez assuré de toute ma reconnaissance.

Mes remerciements vont également vers tous ceux qui, lors de mon passage au Laboratoire m'ont témoigné leur amitié. Qu'ils soient ici assurés de ma reconnaissance.

Je voudrais remercier tout particulièrement : Monsieur Jean-Claude MICHALSKI.

Par tes conseils toujours judicieux tu m'as permis de mener à bien ce travail. Aussi, je tiens à te remercier non seulement , pour le soutien scientifique que tu m'as apporté pendant deux ans mais aussi et surtout pour ta gentillesse et l'amitié dont tu as toujours fait preuve à mon égard. Pour tout, merci Jean-Claude.

Madame Catherine ALONSO. Ces deux années passées au "110" m'ont permis d'apprécier ta grande disponibilité et ta compétence technique qui n'ont d'égaux que ta gentillesse et ta bonne humeur. C'est avec plaisir que je te remercie aujourd'hui. Sois assurée de mon amitié.

Monsieur Jean-Michel WIERUSZESKI. Sans ton aide pour tout ce qui concerne la RMN, ce travail n'aurait pas pu être ce qu'il est. C'est pourquoi, je remercie autant le spécialiste RMN que l'ami que tu as été pour moi pendant ces deux ans.

Ce travail a été réalisé sous la direction de Messieurs Gérard STRECKER, Directeur 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 de l'Université des Sciences et Techniques de LILLE Flandres-Artois (Unité associée au C.N.R.S. n° 217, Directeur : Monsieur le Professeur Jean MONTREUIL).

Il a bénéficié d'une aide de l'I.N.S.E.R.M. (C.R.E. n° 841-026) et du Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur (contrat d'allocataire de Recherche n° 570).

Ce travail a fait l'objet de deux communications à des congrès et d'une publication.

Communications :

- Caractérisation d'une nouvelle voie du catabolisme des N-glycosylprotéines résultant de l'action successive d'une aspartyl-N-acétyl- β -D-glucosaminidase et d'une endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase lysosomiques.

D. BRASSART, T. BAUSSANT, J. M. WIERUSZESKI, G. STRECKER, J. MONTREUIL, J.C. MICHALSKI.

XI^{èmes} Journées de la Chimie et de la Biochimie des Glucides. Le MONT-DORE (FRANCE) 21-24 Septembre 1986.

- Catabolism of N-glycans : use of ^1H NMR spectroscopy for cinetical studies of lysosomal exo- and endoglycosidases.

D. BRASSART, J.M.WIERUSZESKI, J. MONTREUIL, G. STRECKER, J. C. MICHALSKI.

Proceedings fo the IXth International Symposium on Glycoconjugates. LILLE (FRANCE) 6-11 Juillet 1987.

Publication :

- Catabolism of N-glycosylprotein glycans : evidence for a degradation pathway of sialylglyco-asparagines resulting from the combined action of the lysosomal aspartylglucosaminidase and endo-N-acetyl- β -D-glucosaminidase. A 400-MHz ^1H -NMR stuy.-

D. BRASSART, T. BAUSSANT, J. M. WIERUSZESKI, G. STRECKER, J. MONTREUIL, J. C. MICHALSKI.

Eur. J. Biochem. (1987) Sous presse.

ABREVIATIONS

Asn :	L-Asparagine.
Endo :	Endo-N-acétyl-D-glucosaminidase.
Aspartamidase :	Aspartyl-N-acétylglucosaminidase.
Fuc :	L-fucose.
Gal :	D-galactose.
Man :	D-mannose.
Glc :	D-glucose.
GlcNAc :	N-acétyl-D-glucosamine.
NeuAc :	Acide-5-N-acétyl-neuraminique.
HEPES :	N-2-hydroxyéthylpiperazine-N'-2-éthanesulfonic acid.
CP 100 :	Tampon citrate-phosphate 100 mM, EDTA 10 mM, 2-mercaptoéthanol 1mM.
CP 1 :	Tampon citrate-phosphate 1mM.
EDTA :	Acide éthylène diamine tétra-acétique.
RMN- ¹ H :	Résonance Magnétique Nucléaire du proton.
ppm :	Parties par million.
PNP :	Para-nitro-phényl.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

GENERALITES

LES LYSOSOMES

I - ORIGINE DES LYSOSOMES

II - CARACTERISTIQUES GENERALES

A) La membrane lysosomique et sa perméabilité

- 1) L'efflux de métabolites
- 2) Les macromolécules
- 3) Les peptides et les acides aminés
- 4) Les glucides
- 5) Les nucléotides
- 6) Les protons

B) Le pH lysosomique

III - ROLES DES LYSOSOMES

- A) Autophagie
- B) Hétérophagie.

- 1) la phagocytose
- 2) la pinocytose

- a) la pinocytose en phase fluide
- b) La pinocytose adsorptive
- c) Exocytose

IV - PATHOLOGIE LYSOSOMIQUE

- A) Rupture de la membrane
- B) Déversement des enzymes dans le milieu extra-cellulaire
- C) Surcharge lysosomique par déficit enzymatique

LES GLYCOSIDASES LYSOSOMIQUES

I - CARACTERISTIQUES GENERALES DES HYDROLASES ACIDES

- A) pH dépendance et stabilité
- B) Propriétés structurales
- C) Spécificité et formes multiples (isoenzymes)

II - BIOSYNTHESE ET TRANSPORT DES ENZYMES LYSOSOMIQUES

- A) Biosynthèse des enzymes lysosomiques
- B) Transport intracellulaire des glycosidases lysosomiques

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

- a) Généralités.
- b) Etude des glycannes des glycosidases lysosomiques
- c) Phosphorylation du mannose.

2) Le récepteur à Man 6-P	46
a) Généralités	46
b) Localisation cellulaire des récepteurs.	47
c) Mise en évidence d'un 2ème récepteur à Man 6-P.	47
3) Autres voies d'intégration d'enzymes dans le lysosome.	49
<u>LE CATABOLISME DES N-GLYCOSYL PROTEINES</u>	50
<u>I - LES N-GLYCOSYL PROTEINES</u>	50
A) Classification des glycoconjugués.	50
B) Les N-glycosylprotéines.	52
1) Glycannes de type oligomannosidique	52
2) Glycannes de type N-acétyllactosaminique	53
3) Glycannes de type mixte	53
<u>II - REPRISE SPECIFIQUE DES GLYCOPROTEINES PAR LA CELLULE</u>	53
A) Le récepteur hépatocytaire des asialoglycoprotéines.	53
1) Historique.	53
2) Caractéristiques	56
3) Localisation subcellulaire	56
4) Rôles du récepteur à galactose	57
B) Autres voies de capture des glycoprotéines.	57
1) Les récepteurs à mannose/N-acétylglucosamine	58
2) Le récepteur à fucose	58
<u>III - LES GLYCOPROTEINOSES</u>	58
A) Concept.	59
B) Les pathologies.	59
<u>IV - LE CATABOLISME DES N-GLYCOSYLPROTEINES</u>	61
A) Le catabolisme de la protéine.	61
1) Catabolisme des glycoprotéines exocellulaires	61
2) Catabolisme des glycoprotéines endocellulaires	61
a) le catabolisme protéolytique cytosolique	62
b) le catabolisme lysosomique	62
B) Catabolisme des N-glycannes.	63
1) Introduction.	63
2) Historique	64
3) L'hypothèse du catabolisme initié par une endo-N-Acetyl- β -D-glucosaminidase.	64
4) Les glycoprotéinoses animales.	65
5) Le rôle de l'aspartamidase (aspartyl-N-acétylglucosaminidase)	68
a) Historique.	68

b) Propriétés.	70
c) Spécificité.	70
6) Mise en évidence d'une endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase lysosomique.	71
a) Historique.	71
b) Spécificité.	72
c) Mise en évidence d'une endoglucosaminidase dans le lysosome	72
<u>TRAVAUX PERSONNELS</u>	76
<u>INTRODUCTION</u>	77
<u>MISE EN EVIDENCE D'UNE ACTIVITE ENDO-N-ACETYL-β-D-GLUCOSAMINIDASE LYSOSOMIQUE DANS LES CELLULES HUMAINES</u>	80
<u>I - INTRODUCTION</u>	81
<u>II - MATERIEL ET METHODES</u>	82
A) Culture cellulaire :les cellules lymphoblastoïdes	82
B) Culture cellulaire : les fibroblastes.	82
C) Préparation du substrat radioactif OL-I.	83
D) Incubations.	84
1) Cellules lymphoblastoïdes	84
2) Fibroblastes	85
a) témoin	85
b) cellules sans mannonolactone	86
<u>III- RESULTATS-DISCUSSION</u>	86
A) Cellules lymphoblastoïdes	86
B) Les fibroblastes.	88
1) En présence de mannonolactone	88
2) En absence de mannonolactone	88
<u>IV - CONCLUSION</u>	88
<u>PREPARATION D'UNE FRACTION PURIFIEE EN ENDO-N-ACETYL-β-D-GLUCOSAMINIDASE LYSOSOMIQUE</u>	92
<u>I INTRODUCTION</u>	93
<u>II- MATERIEL ET METHODES</u>	93
A) Le substrat OL-I	93
B) Le fractionnement cellulaire	94
C) Dosage des protéines	94
D) Dosage de l'activité endo-N-Acétyl- β -D-glucosaminidase	94
E) Définition de l'unité d'activité enzymatique	94
F) Dosage des activités exoglycosidases	95
<u>III RESULTATS</u>	95

<u>IV DISCUSSION</u>	95
<u>MISE EN EVIDENCE D'UNE ACTIVITE SIALYL-ENDO-N-ACÉTYL-β-D-GLUCOSAMINIDASE LYSOSOMIQUE</u>	100
<u>I - INTRODUCTION</u>	101
<u>II - MATERIEL ET METHODES</u>	102
A) Préparation des substrats.	102
B) Préparation des fractions enzymatiques.	103
1) Fractionnement cellulaire	103
2) Aspartylglucosaminidase	103
3) Endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase	104
C) Activités exoglycosidases.	104
D) Chromatographie couche mince.	105
E) Analyses RMN.	105
<u>III - RESULTATS</u>	105
A) Analyse du spectre RMN du sialylglycoasparagine GP-I.	106
B) Etude du spectre de l'oligosaccharide OL-II : Action de l'aspartamidase.	107
C) Analyse du spectre RMN de OL-III : mise en évidence d'une activité endoglucosaminidase lysosomique.	108
<u>IV -DISCUSSION</u>	112
<u>ETUDE DU CATABOLISME IN VITRO DES N-GLYCANNES</u>	114
<u>I - INTRODUCTION</u>	115
<u>II - MATERIEL ET METHODES</u>	118
A) Obtention des substrats.	118
1) L'oligosaccharide OL-A	118
2) Le glycopeptide GP-A	118
B) Préparation des fractions enzymatiques	118
C) Incubations	119
D) Analyses RMN	119
<u>III - RESULTATS</u>	122
A) Hydrolyse du substrat oligosaccharidique OL-A	122
1) Oligosaccharide OL-A de référence (temps = 0h)	122
2) A 1 heure d'hydrolyse	122
3) A 2 heures, 4 heures et 8 heures d'hydrolyse	124
4) A 24 heures d'hydrolyse	124
5) Conclusion	125
B) Hydrolyse du glycopeptide GP-A	128
1) Glycopeptide GP-A de référence temps = 0	128

2) A 2 heures et 4 heures d'hydrolyse	128
3) A 8 heures d'hydrolyse	129
4) A 24 heures d'hydrolyse	129
5) A 36 heures d'hydrolyse	131
6) Conclusion	131

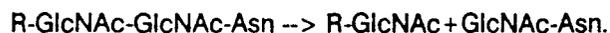
<u>IV - DISCUSSION</u>	132
-------------------------------	-----

CONCLUSION GENERALE

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

Il est établi depuis longtemps que le catabolisme des glycoprotéines fait appel à l'action des protéases et des glycosidases lysosomiques. L'étude des structures oligosaccharidiques accumulées dans les tissus de patients atteints de glycoprotéinoses a mis en lumière le rôle des exoglycosidases dans ces processus catabolismes. Une énigme subsistait quant aux séquences enzymatiques conduisant à la dégradation du chaînon GlcNAc-Asn constituant le point d'attache sucre-protéine. La présence d'oligosaccharides excrétés avec une seule GlcNAc réductrice dans les cas de glycoprotéinoses (dues à un déficit en exoglycosidases) amena STRECKER et MONTREUIL en 1975 à postuler que le catabolisme des N-glycannes débutait par l'action d'une endo-N-Acétyle- β -D-glucosaminidase clivant le chaînon chitobiose suivant le schéma :



Les travaux du groupe de G. SPIK au laboratoire en 1979-1980 ont abouti à la mise en évidence d'une endo-N-Acétyle- β -D-glucosaminidase cytosolique. Cet enzyme permettait alors d'expliquer l'existence d'oligosaccharides à une seule GlcNAc terminale réductrice dans les tissus atteints de glycoprotéinoses. Cependant, cet enzyme cytosolique, hydrolysant des glycopeptides, restait inactif sur des structures sialylées. De plus sa localisation cytosolique était difficilement conciliable avec sa participation au catabolisme lysosomique des glycoprotéines.

C'est ensuite T. BAUSSANT qui au laboratoire mit en évidence une activité endo-N-acétyle- β -D-glucosaminidase lysosomique. Ce nouvel enzyme, de par sa spécificité restreinte aux oligosaccharides possédant en position terminale réductrice le chaînon N,N'-diacétylchitobiose, ne pouvait intervenir qu'après l'aspartylglucosaminidase. (aspartamidase). Ces travaux sur l'endoglucosaminidase lysosomique et l'aspartamidase amenèrent STRECKER, MICHALSKI et BAUSSANT à postuler que le catabolisme des N-glycannes débutait par la séquence

enzymatique aspartamidase, puis endoglucosaminidase dont le rôle serait de favoriser l'action des exoglycosidases, plus actives sur des oligosaccharides que sur des glycopeptides.

Notre travail au sein du groupe de G. STRECKER, constitue une prolongation de travaux préalablement énoncés et a consisté en la purification partielle de l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase lysosomique, à rechercher et caractériser une activité sialyl-endoglucosaminidase lysosomique, qui pourrait rendre compte de l'excrétion urinaire de sialyloligosaccharides à une seule GlcNAc terminale réductrice dans les cas de sialidoses. Dans ce cadre, nous avons également tenté de mettre en évidence une activité endoglucosaminidase lysosomique dans les cellules humaines. Dans une seconde partie, nous avons étudié *in vitro*, le catabolisme d'oligosaccharides et de glycopeptides afin d'étudier les rôles respectifs des exoglycosidases et du système aspartamidase-endoglucosaminidase lysosomique ;

GENERALITES

LES LYSOSOMES

C'est en 1955, que DE DUVE et al. (38) donnent le nom de "lysosomes" à un groupe de particules cytoplasmiques renfermant une quarantaine d'activités enzymatiques hydrolytiques.

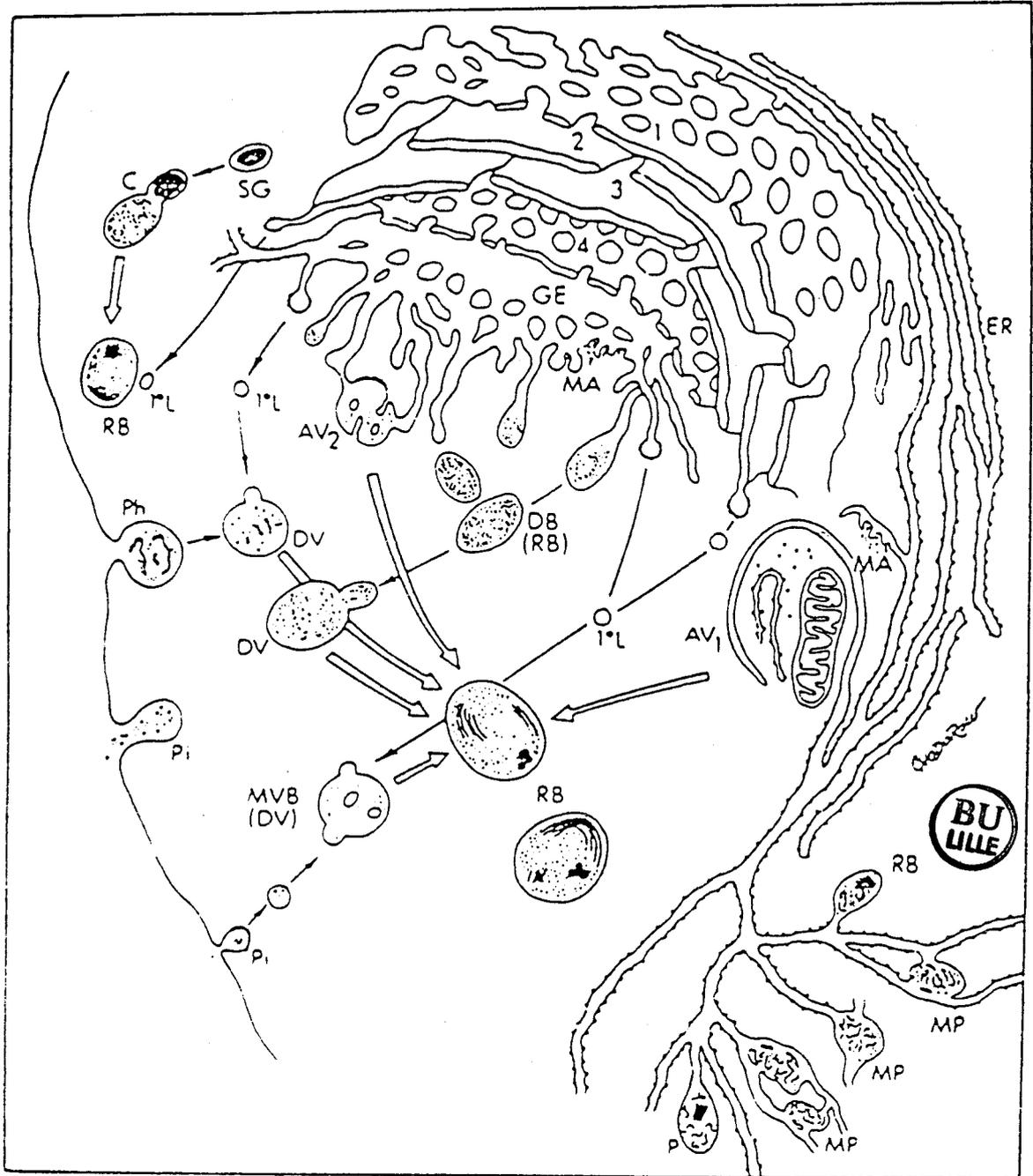
Ces enzymes, dont l'activité optimale se situe à pH acide, furent appelés hydrolases acides : ils se trouvent sequestrés au sein du lysosome grâce à une membrane (dont les caractéristiques essentielles seront discutées dans la suite de cet exposé) destinée à assurer une compartimentation, et ainsi éviter l'attaque du cytoplasme environnant.

I - ORIGINE DES LYSOSOMES

Dans les cellules à activités macrophagiques (granulocytes, macrophages, monocytes), les lysosomes se forment directement à partir de l'appareil de Golgi selon la voie classique de synthèse et d'emballage des protéines (136).

Pour ce qui concerne les autres types cellulaires, les lysosomes se forment par vésiculation de la région "trans" de l'appareil de Golgi, dénommée G.E.R.L [pour Golgi associated smooth Endoplasmic Reticulum that forms Lysosomes (127)]. Cette relation entre lysosomes et trans-Golgi a été établie à la suite d'expériences de cytochimie utilisant des enzymes marqueurs, tels la phosphatase acide (144).

Le GERL donne ainsi naissance à 4 types de lysosomes (Fig. 1) :



1°L : Lysosomes primaires
 AV1 : Vacuoles autophagiques de type I
 AV2 : Vacuoles autophagiques de type II
 C : Crinophagie
 DB : Corps dense
 DV : Vacuole digestive
 ER : Réticulum ergastoplasmique

GE : GERL
 MA : Microantophagie
 MP : Microperoxyssomes
 p : Peroxyssomes
 Ph : Vacuole de phagocytose
 P : Vacuole de pinocytose
 RB : Corps résiduel
 SG : Granule de sécrétion

FIGURE 1 : Origine et rôles des lysosomes. (NOVIKOFF et al. 1973) (128)

Les "coated vesicles" :

Ainsi dénommées car ces vésicules sont tapissées sur leur face externe par une protéine particulière : la clathrine, dont la structure moléculaire leur donne un aspect hérissé. Ces vésicules contiennent un équipement enzymatique "vierge" n'ayant encore participé à aucun processus hydrolytique. Ce sont elles qui sont à l'origine des lysosomes primaires.

Les vacuoles autophagiques de type I :

Dans ce cas, le GERL, riche en hydrolases englobe une partie de cytoplasme contenant des organites (mitochondries, réticulum endoplasmique..). Une fois la vésicule formée, il y a déversement des hydrolases au sein de la vacuole et digestion du contenu de celle-ci, qui la digestion terminée deviendra un corps résiduel

Les vacuoles autophagiques de type II :

Dans ce cas, le GERL englobe une portion de cytosol ou de glycogène qui sont digérés comme dans le cas précédent.

Les corps résiduels :

Ils contiennent les résidus de la digestion autophagique.

II - CARACTERISTIQUES GENERALES

Diverses méthodes de préparation de lysosomes par centrifugation différentielle à partir d'homogénats cellulaires ont été décrites. Les détails méthodologiques figurent dans la monographie de DINGLE (1977) (40). Plus récemment, KAMRATH et al. (84) ont mis au point une méthode de purification de lysosomes par chromatographie d'affinité sur lectine (Ricinus communis agglutinins I + II) permettant selon eux de préserver l'intégrité du lysosome mieux que lors de préparations par centrifugation différentielle.

Le moyen d'identifier une population d'organites à des lysosomes est la co-sédimentation (dans le cas de préparation par centrifugation) ou la co-chromatographie (dans le cas de préparation par affinité) des hydrolases acides. Toutefois, ces activités hydrolytiques

acides s'exprimeront avec une certaine "latence" due à la présence et aux propriétés de la membrane lysosomique. En effet, celle-ci étant généralement imperméable aux substrats et aux enzymes, les activités hydrolytiques ne s'exprimeront qu'après rupture de la barrière membranaire (que l'on peut obtenir expérimentalement par action de détergents, par choc osmotique, par congélation, décongélation, par sonication, etc...)

A) La membrane lysosomique et sa perméabilité

Les propriétés de la membrane lysosomique ont été étudiées par REIJNGOUD et TAGER (1977) (157). Cette membrane, longtemps considérée comme un simple "cordon sanitaire" destiné à préserver le cytoplasme des enzymes, a fait l'objet de nombreuses études qui ont permis une meilleure connaissance de son rôle et de la physiologie lysosomique (101).

Si la membrane du lysosome assure une ségrégation efficace entre cytoplasme et milieu intra-lysosomique, elle a également un rôle important en ce qui concerne l'économie de la cellule. Par sa perméabilité sélective, grâce à divers transporteurs intégrés, elle contribue à assurer un fonctionnement optimal de toute la machinerie enzymatique de l'organite. En effet, la membrane doit assurer un équilibre entre l'efflux des métabolites issus de la digestion (sinon il y aurait un engorgement à l'origine d'une augmentation de pression osmotique pouvant produire l'éclatement de l'organite (32) et l'influx de substrats.

1) L'efflux de métabolites

Il paraît évident que les produits finals de la digestion lysosomique doivent traverser la membrane vers le cytosol. Ce sont : les amino-acides, les monosaccharides, les nucléosides et les anions minéraux. Par exemple, des lysosomes isolés contenant des protéines marquées à l'iode 125 relarguent de la tyrosine marquée (113). De même, des lysosomes contenant des glycoprotéines marquées laissent passer au travers de leur membrane du sulfate et des N-acétyl hexosamines (163).

2) Les macromolécules

Les protéines, polysaccharides, glycosaminoglycannes, les polynucléotides ne peuvent sortir du lysosome (101). Ainsi dans la glycogénose de type II (déficiency en α -glucosidase lysosomique), la glycogène-phosphorylase cytoplasmique ne peut atteindre le glycogène car il est intra-lysosomique.

3) Les peptides et les acides aminés

Les amino-acides ne semblent pas pouvoir traverser la membrane lysosomique, alors que les dipeptides peuvent le faire à l'exception de (D-Glu)₂ et Gly-Glu (31,58). Il semble que la majorité des acides aminés quittent le lysosome grâce à des transporteurs dont les spécificités sont encore mal connues (145,146). La seule déficiency en transporteur mise en évidence concerne la cystinose : accumulation de cystine (91,173).

4) *Les glucides*

Les monosaccharides sont perméants par diffusion facilitée (145). Une déficience du transporteur à l'origine de la maladie de Salla (accumulation lysosomique d'acide sialique) a d'ailleurs été décrite (160,161). Les disaccharides et à fortiori les oligosaccharides plus importants ne peuvent quitter le lysosome (32).

5) *Les nucléotides*

Ils ne sont pas perméants et doivent être hydrolysés en nucléosides et phosphate pour le devenir (25)

6) *Les protons*

Une pompe à protons ATP-dépendante assure le maintien du pH lysosomique. Une étude plus détaillée sera présentée dans la suite de ce mémoire.

B) Le pH lysosomique

Les enzymes lysosomiques ont pour leur grande majorité un pH optimum acide et sont pour la plupart inactifs à un pH voisin de la neutralité. C'est cette constatation qui a conduit COFFEY et DE DUVE en 1968 à émettre l'hypothèse d'un pH intra-lysosomique très bas par rapport à celui du cytosol (30).

Afin de mesurer le pH intra-lysosomique, deux méthodes sont possibles :

- la distribution de bases faibles entre les compartiments intra et extra-lysosomiques. Cette méthode se fonde sur le fait que ces bases ne peuvent traverser la membrane que si elles sont chargées et qu'à l'équilibre on aura une concentration identique en forme neutre de part et d'autre de la membrane. Cette méthode a été appliquée à la mesure du pH lysosomique par GOLDMAN et al. (59) et par HOLLEMANS et al. (81).

- la méthode à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). Le FITC couplé à un polymère de dextran est incorporé dans les lysosomes par les voies classiques d'endocytose. Le spectre d'excitation du dextran marqué est dépendant du pH. La valeur du pH est donnée par le rapport de l'intensité de fluorescence pour des longueurs d'onde d'excitation de 495 nm et 450 nm (131).

Ces méthodes ont permis de calculer le pH lysosomique de différents type cellulaires. Ces pH sont compris entre 4,5 et 5,5 (110).

Deux mécanismes ont été proposés pour expliquer l'acidification et le maintien du pH lysosomique :

- un équilibre acide-base de type DONNAN. Cette théorie s'appuie sur le fait que la matrice lysosomique peut être considérée comme une solution isotonique contenant de nombreuses glycoprotéines de point isoélectrique très bas assurant ainsi un pH acide (59,158)

- l'action d'une pompe à protons membranaire Mg^{2+} et ATP dépendante, démontrée en 1982 par OHKUMA et al. (129). Le mécanisme de fonctionnement et la structure de cette pompe restent encore inconnus (32)

III - ROLES DES LYSOSOMES

Du fait de la présence de toute une panoplie enzymatique hydrolytique les lysosomes auront d'une part une fonction hétérophagique (digestion de substrats extra-cellulaires) et d'autre part, une fonction autophagique (digestion de substrats endo-cellulaires).

A) Autophagie

L'autophagie se définit comme un processus par lequel la cellule digère au sein des lysosomes ses propres constituants (macromolécules, mitochondries, réticulum...) Elle a été mise en évidence par ERICSSON en 1969 (47).

Physiologiquement, elle a plusieurs raisons d'être :

- 1) Elle permet d'assurer un "approvisionnement" en nutriments quand la cellule (ou l'animal) se trouve carencée en ceux-ci (animal privé de nourriture par exemple). Ainsi, le foie, dont l'une des fonctions principales est la régulation de la concentration sérique en nutriments (cette fonction étant assurée par les hépatocytes) est un organe qui réagit de façon drastique au jeûne en pratiquant une autophagie importante (64).
- 2) Elle a un rôle pour ce qui concerne la sécrétion de certaines molécules. Les vésicules de sécrétion fusionnent avec des lysosomes qui dégradent leur contenu. Ce processus appelé crinophagie est considéré comme une forme d'autophagie (22,64).
- 3) Elle permet à la cellule de se débarrasser de macromolécules ou d'organites usagés ou abîmés.

L'englobement d'une partie du cytosol, donnant naissance à une vacuole autophagique de type I ou II, (voir précédemment, origine des lysosomes) se fait essentiellement au niveau du GERL, bien que des cas de vésicules autophagiques à partir du réticulum endoplasmique aient été décrits (55). Les lysosomes eux-mêmes peuvent être à l'origine d'autophagie, on parle alors

de microautophagie (55,121). Ce dernier cas pouvant expliquer le catabolisme des glycoprotéines endocellulaires in vivo.

Les processus autophagiques sont sous la dépendance de certaines hormones (107), de la concentration cellulaire en acides aminés. Ils sont ATP, pH et Ca dépendants (63,168) et nécessitent la participation du cytosquelette (micro-tubules, microfilaments) ainsi que celle de filaments intermédiaires tels que les kératines (64) (Fig.2).

B) Hétérophagie.

C'est un processus par lequel des particules ou des molécules d'origine exo-cellulaire seront digérées au sein des lysosomes. Cette fonction hétérophagique des lysosomes est donc couplée au phénomène d'endocytose dont on distingue généralement deux types (fig 3)

- La phagocytose : elle permet l'ingestion de grosses particules insolubles (bactéries, macromolécules) généralement observables au microscope, donnant naissance à une vésicule d'endocytose appelée phagosome (dont le diamètre atteint 0,1 - 0,2 μ m).
- La pinocytose : elle aboutit à l'internalisation de molécules solubles, plus petites au sein de vésicules appelées endosomes : terme qui en fait regroupe une population hétérogène de vacuoles d'endocytose (71)

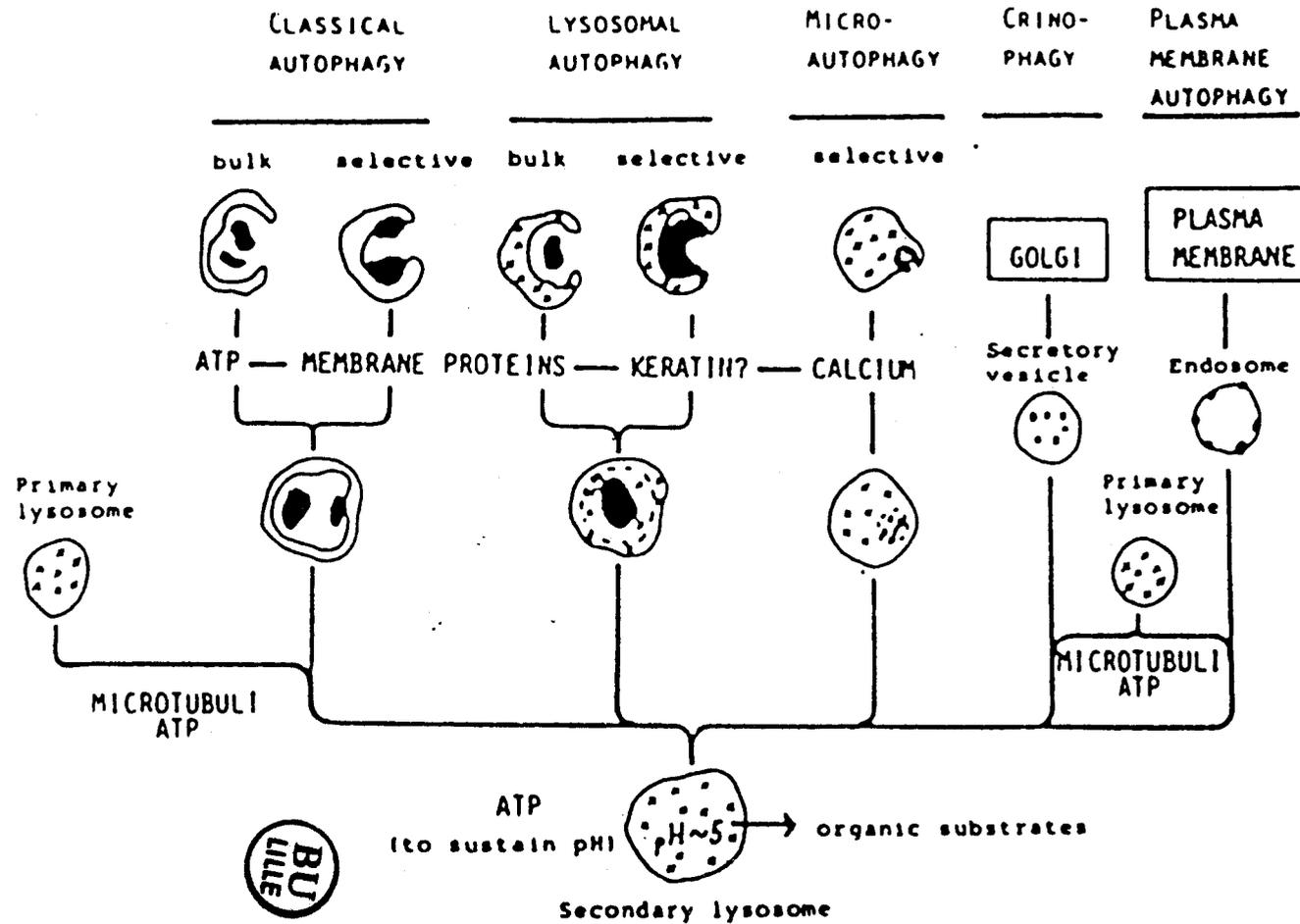


FIGURE 2 : Mécanismes de l'autophagie. (D'après GRINDE, (64),)

1) la phagocytose :

Expérimentalement, elle se divise en deux phases :

- l'attachement de la particule à la surface cellulaire via ou non un récepteur
- l'internalisation de la particule.

Chacune de ces deux phases dépend de différents événements résumés par STOSSEL

(187) :

- reconnaissance de la particule par la membrane plasmique du phagocyte
- le phagocyte reçoit le message de reconnaissance
- le phagocyte transmet le message de reconnaissance au cytoplasme afin de déclencher l'internalisation
- la membrane plasmique adhère fortement à la particule
- la membrane plasmique émet des pseudopodes
- fusion des pseudopodes et internalisation de la particule.

La phagocytose est sous la dépendance de divers facteurs tels que, modification du potentiel de membrane en raison de l'association membrane-ligand, présence de récepteurs membranaires (en particulier récepteur du fragment Fc des immunoglobulines) modification chimique de divers composants membranaires (carboxyméthylation) (205), association de la particule avec des protéines sériques qui favoriseront sa reconnaissance par le phagocyte : c'est le concept d'opsonisation dont l'exemple le mieux connu est constitué par les immunoglobulines G (23).

Celles-ci, après s'être associées aux antigènes de surface d'une bactérie ou d'un érythrocyte par exemple, voient leurs fragments Fc reconnu par un récepteur membranaire du

macrophage. Ce processus permet au complexe particule opsonisée récepteur d'être internalisé afin de permettre au phagosome ainsi formé la fusion avec des lysosomes primaires.

2) la pinocytose

Selon que l'internalisation de molécules solubles se produit via un récepteur ou non, on distinguera deux types de pinocytose dits respectivement adsorptive ou en phase fluide (Fig 4).

a) la pinocytose en phase fluide

Dans ce cas, la membrane plasmique englobe une fraction de liquide extra-cellulaire contenant des molécules en solution. Il en résulte la formation d'une vésicule appelée macropinosome (137).

Le taux d'internalisation est proportionnel, à la concentration extra-cellulaire du soluté. Il se trouve régulé par différents facteurs détaillés dans la revue de BESTERMAN et LOW (20). Il a été estimé par STEINMAN et al. (183).

Etudiant des macrophages, ces auteurs ont trouvé que, ces cellules pouvaient internaliser par pinocytose environ l'équivalent de 25 % de leur volume cellulaire et 185 % de leur surface cellulaire par heure. Ces résultats indiquent que ce type de pinocytose est l'un des phénomènes à l'origine du flux membranaire continu qui existe dans toutes les cellules. C'est pourquoi, la pinocytose en phase fluide ne peut être dissociée du phénomène antagoniste d'exocytose, l'un internalisant de grosses quantités de membranes, tandis que l'autre les restaure assurant ainsi un bon équilibre membranaire (122,174). Un autre rôle a été dévolu à la pinocytose en phase fluide : elle serait le moyen par lequel la cellule assurerait un approvisionnement en amino-acides d'origine exogène, tout particulièrement dans les cas de déprivation, et ceci afin d'assurer une synthèse protéique de novo (20,65).

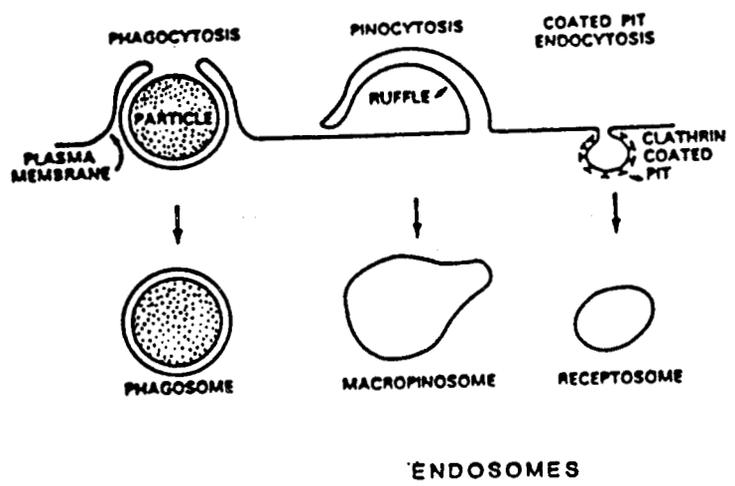


FIGURE 3 : Représentation schématique des différents types d'endocytose.
(d'après PASTAN et WILLINGHAM (137).)

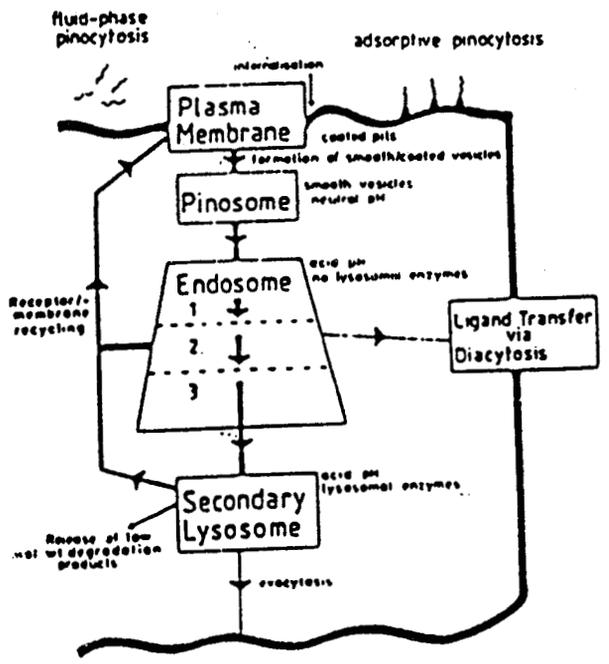


FIGURE 4 : La pinocytose : représentation schématique.
(d'après PASTAN et WILLINGHAM (137).)

b) La pinocytose adsorptive

Toutes les cellules (sauf les érythrocytes) possèdent à leur surface un certain nombre de récepteurs auxquels peuvent se lier des ligands spécifiques. L'association récepteur-ligand a pour conséquence un déplacement latéral du complexe vers des régions spécialisées de la membrane plasmique (60). Ces régions dénommées en anglais "coated pits" (6) sont tapissées sur leur face interne d'un réseau macromoléculaire, constitué d'une protéine caractéristique : la clathrine (139), de masse moléculaire 180000 daltons. Dès lors qu'un certain nombre de complexes récepteur-ligand ont été concentrés au niveau de ces puits recouverts ("coated pits"), il y a formation d'une vésicule d'endocytose tapissée de clathrine. Très rapidement, par action d'un enzyme ATP-dépendant (171) le manteau de clathrine se dépolymérise pour donner naissance à une vésicule appelée endosome.

Les endosomes sont acidifiés par une pompe à protons ATP- dépendante (201). Cette acidification a pour conséquence la dissociation des complexes récepteur ligand (ce compartiment de dissociation a été appelé CURL : Compartment of Uncoupling Receptors and Ligands). A ce stade, plusieurs évènements sont possibles :

- recyclage du récepteur et du ligand, au niveau de la membrane plasmique : c'est le cas de la transferrine qui après avoir perdu son fer dans les endosomes est recyclée.
- recyclage du récepteur seul ; dégradation du ligand, c'est le cas des asialo-glycoprotéines plasmatiques qui sont dégradées au sein des lysosomes alors que le récepteur hépatocytaire d'Ashwell est recyclé.
- dégradation lysosomique du ligand et du récepteur : c'est le cas des IgG et de leur récepteur.
- les endosomes sont guidés vers le Golgi. De là, leur contenu est dirigé vers sa destination cellulaire finale.

Tous ces cas de figure sont détaillés dans la revue de STAHL et SCHWARTZ (180) qui définissent 7 classes de systèmes récepteur-ligand. (Voir tableau 1).

c) Exocytose

Comme nous l'avons mentionné préalablement (Voir II-A) seules les petites molécules peuvent être exportées du lysosome. Toutefois, une fraction de matériel non dégradé peut s'y accumuler. Bien que très rare (en raison d'une éventuelle toxicité de ces composés), il peut arriver que de tels matériaux soient libérés dans le milieu extra-cellulaire. D'ordinaire, les lysosomes, contenant des substrats non totalement dégradés, évoluent en corps résiduels d'aspect caractéristique en microscopie électronique (voir I.4).

Chez certains protozoaires tels que Amoeba proteus, il a été mis en évidence des processus d'exocytose permettant à la cellule de se débarrasser de composés préalablement pinocytés et n'ayant pas été totalement digérés dans les lysosomes (153).

IV - PATHOLOGIE LYSOSOMIQUE

Les lysosomes possèdent un équipement enzymatique leur permettant de dégrader une grande variété de substrats.

	Ligand	Receptor	Cell types
Cell nutrients	LDL (cholesterol)	LDL-R	all
	transferrin (iron)	transferrin-R	all
	vitellogenin	vitellogenin-R	egg
	transcobalamin (B ₁₂)	TC-II-R	all
Growth factors and hormones	insulin	insulin-R	adipocyte hepatocyte
	EGF	EGF-R	epithelial
	PDGF	PDGF-R	epithelial
	luteinizing hormone/follicle-stimulating hormone/ human chorionic gonadotropin	gonadotropin-R	gonadal
Viruses	influenza	?	
Toxins	diphtheria	?	
	pseudomonas exotoxin	?	
	ricin	?	
Protein clearance systems	mannosylated proteins	mannose-R	macrophage
	asialoglycoproteins	ASGP-R	hepatocyte
	α -2-macroglobulin-protease	α -2M-R	fibroblast
	Fc modified lipoproteins	Fc-R scavenger-R	macrophage macrophage
Transcellular systems	IgA	IgA-R	epithelial
	IgG	IgG-R	gut epithelial
Protein processing	antigen (lysozyme)	Ia	macrophage
	lysosomal enzymes	M-6-P-R	fibroblast
	f-met-leu-phe	chemotactic peptide-R	granulocyte
	parathyroid hormone	PTH-R	macrophage

TABLEAU I : Les 7 classes de systèmes récepteur-ligand.
(d'après STAHL et SCHWARTZ. (180).)

Plusieurs types de pathologies ont été décrits portant notamment sur :

- la rupture de la membrane lysosomique.
- le déversement des hydrolases acides dans le milieu extra-cellulaire.
- des surcharges à la suite de déficits enzymatiques.

A) Rupture de la membrane

Certaines circonstances peuvent provoquer une rupture de la membrane lysosomique (acidose, anoxie). On observe alors une autophagie de la cellule, c'est notamment le cas de deux maladies particulières : la silicose et la goutte (perforation de la membrane par respectivement des cristaux de silice et d'acide urique). Expérimentalement, on peut provoquer des ruptures de membrane par congélations et décongélations répétées.

B) Déversement des enzymes dans le milieu extra-cellulaire

Il intervient lors de la fusion prématurée de lysosomes avec des vésicules d'endocytose avant que celles-ci ne se soient refermées. Ce type d'accident a pour conséquence des états inflammatoires locaux.

C) Surcharge lysosomique par déficit enzymatique

C'est HERS (72) qui a énoncé le concept de maladie génétique de surcharge, à la suite de travaux sur la maladie de POMPE (déficit en α -D-glucosidase lysosomique). Ces pathologies de surcharge, sont dues à un déficit primaire en enzymes (ou éventuellement en protéine structurale).

Elle se caractérisent par une accumulation de polymères non dégradés au sein des lysosomes, qui prennent alors un aspect vacuolé caractéristique, à l'origine du diagnostic de

certaines de ces maladies. On observera dans le cas de produits d'accumulation micro-moléculaires solubles, une importante excrétion urinaire de ceux-ci, qui constitueront alors un matériel de choix pour une étude biochimique de ces troubles. C'est notamment le cas des glycoprotéinoses qui seront étudiées plus en détail dans la suite de ce mémoire.

Plus d'une vingtaine de maladies lysosomiques congénitales ont été décrites (90,138), leur mode de transmission est généralement autosomal récessif, quelques unes sont liées au sexe (maladie de FABRY, déficience en α -galactosidase par exemple).

LES GLYCOSIDASES LYSOSOMIQUES

A ce jour, plus d'une cinquantaine d'hydrolases acides ont été décrites. La revue générale de BARRETT et HEATH (11) présente une synthèse de l'abondante littérature concernant ce sujet. Ce chapitre a pour but de préciser les caractéristiques et les propriétés générales des glycosidases.

I - CARACTERISTIQUES GENERALES DES HYDROLASES ACIDES

A) pH dépendance et stabilité

Le pH optimum des enzymes lysosomiques varie avec différents facteurs tels que : la nature du substrat, le tampon utilisé, la force ionique du milieu, la présence ou l'absence d'effecteurs. Cependant, les différents travaux concernant les hydrolases acides montrent que celles-ci présentent un maximum d'activité dans une zone de pH comprise entre 4,0 et 5,5.

L'aspartyl-glucosaminidase (104) et l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase (14) présentent des pH optimaux respectivement de 7,5 et 3,5. In vivo, les glycosidases lysosomiques se trouvent dans un milieu de pH 4,5-5,5 suivant le type cellulaire étudié (155) et au voisinage de nombreux enzymes protéolytiques.

D'après GOLDBERG et ST-JOHN (57), ces enzymes, stables en milieu acide, ne se trouvent pas dénaturés et ne sont pas dégradés par les protéases. Ainsi, la dénaturation acide serait nécessaire pour permettre une action protéolytique. Cette stabilité en milieu acide pourrait être due à la présence de la chaîne glycanique, comme il l'a été démontré pour la ribonucléase B (29) ou la carboxypeptidase Y (196).

En ce qui concerne le renouvellement des enzymes in vivo, les seules données viennent d'expérience de "recapture" enzymatique par des fibroblastes en culture. BARTON et NEUFELD (1971) (13) ont déterminé des demi-vies de 3 jours pour la β -glucuronidase et 9 jours pour la α -L-iduronidase.

B) Propriétés structurales

Les enzymes lysosomiques représentent une population de protéines très hétérogènes dont la masse molaire est comprise entre 15 000 et 280 000 pour la β -glucuronidase. Ces enzymes sont en général multimériques, les différentes sous-unités pouvant être dissociées par le sodium dodécyl sulfate ou le chlorhydrate de guanidine. Le taux de ponts disulfures varie de 0,5 à 6% environ et semble être d'autant plus important que l'enzyme est de petite taille.

Toutes les glycosidases décrites à ce jour sont des glycoprotéines. Le tableau II rassemble les compositions glucidiques de quelques hydrolases acides. Nous reviendrons ultérieurement sur la détermination des structures des glycannes, ceci en raison du rôle fondamental qu'ils jouent dans les processus de ségrégation cellulaire (voir chapitre transport cellulaire des glycosidases).

C) Spécificité et formes multiples (isoenzymes) (voir les revues générales de ROBINSON 1974 (162), SPIK 1977 (178) et SCHRAM et TAGER 1981 (175)).

TABLEAU II : Composition glucidique de quelques hydrolases lysosomiques.

ENZYME	SUCRES (mg/100 mg protéine)						REFERENCES	
	Fuc	Gal	Glc	Man	GlcNAc	NeuAc		
β -Glucuronidase	foie souris	-	0,23	0,44	4,52	2,10	-	Tomino <u>et al.</u> 1975 (197)
	foie rat	0,30	0,20	0,42	2,94	2,07	-	Tulsiani <u>et al.</u> 1978 (199)
	glande prépatiale de rat	0,21	0,17	0,17	2,82	1,92	-	Tulsiani <u>et al.</u> 1975 (200)
α -L-fucosidase	foie rat	0,35	0,80	0,90	3,20	3,20	0,80	Opheim et Touster 1977(133)
	foie humain	0,56	0,30	0,58	3,00	1,87	0,55	Alhadeff et Freeze 1977(5)
β -hexosaminidase A	Placenta humain	-	0,52	1,11	2,17	1,96	0,18	Freeze <u>et al.</u> 1979 (53)
	foie humain	-	0,47	-	3,85	1,37	0,45	Joziassse <u>et al.</u> 1981 (83)
	cerveau boeuf	-	1,24	-	2,70	2,06	0,18	Overdijk <u>et al.</u> 1982 (135)
β -hexosaminidase B	Placenta humain	-	0,35	0,32	2,37	1,36	0,09	Freeze <u>et al.</u> 1979 (53)
	foie humain	-	0,61	-	3,96	1,43	0,70	Joziassse <u>et al.</u> 1981 (83)
	cerveau boeuf	-	0,82	-	1,72	1,33	0,18	Overdijk <u>et al.</u> 1982 (135)



Le terme isoenzyme désigne des familles enzymatiques ayant les mêmes propriétés catalytiques portées par des formes moléculaires différentes que l'on peut mettre en évidence par des différences de propriétés physiques telles que :

- le pHi (point isoélectrique)
- le pH optimum
- la mobilité électrophorétique
- la stabilité à la dénaturation (chaleur, agents chimiques)
- les paramètres cinétiques

On rencontre tout d'abord une hétérogénéité quant à la distribution sub-cellulaire des différentes formes. En effet, si la majorité des glycosidases sont lysosomiques, d'autres isoenzymes peuvent se rencontrer dans les autres compartiments cellulaires. Il en est ainsi de la neuraminidase qui a été mise en évidence dans les membranes plasmiques, l'appareil de Golgi (35,214) et récemment au niveau du cytosol de macrophages alvéolaires du rat (143). De même, des endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidases ont été mises en évidence à la fois dans le lysosome et dans le cytosol d'hépatocyte de rat (16,95,141)

On peut également mettre en évidence l'existence de formes isoenzymatiques au sein du même organe. Dans le lysosome, on rencontre à la fois des mannosidases spécifiques des liaisons α 1-3 et α 1-6 et une mannosidase spécifique des liaisons β du mannose. (Par contre, les α 1-2 mannosidases sont également rencontrées dans les microsomes, et interviennent en cours de biosynthèse). Cette multiplicité des glycosidases est due au fait que ces enzymes sont spécifiques plus d'un type de liaison que d'un substrat déterminé.

D'un point de vue clinique, l'étude des isoenzymes, revêt un intérêt diagnostique. PLUCINSKI *et al.* (147), étudiant la β -hexosaminidase sérique et hépatocytaire de patients atteints de tumeurs hépatiques, ont mis en évidence l'existence d'un variant enzymatique (qui se distingue de la forme normale par un pHi plus acide et une stabilité thermique plus faible).

De même, BEYER et WIEDERSCHAIN, s'appuyant sur le fait que l' α -L-fucosidase et l'hexosaminidase sont identiques dans les tissus foetaux et placentaires proposent de doser les isoenzymes de ces deux glycosidases sur des biopsies placentaires afin de pouvoir diagnostiquer précocement les fucosidoses, (déficit en α -L-fucosidases), les maladies de Tay-Sachs (déficit en hexosaminidase A) et de Sandhoff (déficience en hexosaminidases A et B) (21).

L'existence d'isoenzymes peut s'expliquer de deux façons :

- tout d'abord, le polymorphisme peut être d'origine génétique.

* d'une part les variations alléliques des gènes codant pour ces protéines sont à l'origine de formes isoenzymatiques différentes que l'on peut mettre en évidence par électrophorèse (193)

* d'autre part, les différentes associations des sous-unités constituant certaines glycosidases aboutissent à la formation de formes Isoenzymatiques. C'est ainsi que l'hexosaminidase A est un hétéropolymère constitué de 2 sous-unités α et de deux sous-unités β tandis que l'hexosaminidase B est un homopolymère $(\beta)_2$

- ensuite, les formes isoenzymatiques peuvent être produites par des modifications post-traductionnelles, telles que notamment la glycosylation. Des différences de sialylation des glycosidases sont responsables par exemple de leurs différences de mobilité électrophorétique (61).

II - BIOSYNTHESE ET TRANSPORT DES ENZYMES LYSOSOMIQUES

A) Biosynthèse des enzymes lysosomiques

Les glycosidases comme toutes les hydrolases acides sont synthétisées (pour ce qui concerne la partie protéique) par les polyribosomes liés au réticulum endoplasmique (d'où l'appellation R.E.R : Réticulum Endoplasmique Rugueux). La protéine est initialisée à son extrémité N-terminale par une séquence hydrophobe de 20 amino-acides. Celle-ci serait reconnue par un récepteur membranaire du réticulum permettant ainsi au proenzyme nouvellement synthétisé de se retrouver dans la lumière du réticulum (voir la revue de ERICKSSON et al. (46). Une autre caractéristique structurale des proenzymes lysosomiques est leur synthèse sous forme de précurseurs de masse moléculaire plus importante que celle des enzymes matures. Ceci a été démontré en particulier pour l'hexosaminidase (69), l' α -fucosidase (93), l' α -glucosidase (77). La maturation en enzymes matures s'effectuera au sein même des lysosomes par protéolyse limitée une fois ces enzymes arrivés à leur destination finale (46).

C'est également dans le réticulum que s'effectue la glycosylation des proenzymes lysosomiques, par transfert en bloc du glycanne $\text{Glc}_3 \text{Man}_9 \text{GlcNAc}_2$ du dolichol pyrophosphate oligosaccharide sur un résidu asparaginyll de la chaîne peptidique (19,88,165).

Le pro-enzyme glycosylé va ensuite migrer du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi. Tout au long de ce parcours, le glycanne va faire l'objet de toute une série de modifications ayant pour conséquence l'édification de glycannes matures (voir la revue de GOLDBERG et al. (56).

Pour la suite de cet exposé, nous ne nous intéresserons qu'à la maturation des glycanes d'enzymes lysosomiques.

En 1971, NEUFELD et CANTZ (125) démontraient que des cellules déficientes en glycosidases pouvaient être corrigées par l'ajout dans le milieu de culture de glycosidases provenant de cellules saines, ou par co-culture avec ces cellules. Ce phénomène de "sécrétion-recapture" suggérait une absorption par pinocytose.

Depuis, un grand nombre de travaux ont mis en évidence le rôle des glycanes des hydrolases acides quant à la destination cellulaire finale de ces enzymes (voir la revue de CREEK et SLY (1984) (36).

B) Transport intracellulaire des glycosidases lysosomiques : le signal et le récepteur à mannose 6-P.

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

a) Généralités.

En 1972, HICKMAN et NEUFELD (74) montrent que les glycosidases lysosomiques secrétées par des fibroblastes normaux en culture sont rapidement endocytées par des fibroblastes déficients en enzymes, alors que ces mêmes cellules s'avèrent incapables de capturer les glycosidases secrétées par des fibroblastes de patients atteints de I-Cell-disease (mucopolipidose de type II).

Ces travaux suggéraient l'existence à la surface des cellules d'un récepteur reconnaissant un déterminant commun des enzymes lysosomiques sauf dans le cas des enzymes de I-Cell-disease. Divers travaux permirent ensuite de préciser la nature oligosaccharidique de ce signal sans toutefois pouvoir en déterminer la structure exacte (75,76).

La détermination de la nature exacte du signal a été apportée par KAPLAN et al. (96) qui avaient constaté que la pinocytose adsorptive des hydrolases acides était fortement et spécifiquement inhibée par le mannose-6-phosphate (97). Le Man 6-P fut ainsi identifié comme le signal assurant la reconnaissance des enzymes lysosomiques.

b) Etude des glycanes des glycosidases lysosomiques

Ce sont les groupes de KORNFELD (203) et HASILIK (68) qui indépendamment précisèrent la nature polymannosidique des chaînes glycaniques. Des travaux plus récents de VARKI et KORNFELD ont montré que des glycanes de type mixte pouvait également être phosphorylés (204). (figure 5) -

Dans tous les cas, le phosphate est engagé dans une liaison monoester (68,203,204). Cinq sites de phosphorylation ont été proposés (figure 5).

c) Phosphorylation du mannose.

Cette réaction se fait par transfert d'une N-acétyl-glucosamine-1-phosphate à partir d'UDP-GlcNAc sur la fonction alcool primaire du carbone 6 du mannose. Cette réaction est catalysée par un enzyme particulier : l'UDP-N-acétylglucosamine : glycoprotéine-N-acétyl-glucosamine transférase (70,159) situé dans le cis-Golgi (149) et agissant après les glucosidases I et II (92).

HASILIK et NEUFELD, en 1980, ont démontré que les enzymes lysosomiques étaient synthétisés sous forme de pro-enzymes de haute masse moléculaire (69). La maturation par protéolyse limitée étant post-golgienne, la séquence peptidique "additionnelle" pourrait

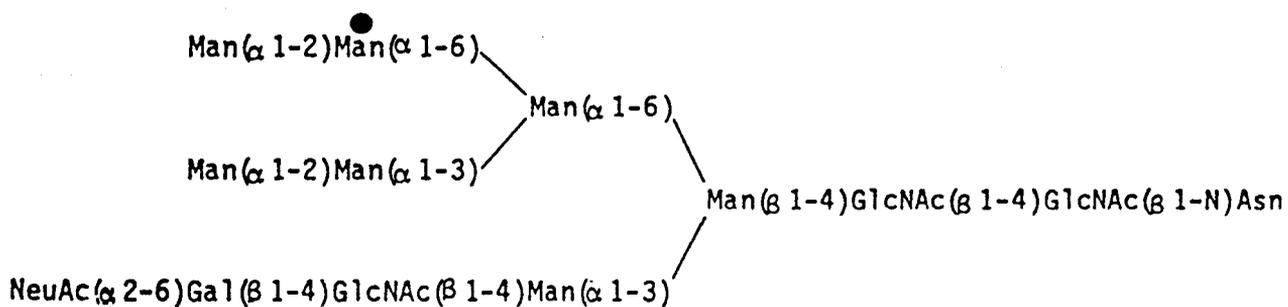
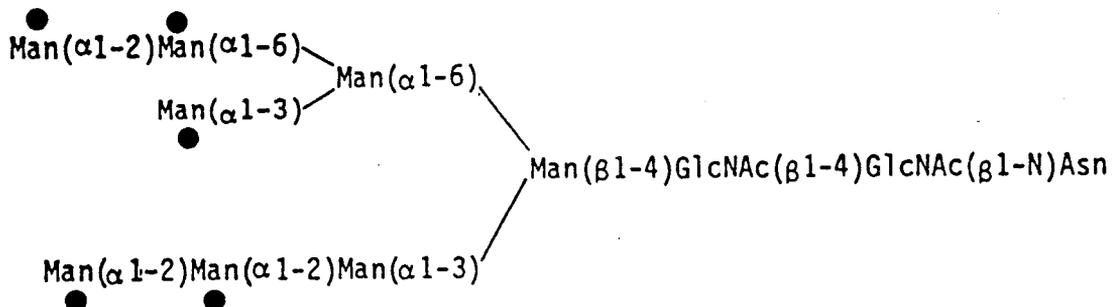


FIGURE 5 : Les sites de phosphorylation du mannose. (●)

A : structure oligomannosidique.

B : structure mixte

(d'après VARKI et KORNFELD. (204).)

constituer un signal de phosphorylation. L'existence d'une telle séquence a d'ailleurs été mise en évidence pour la β glucuronidase (164).

2) Le récepteur à Man 6-P

a) Généralités

Ce récepteur d'une masse molaire de 215 000 a été purifié par SAHAGIAN *et al.* (166) et par ROME et STEINER (182) par chromatographie d'affinité sur phospho-mannose sépharose.

Les hydrolases acides phosphorylées se fixent à ce récepteur dans l'appareil de Golgi. Celui-ci émet ensuite des vésicules pré-lysosomiques qui sont acidifiées par le jeu d'une pompe à protons, ce qui a pour conséquence une dissociation enzyme-récepteur, lequel est ensuite recyclé, regagnant la membrane golgienne tandis que les enzymes sont quant à eux intégrés dans les lysosomes.

b) Localisation cellulaire des récepteurs.

Qu'ils s'agissent de fibroblastes ou d'hépatocytes de rat 80 à 90 % des récepteurs ont été trouvés au niveau des membranes intracellulaires (Réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, lysosome) (50). Les 10 à 20 % restant se situent au niveau de la membrane plasmique et seraient responsables de phénomènes de recapture enzymatique décrits par NEUFELD et CANTZ (125) et HICKMAN et NEUFELD (74).

c) Mise en évidence d'un 2ème récepteur à Man 6-P.

HOFACK et KORNFELD travaillant sur des cellules déficientes en récepteur à Man 6-P ont mis en évidence en 1985 un second récepteur à Man 6-P (80). Celui-ci se distingue du récepteur précédemment décrit par le fait qu'il est cation-dépendant (essentiellement Mn^{2+} dépendant). Il a une masse molaire de 138 000 et semble composé de 3 sous-unités de 46 000 chacune. Ces mêmes auteurs ont apporté la preuve que ce nouveau récepteur n'était pas le produit de l'action de protéases sur le récepteur de 215 000. En effet, ces deux récepteurs sont immunologiquement distincts (78). La signification biologique de l'existence de plusieurs récepteurs à mannose 6-P demeure ambiguë. Pour HOFACK et KORNFELD, chaque récepteur pourrait lier spécifiquement certaines enzymes ce qui aurait pour conséquence une orientation des enzymes vers différentes classes de lysosomes (79).

De plus, DISTLER et JOURDIAN ont récemment décrit un récepteur à Man 6-P cation-indépendant de 42 000 de masse (isolé de testicule de taureaux). Il est différent du récepteur de 215 000 et distinct du récepteur de HOFACK et KORNFELD (car cation-indépendant)(39). Les différentes étapes de biosynthèse et de transfert des enzymes lysosomiques via le récepteur à Man 6-P sont indiquées dans la figure 6.

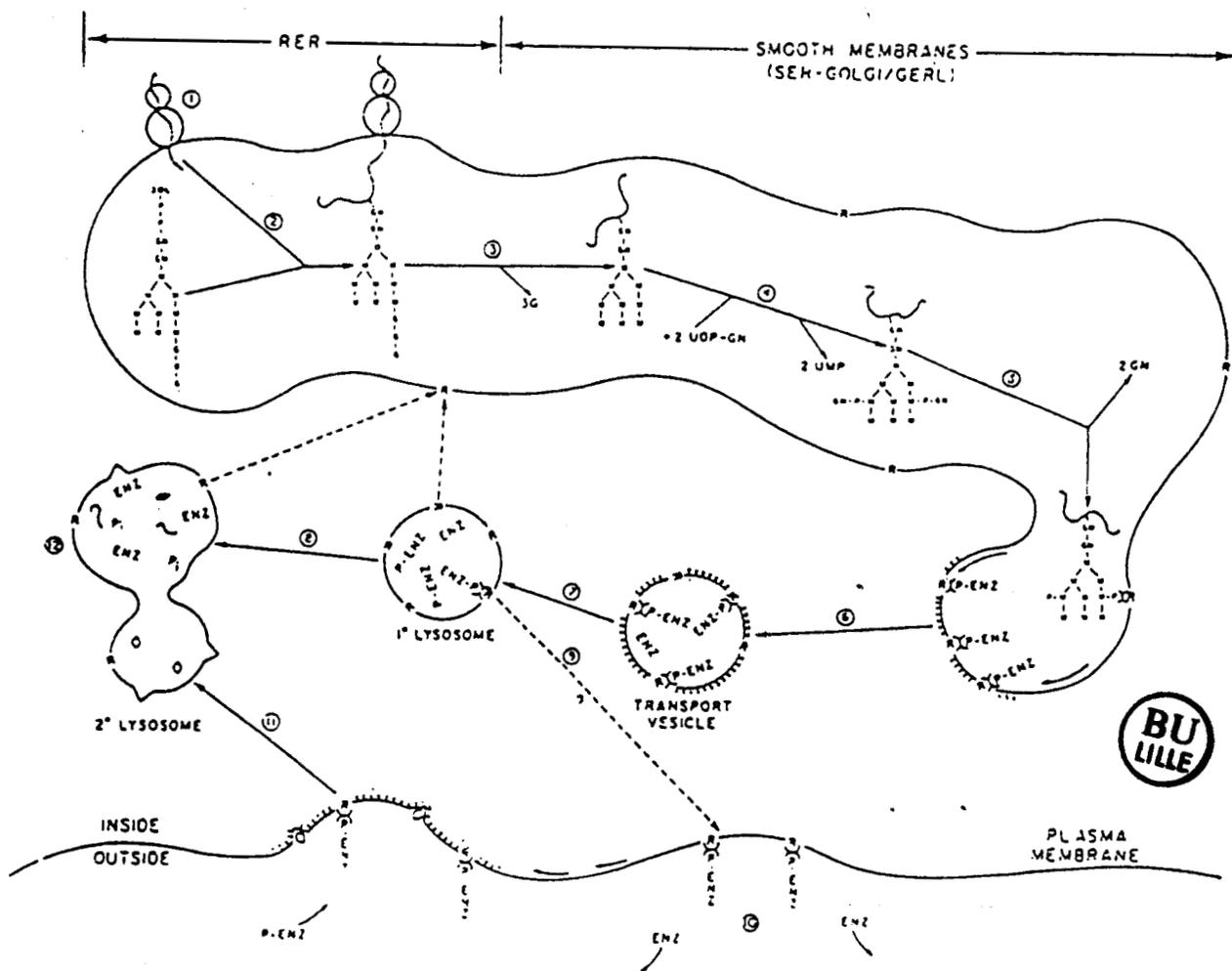


FIGURE 6 : Différentes étapes de transfert des hydrolases acides vers le lysosome.

M : Man	P : Phosphate
G : Glc	ENZ : Enzyme
GN : GlcNAc	R : Récepteur à Man 6-P
DoI : Dolichol	

3) *Autres voies d'intégration d'enzymes dans le lysosome.*

STAHL et al. (181) en plus de la voie faisant appel au récepteur à Man 6-P distinguent deux autres mécanismes permettant aux hydrolases acides de gagner le lysosome.

- tout d'abord des cellules telles les macrophages de patients atteints de I-Cell disease possèdent un équipement enzymatique lysosomique pratiquement normal. Ces auteurs expliquent cela par le fait que de telles cellules possèdent un récepteur à mannose/N-acétyl glucosamine qui pourrait ainsi capturer les hydrolases acides circulantes (à la suite par exemple de libération plasmatique d'enzymes après lyse cellulaire).

- ensuite, des cellules déficientes à la fois en récepteurs à Man 6-P et à Man/GlcNAc peuvent avoir un équipement enzymatique lysosomique normal. Il existerait donc une troisième voie, dont les mécanismes demeurent inconnus à ce jour, permettant aux hydrolases acides de gagner le lysosome (181).

Il semble que ces deux autres voies intéressent essentiellement des enzymes et des protéines lysosomiques membranaires. En effet, BARRIOCANAL et al. ont démontré que des glycoprotéines lysosomiques membranaires pouvaient gagner le lysosome par un mécanisme ne mettant pas en cause leurs chaînes glycaniques (tout au moins pas leurs chaînes N-glycaniques) (12). AERTS et al. (4) ont montré, quant à eux, que la glucocérebrosidase (enzyme lié à la membrane lysosomique) gagnait le lysosome sans avoir été phosphorylée (elle n'est d'ailleurs pas déficiente dans les cas de I-Cell disease).

LE CATABOLISME DES N-GLYCOSYL PROTEINES

I - LES N-GLYCOSYL PROTEINES

A) Classification des glycoconjugués.

Le terme générique de glycoconjugués regroupe en fait essentiellement deux familles : les glycolipides et les glycoprotéines : (voir figure 7 d'après STRECKER et MONTREUIL (190)).

Ces dernières se divisent en deux sous classes :

- les O-glycosylprotéines

La liaison O-glycosidique s'effectue par liaison covalente entre un monosaccharide et un amino-acide pouvant être la sérine, la thréonine ou l'hydroxyllysine.

- les N-glycosylprotéines

La liaison N-glycosidique s'effectue de façon covalente entre la N-acétyl glucosamine et l'asparagine

Pour la suite de notre exposé, nous nous intéresserons plus particulièrement aux N-glycosylprotéines.

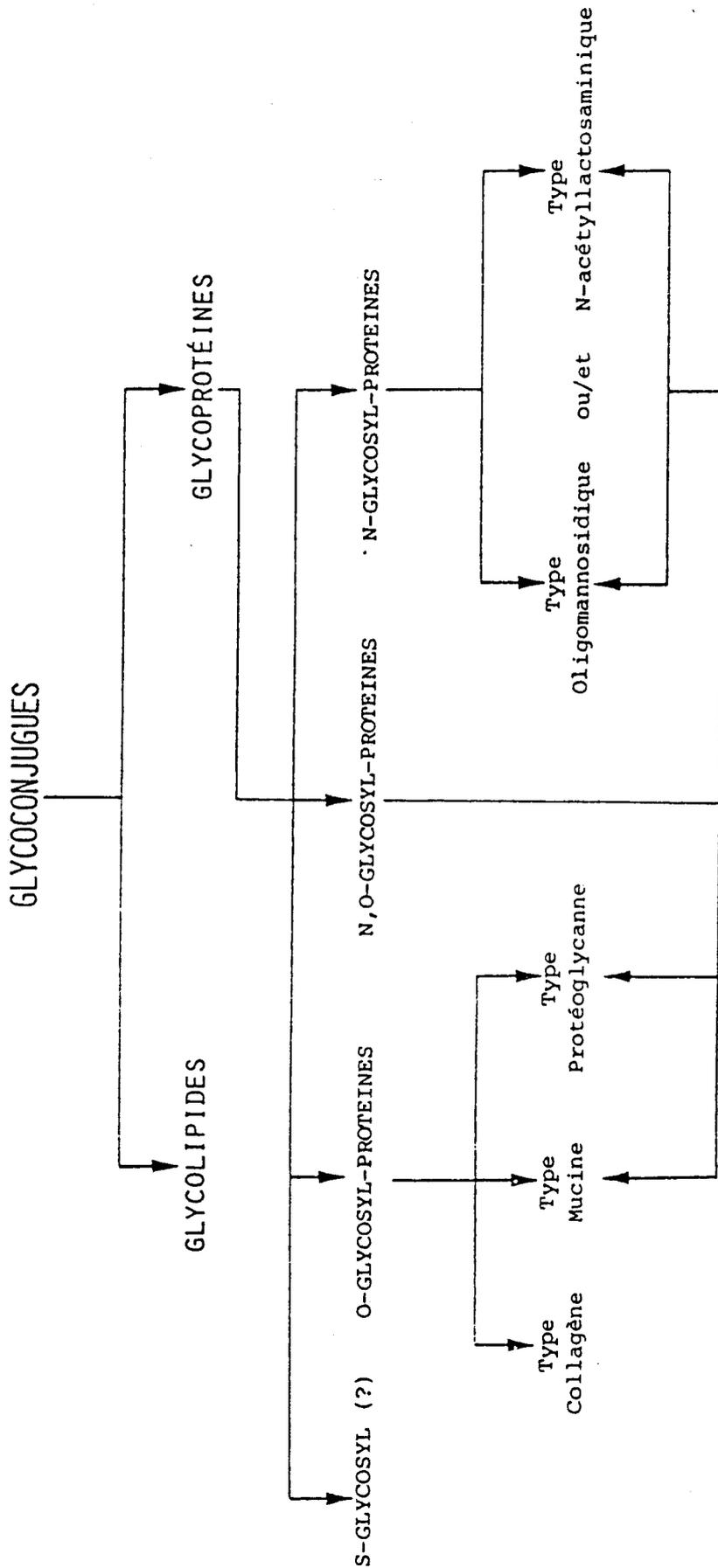
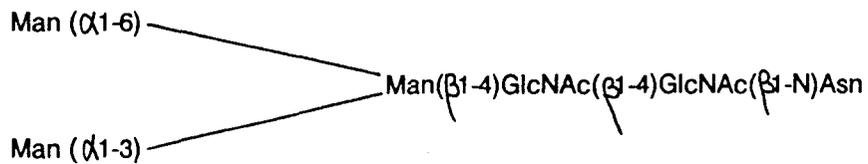


FIGURE 7 : Classification des glycoconjugués (d'après STRECKER et MONTREUIL. (190).)



B) Les N-glycosylprotéines.

Tout glycanne de type N-glycosidique possède un noyau invariable (inv) : le trimannosyl-N, N'-diacétylchitobiose (voir la revue de MONTREUIL (118)).



Cette fraction oligosaccharidique commune donne naissance à trois types de structures par substitution par des motifs oligosaccharidiques variables (var), à l'origine de la spécificité des chaînes glycaniques

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

1) Glycannes de type oligomannosidique

Ces structures résultent de la substitution du noyau "inv" pentasaccharidique par un nombre variable de résidus mannosyls (de 1 à 6 mannoses). Ces structures sont des intermédiaires apparaissant lors de la biosynthèse des N-glycannes (119,154,161) (voir figure 8).

2) Glycannes de type N-acétyllactosaminique

Ces structures voient leur noyau "inv" substitué par un nombre variable de chaînons N-acétyllactosaminiques : Gal (β 1-4)GlcNAc. Ces glycannes peuvent également être substitués par des résidus de fucose ou d'acide sialique en nombre variable, d'où la grande micro-hétérogénéité des structures, à l'origine de nombreux rôles biologiques qui leur sont dévolus. De plus, en fonction du nombre de chaînons N-acétyllactosaminiques branchés sur les mannoses 4 et 4', on distinguera des structures bi-, tri-, tétra ou penta-antennées (voir tableau III)

3) Glycannes de type mixte

Le noyau "inv" sera substitué, à la fois, sur le mannose 4 par des résidus N-acétyllactosamines et sur le mannose 4' par des résidus de mannose (voir figure 8)

II - REPRISE SPECIFIQUE DES GLYCOPROTEINES PAR LA CELLULE

Alors que le catabolisme des glycoprotéines endocellulaires commence à peine à être compris, le catabolisme des glycoprotéines exocellulaires s'est vu en grande partie élucidé par les travaux de ASHWELL et MORELL (9). Ces auteurs ont en effet montré que les glycannes de glycoprotéines circulantes pouvaient être spécifiquement reconnus par des lectines hépatocytaires à l'origine de leur élimination

A) Le récepteur hépatocytaire des asialoglycoprotéines.

1) Historique.

C'est le groupe d'ASHWELL qui mit en évidence l'existence d'un tel récepteur. En effet, ces auteurs avaient constaté que des asialoglycoprotéines plasmatiques étaient rapidement

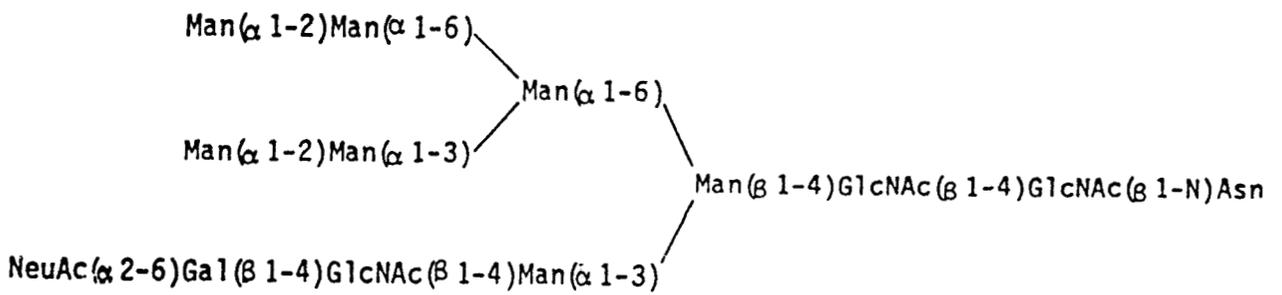
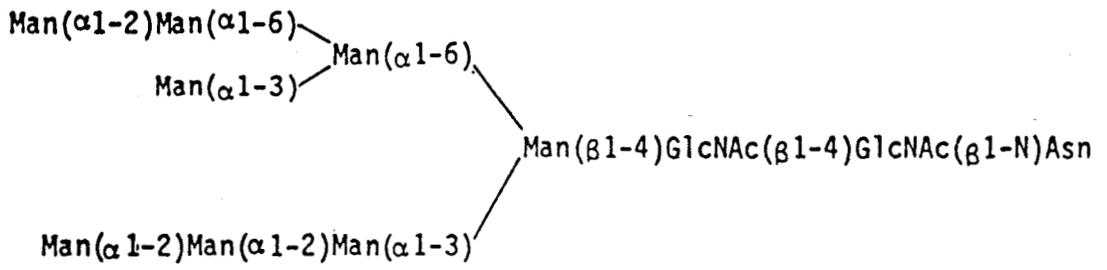


FIGURE 8 : A : structure oligomannosidique
B : structure mixte.

TABLEAU III : Exemples de structures N-acétyllactosaminiques.

STRUCTURE.	TYPE.	ORIGINE/REFERENCE.
$ \begin{array}{c} \text{Hex}(\beta 2-6)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2)\text{Man}(\alpha 1-6) \\ \text{Hex}(\beta 2-6)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{Fuc}(\beta 1-3) \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2)\text{Man}(\alpha 1-6) \\ \text{Hex}(\beta 2-6)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{Hex}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{Asn} \\ \text{Fuc}(\beta 1-6) \end{array} $	<p>Biantenné.</p>	<p>Sérotransferrine humaine. SPIK <u>et al.</u> (177)</p> <p>Lactotransferrine humaine. SPIK <u>et al.</u> (179)</p>
$ \begin{array}{c} \text{Hex}(\beta 2-6)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-6) \\ \text{Hex}(\beta 2-6)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2) \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2)\text{Man}(\alpha 1-6) \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3) \end{array} $	<p>Triantenné.</p>	<p>Orosomucoïde humain. FOURNET <u>et al.</u> (51)</p>
$ \begin{array}{c} \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-6) \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2) \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2) \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4) \end{array} $	<p>Tetraantenné.</p>	<p>Asialo-orosomucoïde humain. SCHMID <u>et al.</u> (172)</p>
$ \begin{array}{c} \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-6) \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2) \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2) \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2) \\ \text{Hex}(\beta 2-6)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-6) \end{array} $	<p>Pentaantenné.</p>	<p>Ovomucoïde de Tourterelle. FRANCOIS-GERARD <u>et al.</u> (52)</p>



retirées de la circulation sanguine (en quelques minutes) alors que la glycoprotéine native avait une demi-vie de plusieurs heures. Le démasquage du galactose en position pénultième sur la chaîne glycanique semblait être responsable de l'élimination. Ceci fut confirmé par le fait qu'une dégalactosylation (par une β -galactosidase), démasquant un résidu de N-acétyl glucosamine avait pour conséquence de rétablir une demi-vie normale (120). Les asialoglycoprotéines ainsi reconnues par l'hépatocyte sont ensuite endocytées par pinocytose adsorptive et dégradées au sein des lysosomes (62).

2) Caractéristiques

Le récepteur dit d'ASHWELL a été purifié en particulier par HUDGIN *et al.* (82). Il s'agit d'une glycoprotéine de 260 000 de masse moléculaire et composée de six sous-unités (dans le cas du foie de lapin). En ce qui concerne sa spécificité, ce récepteur ne reconnaît une asialoglycoprotéine que si celle-ci présente au moins deux résidus de galactose en position terminale non réductrice (167). La conformation spatiale du ligand influe sur la reconnaissance. Ainsi, il semble que ce récepteur ait, pour les glycopeptides de type triantenné, une affinité supérieure à celle qu'il a pour les glycopeptides biantennés (10).

3) Localisation subcellulaire

Les récepteurs à galactose se situent essentiellement au niveau des "coated pits" de la membrane plasmique (89,207) et possèdent une localisation transmembranaire (66). De plus, il a été retrouvé au niveau des membranes intracellulaires (appareil de Golgi, microsomes, lysosomes) (67). Néanmoins, les récepteurs situés dans les membranes lysosomiques, à l'inverse de ceux situés dans les membranes microsomiques et golgiennes, sont orientés vers le cytosol (195). Ce positionnement qui est contraire à celui attendu notamment au vu des processus d'endocytose n'est pas, à ce jour expliqué. Il pourrait s'agir d'un phénomène visant à éviter l'attaque protéolytique des récepteurs.

4) Rôles du récepteur à galactose

WEIGEL attribue dans une revue générale récente quatre rôles au récepteur à galactose (209).

- élimination des asialoglycoprotéines du plasma.

C'est le rôle primaire de ce récepteur qui a permis sa mise en évidence par ASHWELL

- transport intracellulaire de glycoprotéines.

Le récepteur à galactose pourrait jouer un rôle en ce qui concerne le transport intracellulaire de glycoprotéines (132).

- élimination des anticorps ou des complexes antigène-anticorps du plasma.

L'association antigène-IgG pourrait provoquer une modification conformationnelle de la région flexible des IgG, démasquant les résidus galactosyl externes, permettant leur élimination (186).

- adhésion cellulaire

Des cellules cancéreuses pourraient développer une métastase hépatique via le récepteur d'ASHWELL (28), qui en outre pourrait jouer un rôle dans l'adhésion cellule-cellule (208).

B) Autres voies de capture des glycoprotéines.

D'autres types de récepteurs ont été décrits. Ces récepteurs essentiellement présents au niveau du système réticulo-endothélial contribuent également à l'élimination de glycoprotéines circulantes.

1) Les récepteurs à mannose/N-acétylglucosamine

Ce type de récepteurs a été mis en évidence à la suite d'observations démontrant que des enzymes lysosomiques injectés par voie intraveineuse étaient rapidement éliminés de la circulation et se retrouvaient au niveau du foie, de la rate et des os (2,170). Ce processus peut être inhibé par de l'asialo-agalacto-orosomucoïde. La spécificité pour le mannose et la N-acétylglucosamine fut démontrée par KAWASAKI *et al.* (86,87).

2) Le récepteur à fucose

Des études réalisées avec la lactotransferrine et la β glucocérébrosidase montrent que ces glycoprotéines fucosylées en α 1-3 disparaissent rapidement du plasma et se retrouvent au niveau du foie (54,152).

III - LES GLYCOPROTEINOSSES

Dans le cadre de cette étude, nous nous limiterons à une description des glycoprotéinoses intéressant uniquement les N-glycosylprotéines (pour une étude complète voir la revue de DORLING (42)).

A) Concept.

Ces maladies métaboliques sont caractérisées par un blocage partiel ou total de l'activité des glycosidases lysosomiques. Les causes de ces maladies ont été traitées précédemment (voir chapitre pathologie lysosomique).

B) Les pathologies.

Dans tous les cas, le blocage métabolique se concrétisera par une accumulation lysosomique de polymères incomplètement dégradés. Ces oligosaccharides ou glycopeptides seront ensuite excrétés dans les urines. Ces composés, spécifiques de la maladie, possèdent en position terminale non réductrice le monosaccharide n'ayant pu être hydrolysé du fait de la déficience enzymatique.

Toutes les glycosidases impliquées dans le catabolisme des N-glycannes sont à l'origine d'une pathologie humaine connue (sauf pour ce qui concerne l'endo-N-acétyl- β -D glucosaminidase). Récemment, un déficit en β -mannosidase humaine (seule exoglycosidase pour laquelle aucune pathologie n'avait été décrite) a été mis en évidence (34,210).

Le tableau IV résume les différents types de glycoprotéinoses intéressant les N-glycosylprotéines.

TABLEAU IV : Classification des glycoprotéinoses.
(d'après MICHALSKI. (114).)

DEFICIT	MALADIES
α -Neuraminidase	Pseudo-Hurler polydystrophie Sialidoses (Mucopolipidose type I) Sialidose à déficit combiné Neu ⁻ /Gal ⁻ (Syndrome de Goldberg)
β -Galactosidase	GM ₁ gangliosidose Maladie de MORQUIO type B
α -Fucosidase	Fucosidose
α -Mannosidase	Mannosidose
β -Mannosidase	β -Mannosidose
β -N-acétylhexosaminidases A et B	Maladie de SANDHOFF
Aspartylglucosamine amidohydrolase	Aspartylglucosaminurie



IV - LE CATABOLISME DES N-GLYCOSYLPROTEINES

A) Le catabolisme de la protéine.

Comme nous le verrons par la suite, l'hydrolyse de la partie protéique est un évènement préalable à la dégradation des glycanes.

1) Catabolisme des glycoprotéines exocellulaires

Pour ces protéines, qui à l'exception de l'albumine sérique sont toutes des glycoprotéines, le catabolisme implique au préalable une internalisation. Celle-ci se fait via les récepteurs lectiniques membranaires précédemment étudiés. Une fois la glycoprotéine reconnue par le récepteur, on aura endocytose (voir le chapitre endocytose). Les endosomes ainsi formés fusionneront avec des lysosomes primaires, pour donner naissance à des lysosomes secondaires, où se fera la protéolyse par actions des protéases lysosomiques (cathepsines).

2) Catabolisme des glycoprotéines endocellulaires

(voir les revues de HERSCHKO CIECHANOVER (1982) (73) et MAYER DOHERTY (1986) (112)

La dégradation de la copule protéique de ces glycoprotéines est longtemps demeurée obscure. Ce n'est que récemment que les processus protéolytiques ont été partiellement élucidés. Il est acquis aujourd'hui que le catabolisme s'exerce à deux niveaux qui sont d'une part le lysosome et d'autre part le cytosol (112).

a) le catabolisme protéolytique cytosolique

L'existence d'un mécanisme protéolytique non lysosomique a été suspectée dès 1956 par SCHWEIGER et al. (176). Ce n'est que plus récemment que le mécanisme de ce système protéolytique a été compris. L'ATP est nécessaire à la formation d'un complexe protéine-ubiquitine (211).

L'ubiquitine est un polypeptique de 9 000 de masse qui une fois conjuguée à la protéine déclenche une dégradation très rapide de celle-ci (112).

Les rôles physiologiques de l'ubiquitination des protéines demeurent obscurs néanmoins, il semble qu'ils interviennent dans les cas suivants (49) :

- élimination de protéines anormales
- contrôle du cycle cellulaire
- contrôle de l'expression génique par histone 2A ubiquitination
- réponse au stress

b) le catabolisme lysosomique

Dans les cas de privation nutritionnelle, la cellule trouve les amino-acides nécessaires à ses fonctions vitales en pratiquant l'autophagie. Les membranes internes peuvent s'invaginer pour former des vésicules englobant le cytosol (112). Il a même été rapporté des cas de micro-autophagie dans lesquels le lysosome lui-même "capture" le cytosol. Le cytosquelette en véhiculant les vacuoles autophagiques joue un rôle très important dans tous ces phénomènes (112).

Des travaux récents indiquent que les protéines endocellulaires sont séquestrées dans une fraction juxtanucléaire préalablement à la protéolyse lysosomique par les cathepsines (111).

Il a également été mis en évidence l'existence d'hydrolases lysosomiques liées à la membrane en particulier la cathepsine M dont plus de la moitié de l'activité totale est membranaire. Certains de ces enzymes ont leur site orienté vers le cytosol (cathepsine M par exemple) et pourraient participer au catabolisme de composés cytosoliques. Dans la majorité des cas, ces hydrolases ont des pH optima neutres, voire légèrement basiques (voir la revue de PONTREMOLI et al. (151).

B) Catabolisme des N-glycannes.

1) Introduction.

Comme nous l'avons vu le lysosome possède plusieurs cathepsines capables de dégrader totalement les copules protéiques des N-glycosylprotéines. Il en résulte la production d'acides-amino et de glycoasparagines qui seront dégradés par les glycosidases lysosomiques. L'hydrolyse des oligosaccharides et glycoasparagines issus des glycoprotéines cytosoliques pose le problème de leur mode d'entrée dans le lysosome qui à ce jour, n'a pas été élucidé. On peut également imaginer leur intégration via le récepteur lysosomique d'ASHWELL qui, rappelons le, a son site lectinique orienté vers le cytosol (195). Cette hypothèse n'a toutefois jamais été démontrée.

2) Historique

Jusqu'au début des années 70, les seuls éléments permettant de comprendre le catabolisme des N-glycannes étaient apportés par l'étude des structures isolées d'urines de malades atteints de glycoprotéinoses (voir la revue STRECKER et MONTREUIL (190)).

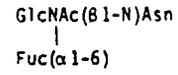
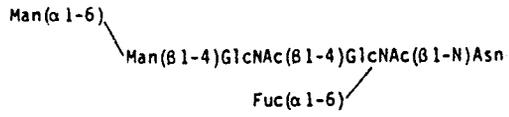
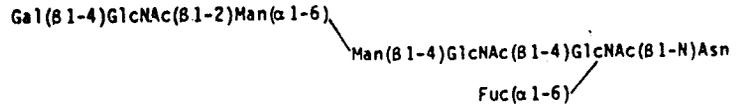
Il avait été postulé à l'époque que le catabolisme se faisait par action récurrente des exoglycosidases à partir de l'extrémité terminale non réductrice. Toutefois, l'étude des structures isolées d'urines pathologiques infirmait cette hypothèse. En effet, ces structures peuvent être classées en deux groupes :

- d'une part des oligosaccharides, à une seule N-acétyl-glucosamine à l'extrémité terminale réductrice accumulés lors de sialidoses, gangliosidoses à GM1, maladie de SANDHOFF et α -mannosidoses.
- d'autre part, des glycoasparagines excrétés dans l'urine de patients atteints de fucosidose ou d'aspartyl-glucosaminurie (figure 9).

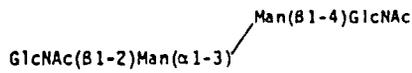
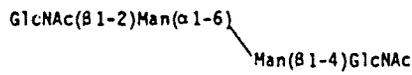
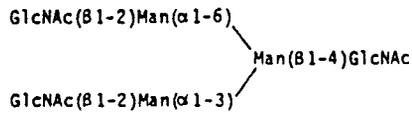
L'existence de ces deux types de structures laissait supposer l'existence d'un ou plusieurs enzymes agissant au niveau de l'extrémité terminale réductrice et responsables de la présence de la seule osamine 2 des oligosaccharides.

3) L'hypothèse du catabolisme initié par une endo-N-Acétyl- -D-glucosaminidase.

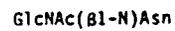
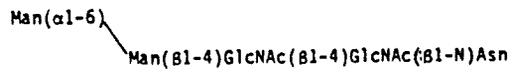
L'existence d'une seule glucosamine en position terminale réductrice des oligosaccharides excrétés lors de glycoprotéinoses (exceptées les fucosidoses et l'aspartylglucosaminurie) amena STRECKER et MONTREUIL en 1975 à émettre l'hypothèse que le catabolisme des N glycannes commençait par l'action d'une endo-glucosaminidase (118)



FUCOSIDOSE



MALADIE DE SANDHOFF.



ASPARYL-GLUCOSAMINURIE.

FIGURE 9 : Exemples de structures accumulées lors de glycoprotéinoses

libérant d'une part le glycoasparagine GlcNAc-Asn, et d'autre part, un oligosaccharide à une seule glucosamine en position terminale réductrice (figure 10).

Des études réalisées au laboratoire visant à mettre en évidence une activité endo-glucosaminidase s'avèrent infructueuses dans le compartiment lysosomique.

Par contre, une telle activité fut mise en évidence dans le cytosol par PIERCE et al. (141).

Cet enzyme clive les glycopeptides en hydrolysant la liaison entre les osamines 1 et 2. En outre, il possède une spécificité réduite aux glycopeptides et glycoasparagines polymannosidiques (activité "manno" endo-glucosaminidase) et N-acétyllactosaminiques (activité "galacto" endoglucosaminidase) mais est totalement inactif sur les sialylglycoasparagines (142). Ce dernier point ne permettait pas d'expliquer dans les cas de sialidoses l'accumulation de sialyloligosaccharides à une seule osamine en position terminale réductrice.

4) *Les glycoprotéinoses animales.*

Alors que dans notre laboratoire, les études portaient essentiellement sur les glycoprotéinoses humaines, d'autres équipes s'intéressaient plus particulièrement aux glycoprotéinoses animales (voir les revues de WINCHESTER (212) et DORLING (42).

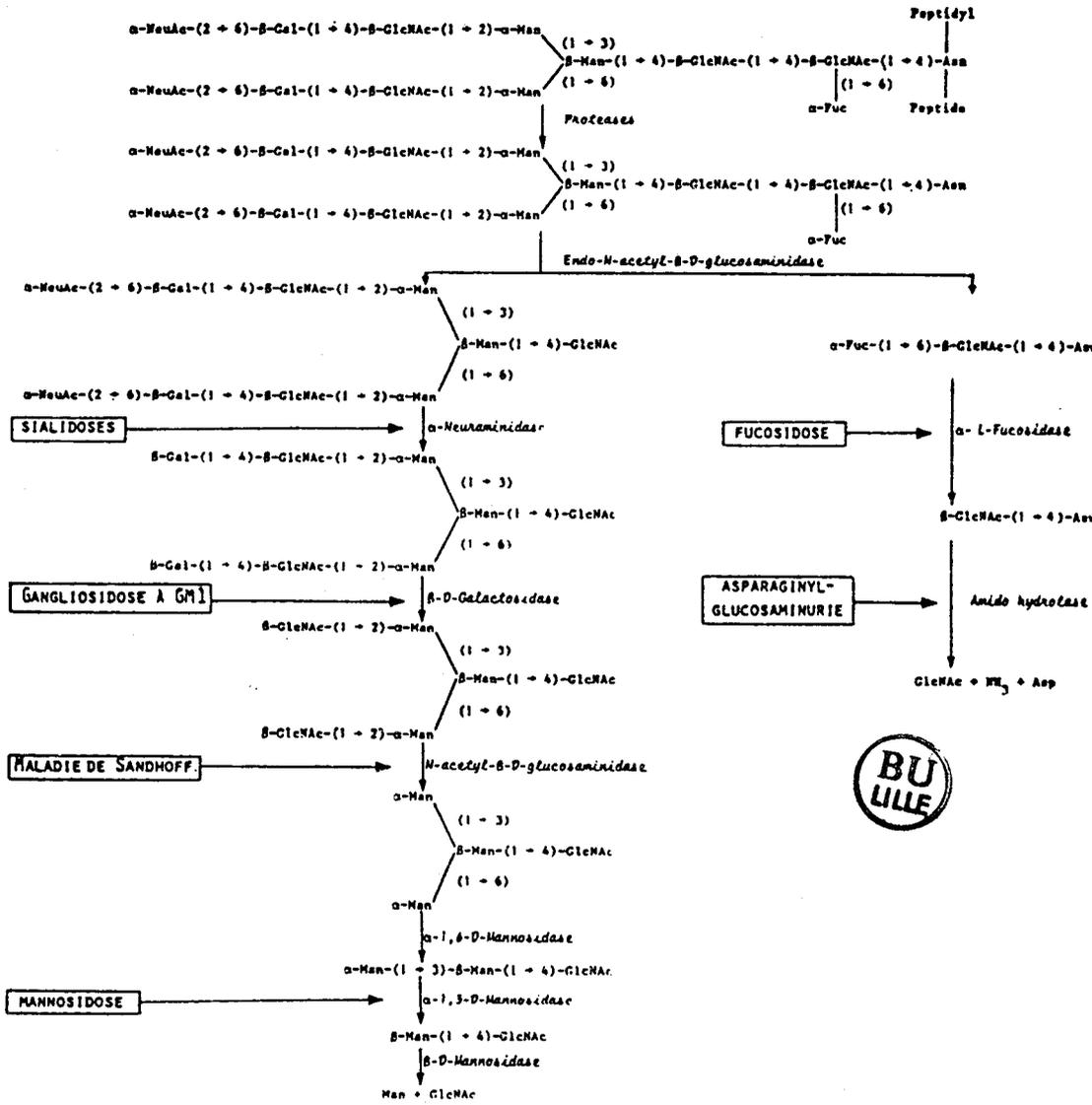


FIGURE 10 : Schéma du catabolisme selon STRECKER et MONTREUIL. (1975). (190).

Ce sont des études réalisées sur la mannosidose génétique ou induite par la swainsonine (33,43) qui permet de classer les espèces animales en deux catégories :

- l'une présentant une excrétion urinaire d'oligosaccharides à une seule osamine réductrice comme chez l'homme (rat, porc)
- l'autre présentant une excrétion urinaire d'oligosaccharides ayant en position terminale réductrice le chaînon N, N'-di-acétyl chitobiose intact (bovins, ovins, chiens, chats) (1,2) (figure 11).

Signalons ici, également, la chèvre qui accumule à la fois des oligosaccharides à une ou deux osamines en position terminale réductrice (108,109).

Le fait qu'il existe des espèces animales ayant un catabolisme de type bovin et d'autres ayant un catabolisme de type humain conduisit à l'hypothèse selon laquelle préalablement à l'action d'une endoglucosaminidase devait agir l'aspartyl-N-acétyl glucosaminidase. Ce dernier enzyme, mis en évidence par MURAKAMI et EYLAR en 1965 dans l'épididyme du mouton (123), était supposé hydrolyser le chaînon GlcNAc-Asn et intervenir après action de l'endoglucosaminidase.

5) *Le rôle de l'aspartamidase (aspartyl-N-acétylglucosaminidase)*

a) Historique.

Après la découverte de l'enzyme (123), son mécanisme d'action est élucidé en 1966 par MAKINO *et al.* (106). Le premier cas de déficience est rapporté par JENNER et POLITT en 1968 (150). MAHADEVAN et TAPPEL localisent en 1967 l'enzyme dans le compartiment lysosomique du foie de rat (130) tandis que YAMASHINA la purifie à partir du rein de porc (213) et DUGAL à partir du foie humain (44).

Nombre de résidus GlcNAc en position terminale réductrice des oligosaccharides

accumulés

2

1

ESPECES

Homme

Rat

Porc

Veau

Mouton

Chien

Chat

Chèvre

+
+
+

+
+
+
+

+

+



b) Propriétés.

L'aspartamidase a un pH optimum de 7 à 8 selon les espèces (213). Elle a une masse molaire de 70 000 dans le cas du foie humain (102). Elle présente une étonnante stabilité à la chaleur, un traitement de 6 heures à 60 °C ne réduisant son activité que de 10 %. (14)

c) Spécificité.

Si le rôle de l'aspartamidase sur le chaînon GlcNAc (β 1-N) Asn est connu depuis longtemps, peu d'études concernant sa spécificité vis à vis d'autres glycoasparagines ont été publiées. Tout au plus MAKINO et al. (106) et PLUMMER et al. (148) avaient-ils démontré son action sur des glycoasparagines mixtes et oligomannosidiques de l'ovalbumine. BAUSSANT reprenant les études de spécificité montra que l'enzyme était incapable d'hydrolyser l'asparagine si celle-ci se trouvait acétylée sur sa fonction α -aminée (14). Des travaux plus anciens de MAKINO et al. (105) avaient déjà démontré que la substitution carboxylique de l'asparagine inhibait l'enzyme.

Ces résultats prouvent que l'aspartamidase est spécifique des glycoasparagines vrais. Il faut donc que le catabolisme de la protéine libérant de tels glycoasparagines soit antérieur à l'action de l'aspartamidase.

Il avait été observé depuis longtemps que les produits fucosylés en (α 1-6) sur l'osamine 1 étaient excrétés dans les cas de fucosidoses sous forme de glycoasparagines. Cette observation laissait supposer que l'action de la fucosidase était antérieure à celle de l'aspartamidase.

BAUSSANT en apporta la preuve en étudiant après inhibition par la chaleur des mannosidases, l'action de l'aspartamidase sur respectivement $\text{Man}_2\text{GlcNAc}_2\text{Asn}$ et $\text{Man}_2\text{GlcNAc}_2\text{FucAsn}$. Si dans le premier cas l'enzyme était actif, il ne l'était pas du tout dans le

second (14). Cette expérience prouvait indiscutablement l'antériorité de l'action de la fucosidase sur l'aspartamidase.

Le fait que l'endoglucosaminidase décrite par PIERCE et al. (141,142) était totalement inactif sur les sialylglycoasparagines, amena BAUSSANT à étudier l'action de l'aspartamidase sur de tels composés et démontra ainsi que l'enzyme pouvait les hydrolyser (14).

Cette dernière expérience constituait une première étape dans l'explication de l'excrétion par les patients atteints de sialidoses de sialyloligosaccharides à une seule osamine en position terminale réductrice. En effet, ces composés ne pouvaient provenir de l'action de l'endoglucosaminidase cytosolique (141,142). Il restait donc à mettre en évidence une endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase spécifique des oligosaccharides possédant le chaînon N,N'di-acétyl chitobiose en position réductrice.

6) *Mise en évidence d'une endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase lysosomique.*

a) Historique.

En 1974, NISHIGAKI et al. (126) mettent en évidence dans le foie de rat et de porc une activité endoglucosaminidase, tandis que BOERSMA et al. la détectent en 1975 dans le foie humain (24). La première localisation cellulaire est due à PIERCE et al. en 1979 (141).

En 1981, OVERDIJK et al. (134) étudient les propriétés de l'endoglucosaminidase du foie et du rein humains.

La spécificité de l'enzyme hépatique du rat a fait l'objet d'une étude de TACHIBANA et al. en 1982 (194) qui posent l'hypothèse d'une seule forme enzymatique pour les activités "manno" et "galacto" endoglucosaminidases tout comme LISMAN et al. en 1983 (98) et 1985 (99) qui en outre confirment la localisation cytosolique.

Par contre, EL BATTARI et al. en 1983 postulent l'existence d'isoenzymes à l'origine des deux types d'activités (45).

Les paramètres cinétiques des deux activités endoglucosaminidase ont été déterminés en 1983 par APPOURCHAUX (7)

L'endoglucosaminidase de foie de rat est partiellement purifiée par LISMAN et al. (99).

Les activités endoglucosaminidase précédemment décrites sont toutes cytosoliques (elles présentent un pH optimum neutre). Ces activités pourraient intervenir dans le catabolisme des glycoprotéines intracellulaires ainsi que dans la régulation de la biosynthèse des N-glycosylprotéines (117,142). Dans le cadre de cette dernière hypothèse, l'endoglucosaminidase pourrait dégrader les dolichol-oligosaccharides précurseurs en excès (26).

b) Spécificité.

L'enzyme du cytosol dégrade des glycopeptides de type oligomannosidique et N-acétyl lactosaminique (141,142) mais demeure inactif sur des glycopeptides sialylés ou fucosylés sur l'osamine 1. Le glycoasparagine $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{Asn}$ est le substrat pour lequel l'endoglucosaminidase cytosolique présente la plus grande vitesse d'hydrolyse.

Il est intéressant de noter que l'enzyme demeure actif après acétylation de la fonction α aminée de l'asparagine, ce qui permet de la doser facilement par méthode radioactive.

c) Mise en évidence d'une endoglucosaminidase dans le lysosome

Le premier, STIRLING met en évidence en 1974 une activité NN'-diacétyl chitobiase au niveau du foie humain. L'enzyme décrit se distingue de la β -hexosaminidase par le fait qu'il est incapable d'hydrolyser des substrats synthétiques tels que le paranitrophényl- β -D-N acétyl-

glucosamine (PNP-GlcNAc) (184). STIRLING, encore, la même année démontre une activité chitobiase dans des cellules déficientes en hexosaminidases A et B (maladies de Sandhoff et Tay-Sachs). Il détermine de plus que cet enzyme a une masse moléculaire plus faible que celle de l'hexosaminidase (185). L'activité chitobiase précédemment décrite est maximale à un pH de 3,5, ce qui est un argument supplémentaire pour une localisation lysosomique.

Il faut ensuite attendre 1985 et les travaux de LI et al. (97) qui décrivent dans l'urine humaine, une activité endo dont le pH optimum est de 4,0.

Enfin, en 1985, ARONSON et KURANDA (94) et BAUSSANT et al. (15) au laboratoire décrivent en même temps une activité endo-N-acétyl- β -D glucosaminidase au niveau du lysosome.

KURANDA et ARONSON démontrent l'existence d'un tel enzyme en inhibant l'aspartamidase du foie de rat perfusé. Ces auteurs remarquent qu'après action des exoglycosidases, le foie accumule le composé suivant : GlcNAc (β -4)GlcNAc(β -N)Asn au lieu du GlcNAc (β -N)Asn attendu. Ils démontrent ensuite l'activité chitobiase en utilisant des asialo-oligosaccharides obtenus par hydrazinolyse et réacétylés par de l'anhydride acétique [¹⁴ C] (95)

BAUSSANT et al., quant à eux utilisent l'oligosaccharide Man₃GlcNAc₂ (obtenus après digestion par l'aspartamidase du glycoasparagine correspondant) qu'ils incubent à pH 3,5 avec un homogénat lysosomique. La démonstration de l'activité endo est faite par RMN à 400 MHz (14,16).

L'endo-N-acétyl- β -D glucosaminidase présente un pH optimum d'activité de 3,5. Sa masse molaire a été estimée à 35 000 par tamisage moléculaire (95).

Ses travaux sur l'aspartamidase et l'endoglucosaminidase ont amené BAUSSANT à proposer le schéma du catabolisme présenté figure 12.

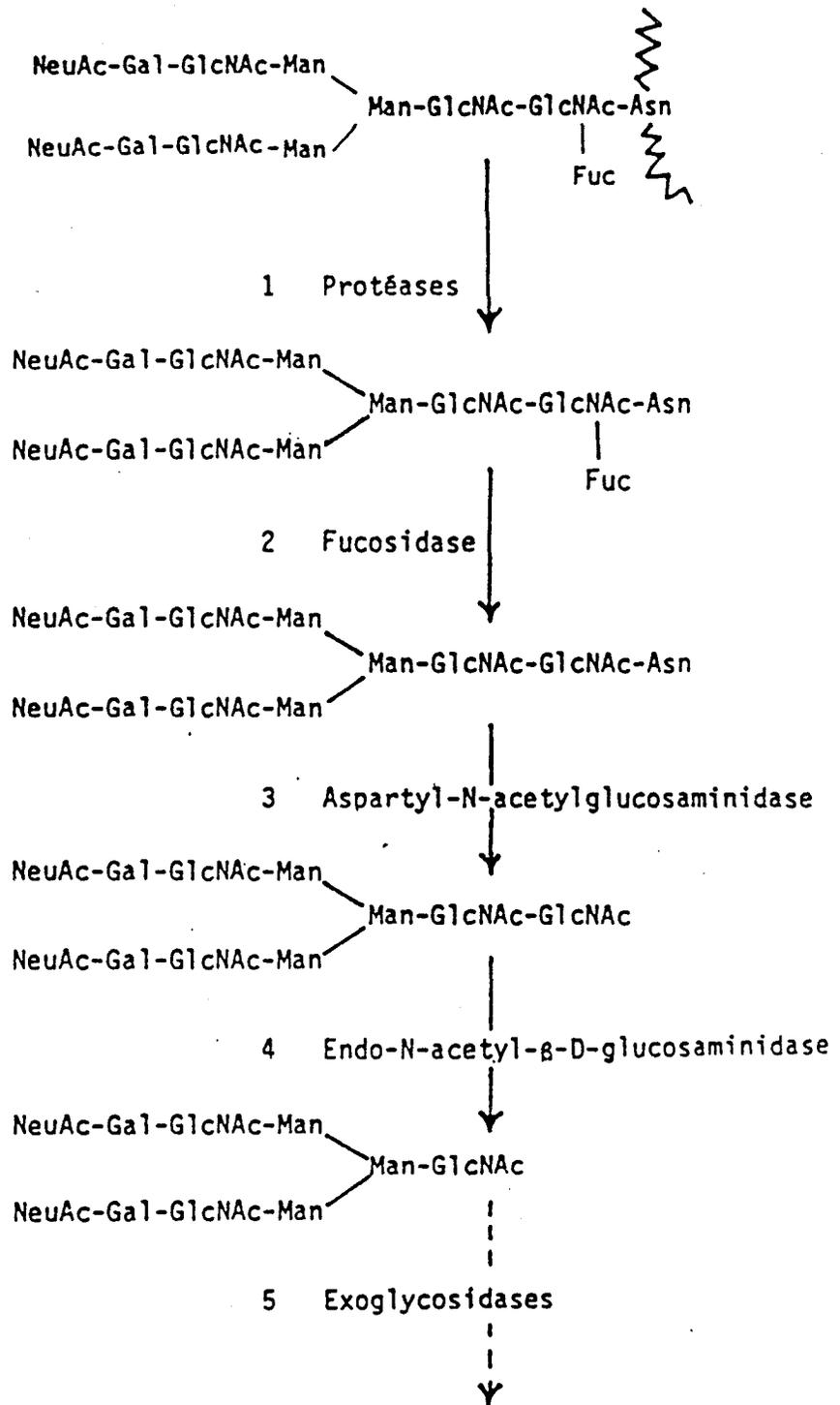


FIGURE 12 : Schéma du catabolisme selon BAUSSANT. (1985)

TRAVAUX PERSONNELS

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les travaux récents sur l'aspartamidase (14) et sur l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase (15,16,94,95) ont permis d'élucider le catabolisme des N-glycannes au niveau du point d'attache avec la protéine. Ainsi, il est maintenant démontré qu'au niveau lysosomique le catabolisme est initié par l'aspartamidase et non par une endoglucosaminidase. De plus, l'action successive et la spécificité de ces deux enzymes permettent aujourd'hui d'expliquer la structure des oligosaccharides et glycoasparagines accumulés lors des glycoprotéinoses, en particulier en ce qui concerne l'extrémité terminale réductrice. Cependant, ni les travaux de BAUSSANT ni ceux d'ARONSON n'ont permis de mettre en évidence l'existence de sialyl-dérivés à une seule glucosamine en position terminale réductrice dans les cas de sialidoses.

Enfin, MAHADEVAN et al., (103) ont dès 1969 montré que les exoglycosidases étaient beaucoup plus actives sur des oligosaccharides que sur des glycoasparagines. D'autre part, dans les cas de fucosidose et d'aspartyl glucosaminurie, il a été remarqué que les structures accumulées avaient plus ou moins subi l'action des exoglycosidases, de plus, ces structures présentent dans leur majorité une dégradation plus avancée de l'antenne en (α 1-3) que l'antenne en (α 1-6) (figure 9). Ces observations laissent supposer à la fois un catabolisme bidirectionnel (faisant appel aux exoglycosidases et au binôme endo-aspartamidase) comme l'a suggéré ARONSON (8,94) et une dégradation antenne par antenne par action des exoglycosidases.

Nos travaux ont donc d'abord visé à mettre en évidence une activité endo-glucosaminidase lysosomique dans les cellules humaines. Nous avons ensuite partiellement purifié l'enzyme du foie de rat afin de tester son activité sur les sialyl dérivés et pouvoir ainsi expliquer l'excrétion urinaire de composés à une seule glucosamine en position terminale réductrice dans les cas de sialidoses.

La seconde partie de notre travail a consisté à étudier in vitro le catabolisme des N-glycannes, afin d'une part de déterminer les rôles respectifs du binôme endo-aspartamidase et des exoglycosidases et d'autre part de mettre en évidence un catabolisme antenne par antenne.

MISE EN EVIDENCE D'UNE ACTIVITE
ENDO-N-ACETYL- β -D-GLUCOSAMINIDASE
LYSOSOMIQUE HUMAINE

MISE EN EVIDENCE D'UNE ACTIVITE
ENDO-N-ACÉTYL- β -GLUCOSAMINIDASE LYSOSOMIQUE
DANS LES CELLULES HUMAINES

I - INTRODUCTION

L'existence dans les urines de patients atteints de sialidose d'oligosaccharides possédant une seule N-acétyl-glucosamine en position terminale réductrice (114) laissait supposer la présence d'une endoglucosaminidase lysosomique dans les cellules humaines. En effet, de tels composés ne peuvent être produits par l'endo-glucosaminidase cytosolique, ce dernier étant totalement inactive sur les sialyl glycopeptides (141,142).

L'endoglucosaminidase lysosomique mise en évidence chez le rat (14,95) et agissant après l'aspartamidase pourrait expliquer l'accumulation lors des glycoprotéinoses (sauf dans les cas de fucosidose et l'aspartyl glucosaminurie d'oligosaccharides à une seule GlcNAc en position terminale réductrice. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons dosé l'activité endoglucosaminidase lysosomique de cellules humaines en culture.

II - MATERIEL ET METHODES

A) Culture cellulaire : les cellules lymphoblastoïdes

Les cellules ont été obtenues par transformation de lymphocytes humains normaux par le virus d'Epstein-Barr. La transformation a été réalisée dans le laboratoire du Professeur G.LENOIR du Centre International de Recherches sur le Cancer de Lyon (C.I.R.C.).

Les cellules lymphoblastoïdes sont cultivées en suspension dans des flacons de cultures (NUNC) de 250 ml 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.

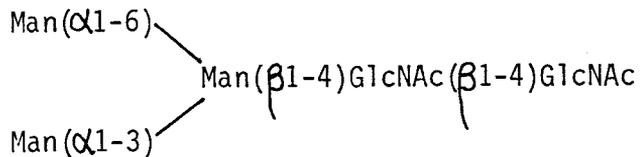
Les cellules sont divisées tous les 3 à 4 jours en répartissant le contenu d'un flacon dans 3 autres flacons dont on complète ensuite le volume à 30 ml par du milieu neuf.

B) Culture cellulaire : les fibroblastes.

Les fibroblastes normaux nous ont été fournis par le Laboratoire Régional de Dépistage des Maladies Génétiques (Prof. J. P. FARRIAUX). Les cellules sont cultivées en flacons de 250 ml (NUNC) jusqu'à confluence, le milieu de culture étant du milieu de HAM supplémenté en glutamine à raison de 0,3 g/l. Les cellules sont ensuite décollées du plastique par trypsinisation.

C) Préparation du substrat radioactif OL-I.

Il s'agit d'un oligosaccharide dont la structure est indiquée ci-dessous :



Ce substrat est marqué au [^{14}C] sur les deux osamines. Il a été obtenu de la façon suivante :

Après digestion pronasique de fraction IV de COHN (concentration de 10 mg/ml), les glycopeptides libérés sont traités par hydrazinolyse et réacétylés par l'anhydride acétique [^{14}C] selon la méthode de BAYARD et al. (17).

Les oligosaccharides sont ensuite traités par un mélange d'exoglycosidases bactériennes (activités α neuraminidases, β galactosidases, β hexosaminidases et α fucosidases fournies par le Prof. S. BOUQUELET) à 37°C pendant 24 heures. L'activité mannosidase étant absente nous obtenons l'oligosaccharide OL-I.

Les protéines sont ensuite précipitées par l'éthanol à -20°C à une concentration finale de 50 % (V/V). Après centrifugation, le surnageant est concentré puis déposé sur une colonne de Biogel P4 (Biorad-Richmond USA). Les fractions contenant l'oligosaccharide OL-I sont rassemblées puis lyophilisées.

Le substrat OL-I, ainsi préparé présente une radioactivité spécifique de 270 cpm/nmole.

Lors des incubations, ce substrat est utilisé à une concentration de 3,3 mM.

D) Incubations.

1) Cellules lymphoblastoïdes

Le contenu de 20 flacons de culture est centrifugé à 1500 t/mn pendant 5 mn. Le culot cellulaire est lavé 3 fois par une solution isotonique de NaCl 9°/oo, puis repris par 500 μ l de tampon CP100 pH 3,5, Triton X100 0,5%. Après homogénéisation en bain de glace par 20 à 25 aller-retours de piston de l'appareil de DOUNCE, le pH de l'homogénat est réajusté à pH 3,5 par de l'acide citrique 0,1 M puis laissé 3 heures à + 4°C.

Le milieu d'incubation se compose comme suit :

- 30 μ l d'homogénat cellulaire
- 30 μ l de L-mannono-1,4-lactone 30 mM en tampon CP 100 pH 3,5 (inhibiteur de mannosidases)
- 10 μ l de tampon CP 100 pH 3,5
- 20 μ l de OL-I [14 C] 3,3 mM (18000 cpm/incubation)

Un témoin est effectué en utilisant 30 μ l d'homogénat cellulaire préalablement traités 5 mn à 100°C.

Après 15 heures à 37°C, les protéines sont précipitées par ajout de 90 μ l d'éthanol à -20°C. Après centrifugation le surnageant est déposé en totalité sur papier Whatman 3. La chromatographie s'effectue pendant 15 à 20 heures dans le solvant butanol /acide

acétique/eau (4/1/5 : v/v/v). Les pistes de migration sont découpées en bandes de 1 cm de large et la radioactivité mesurée par comptage en scintillation liquide après avoir ajouté 1,5 ml de cocktail de scintillation ("Lipoluma" J.T.BAKER. Pays-Bas).

La zone de migration de la N-acétyl glucosamine est estimée par rapport à un spot de N-acétyl glucosamine froide déposée sur une piste parallèle. Cette piste est révélée à l'oxalate d'aniline.

2) Fibroblastes

6 boîtes de cultures sont traitées de la même façon que précédemment.

Les milieux d'incubation sont les suivants :

a) témoin (dénaturation 5 mn à 100°C de l'homogénat) et cellules avec mannonolactone

- 20 μ l d'homogénat cellulaire

- 20 μ l de mannonolactone 30 mM en tampon CP100 pH 3,5

- 17 μ l de tampon CP 100 pH 3,5

- 3 μ l d'OLI 3,3 mM (3200 cpm)

b) cellules sans mannonolactone :

Les 20 μ l de mannonolactone sont remplacés par 20 μ l de tampon CP100 pH 3,5

Après 15 H à 37°C, les protéines sont précipitées par 60 μ l d'éthanol à -20°C. La suite du protocole est identique à celui des cellules lymphoblastoïdes.

Le pourcentage d'hydrolyse est calculé en divisant le nombre de cpm dues à l'osamine libérée par la moitié de la radioactivité totale (car les deux osamines sont marquées mais seule l'osamine en position terminale réductrice peut être libérée par l'endoglucosaminidase).

III- RESULTATS-DISCUSSION

A) Cellules lymphoblastoïdes (figure 13)

On observe dans ce cas l'existence de deux pics de radioactivité, l'un correspondant à la GlcNAc [14 C] (la glucosamine froide témoin migrant au même niveau, indiqué par la flèche) l'autre correspondant au substrat OL-I non hydrolysé et à l'oligosaccharide trimannosyl N-acétylglucosamine ne possédant qu'une seule osamine en position terminale réductrice.

Ces résultats permettent de démontrer l'existence d'une endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase lysosomique dans les cellules humaines active à pH 3,5. En effet, l'hydrolyse de la N-acétyl glucosamine terminale réductrice ne peut être attribuée qu'à une endoglucosaminidase lysosomique car BAUSSANT (14) a démontré qu'à pH 3,5 l'endoglucosaminidase cytosolique était totalement inactive sur ce même substrat.

Après 15 Heures d'incubation, le calcul indique que environ 55 % du substrat OL I a été hydrolysé.

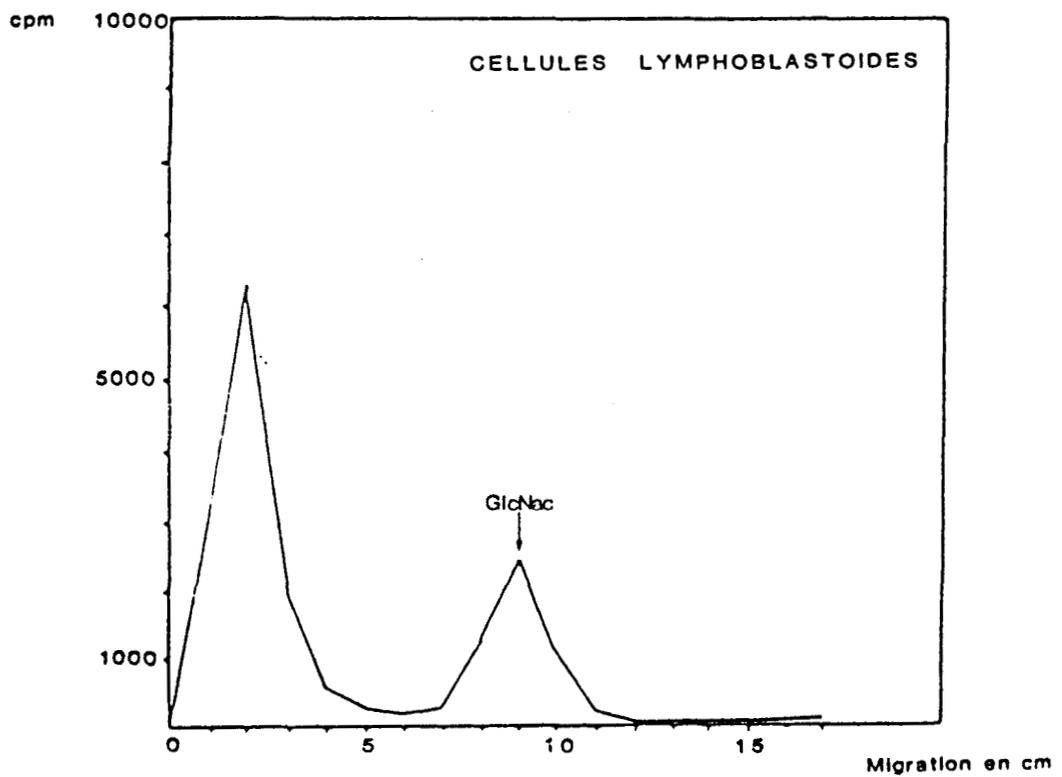
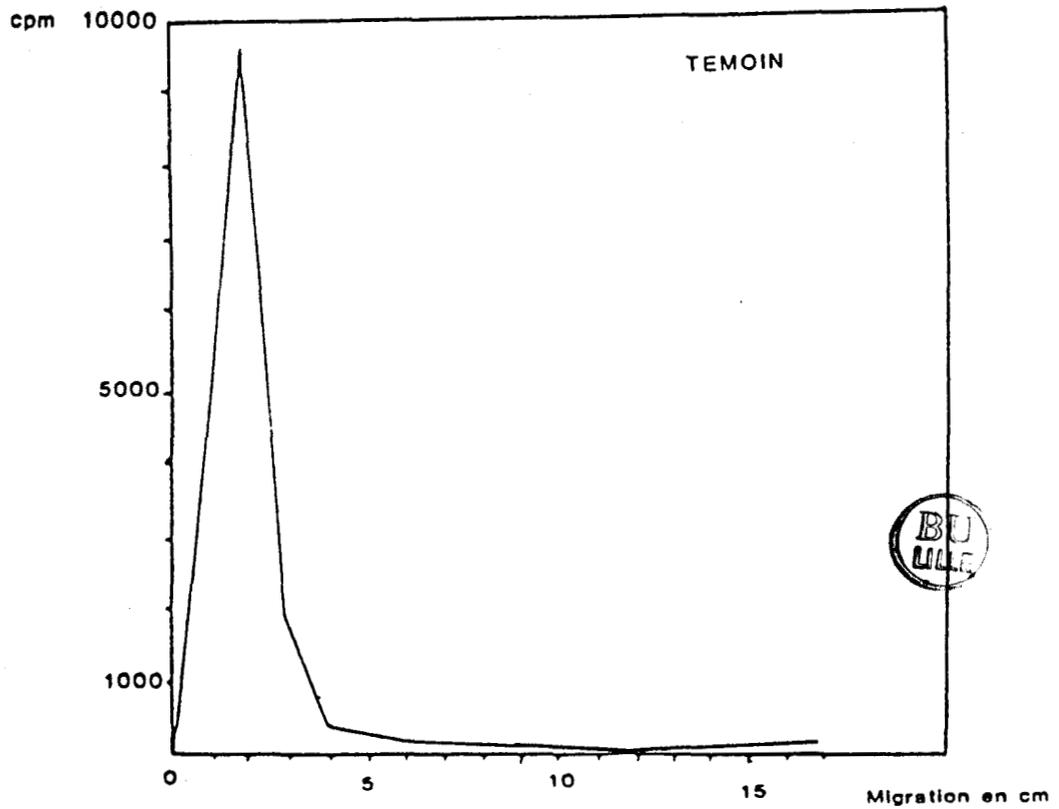


FIGURE 13 : Mise en évidence d'une activité endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase lysosomique. (cellules lymphoblastoïdes)
(Pour les modalités expérimentales, voir le texte.)

B) Les fibroblastes.

1) *En présence de mannonolactone (figure 14)*

Les conclusions quant à l'existence d'une activité endoglucosaminidase lysosomique sont les mêmes que précédemment.

On a dans ce cas un pourcentage d'hydrolyse du substrat OL-I de l'ordre de 15 %

2) *En absence de mannonolactone (figure 15)*

On observe également dans ce cas, une activité endoglucosaminidase. Le substrat OL-I ayant ici été dégradé à environ 20 %. Toutefois, il est intéressant de noter que le pic de radioactivité correspondant à l'oligosaccharide présente un maximum décalé de 1 cm par rapport au témoin (alors que le même substrat incubé en présence de mannonolactone ne présente pas ce phénomène).

Ceci peut s'expliquer par l'action des mannosidases qui hydrolysant l'un des résidus mannose en position terminale non réductrice permettrait à l'oligosaccharide ainsi produit une migration plus rapide dans le système solvant employé. Il semble dans ce cas que les mannosidases agissent plus vite que l'endoglucosaminidase car sur les 1600 cpm théoriques dues à la N-acétyl glucosamine libérée seulement 20 % le sont effectivement, par contre, en ce qui concerne l'oligosaccharide, on constate que le maximum de radioactivité dans ce cas correspondrait à environ 40 à 50 % du substrat démannosylé.

IV - CONCLUSION

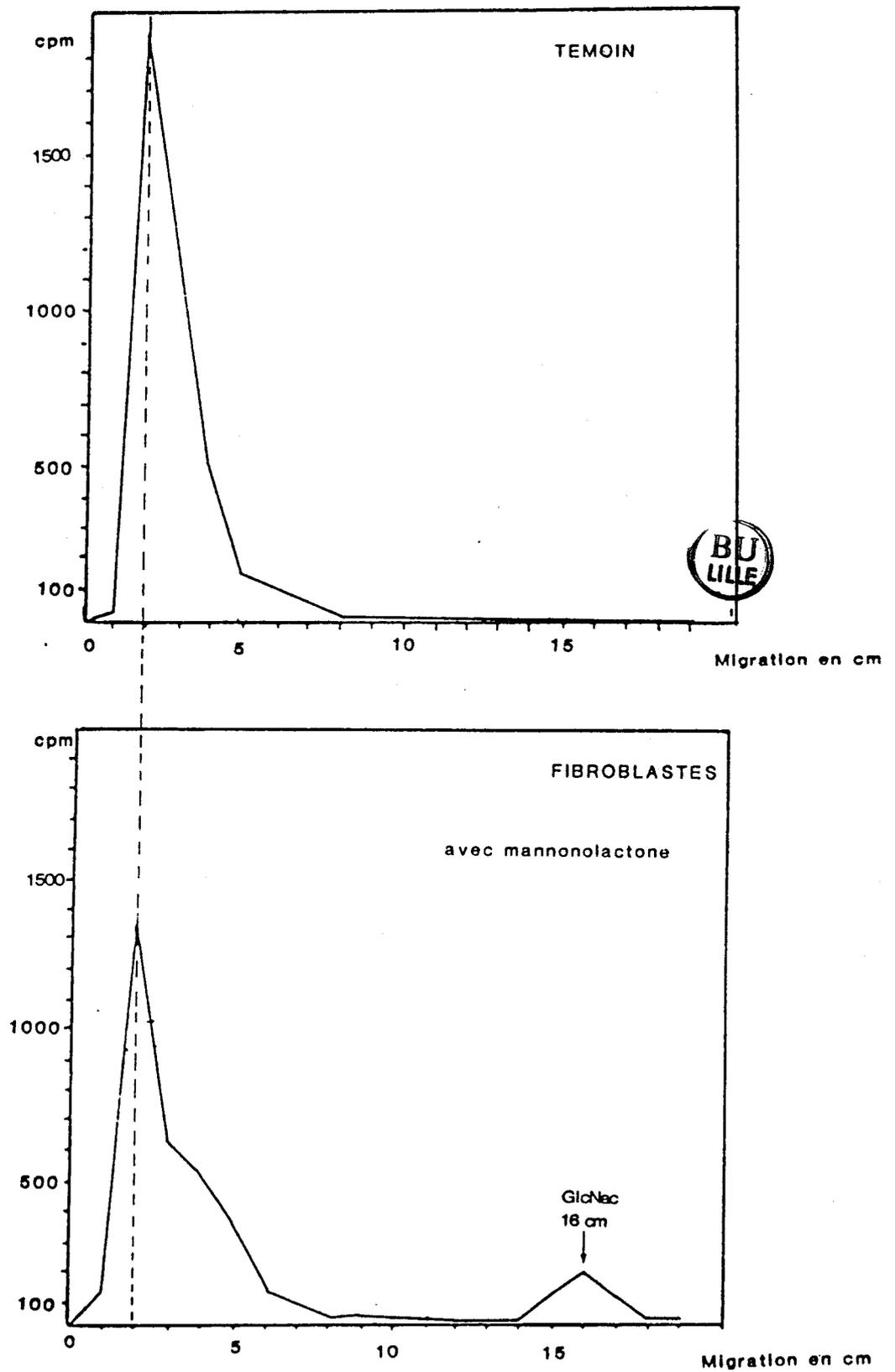


FIGURE 14 : Dosage de l'activité endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase lysosomique en présence de mannosylactone. (fibroblastes) (Pour les modalités expérimentales, voir le texte.)

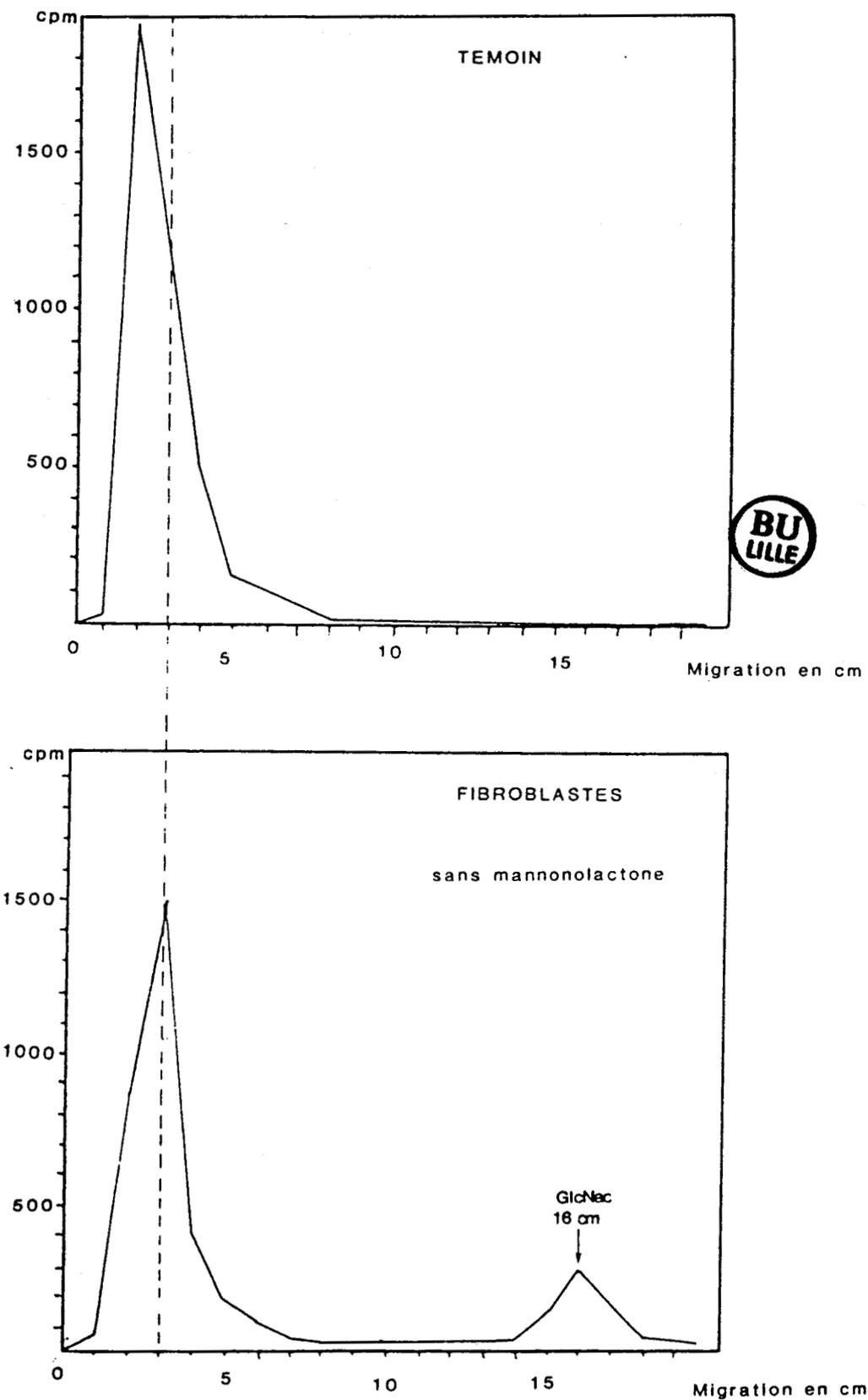


FIGURE 15 : Dosage de l'activité endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase lysosomique en absence de mannonolactone. (fibroblastes) (Pour les modalités expérimentales, voir le texte.)

Qu'il s'agisse de cellules lymphoblastoïdes ou de fibroblastes, ces expériences mettent en évidence une activité endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase lysosomique analogue à celle précédemment décrite par BAUSSANT et al. et KURANDA et ARONSON. (16,95).

De plus, ces résultats semblent en outre indiquer dans le cas d'incubation sans inhibiteurs de mannosidases une action conjointe de "l'endo" et des α -mannosidases, ce qui corrobore les travaux de KURANDA et ARONSON faisant état d'un catabolisme glycanique bidirectionnel (94).

»

PREPARATION D'UNE FRACTION PURIFIEE EN
ENDO-N-ACETYL- β -D-GLUCOSAMINIDASE
LYSOSOMIQUE

PREPARATION D'UNE FRACTION PURIFIEE EN
ENDO-N-ACÉTYL- β -D-GLUCOSAMINIDASE LYSOSOMIQUE.

I INTRODUCTION

L'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase cytosolique mise en évidence par PIERCE *et al.* (141) étant inactive sur les sialylglycoasparagines et sialylglycopeptides (142), nous avons entrepris de purifier l'endo-N-Acétyl- β -D-glucosaminidase lysosomique de foie de rat, mise en évidence conjointement par BAUSSANT *et al.* (16) et KURANDA *et al.* (95). Ceci dans le but d'en étudier l'action sur des sialyloligosaccharides à deux GlcNAc terminales réductrices.

Le protocole de purification que nous détaillons dans les pages suivantes présente l'avantage d'éliminer l' α -neuraminidase lysosomique. En éliminant cette activité, nous pouvons ainsi éviter la désialylation des sialyloligosaccharides, et empêcher les β -galactosidases, β -hexosaminidases, α -mannosidases d'hydrolyser le substrat.

II- MATERIEL ET METHODES

A) Le substrat OL-1 :

Ce substrat a été préparé comme indiqué dans le chapitre : "Mise en évidence d'une endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase lysosomique dans les cellules humaines."

B) Le fractionnement cellulaire :

Des rats femelles Wistar (150-200g) sont mis à jeûn une nuit avant d'être sacrifiés par décapitation. Les foies rapidement prélevés sont transférés dans une solution de tampon Hépès 10mM, MgCl₂ 5mM, Sucrose 0,25 M. Après broyage au moyen de l'appareil de FISCHER, ils sont homogénéisés dans le tampon précédent par 3 aller-retours de piston de l'appareil de POTTER (750 tours/mn). L'homogénat cellulaire est ensuite filtré sur gaze. Le volume est ajusté par le même tampon à raison de 4 ml/g de foie au départ. Le fractionnement est ensuite conduit selon la méthode de DE DUVE (38). Un culot enrichi en lysosomes est préparé par centrifugation du surnageant post-nucléaire à 10000 rpm pendant 15 mn.

C) Dosage des protéines :

Il a été effectué selon la méthode de LOWRY et al. (100) modifiée par PETERSON (140).

D) Dosage de l'activité endo-N-Acetyl-D-glucosaminidase

Il a été effectué de la façon suivante :

- 30 μ l de la fraction contenant l'activité endoglucosaminidase
- 30 μ l de mannonolactone 30 mM en tampon CP 100 pH 3,5.
- 17 μ l de tampon CP 100 pH 3.5
- 3 μ l de substrat radioactif OL-I (270 cpm/nmole soit 3200 cpm/incubation)

Après 3 heures à 37°C, les protéines sont précipitées par addition de 90 μ l d'éthanol à -20°C. Après centrifugation le surnageant est déposé sur papier Whatman 3. Au bout de 15 h de chromatographie en solvant butanol/acide acétique/eau 4/1/5 (en volumes), les pistes de migration sont découpées et comptées de la même façon que dans le chapitre : "Mise en évidence d'une activité endoglucosaminidase dans les cellules humaines."

E) Définition de l'unité d'activité enzymatique :

1 unité hydrolyse 1 nmole de substrat OL-I en 1 heure

F) Dosage des activités exoglycosidases :

L'activité neuraminidase a été déterminée en utilisant un oligosaccharide marqué (189)

Les autres glycosidases ont été dosées par la méthode au p-nitrophényl glycoside (198).
Notamment en ce qui concerne les β -hexosaminidases dont l'activité a été suivie tout au long de la purification.

III RESULTATS

Nous avons travaillé sur 15 grammes de foie. Après obtention du culot enrichi en lysosomes, celui-ci est repris par 6 ml de tampon citrate-phosphate 1 mM pH 3,5 et homogénéisé par 15 à 20 aller-retours de piston de l'appareil de DOUNCE (4°C). L'homogénat est ensuite laissé à 4°C pendant 2 heures afin d'obtenir une rupture de la membrane lysosomique par choc hypotonique. Après avoir ajusté le pH de l'homogénat à 3,5 par addition d'acide citrique 0,2 M pour obtenir une précipitation des protéines, celui-ci est laissé une nouvelle fois à 4°C. Après centrifugation 5 mn à 3000 rpm (Rotor BECKMAN SW 50-1), le surnageant est déposé sur une colonne de SP-Séphadex (Pharmacia) (5 ml) équilibrée en tampon CP 100 pH 3,5. L'activité endoglucosaminidase est éluée par le même tampon contenant 300 mM NaCl (Fig 16). L'activité β -hexosaminidase co-chromatographiée avec l'activité "endo" est éliminée par concentration sur membrane AMICON YM-50 (seuil d'exclusion : 50000 daltons). La fraction exclue est reconcentrée sur membrane AMICON YM-10 (seuil d'exclusion : 10000 daltons)

IV DISCUSSION

Le protocole schématisé fig.17 permet d'obtenir une fraction endoglucosaminidase enrichie environ 360 fois.

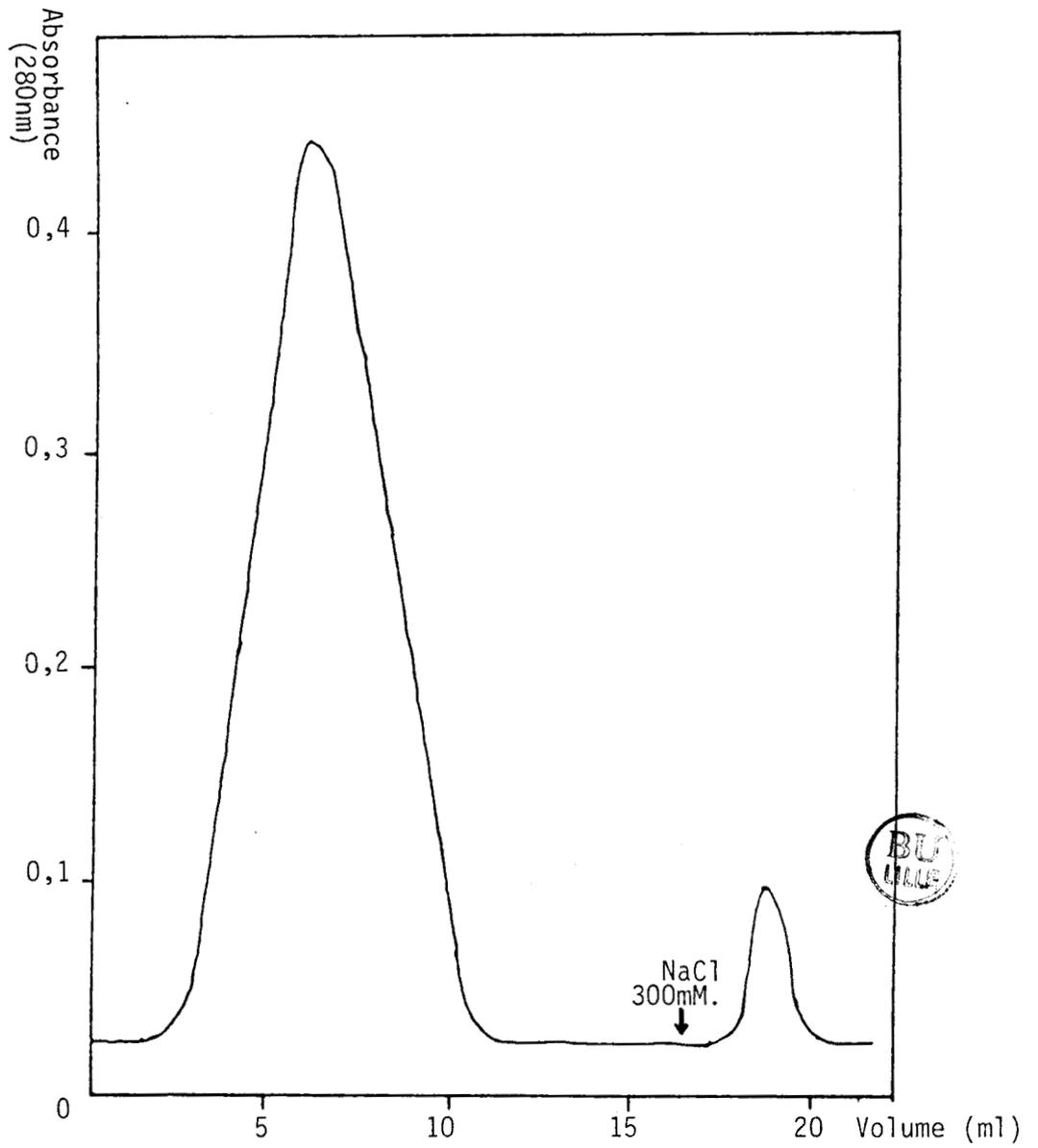


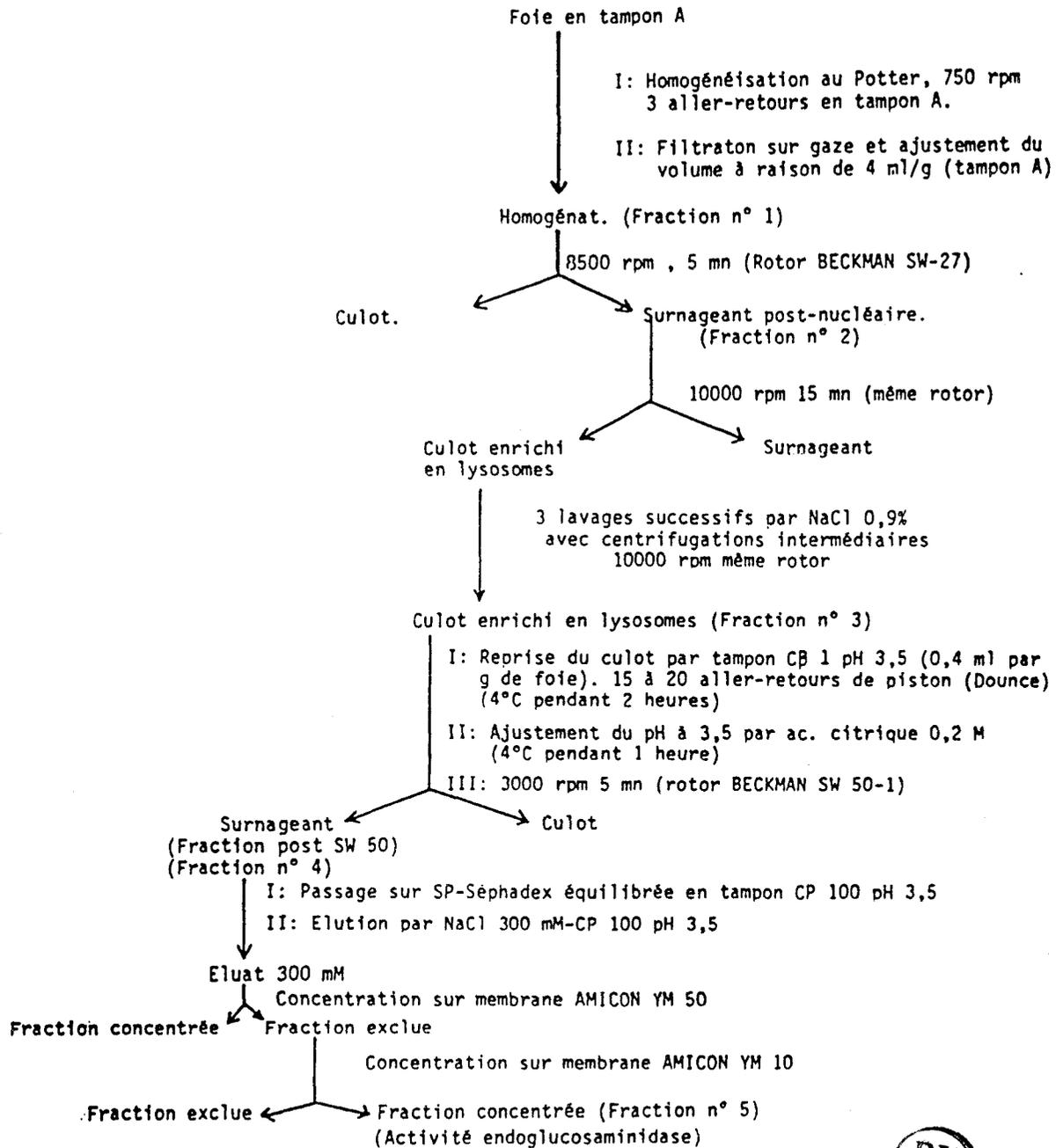
FIGURE 16 : Purification de l'endo-N-acetyl- β -D-glucosaminidase sur SP-Séphadex (Pharmacia, Suède)

L'enrichissement et le rendement de purification sont présentés dans le tableau V.

On constate que l'étape essentielle est celle de précipitation des protéines par l'acide citrique (fraction n° 4) En effet, l'enrichissement en activité endoglucosaminidase passe de 8,5 fois (fraction n° 3) à 280 fois environ. Cette étape présente en plus l'avantage d'éliminer l'activité neuraminidase, celle-ci étant membranaire (115), elle se trouve éliminée lors de la centrifugation.

L'étape de chromatographie sur SP-Séphadex, si elle n'est pas déterminante quant à l'enrichissement, présente l'intérêt d'éliminer bon nombre de protéines dénaturées par le pH de 3,5 mais n'ayant pas été précipitées. En outre l'activité endoglucosaminidase est éluée par cette méthode à son pH optimum d'activité et peut donc être utilisée directement pour des études de spécificité (comme dans le cas des sialyloligosaccharides, voir chapitre suivant).

Des essais de purification faisant appel à la chromatographie d'affinité n'ont pas donné de résultats concluants. En raison de la stricte spécificité de l'enzyme (il faut le chaînon N,N'-diacétylchitobiose intact en position terminale réductrice), il est difficile de préparer des supports d'affinité. Il semble en tout état de cause, qu'il faille que le carbone 1 de la GlcNAc terminale réductrice ne soit engagé dans aucune liaison pour que l'enzyme puisse se fixer. Des essais de purification sur chitobiose, chitotriose, chitotétraose couplés au Sépharose par leur carbone 1 n'ont pas permis d'associer l'enzyme par affinité au support. D'autres tentatives de purification sur colonne de chitine n'ont permis d'obtenir un taux d'enrichissement que de 440 fois. La purification par chromatographie d'affinité semble maintenant devoir passer par l'immobilisation de substrats (oligosaccharides, chitobiose, chitotriose, chitotétraose) possédant en position terminale réductrice le chaînon N,N'-diacétylchitobiose.



Tampon A : Hépès 10 mM, MgCl₂ 5 mM, Saccharose 250 mM, pH 7,5
 Tampon CP 1 : Citrate-phosphate 1mM, pH 3,5
 Tampon CP 100 : Citrate-phosphate 100 mM, EDTA 10 mM, 2-mercapto-éthanol 1 mM.
 pH 3,5

FIGURE 17 : Protocole de purification de l'endo-N-acétyl-β-D-glucosaminidase lysosomiale.

TABLEAU V : Enrichissement et rendement de purification de l'endo-N-acétyl-β-D-glucosaminidase lysosomique.

FRACTION	FRACTION N°	VOLUME (ML)	UNITES/ML	TOTAL DES UNITES	PROTEINES (MG/ML)	UNITES/MG DE PROT.	RENDEMENT (%)	FACTEUR DE PURIFICATION
Homogénat total	1	60	35,7	2142	51	0,7	100	1 fois
Surnageant post-nucléaire	2	50	20,02	1001	15,4	1,3	46,7	1,85 fois
Culot lysosomique	3	7	40	280	6,7	6	13	8,6 fois
Fraction post-SW 50-1	4	6,1	39	238	0,2	195	11	278 fois
Fraction post-YM 10	5	1,1	53	59	0,12	251	2,7	358 fois

1 Unité hydrolyse 1 nanomole de substrat OL-I en 1 heure.

OL-I : $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ [^{14}C]



MISE EN EVIDENCE D'UNE ACTIVITE
SIALYLENDO-N-ACETYL- β -D-GLUCOSAMINIDAS
LYSOSOMIQUE

MISE EN EVIDENCE D'UNE ACTIVITE

SIALYL-ENDOGLUCOSAMINIDASE LYSOSOMIQUE

I - INTRODUCTION

L'urine de patients atteints de sialidose contient de grandes quantités de sialyloligosaccharides portant à leur extrémité terminale réductrice une seule glucosamine au lieu du noyau chitobiose communément rencontré au niveau de la liaison avec l'asparagine (188,192).

Se basant sur ces observations, STRECKER et MONTREUIL postulèrent en 1975 l'existence d'un enzyme hydrolysant la liaison entre les deux GlcNAc de l'extrémité terminale réductrice (118). Une telle activité, découverte en 1979, par PIERCE et al. dans le compartiment cytosolique (141,142), présentait une spécificité restreinte aux glycopeptides de types oligomannosidique et N-acétyllactosaminique désialylé et ne permettait pas d'expliquer l'accumulation des sialyl-dérivés lors de sialidoses. La mise en évidence par KURANDA et ARONSON et BAUSSANT et al. d'une activité endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase lysosomique avec un pH optimal de 3,5 et une spécificité limitée aux oligosaccharides portant le noyau chitobiose en position réductrice permettait d'expliquer lors de glycoprotéinoses l'accumulation d'oligosaccharides à une seule glucosamine réductrice (14,15,16,94,95). Toutefois, les travaux antérieurs n'apportaient pas de solutions quant à la structure à une seule GlcNAc réductrice des oligosaccharides de sialidose.

Notre travail a donc consisté à étudier l'action de l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase lysosomique sur des sialyl oligosaccharides portant le noyau chitobiose en position terminale réductrice

La détermination des structures glycaniques a été effectuée par RMN du proton à 400 MHz au sein du Centre Commun de Mesures de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres Artois par M. Jean-Michel WIERUSZESKI que nous remercions.

II - MATERIEL ET METHODES

A) Préparation des substrats.

Les glycopeptides obtenus par hydrolyse alcaline de la fraction IV de COHN (10 mg/ml NaOH 0,05M, BH_4K 1M, 37°C 48 heures) sont ensuite soumis à deux cycles successifs de pronase.

Après précipitation des protéines par 1 volume d'éthanol à -20°C, les glycopeptides sont déposés sur une colonne de DOWEX 1x2 (200-400 mesh, forme acétate) élués par un gradient d'acétate de pyridine (pH = 5,6). Le glycopeptide GP-I est élué à une concentration de 200 mM d'acétate de pyridine.

Les oligosaccharides de référence ont été isolés à partir d'urines de patients atteints de sialidoses ou de GM1 gangliosidose (192).

B) Préparation des fractions enzymatiques.

1) Fractionnement cellulaire

Des rats femelles WISTAR (150-200g) sont mis à jeûn pendant une nuit avant d'être sacrifiés par décapitation. Les foies rapidement prélevés sont transférés dans une solution de tampon Hépès 10 mM, $MgCl_2$ 5mM, sucrose 0,25M pH 7,5 à 4°C (bain de glace) et homogénéisés dans le même tampon par 3 aller-retours du piston de l'appareil de Potter Elvehjem (750 Tours/mn). L'homogénat cellulaire est ensuite filtré sur gaze. Le volume est ajusté par le tampon Hépès 10 mM, $MgCl_2$ 5mM, sucrose 0,25M à raison de 4 ml/g de foie au départ. Le fractionnement cellulaire est ensuite conduit selon la méthode de DE DUVE *et al.* (38). Un culot enrichi en lysosomes est préparé par centrifugation de la fraction post-nucléaire à 10 000 tours par mn pendant 15 mn (Rotor SW 27.Beckman)

2) Aspartylglucosaminidase

Le culot enrichi en lysosomes est lavé 3 fois par une solution isotonique de NaCl à 9‰ (P/V) afin d'éliminer le saccharose, avec à chaque fois centrifugation dans les mêmes conditions que précédemment. Le culot est ensuite resuspendu dans 2 ml de tampon phosphate 0,1M pH7,5 contenant 0,5% de Triton X100 et homogénéisé par 20 à 25 coups de piston de l'appareil de DOUNCE (en bain de glace). La solution enzymatique est ensuite traitée par la chaleur 6 heures à 60°C afin d'éliminer les activités exoglycosidases.

Le milieu d'incubation est composé de :

- 5 mg de GP I dans 150 μ l de tampon phosphate 100 mM pH 7,5
- 150 μ l de fraction aspartamidase.

L'incubation a lieu à 37°C pendant 48 heures, en ajoutant 100 μ l de fraction enzymatique toutes les 4 heures.

L'incubation est arrêtée en ajoutant au milieu d'incubation 1V d'éthanol à -20°C. Après centrifugation 10 mn à 3000 rpm, le surnageant est déposé sur DOWEX 50 x 2. La fraction non retenue est concentrée puis désalée sur Biogel P2 (fraction OL-II).

3) *Endo-N-acétyl-β-D-glucosaminidase*

Le culot lysosomique lavé comme précédemment par une solution de NaCl 9‰, est repris par une solution hypotonique de citrate-phosphate 0,1mM, EDTA 1mM, β-mercaptoéthanol 0,1 mM à raison de 0,4 ml par g de foie au départ, puis laissé 2 heures à + 4°C, après quoi le pH du milieu est réajusté à 3,5 par l'acide citrique 0,2M. Après 1 heure à + 4°C, le milieu est centrifugé à 3000 rpm pendant 5 mn (rotor BECKMAN SW 50-1). Le surnageant est déposé sur une colonne de SP SEPHADEX équilibrée en tampon CP 100 pH 3,5. L'activité "endo" est éluée par le même tampon contenant 300 mM en NaCl. C'est cette fraction qui après concentration à 2 ml (par système d'ultrafiltration CX 10 de MILLIPORE) est utilisée lors de l'incubation qui s'effectue comme suit :

- 3,2 mg d'OL-II dans 150 μl de tampon CP 100 pH 3,5
- 150 μl de fraction enzymatique contenant l'activité endo-N-acétyl glucosaminidase.

L'incubation a lieu pendant 48 heures à 37°C en ajoutant 100 μl d'enzymes toutes les 4 heures, soit au total 200 μg de protéines (dosé par la méthode de LOWRY utilisant la sérum albumine bovine comme référence (100)

La purification de l'OL-III a lieu comme précédemment indiqué pour l'OL-II.

C) Activités exoglycosidases.

L'activité neuraminidase a été déterminée en utilisant un sialyl oligosaccharide marqué (189).

Les autres glycosidases ont été dosées par la méthode au p-nitrophényl glycoside (198).

D) Chromatographie couche mince.

Elle a été réalisée en utilisant des plaques Silicagel-60 plates (20 x 20 cm) (MERCK.RFA) dans le système solvant n-butanol/éthanol /pyridine /acide acétique /eau 10/100/10/3/30 (en volumes). Après une première migration, la plaque est séchée puis remise dans le solvant avant d'être révélée par le réactif à l'orcinol sulfurique.

E) Analyses RMN. (effectuées par M. J.M. WIERUSZESKI)

Après purification des différentes fractions glycaniques obtenues lors des incubations (voir précédemment), celles-ci sont échangées plusieurs fois par D₂O avec lyophilisations intermédiaires .

L'analyse RMN des solutions à 1 mM dans D₂O (99,95%: CEA.France) est effectuée au moyen d'un appareil BRUKER AM-400 WB à 300 K. Les glissements chimiques sont donnés par rapport au sodium-4, 4-diméthyl-4-silapentane-1-sulfonate (Indirectement par rapport à l'acétone dans D₂O : $\delta = 2,225$ ppm).

Les spectres RMN sont interprétés par comparaison avec les valeurs fournies par la littérature (206).

III - RESULTATS

A) Analyse du spectre RMN du sialylglycoasparagine GP-I.

Le spectre RMN est présenté figure 18 et les valeurs de glissements chimiques rapportées dans le tableau VI.

Les résultats montrent que GP-I est un mélange de glycopeptides biantennés mono- et disialylés comparables à ceux isolés de la sérotransferrine humaine ou de lapin (96,206). Les monosialoglycopeptides GP Ib et GP Ic représentent environ 20 % du matériel glycanique comme l'indiquent les signaux des protons anomériques de Man 4 et 4' respectivement à $\delta = 5,119$ et $\delta = 4,924$. L'absence d'asialoglycopeptides est vérifiée par chromatographie couche mince (voir figure 19).

Le GP I est composé à 50 % de glycoasparagines vrais (aucun autre amino-acide lié à l'asparagine) en raison de la présence du doublet de H-1 de l'osamine 1 à 5,070 ppm et du singulet de l'acétamido de cette même osamine à 2,013 ppm. Pour les 50 % restants, les signaux à 5,063 et 5,047 (H-1 GlcNAc 1), 2,002 ppm et 2,009 ppm (acétamido de GlcNAc 1) révèlent une partie peptidique hétérogène (d'autres aminoacides n'ayant pas été hydrolysés par la pronase restent liés à l'Asn). Ceci a déjà été observé dans le cas des sérotransferrines de lapin (96) et humaine (41). Les valeurs RMN des autres monosaccharides ne sont pas modifiées par l'hétérogénéité peptidique du GP-I.

Le GP-I contient également de l'acide sialique libre provenant de l'autolyse du substrat (signal à $\delta = 2,048$).

Le spectre révèle également la présence d'oligosaccharide OL-II par l'existence d'un doublet à $\delta = 5,189$ caractéristiques d'une GlcNAc 1 en position terminale réductrice. Ce composé tire son origine d'une probable activité aspartyl-glucosaminidase ou N-glycanase dans la pronase commerciale.

B) Etude du spectre de l'oligosaccharide OL-II - Action de l'aspartamidase.

Le spectre et les paramètres RMN de OL-II sont donnés respectivement Figure 18 et Tableau VI.

L'incubation du GP-I avec une préparation d'aspartamidase aboutit à l'hydrolyse de plus de 90 % du substrat de départ (voir figure 18 et tableau VI). La libération de l'OL-II est mise en évidence par la présence des doublets caractéristiques de H-1 de GlcNAc 1 en conformation α ou β ($\delta = 5,189$ (α) et $4,690$ (β)) et par un incrément de $0,0025$ ppm du signal de l'acétamido de cette même osamine (nouveau signal à $2,038$ ppm). La disparition du doublet à $\delta = 5,070$ et du singulet à $\delta = 2,023$ témoigne de l'hydrolyse de la liaison GlcNAc-Asn. De plus, on remarque que malgré l'hétérogénéité de la partie peptidique du GP-I, celui-ci a été pratiquement totalement hydrolysé pour donner naissance à OL-II. Compte tenu de la spécificité très étroite de l'aspartamidase (173), il faut admettre que l'homogénat lysosomique conserve même après traitement à la chaleur (60 °C, 6h) des activités protéasiques capables d'hydrolyser les glycopeptides produisant ainsi des glycoasparagines eux-mêmes ensuite dégradés par l'aspartamidase. Cette observation confirme les récents travaux de BAUSSANT selon lesquels l'action de l'aspartamidase est postérieure à celle des protéases (14).

C) Analyse du spectre RMN de OL-III - mise en évidence d'une activité endoglucosaminidase lysosomique.

Le spectre et les paramètres RMN de OL-III sont donnés respectivement figure 18 et tableau VI.

Après purification de l'OL-II celui-ci a été incubé avec une solution enzymatique contenant l'activité endoglucosaminidase lysosomique (voir Matériel et méthodes).

Après purification sur DOWEX 50 x 2 et Biogel P2, le matériel résultant (oligosaccharide OL-III) a été analysé par RMN à 400 MHz.

L'examen du spectre permet de conclure que l'oligosaccharide OL-III est un mélange d'oligosaccharides mono-et bisialylés identiques aux produits isolés d'urines de patients atteints de sialidose (188,192). L'analyse en chromatographie couche mince confirme l'absence de dérivés asialo (figure 19).

La disparition du doublet H-1 (α) de GlcNAc-1 prouve une hydrolyse totale de l'oligosaccharide OL-II par l'endo-N-acétyl- β -glucosaminidase du lysosome. L'effet d'anomérisation de la GlcNAc-2 est clairement observable par la subdivision des signaux N-acétyl des GlcNAc 2 et 5' (anomères α et β).

Quelques doublets de faible intensité à $\delta = 5,063$ et $5,047$ (H-1 de GlcNAc-1) et des singulets à $2,010$; $2,008$ et $2,002$ ppm (signaux du groupement acétamido de l'osamine -1) témoignent de la présence de traces de glycopeptides ayant résisté à l'action de l'aspartamidase et par conséquent à celle de l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase. Cette observation confirme que ce dernier enzyme est spécifique des oligosaccharides présentant en position terminale réductrice le chaînon chitobiose intact (16,95)

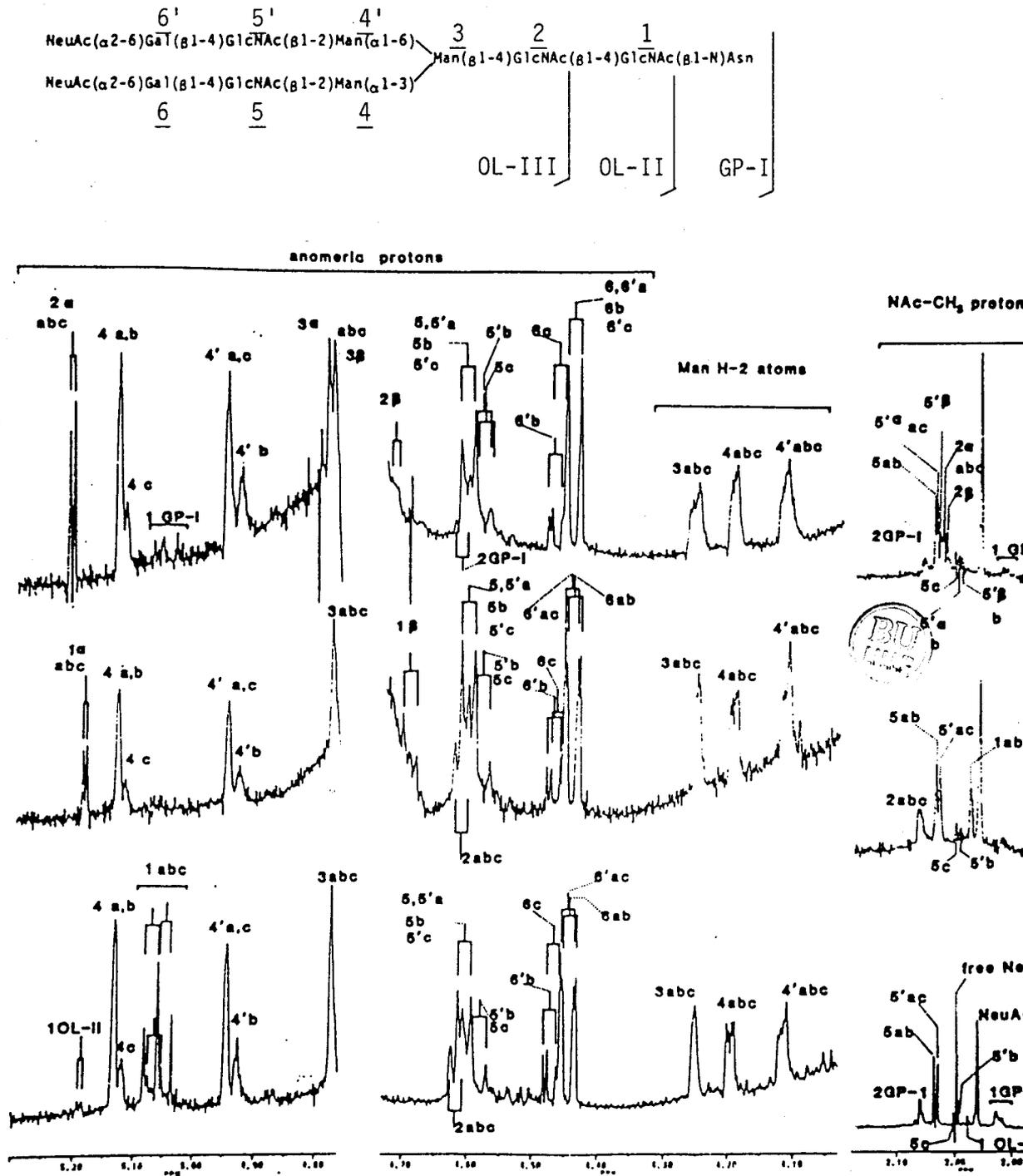


FIGURE 18 : Spectres RMN à 400 MHz du substrat GP-I et des produits de l'action de l'aspartamidase (OL-II) et de l'endo-N-acétyl-β-D-glucosaminidase (OL-III).

TABLEAU VI : Glissements chimiques des protons des monosaccharides constituant les GP-I, OL-II et OL-III.

Proton	Residue	Chemical shift in									
		GP-Ia	GP-Ib	GP-Ic	OL-IIa	OL-IIb	OL-IIc	OL-IIIa	OL-IIIb	OL-IIIc	
		ppm									
H-1 of	1	5.070 ^a	5.070 ^a	5.070 ^a	5.189 (α)	5.189 (α)	5.189 (α)	5.213 (α)	5.213 (α)	5.213 (α)	5.213 (α)
		5.063 ^b	5.063 ^b	5.063 ^b	4.690 (β)	4.690 (β)	4.690 (β)	4.72 (β)	4.72 (β)	4.72 (β)	4.72 (β)
		5.047 ^b	5.047 ^b	5.047 ^b	4.619 (α)	4.619 (α)	4.619 (β)	4.784 (α)	4.784 (α)	4.784 (α)	4.784 (α)
2		4.615	4.615	4.615	4.619 (β)	4.619 (β)	4.619 (β)	4.774 (β)	4.774 (β)	4.774 (β)	4.774 (β)
		4.774	4.77	4.77	4.774	4.77	4.77	4.774 (α)	4.774 (α)	4.774 (α)	4.774 (α)
4		5.134	5.134	5.119	5.133	5.133	5.120	5.134	5.134	5.134	5.121
		4.946	4.924	4.928	4.946	4.926	4.929	4.950	4.950	4.929 (α)	4.950
5		4.603	4.603	4.580	4.605	4.605	4.580	4.605	4.605	4.605	4.584
		4.603	4.580	4.603	4.605	4.580	4.605	4.605	4.605	4.587	4.605
6		4.443	4.443	4.666	4.443	4.443	4.466	4.442	4.442	4.442	4.468
		4.445	4.469	4.445	4.447	4.470	4.447	4.442	4.442	4.471	4.442
H-2 of	3	4.252	4.252	4.252	4.253	4.253	4.253	4.26	4.26	4.26	4.26
		4.195	4.195	4.195	4.195	4.195	4.195	4.195	4.195	4.195	4.195
H-3		4.115	4.115	4.115	4.115	4.115	4.115	4.118	4.118	4.118	4.118
		1.717	1.717	1.717	1.718	1.718	1.718	1.717	1.717	1.717	1.717
H-3c		2.671	2.671	2.671	2.672	2.672	2.672	2.670	2.670	2.670	2.670
		2.013 ^a	2.013	2.013	2.038	2.038	2.038	2.038	2.038	2.038	2.038
NAc of	1	2.009 ^b	2.009	2.009	2.083	2.083	2.083	2.063 (α)	2.063 (α)	2.063 (α)	2.063 (α)
		2.002 ^b	2.002	2.002	2.083	2.083	2.083	2.060 (β)	2.060 (β)	2.060 (β)	2.060 (β)
5		2.069	2.069	2.052	2.069	2.069	2.051	2.071	2.071	2.071	2.053
		2.065	2.043	2.065	2.066	2.046	2.066	2.069 (α)	2.049 (α)	2.049 (α)	2.069 (α)
NeuAc		2.030	2.030	2.030	2.031	2.031	2.031	2.030	2.030	2.030	2.030
		2.030	2.030	2.030	2.031	2.031	2.031	2.030	2.030	2.030	2.030

^a GlcNAc liée à l'Asn.

^b GlcNAc liée à une chaîne peptidique.

Pour GP-I, OL-II et OL-III, les indications a, b, c se rapportent respectivement à des composés disialylés, Gal-6 et Gal-6' monosialylés.



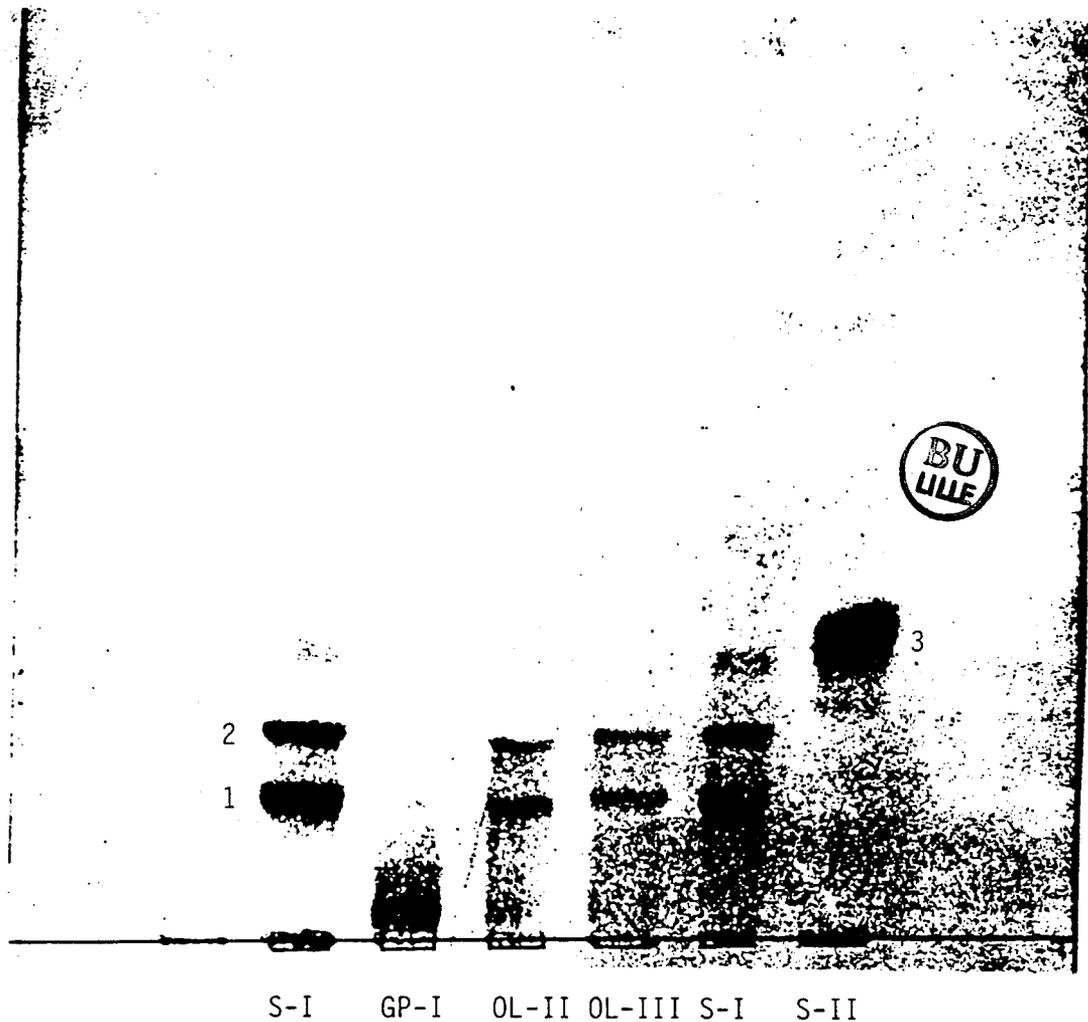


FIGURE 19 : Analyse par chromatographie en couche mince des sialyloligosaccharides produits par l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase .

S-I et S-II sont des témoins oligosaccharidiques isolés d'urines pathologiques.

- 1- $(\text{NeuAc})_2(\text{Gal})_2(\text{GlcNAc})_2(\text{Man})_3\text{GlcNAc}$.
- 2- $\text{NeuAc}(\text{Gal})_2(\text{GlcNAc})_2(\text{Man})_3\text{GlcNAc}$.
- 3- $(\text{Gal})_2(\text{GlcNAc})_2(\text{Man})_3\text{GlcNAc}$.

IV -DISCUSSION

Une activité endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase maximale à pH 7,5 a été mise en évidence dans le cytosol (141,142)

Du fait de sa localisation cellulaire et de sa spécificité limitée (aux structures polymannosidiques et N-acétyllactosaminiques désialylées), cet enzyme ne pouvait pas rendre compte de l'excrétion urinaire d'oligosaccharides sialylés dans les cas de sialidoses (191).

Récemment, une activité di-N-acétyl chitobiase lysosomique a été décrite dans le foie de rat (16,95). Celle-ci pourrait être à l'origine des oligosaccharides à une seule GlcNAc en position terminale réductrice excrétés dans le cas déjà mentionné de sialidoses.

Sur la base de ces observations, nous avons étudié le catabolisme lysosomique de glycopeptides sialylés en nous intéressant plus particulièrement aux enzymes hydrolysant l'extrémité terminale réductrice de tels composés.

Au vu des résultats, il est possible de constater que l'endoglucosaminidase lysosomique, contrairement à l'enzyme cytosolique, est capable d'hydrolyser les oligosaccharides sialylés possédant en position terminale réductrice le chaînon chitobiose.

De plus, la présence et l'activité d'un tel enzyme permet d'une part de montrer que le catabolisme des N-glycannes peut s'effectuer uniquement au niveau lysosomique et d'autre part d'expliquer la présence de sialyl oligosaccharides à une seule GlcNAc réductrice dans les urines de patients atteints de sialidose.

Ces travaux prouvent également la nécessité de l'action préalable de l'aspartamidase, celle-ci libérant des oligosacchrides à 2 GlcNAc en position terminale réductrice accessibles à l'action de l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase.

Le rôle biologique de ces deux enzymes pourrait être de faciliter l'action des exoglycosidases, celles-ci semblant beaucoup plus actives sur des oligosaccharides que sur des glycopeptides.

CATABOLISME IN VITRO DES N-GLYCANNES

ETUDE DU CATABOLISME IN VITRO DES N-GLYCANNES

I - INTRODUCTION

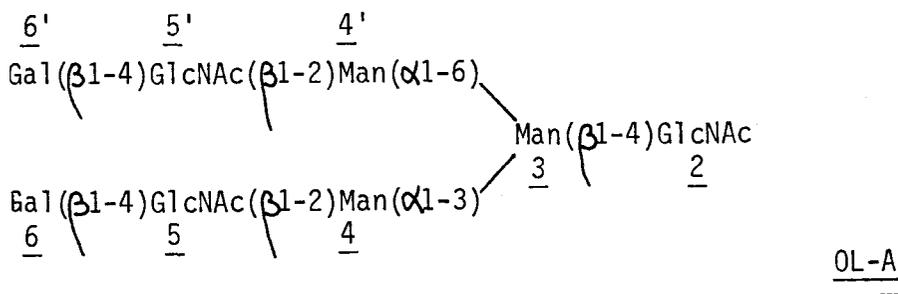
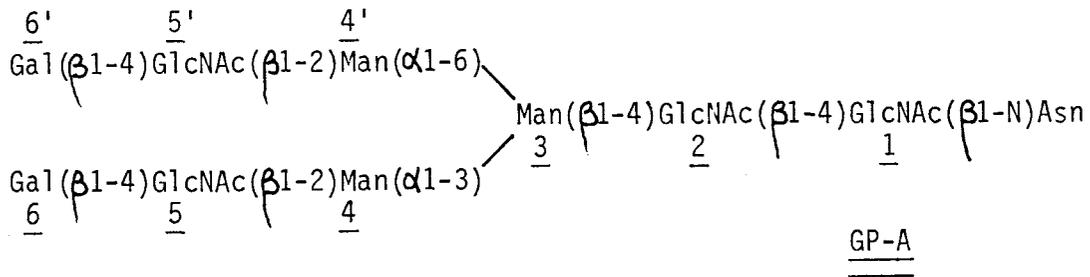
Les seuls éléments permettant de comprendre le catabolisme des N-glycannes étaient jusqu'à présent l'étude des structures oligosaccharidiques et glycopeptidiques accumulées dans les cas de glycoprotéinoses. Ces études ont permis d'avancer plusieurs hypothèses :

- tout d'abord, le catabolisme semble plus rapide sur des structures de type oligosaccharidique que sur des structures glycopeptidiques : en particulier, il a été remarqué que dans les cas de fucosidose ou d'aspartyl glucosaminurie, les glycoasparagines majeurs accumulés étaient composés de longues chaînes indiquant que les exoglycosidases avaient une affinité plus faible pour ces structures que pour les structures correspondantes de type oligosaccharidique (190,27). De plus BEARPARK et al. (18) avaient constaté dès 1977 que l'hexosaminidase était beaucoup plus active sur des oligosaccharides que sur les glycopeptides correspondants (30 % d'hydrolyse en 30 mn dans le premier cas contre 4 % en 3 heures dans le second). Cette observation, entre autres, amena MONTREUIL en 1981, à formuler l'hypothèse selon laquelle le catabolisme des N-glycannes était initié par une endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase (117) libérant des oligosaccharides à une seule osamine terminale réductrice devenant

Sur la base de ces observations, notre travail a consisté à étudier in vitro les différentes voies du catabolisme des N-glycannes en nous attachant plus particulièrement aux points suivants :

- quels sont les rôles respectifs des exoglycosidases d'une part, et du complexe aspartamidase-endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase lysosomique, lors du catabolisme ?
- Y'a-t-il une différence de vitesse d'hydrolyse entre un oligosaccharide et son homologue glycopeptidique ?
- Le catabolisme est-il identique sur les deux branches ou existe t-il un catabolisme branche par branche aboutissant à la dégradation préférentielle de l'une d'entre-elles ?

Pour ce faire, nous avons utilisé deux types de substrats : l'un oligosaccharidique (OL-A), l'autre glycopeptidique (GP-A) qui sont représentés ci-dessous :



II - MATERIEL ET METHODES

A) Obtention des substrats.

1) L'oligosaccharide OL-A

L'oligosaccharide a été isolé d'urine de patients atteints de GM1 gangliosidose selon la méthode décrite par STRECKER et POITAU (192).

2) Le glycopeptide GP-A

Il a été préparé comme indiqué précédemment dans le chapitre : "mise en évidence d'une activité sialylendoglucosaminidase lysosomique". Le glycopeptide GP-I obtenu a ensuite été désialylé par action de l'acide trifluoroacétique 0,05 N à 80°C pendant une heure. Après évaporation à sec sous pression réduite, le glycopeptide a été déposé sur une colonne de Biogel P2 et élué par de l'eau. Les fractions positives à l'orcinol, contenant le glycopeptide GP-A ont été collectées et lyophilisées.

B) Préparation des fractions enzymatiques

L'obtention du culot enrichi en lysosomes a été préparé comme indiqué précédemment (voir le chapitre "Mise en évidence d'une activité sialylendoglucosaminidase lysosomique"). Après 3 lavages successifs par une solution isotonique de NaCl à 9‰, le culot est repris par 10 ml de tampon acétate pH 4,5 200 mM contenant 0,5% en triton X100 (pour 25 g de foie au départ). L'homogénat lysosomique est ensuite traité en bain de glace par 15 à 20 aller-retours de piston de l'homogénéiseur de DOUNCE avant d'être abandonné 2 heures à + 4°C.

C) Incubations

8 mg d'OL-A ou GP-A sont dissous dans 100 μ l d'eau désionisée, auxquels on ajoute 100 μ l d'homogénat lysosomique. Toutes les 4 heures, 200 μ l d'homogénat lysosomique sont ajoutés au milieu. Aux temps 1,2,4,8,24,36,48 Heures des aliquotes sont prélevés de façon à récupérer à chaque fois 1 mg de matériel oligosaccharidique ou glycopeptidique. La réaction est arrêtée en ajoutant 1V d'éthanol à -20°C. Après centrifugation 5 mn à 3000 rpm (centrifugeuse JOUAN de paillasse) le surnageant, contenant le matériel oligosaccharidique ou glycopeptidique, est déposé sur une colonne de DOWEX 1x2 (5ml) éluée par l'eau. Après concentration, le matériel est déposé sur une colonne de Biogel P2 (50 x 1 cm) éluée par de l'eau. Les fractions orcinol positives sont lyophilisées et analysées par RMN du proton à 400 MHz.

D) Analyses RMN

Elles ont été effectuées de la même façon que lors de la mise en évidence de l'activité sialyl-endoglucosaminidase lysosomique.

TABLEAU VII : Evolution des valeurs de glissement chimiques des protons des monosaccharides de l'OL-A au cours de l'hydrolyse. (valeurs données en ppm).

Temps d'hydrolyse Protons.	TEMPS= 0	TEMPS= 1 heure	TEMPS= 2 heures	TEMPS= 4 heures	TEMPS= 8 heures	TEMPS= 24 heures
H-1 de 2 :	5.213 (α) 4.720 (β)	5.213 (α) 4.720 (β)	5.213 (α) 4.720 (β)	5.213 (α) 4.720 (β)	5.213 (α) 4.720 (β)	5.213 (α) 4.720 (β)
3 :	4.777 (α) 4.766 (β)	4.777 (α) 4.766 (β)	4.777 (α) 4.766 (β)	4.777 (α) 4.766 (β)	4.777 (α) 4.766 (β)	4.777 (α) 4.766 (β)
4 :	5.121	5.121	5.121	5.121	5.121	5.118 5.100 Term n réd
4' :	4.926	4.926 4.915 Sans 6'				
5 :	4.583	4.583 4.557 Term n réd				
5' :	4.583	4.583 4.557 Term n réd				
6 :	4.448	4.448	4.448	4.448	4.448	-
6' :	4.471	4.471	4.471	4.471	4.471	-
H-2 de 3 :	4.26	4.26	4.26	4.26	4.26	4.26
4 :	4.190	4.190	4.190	4.190	4.190	4.190 4.064 Term n réd
4' :	4.109	4.109	4.109	4.109	4.109	4.109

Term. n. réd. position terminale non réductrice.
 Sans 6' : branche 1-6 dégalactosylée.



protons NAc-CH₃

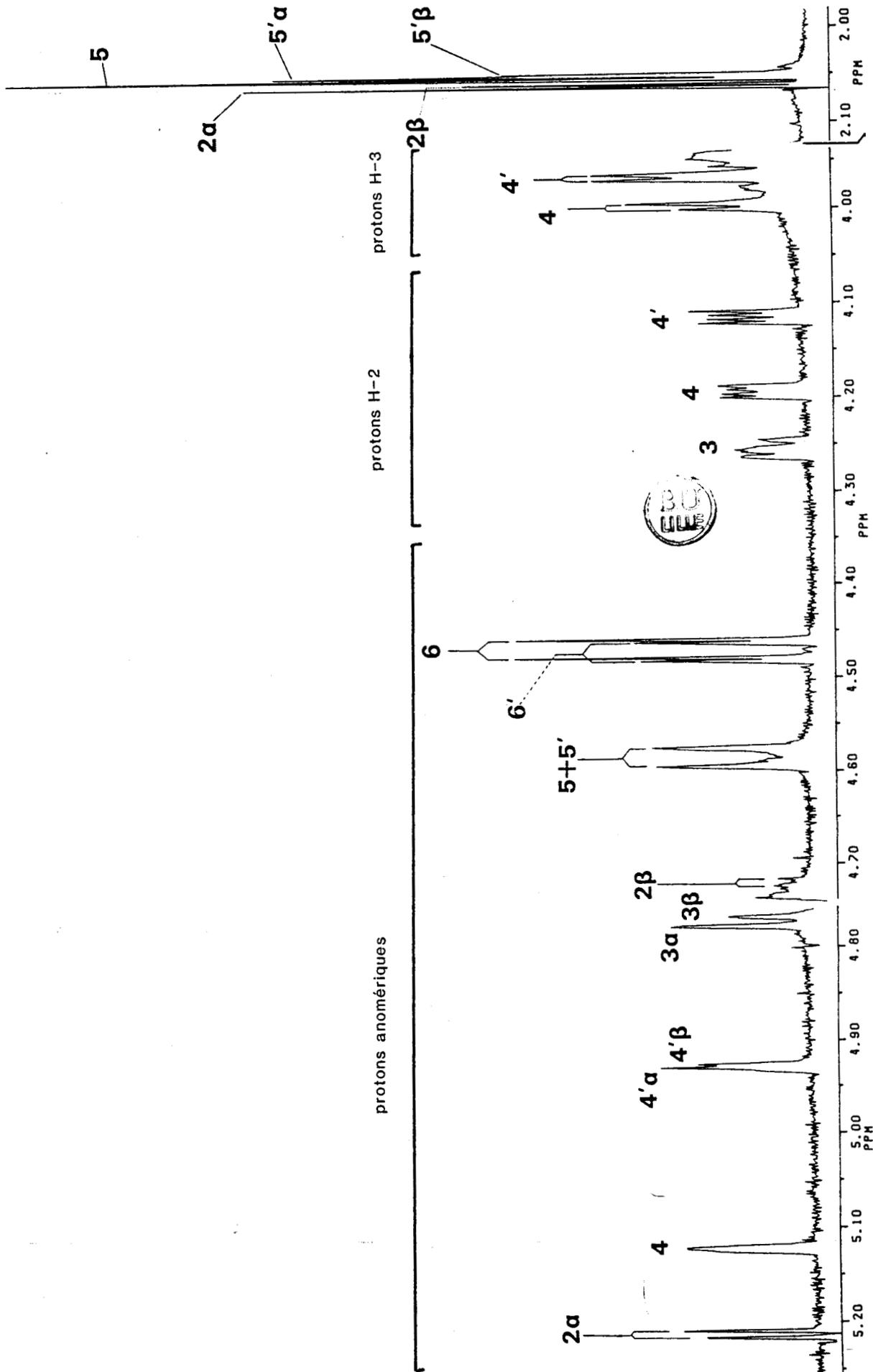


FIGURE : 20 : Spectre RMN à 400 MHz de l'oligosaccharide OL-A (temps= 0 heure).

III - RESULTATS

A) Hydrolyse du substrat oligosaccharidique OL-A

1) Oligosaccharide OL-A de référence (temps = 0h)

Les valeurs des glissements chimiques sont données dans le tableau VII et le spectre fig. 20.

On constate que le substrat OL-A est un oligosaccharide diantenné à une seule osamine en position terminale réductrice, par l'absence des signaux à $\delta = 5,070$ (osamine $\underline{1}$ d'un glycoasparagine et $\delta = 5,188$ osamine $\underline{1}$ en position terminale réductrice).

D'autre part, on constate que OL-A porte en position terminale non réductrice 2 résidus de galactose (absence de signal à $\delta = 4,557$ caractéristique d'une GlcNAc $\underline{5}$ ou $\underline{5'}$ en position terminale non réductrice).

2) A 1 heure d'hydrolyse

On remarque dès une heure d'hydrolyse l'apparition d'un signal à $\delta = 4,557$ caractéristique d'une osamine $\underline{5}$ ou $\underline{5'}$ en position terminale non réductrice. L'apparition de ce signal témoigne de l'action d'une galactosidase sans qu'il soit possible de déterminer si celle-ci a agi sur l'antenne en $(\alpha 1-3)$ ou sur celle en $(\alpha 1-6)$. Cependant l'analyse des deux doublets dus aux Gal $\underline{6}$ et $\underline{6'}$ permet de voir une diminution d'intensité plus rapide du doublet du Gal $\underline{6}$ par rapport au Gal $\underline{6'}$ (voir spectre figure 21 et tableau VII pour les valeurs. Ce fait permet de conclure que la β -galactosidase hydrolyse préférentiellement le Gal $\underline{6}$ par rapport au Gal $\underline{6'}$.
Toutefois, la

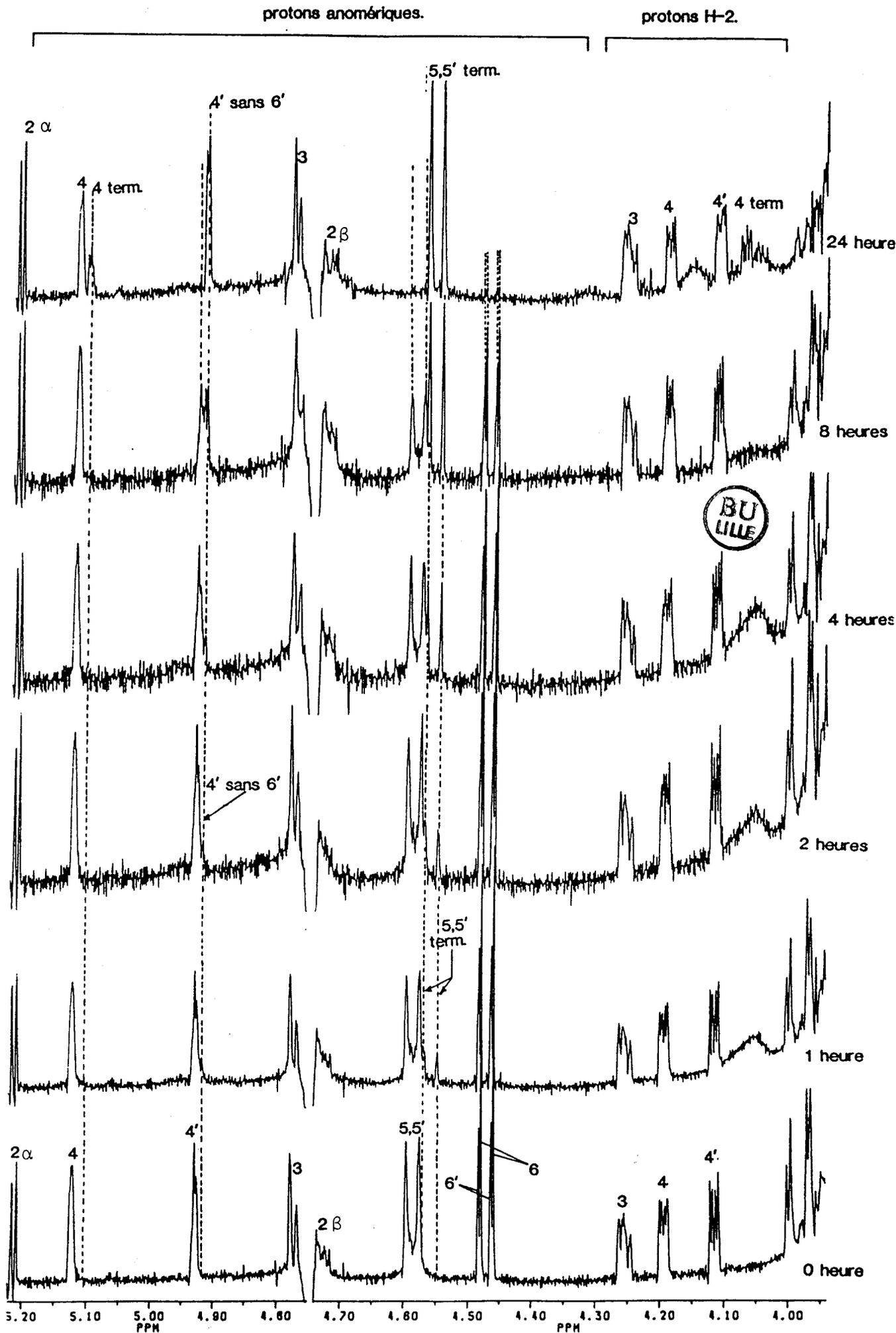


FIGURE 21 : Cinétique d'hydrolyse de l'oligosaccharide 0L-A.

dégalactosylation de l'antenne (α 1-6) (Gal 6) est visible par l'apparition d'un signal à $\delta = 4,915$ caractéristique d'un mannose 4' ne portant en position terminale non réductrice que la GlcNAc 5' (Le mannose 4 quant à lui ne voit pas de déplacement de son signal si le Gal 6 est hydrolysé).

3) A 2 heures, 4 heures et 8 heures d'hydrolyse

Les résultats sont les mêmes que précédemment. On constate une amplification des phénomènes : dégalactosylation préférentielle de l'antenne (α 1-3), mais perte de Gal également par l'antenne (α 1-6) dans des proportions moindres. Ceci est clairement attesté par l'examen du doublet à $\delta = 4,448$ (Gal 6) dont l'intensité relative par rapport au doublet à $\delta = 4,471$ (Gal 6') diminue beaucoup plus rapidement. Dans le même temps, on observe à la fois une diminution du doublet des GlcNAc 5 et 5' à $\delta = 4,583$ (GlcNAc 5 ou 5' liée au Gal) et une augmentation du doublet à $\delta = 4,557$ (osamine 5 ou 5' en position terminale non réductrice).

De plus, on remarque au temps 8 heures d'hydrolyse que le signal du Man 4' porteur seulement d'une GlcNAc 5' à une intensité égale au signal du man 4' portant le chaînon N-acétyl-lactosaminique intact (signaux respectivement à $\delta = 4,926$ et $\delta = 4,915$).

4) A 24 heures d'hydrolyse

On remarque la disparition totale des 2 doublets H-1 des Gal 6 et 6' indiquant une dégalactosylation totale des deux branches. Ce fait est confirmé par la présence du seul doublet à $\delta = 4,557$ des GlcNAc 5 et 5' et du signal du Man 4' à $\delta = 4,915$.

De plus, un signal à $\delta = 5,100$ apparaît témoignant de l'apparition de mannose 4 en position terminale non réductrice. Par mesure de l'intensité du signal du Man 4 par rapport à

TABLEAU VIII : Evolution des valeurs de glissement chimique des protons des monosaccharides du GP-A au cours de l'hydrolyse. (valeurs données en ppm).

Temps d'hydrolyse. Protons.	TEMPS=0	TEMPS= 2 heures	TEMPS= 4 heures	TEMPS= 8 heures	TEMPS= 24 heures	TEMPS= 36 heures
H-1 de 1 :	5.070 5.06 5.036 Asn liée	5.070 5.06 5.036 Asn liée	5.070 5.06 5.036 Asn liée	5.070 5.06 5.036 Asn liée	5.070 5.188 Term. réd	5.070 5.188 Term réd.
2 :	4.615	4.615	4.615	4.615	4.615	4.615 5.211 Term. réd
3 :	4.763	4.763	4.763	4.763	4.763	4.763
4 :	5.118	5.118	5.118	5.118	5.118 5.100 Term n réd.	5.118 5.100 Term. n réd
4' :	4.925	4.925	4.925 4.917 Sans 6'	4.925 4.917 Sans 6'	4.925 4.917 Sans 6'	4.925 4.917 Sans 6'
5 :	4.58	4.58 4.557 Term n réd	4.58 4.557 Term n réd	4.58 4.557 Term n réd	4.58 4.557 Term n réd	4.58 4.557 Term n réd
5' :	4.58	4.58 4.557 Term n réd	4.58 4.557 Term n réd	4.58 4.557 Term n réd	4.58 4.557 Term n réd	4.58 4.557 Term n réd
6 :	4.466	4.466	4.466	4.466	-	-
6' :	4.472	4.472	4.472	4.472	4.472	-
H-2 de 3 :	4.246	4.246	4.246	4.246	4.246	4.246
4 :	4.190	4.190	4.190	4.190	4.190	4.190 4.064 Term n réd
4' :	4.109	4.109	4.109	4.109	4.109	4.109

Asn liée : asparagine liée à d'autres acides aminés.
 Term. réd. position terminale réductrice.
 Term. n. réd. position terminale non réductrice.
 Sans 6' : branche 1-6 dégalactosylée.



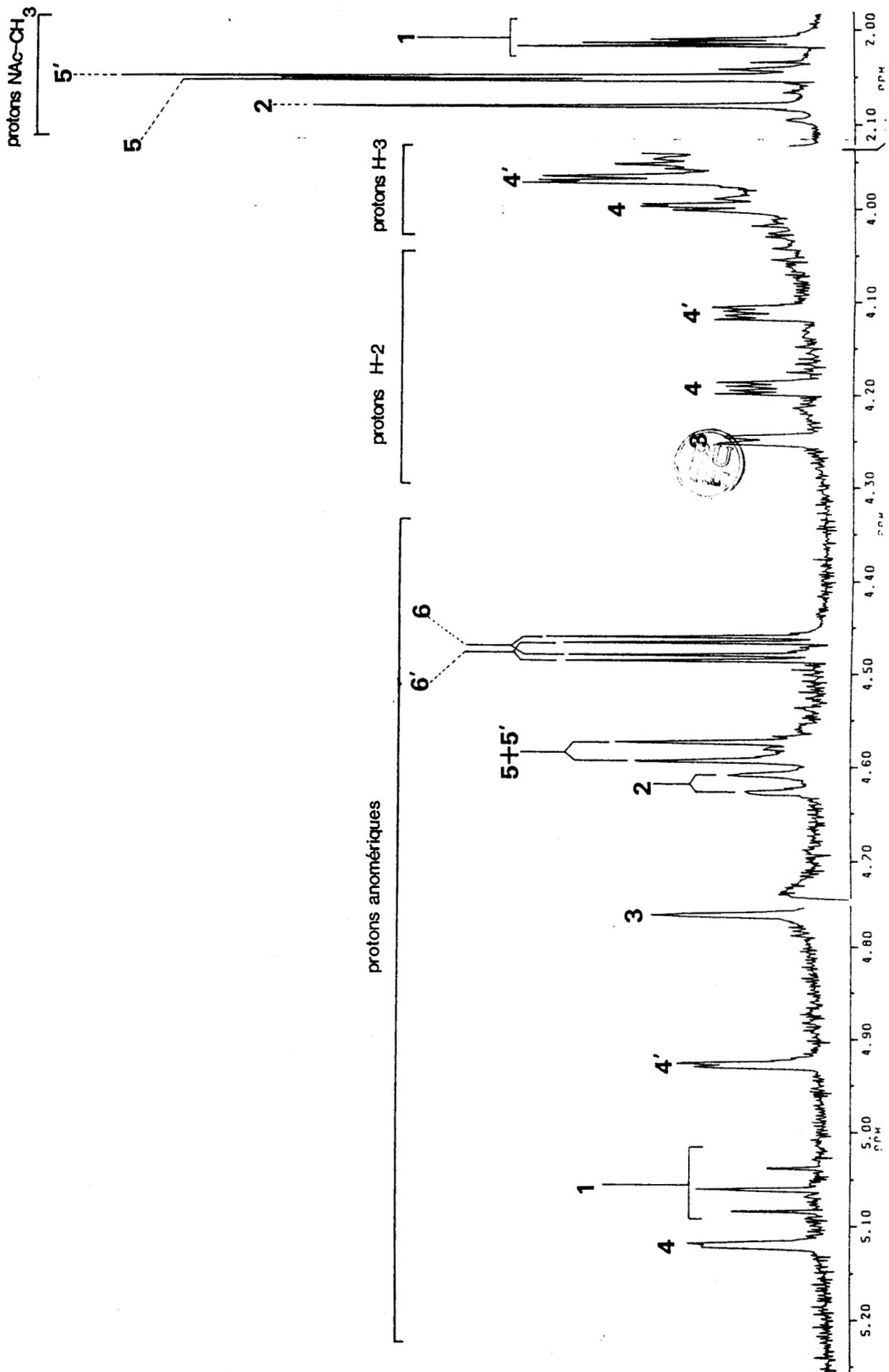


FIGURE 22 : Spectre RMN à 400MHz du glycopeptide GP-A (temps= 0).

lysosome déplaçant ainsi la réaction par loi d'action de masse. Soit, une action des protéases lysosomiques tendent à dénaturer les glycosidases.

B) Hydrolyse du glycopeptide GP-A

1) Glycopeptide GP-A de référence temps = 0

On constate que le GP-A est en fait un mélange de glycoasparagines (signal de GlcNAc 1 à $\delta = 5,070$) et de glycopeptides (signaux à $\delta = 5,06$ et $\delta = 5,036$ de l'osamine 1 liée à plusieurs amino-acides) (41,96). Il n'y a pas dans le GP-A de branche partiellement dégalactosylée (absence des signaux à $\delta = 4,557$ de GlcNAc 5 et 5') Voir fig. 22. et tableau VIII.

2) A 2 heures et 4 heures d'hydrolyse

Un signal dû au doublet des GlcNAc 5 et 5' en position terminale non réductrice commence à apparaître témoignant d'une dégalactosylation de l'une ou l'autre branche ($\delta = 4,557$). Cependant, l'analyse des doublets des Gal 6 et 6' permet de conclure à une dégalactosylation préférentielle de l'antenne en $(\alpha 1-3)$ (Gal 6). On ne remarque pour ces temps d'hydrolyse aucune action ni de l'aspartamidase, ni de l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase lysosomique (absence des signaux à $\delta = 5,188$: GlcNAc 1 (α) et $\delta = 5,211$ GlcNAc 2 (α)), bien que ces deux activités soient présentes dans l'homogénat (Voir fig 23. Tableau VIII.)

3) A 8 heures d'hydrolyse

Outre les phénomènes mentionnés pour les temps d'hydrolyse précédents, un signal à $\delta = 4,915$ témoigne de la présence d'un mannose 4' dont l'antenne ($\alpha 1-6$) a été dégalactosylée. (Voir fig. 23 et Tableau VIII.).

4) A 24 heures d'hydrolyse

Le signal du galactose 6 a complètement disparu témoignant d'une dégalactosylation totale de l'antenne ($\alpha 1-3$) ($\delta = 4,466$ absent). Le doublet du galactose 6' est encore présent bien que d'intensité très faible ($\delta = 4,472$) prouvant que l'antenne ($\alpha 1-6$) porte encore du Gal, ce qui est également attesté par la présence d'un signal résiduel à $\delta = 4,925$ du Man 4'.

De plus, un doublet à $\delta = 5,188$ témoigne de l'action de l'aspartamidase. Celle-ci semble donc agir alors que la β -galactosidase a déjà pratiquement hydrolysé la totalité du galactose. De plus, on remarque que l'intensité des signaux de l'osamine 1 (estimée par rapport à l'intensité du signal du Man 3) diminue, attestant de l'action de protéases antérieures à celle de l'aspartamidase. L'action de la β -galactosidase avant celle de l'aspartamidase pourrait indiquer que ce dernier enzyme présente une affinité supérieure pour des substrats plus petits. En effet, l'activité aspartamidase présente dès le départ ne s'exprime qu'après 24 heures d'incubation. On peut de plus remarquer qu'au pH de 4,5, on se trouve loin de son activité optimum ce qui peut également expliquer sa faible activité.

On met également en évidence pour ce temps d'hydrolyse, un signal à $\delta = 5,100$ (Man 4 en position terminale). (Voir fig. 23 et tableau VIII.).

protons anomériques

protons H-2

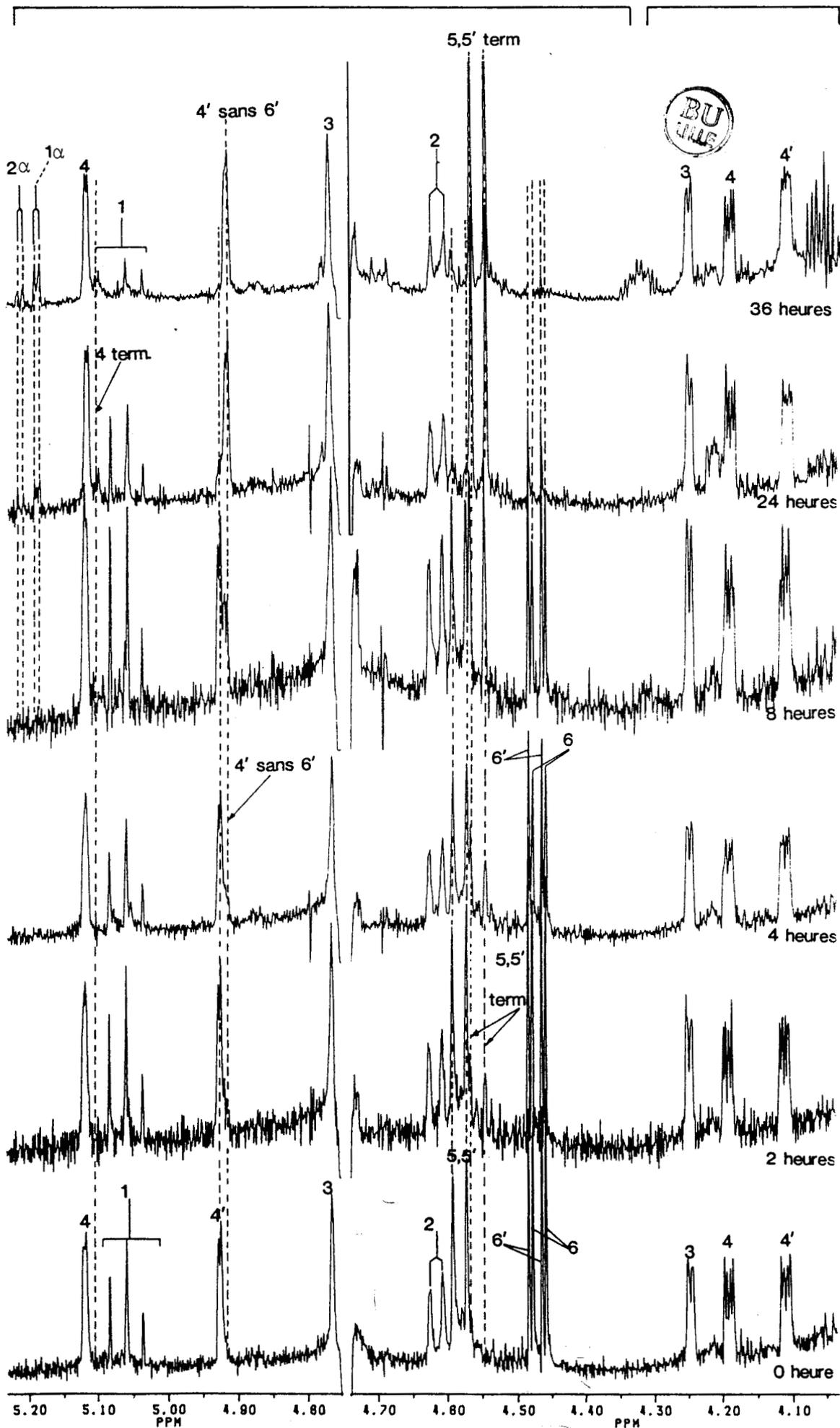


FIGURE 23 : Cinétique d'hydrolyse du glycopeptide GP-A.

5) A 36 heures d'hydrolyse

La dégalactosylation est dans ce cas totale (absence des signaux de $\delta= 4,466$ et $\delta= 4,472$).

On voit également apparaître un signal à $\delta= 5,211$ (GlcNAc α_2) témoignant de l'activité de l'endoglucosaminidase lysosomique.

Le signal à $\delta= 5,100$ (Man α_4 terminal) reste d'intensité faible prouvant le peu de Man α_4 en position terminale non réductrice. (voir fig. 23 et Tableau VIII.).

6) Conclusion

Comme dans le cas de l'OL-A, on met en évidence une action préférentielle des exoglycosidases sur l'antenne en (α_1-3) par rapport à l'antenne en (α_1-6) . La dégalactosylation pratiquement totale au bout de 24 heures est suivie de l'action de la β -hexosaminidase qui hydrolyse préférentiellement la GlcNAc α_5 portée par l'antenne (α_1-3) . Toutefois, l'action de l'hexosaminidase reste limitée sur ce type de substrat, aboutissant à la formation de faibles quantités de structures à Man α_4 externe.

D'autre part, l'aspartamidase agit tardivement sur le GP-A bien que présente dès le début de l'incubation. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'au pH de l'incubation, on se trouve loin du pH optimum de l'enzyme ou que cette dernière présente une affinité plus grande pour les substrats de petite taille (son meilleur substrat étant GlcNAc β_1 -N)Asn (14).

La relative lenteur du catabolisme peut comme dans le cas de l'OL-A s'expliquer par d'une part, une dénaturation des glycosidases par les protéases lysosomiques, et d'autre part

par une inhibition des enzymes par les monosaccharides produits, ceux-ci ne pouvant quitter le lysosome.

IV - DISCUSSION

L'étude du catabolisme in vitro permet de tirer plusieurs conclusions :

- les résultats obtenus confirment la structure des oligosaccharides et glycopeptides accumulés lors de glycoprotéinoses (141). En effet, il apparaît clairement au vu des spectres RMN que les exoglycosidases agissent plus rapidement sur l'antenne en $\alpha(1-3)$ que sur l'antenne en $\alpha(1-6)$. Cependant, la figure 24 montre que si le Gal 6 est hydrolysé plus rapidement que le Gal 6' (environ deux fois plus vite), la vitesse d'hydrolyse des résidus galactosyls est sensiblement la même pour les deux types de substrats (OL-A et GP-A).

Néanmoins, pour ce qui concerne l'action de la β hexosaminidase, nos travaux corroborent ceux de BEARPARK et al. (18). En effet, l'action de la β -N-acétylglucosaminidase est plus rapide sur le substrat oligosaccharidique OL-A que sur le substrat glycopeptidique GP-A. Ce fait est prouvé par la plus faible quantité de mannose 4 en position externe dans le cas du GP-A (quant au Man 4', il ne semble pas apparaître en position externe, aucun signal H-2 du Man 4' externe à $\delta < 4,000$ ppm n'est observable).

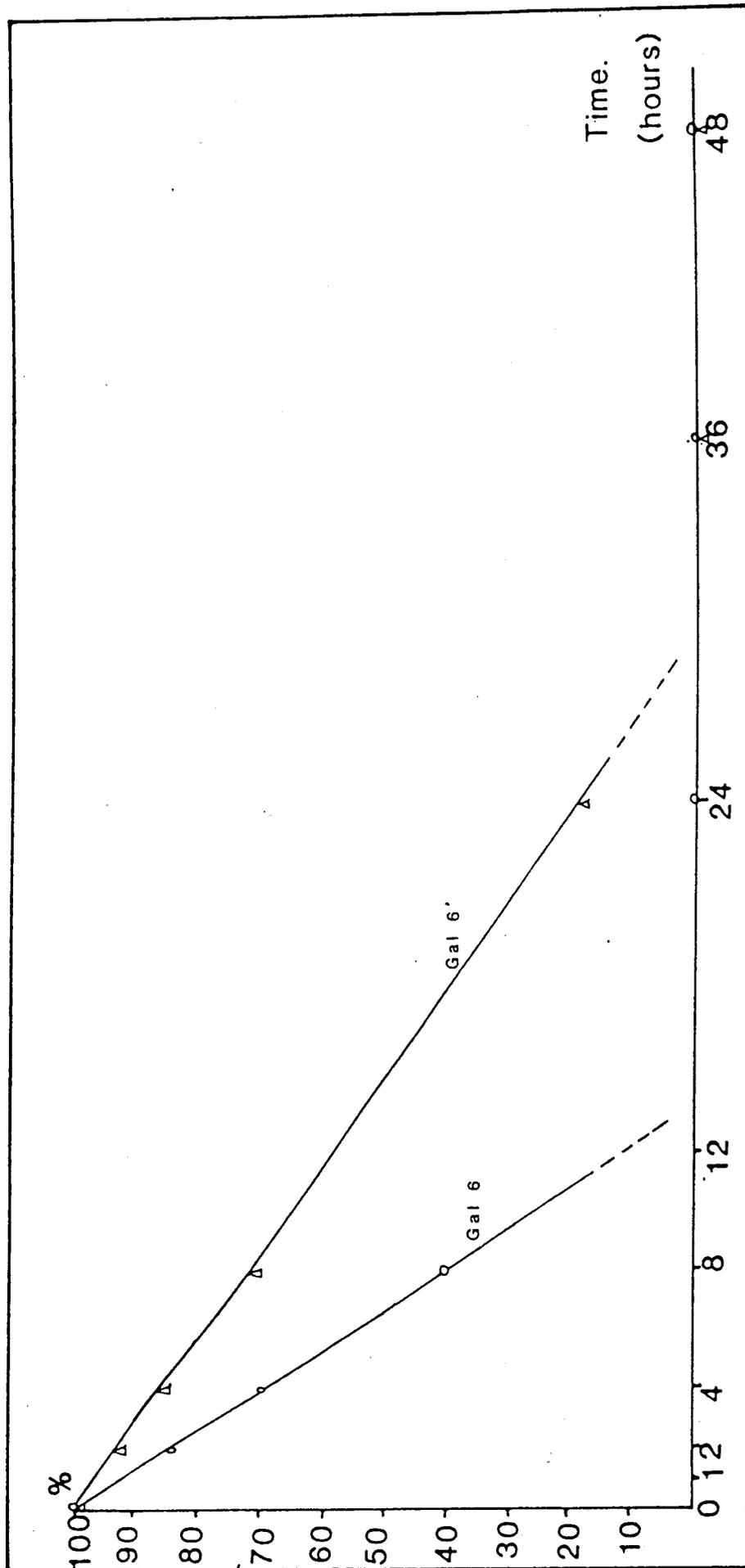


FIGURE 24 : Cinétique d'hydrolyse de GP-A et OL-A par la β -galactosidase. Les tracés indiquent le pourcentage de Gal-6 et de Gal-6' après différents temps d'hydrolyse.



- Le catabolisme, s'il s'effectue bien de façon bidirectionnelle comme l'a proposé ARONSON (8), ne semble pas débiter à l'extrémité terminale réductrice : la galactosidase agit avant l'aspartamidase qui pourrait avoir une affinité d'autant plus importante que les substrats sont de petite taille.

En résumé, la neuraminidase et la galactosidase semblent agir avec la même vitesse qu'il s'agisse de glycopeptides ou d'oligosaccharides. Par contre, la β -hexosaminidase est plus active sur des substrats de type oligosaccharidique. L'action du complexe aspartamidase-endoglucosaminidase qui semble être postérieure à l'hydrolyse par la neuraminidase et la galactosidase pourrait avoir pour rôle une modification conformationnelle du substrat et favoriser l'action ultérieure des hexosaminidases et notamment des mannosidases.

CONCLUSION GENERALE

Nos travaux sur le catabolisme des N-glycannes permettent de tirer plusieurs conclusions :

L'endo-N-Acétyl- β -D-glucosaminidase lysosomique est capable d'hydrolyser les sialyloligosaccharides présentant à l'extrémité terminale réductrice le motif N,N' diacétylchitobiose. Cette spécificité de l'enzyme permet d'expliquer l'origine des oligosaccharides à une seule GlcNAc terminale réductrice dans les urines de patients atteints de sialidose. En effet, l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase cytosolique (142) permettait d'expliquer l'excrétion urinaire des oligosaccharides à une seule GlcNAc terminale réductrice dans les cas de GM1 gangliosidose, maladie de Sandhoff, α -mannosidoses, mais pas dans les cas de sialidoses : l'enzyme étant inactif sur les sialylglycopeptides. La mise en évidence d'une activité sialylendoglucosaminidase lysosomique permet de postuler que le catabolisme des N-glycosylprotéines peut se faire entièrement dans le lysosome. Celui-ci contient en effet tout l'équipement en protéases et en glycosidases pour mener à bien une telle dégradation. Ces travaux sur l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase lysosomique confirment en ce qui concerne le point d'attache du glycanne avec la protéine les travaux de BAUSSANT (14), à savoir que l'endoglucosaminidase voit sa spécificité restreinte aux oligosaccharides présentant en position terminale réductrice le motif N,N'-diacétylchitobiose. Il faut donc impérativement que l'aspartamidase ait hydrolysé l'Asn pour que l'activité endoglucosaminidase puisse s'exprimer. Il est intéressant de remarquer à ce niveau, que le terme endoglucosaminidase n'est pas approprié car l'enzyme en fait hydrolyse une GlcNAc située en position terminale réductrice. Aussi, il semble que le terme chitobiase soit plus rigoureux : cette terminologie est d'ailleurs déjà employée par ARONSON (94,95)

L'étude du catabolisme in vitro des oligosaccharides et glycoasparagines présentée dans ce mémoire permettent de préciser certains aspects de la dégradation de ces structures. Ainsi, si

le catabolisme s'effectue bien de façon bidirectionnelle, comme l'a indiqué ARONSON (8), il n'est pas initié à l'extrémité terminale réductrice comme l'avait supposé BAUSSANT (14). Il apparaît que les exoglycosidases, ou tout au moins les α -neuraminidases et β -galactosidases agissent avant le système aspartamidase-endoglucosaminidase. Ces deux exoglycosidases hydrolysent d'ailleurs à la même vitesse un substrat oligosaccharidique ou glycopeptidique, démontrant ainsi que leur affinité pour le substrat est indépendante de la structure de l'extrémité terminale réductrice.

L'étude comparée du catabolisme d'un oligosaccharide et d'un glycopeptide homologue démontre que une fois ces structures dégalactosylées, la β -hexosaminidase hydrolyse plus rapidement les structures oligosaccharidiques que glycopeptidiques. Cette démonstration a été apportée grâce à l'emploi de la RMN. Il apparaît nettement que le taux de mannose $\underline{4}$ en position terminale est beaucoup plus important dans le cas de l'oligosaccharide que dans le cas du glycopeptide. (30% de Man $\underline{4}$ terminal dans le premier cas contre environ 10% dans le second) Ces résultats indiquent que l'affinité des hexosaminidases est dépendante de la structure de l'extrémité terminale réductrice. Ces conclusions avaient déjà été émises par BEARPARK *et al.* (18). Ces résultats permettent d'expliquer dans les tissus de patients atteints de fucosidose et d'aspartylglucosaminurie la présence de glycoasparagines peu dégradés, l'hexosaminidase voyant son action réduite du fait de la présence de l'Asn.

Pour ce qui concerne la dégradation des antennes par action des exoglycosidases, il apparaît dans les deux cas que le catabolisme aboutit à une dégradation plus rapide de l'antenne en $(\alpha 1-3)$ que de l'antenne en $(\alpha 1-6)$. (L'antenne en $(\alpha 1-3)$ d'un oligosaccharide est dégradée plus rapidement que l'antenne en $(\alpha 1-3)$ d'un glycoasparagine) Ceci indique que les exoglycosidases ont une affinité supérieure pour les monosaccharides de l'antenne $(\alpha 1-3)$ par rapport à ceux de l'antenne $(\alpha 1-6)$. Cette différence de vitesse d'hydrolyse peut s'expliquer par le fait que l'antenne $(\alpha 1-6)$ étant plus mobile (116), elle possède une flexibilité plus grande et peut en outre dans la conformation dite en aile brisée (MONTREUIL) (116) se replier et interagir avec les deux GlcNAc de l'extrémité réductrice. Ce phénomène est particulièrement sensible

En résumé, au vu de nos résultats, le catabolisme des N-glycannes apparaît comme un phénomène dynamique faisant appel à l'action conjointe des exoglycosidases et du système aspartamidase-chitobiase. Le rôle de ces deux dernières enzymes semble de favoriser l'action des exoglycosidases, et notamment celles de la β -hexosaminidase et des α -mannosidases. De plus, il semble que l'action de l'aspartamidase, donc de la chitobiase soit plus importante sur des structures ayant déjà subi l'action d'exoglycosidases. (α -neuraminidase, β -galactosidase, β -hexosaminidase) Le rôle biologique de ces enzymes hydrolysant l'extrémité terminale réductrice pourrait être essentiellement régulateur, surtout en ce qui concerne l'activité des α -mannosidases. A l'issue de nos travaux nous pouvons proposer le schéma de catabolisme des N-glycannes donné dans la Figure 25.

Ces travaux présentent un intérêt double. Tout d'abord, pour ce qui est de la compréhension du catabolisme des N-glycannes, mais aussi pour la préparation d'oligosaccharides à une ou deux GlcNAc terminales réductrices par action de l'aspartamidase et de la chitobiase. Ces oligosaccharides difficiles à préparer constituent en effet des substrats très recherchés.

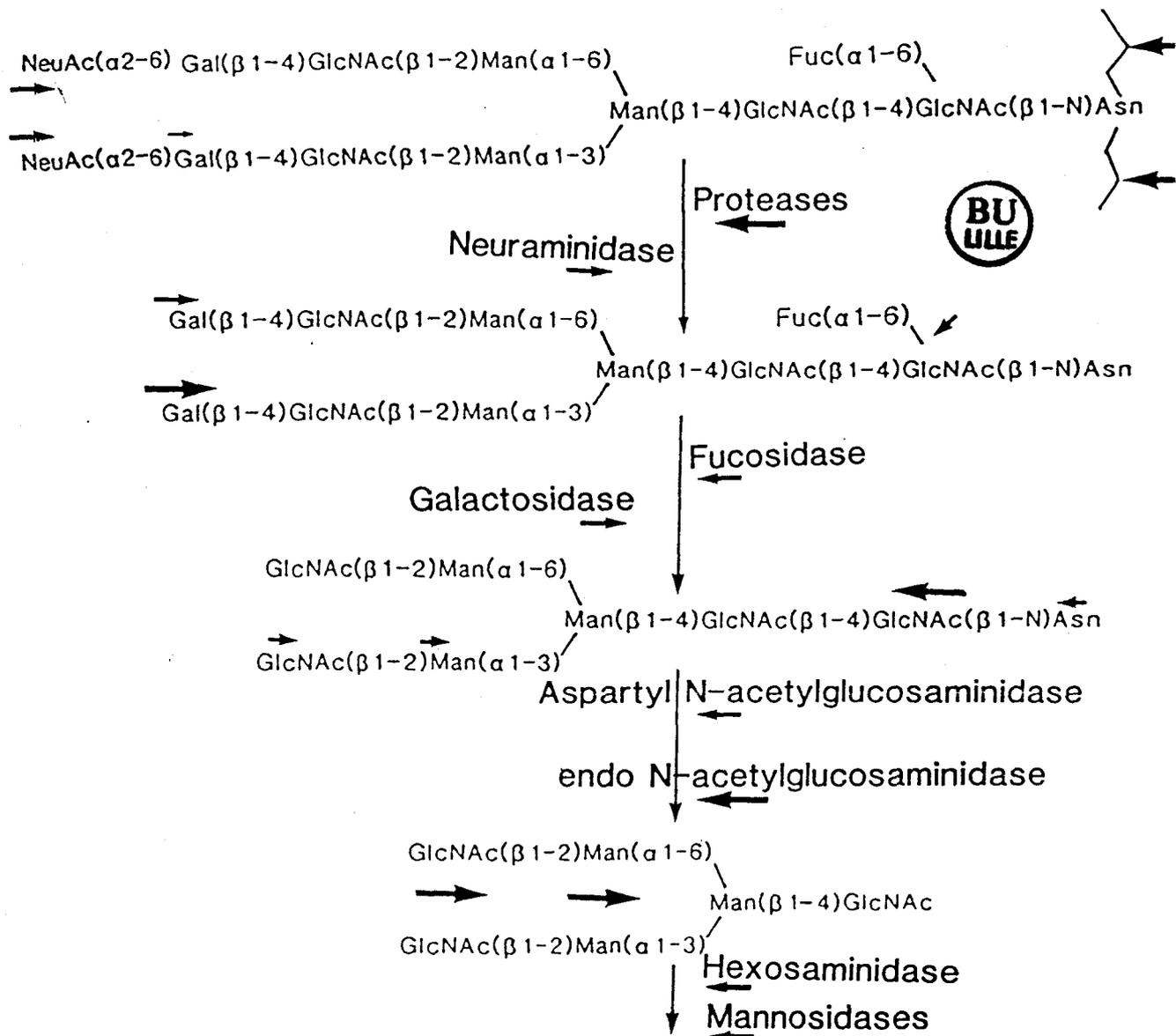


FIGURE 25 : Nouveau schéma de catabolisme des N-glycannes.

(La taille des flèches symbolise des vitesses d'hydrolyse plus ou moins importantes).

BIBLIOGRAPHIE

- (1) ABRAHAM, D.J., BLAKEMORE, W.F., JOLLY, R., SIDEBOTHAM, R., WINCHESTER, B.G., *Biochem. J.* (1983), **215**, 573
- (2) ABRAHAM, D.J., SIDEBOTHAM, R., WINCHESTER, B.G., DORLING, P.R., DELL, A., *FEBS Letters.* (1983), **163**, 110
- (3) ACHORD, D.T., BROTH, F.E., GONZALES-NORIEGA, A., SLY, W.S., STAHL, P., *Pediat. Res.* (1977), **11**, 816
- (4) AERTS, J.M.F.G., BRUL, S., DONKER-KOOPMAN, W.E., VAN-WEELY, S., MURRAY, J.G., BARRANGER, J.A., TAGER, J.M., SCHRAM, A.W., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1986), **141**, 452
- (5) ALDAHEFF, J.A., FREEZE, H., *Mol. Cell. Biochem.* (1977), **18**, 33
- (6) ANDERSON, R.G.W., GOLDSTEIN, M.S., BROWN, J.L., *Cell.* (1977), **10**, 351-364
- (7) APPOURCHAUX, P., Mémoire de DEA Lille (1983)
- (8) ARONSON, N.N., Abstracts of the IXth Symposium on Glycoconjugates. LILLE 6-11 juillet 1987
- (9) ASHWELL, G., MORELL, A.G., *Adv. Enzymol.* (1974), **41**, 99
- (10) BAENZIGER, J.V., FIETE, D., *Cell.* (1980), **22**, 611
- (11) BARRETT, A.J., HEATH, M.F., In "Lysosomes" a laboratory handbook. (1977), pp 19-145, J.T DINGLE eds, North Holland Pub Co
- (12) BARRIOCANAL, J.G., BONIFACIO, J.S., YUAN, L., SANDOVAL, I.V., *J. Biol. Chem.* (1986), **261**, 16755
- (13) BARTON, R.W., NEUFELD, E.F., *J. Biol. Chem.* (1971), **246**, 773
- (14) BAUSSANT, T., Thèse de 3ème cycle présentée le 12 décembre 1985 (LILLE)
- (15) BAUSSANT, T., MONTREUIL, J., STRECKER, G., MICHALSKI, J.C., Abstracts of the III rd European Symposium on Carbohydrates. (1985), **267**, (DEFAYE, J., Ed)
- (16) BAUSSANT, T., STRECKER, G., WIERUSZESKI, J.M., MONTREUIL, J., MICHALSKI, J.C., *Eur. J. Biochem.* (1986), **159**, 381
- (17) BAYARD, D., KERCKAERT, J.P., ROUX, D., STRECKER, G., In "Protides of Biological fluids" Pergamon Press. OXFORD
- (18) BEARPARK, T., BOUQUELET, S., FOURNET, B., MONTREUIL, J., SPIK, G., STIRLING, J., STRECKER, G., *FEBS Letters*, (1977), **84**, 379
- (19) BERGMAN, L.W., KUEHL, W.M., *Biochemistry.* (1978), **17**, 5174
- (20) BESTERMAN, J.M., LOW, R.B., *Biochem. J.* (1983), **210**, 1
- (21) BEYER, E.M., WIEDERSCHAIN, Y.A., *Prenatal Diagnosis.* (1984), **4**, 43
- (22) BIENKOWSKI, R.S., *Biochem. J.* (1983), **214**, 1

- (23) BODMER, J.L., In "Mononuclear phagocytes : Physiology and Pathology". (1985), (DEAN and JESSUP eds) pp 55-78
- (24) BOERSMA, A., LAMBLING, G., ROUSSEL, P., DEGAND, P., BISERTE, G., C. R. Acad. Sci. Paris. (1975), **281**, 1269
- (25) BURTON, R., ECK, C.D., LLOYD, J.B. Biochem. Soc. Trans. (1975), **3**, 1251
- (26) CACAN, R., HOFACK, B., VERBERT, A., Eur. J. Biochem. (1980), **106**, 473
- (27) CACHE, P., Thèse de 3ème cycle présentée à LILLE le 9 décembre 1986
- (28) CHEINGSON-POPOV, R., ROBINSON, P., ALTEVOGT, P., SCHIRMACHER, V., Int. J. Cancer. (1983), **32**, 359
- (29) CHU, F.K., MALLEY, F., Arch. Biochem. Biophys. (1982), **214**, 134
- (30) COFFEY, J.W., DE DUVE, C., J. Biol. Chem. (1968), **243**, 3255
- (31) COHN, Z.A., EHRENREICH, B.A., J. Exp. Med. (1969), **129**, 227
- (32) COHN, Z.A., EHRENREICH, B.A., J. Exp. Med (1969), **129**, 201-225
- (33) COLEGATE, S.M., DORLING, P.R., HUXTABLE, C.R., Aust. J. Chem. (1979), **32**, 2257
- (34) COOPER, A., SHARDARWALLA, I.B., ROBERTS, M.M., The New England Journal of Medicine. (1986), **315**, 1231
- (35) CORFIELD, A.P., MICHALSKI, J.C., SHAUER, R., Perspectives in inherited metabolic diseases. (1981), **4**, 3-70
- (36) CREEK, K.E., SLY, W.S., In "Lysosomes in Biology and Pathology ". (1984), (DINGLE, J.T.; DEAN, R.T., SLY, W., eds) p 63 - Elsevier science publishers.B.V.
- (37) DEAN, R.T.; Biochem. Soc. Trans. (1984), **12**, 911-913
- (38) DE DUVE, C., PRESSMAN, B.C., GIANETO, R., WATTIAUX, R., APPELMANS, F., Biochem. J. (1955), **60**, 604
- (39) DISTLER, J., JOURDIAN, G.W., Fed. Proc. (1985), **44**, 1435
- (40) DINGLE, J.T., In "Lysosomes". (1977), North-Holland Publischin Co. N.Y.
- (41) DORLAND, L., HAVERKAMP, J., VLIAGENTHART, J.F.G., STRECKER, G., MICHALSKI, J.C., FOURNET, B., SPIK, G., MONTREUIL, J., Eur. J. Biochem. (1978), **87**, 323
- (42) DORLING, P.R., In "Lysosomes in Biology and Pathology". (1984), (DINGLE, J.T., DEAN, R.T., SLY, W.,eds) Elsevier Sciences Publisher. Co.B.V.
- (43) DORLING, P.R., HUXTABLE, C.R., COLEGATE, S.M., Biochem. J. (1980) **191**, 649
- (44) DUGAL, B., Biochem. J. (1977), **163**, 9
- (45) EL BATTARI, A., APPOURCHEAU, P., MONTREUIL, J., SPIK, G., Proc VII th. Intern.Symp.on.Glycoconj. (1983), LUND.SWEDEN

- (46) ERICKSON, A.H., CONNER, G.E., BLOBEL, G., In "Molecular Basis of Lysosomal Storage Disorders". (1984) (BARRANGER, J.O., and BRADY, R.O., eds) p235-249. Academic Press
- (47) ERICSSON, J.L.E., In "Lysosomes in Biology and Pathology". (1969), (DINGLE, J.J., and FELL, M.B. eds) Vol 2, 345-394, Nord-Holland Pub Amsterdam
- (48) FELL, H.B., DINGLE, J.T., Biochem. J. (1966), 98, 40
- (49) FINLEY, D., WARSHAVSKY, A., Trends in Biochem.Sci. (1985), 343
- (50) FISHER, H.D., GONZALES-NORIEGA, A., SLY, W.S., MORRE, D.J., J. Biol. Chem. (1980), 255, 9608
- (51) FOURNET, B., MONTREUIL, J., STRECKER, G., DORLAND, C., HAVERKAMP, J., Vliegenthart, J.F.G., BINETTE, J.P., SCHMID, K., Biochemistry (1978), 17, 5206
- (52) FRANCOIS-GERARD, C.H., BROCTEUR, J., ANDRE, A., GERDAY, C., PIERCE-CRETEL, A., MONTREUIL, J., SPIK, G., Blood Transfusion and Immunohaematology (1980), 23, 579
- (53) FREEZE, H., GEIGER, B., MILLER, A.L., Biochem. J. (1979), 177, 749
- (54) FURBISH, F.S., KRETT, N.L., BARRANGER, J.A., BRADY, R.O., Biochem. Biophys. Res. Commun. (1980), 95, 1768
- (55) GLAUMANN, H., ERICSSON, J.L.E, MARZELLA, L., Int. Rev. Cyt. (1981), 73, 149-182
- (56) GOLDBERG, D., GABEL, C., KORNFELD, S., In "Lysosomes In Biology and Pathology". (1984), (DINGLE, J.T., DEAN, R.T., SLY, W., eds) p 45, Elsevier Publishers
- (57) GOLDBERG, A.L., ST JOHN, A.C., Annu. Rev. Biochem. (1976), 45, 747
- (58) GOLDMAN, J., In "Lysosomes In Biology and Pathology". (1976), (DINGLE, J.T., DEAN, R.T., SLY, W., eds), 309-336, Elsevier
- (59) GOLDMAN, R., ROTTENBERG, H., FEBS. Letters. (1973); 33, 233-238
- (60) GOLDSTEIN, J.L., ANDERSON, R.G.W., BROWN, M.S., Nature (1979), 279, 679
- (61) GOLDSTONE, A., KOENIG, H., Biochem. J. (1973), 132, 267
- (62) GREGORIADIS, G., MORELL, A.G., STERNLIEB, I., SHCEINBERG, I.H., J. Biol. Chem. (1970), 245, 5833
- (63) GRINDE, B., Biochem. J. (1983), 216, 529
- (64) GRINDE, B., Experienta (1985), 41, 1089-1095
- (65) HAMMER, J.A., RANNELS, D.E., Biochem. J. (1981), 198, 53
- (66) HARFORD, J., ASHWELL, G., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1981), 78, 1557
- (67) HARFORD, J., ASHWELL, G., In "The glycoconjugates". (1982), Vol IV, pp 27-52 (HOROWITZ, M.I., Ed) Academic Press
- (68) HASILIK, A., KLEIN, V., WAHEED, A., STRECKER, G., VON-FIGURA, G., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1980), 77, 704

- (69) HASILIK, A., NEUFELD, E.F., J. Biol. Chem. (1980), **255**, 4937
- (70) HASILIK, A., WAHEED, A., VON-FIGURA, K., Biochem. Biophys. Res. Commun. (1981), **98**, 761
- (71) HELENIUS, A., MELLMAN, I., WALL, D., HUBBARD, A., Trends. Biochem.Sci. (1983), **8**, 245
- (72) HERS, H.G., Gastroenterology. (1965), **48**, 625
- (73) HERSCHKO, A., CIECHANOVER, A., Ann. Rev. Biochem. (1982), **51**, 331
- (74) HICKMAN, S., NEUFELD, E.F., Biochem. Biophys. Res. Commun. (1972), **49**, 992
- (75) HICKMAN, S., SHAPIRO, L.J., NEUFELD, E.F., Biochem. Biophys. Res. Commun. (1974), **57**, 55
- (76) HIEBER, V., DISTLER, J., MYEROWITH, R., SHMICKEL, R.D., JOURDIAN, G.W., Biochem. Biophys. Res. Commun. (1976), **73**, 710
- (77) HILKENS, J., TAGER, J.M., BUIJS, F., BROUWER-KELDER, B., VAN-THIENEN, G.M., TEGELAERTS, F.P.W., HILGERD, J., Biochim. Biophys. Acta. (1981), **678**, 7
- (78) HOF LACK, B., KORNFELD, S., J. Biol. Chem. (1985), **260**, 12008
- (79) HOF LACK, B., KORNFELD, S., J. Biol. Chem. (1987), **262**, 123
- (80) HOF LACK, B., KORNFELD, S., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1985), **82**, 4428
- (81) HOLLEMANS, M., ELFERINK, R.O., DE-GROOT, P.G., STRIJLAND, A., TAGER, J.M., Biochim. Biophys. Acta. (1981), **643**, 140-151
- (82) HUDGIN, R.L., PRICER, W.E., ASHWELL, G., STOCKER, R.J., MORELL, A.G., J. Biol. Chem. (1974), **249**, 5536
- (83) JOZIASSE, D.H., VAN DER EIJDEN, D.H., LISMAN, J.J.W., HOOGHWINKEL, G.J.M., Biochim. Biophys. Acta (1981), **660**, 174
- (84) KAMRATH, F.J., DODT, G., DEBUCH, H., UHLENBRUCK, G., Hoppe-Seylers'Z. Physiol. Chem. (1984), **365**, 539-547
- (85) KAPLAN, A., ACHORD, D.T., SLY, W.S., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1977), **74**, 2026
- (86) KAWASAKI, T., ETOH, R., YAMASHINA, I., Biochem. Biophys. Res. Commun. (1978), **81**, 1018
- (87) KAWASAKI, T., MORI, K., OKA, S., KAWASAKI, N., KOZUTSUMI, Y., YAMASHINA, I., In "Vertebrate lectins". (1987) p 92. (OLDEN, K., and PARENT, J.B., eds) Van Nostrand Reinhold Company
- (88) KIELY, M., McKNIGHT, G.S., SCHIMKE, R., J. Biol. Chem. (1976), **251**, 5490
- (89) KOLB-BACHOFEN, Y., Biochim. Biophys. Acta. (1981), **645**, 293
- (90) KOLODNY, E.H., CABLE, W.J.L., Ann. Neurol. (1982), **11**, 221

- (114) MICHALSKI, J.C., Thèse de DOCTORAT D'ETAT (1984), LILLE
- (115) MICHALSKI, J.C., CORFIELD, A.P., SCHAUER, R., Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. (1982), **363**, 1097
- (116) MONTREUIL, J., Pure & Appl. Chem. (1984), **56**, 859
- (117) MONTREUIL, J., Compt. Rend. Soc. Biol. (1981), **175**, 694
- (118) MONTREUIL, J., Pure Appl. Chem. (1975), **42**, 431
- (119) MONTREUIL, J., In "Comprehensive Biochemistry" (1982), (NEUBERGER, A., VANDEENEN, L.L.M., eds) Elsevier Pub. Co. Amsterdam
- (120) MORELL, A.G., IRVINE, R.A., STERNLIEB, I., SCHEINBERG, I.H., ASHWELL, G., J. Biol. Chem (1968), **243**, 155
- (121) MORTIMORE, G.E., HUTSON, N.J., SURMACZ, C.A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1983), 2179-2183
- (122) MULLER, W.A., STEINMAN, R.M., COHN, Z.A., J. Cell. Biol. (1980), **86**, 304
- (123) MURAKAMI, M., EYLAR, E.H., J. Biol. Chem. (1965), **240**, 556
- (124) NATOWICZ, M.R., CHI, M.M.Y., LOWRY, O.H., SLY, W.S., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1979), **76**, 4322
- (125) NEUFELD, E.F., CANTZ, M.J., Ann. N.Y. Acad. Sci. (1971), **179**, 580
- (126) NISHIGAKI, M., MURAMATSU, T., KOBATA, A., Biochem. Biophys. Res. Commun. (1974), **59**, 638
- (127) NOVIKOFF, A.B., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1986), **75**, 3327
- (128) NOVIKOFF, P.M., NOVIKOFF, A.B., QUINTANA, N., HAUW, J.J., J. Cell. Biol. (1971), **50**, 859
- (129) OHKUMA, S., MORIYAMA, Y., TAKANO, T., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1982), **79**, 2758-2762
- (130) OHGUSHI, T., YAMASHINA, I., Biochim. Biophys. Acta. (1968), **156**, 417
- (131) OHKUMA, S., POOLE, B., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1978), **79**, 2758
- (132) OLDEN, K., PARENT, J.B., WHITG, S.L., Biochem. Biophys. Acta. (1982), **650**, 209
- (133) OPHEIM, D.J., TOUSTER, O., J. Biol. Chem. (1977), **252**, 739
- (134) OVERDIJK, B., VAN DER KROEFF, W.H., LISMAN, J.J.W., PIERCE, R.J., MONTREUIL, J., SPIK, G., FEBS Letters. (1981), **128**, 364
- (135) OVERDIJK, B., VANSTEIN, G., WOLF, J.H., LISMAN, J.J.W., Int. J. Biochem. (1982), **14**, 25
- (136) PALADE, G.E., Science, (1975), **189**, 347
- (137) PASTAN, I., WILLINGHAM, M.C., In "Endocytosis". (1985), PASTAN and WILLINGHAM Eds pp 1-43. Plenum Publishing Corporation

- (138) PATTERSON, D.F., HASKINS, M.E., JESYK, P.F., In "Advances in human genetics". (1982), (HARRIS and HIRSCHHORN eds), **12**, 263, Plenum Pub.Co
- (139) PEARSE, B.M.F., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1976), **73**, 1255
- (140) PETERSON, G.L., Anal. Biochem. (1977), **83**, 346
- (141) PIERCE, R.J., SPIK, G., MONTREUIL, J., Biochem.J. (1979), **180**, 673
- (142) PIERCE, R.J., SPIK, G., MONTREUIL, J., Biochem.J. (1980), **185**, 261
- (143) PILATTE, Y., Thèse de Doctorat de L'Université de PARIS-VAL de MARNE, présentée à CRETEIL le 26 Juin 1987
- (144) PINO, R.M., PINO, L.C., BANKSTON, P.W., J.Histochem Cytochem. (1981), **29**, 1061
- (145) PISONI, R.L., FLICKINGER, K.S., THOENE, J.G., CHRISTENSEN, H.N., Fed. Proc. (1986), **45**, 1759
- (146) PISONI, R.L., THOENE, J.G., FLICKINGER, H.N., J. Biol. Chem. (1985), **260**, 4791-4798
- (147) PLUCINSKY, M.C., PROROK, J.J., ALHADEFF, J.A., Cancer. (1986), **58**, 1484
- (148) PLUMMER, J.R., TARENTINO, A., MALEY, F., J. Biol. Chem. (1968), **243**, 5158
- (149) POHLMAN, R., WAHEED, A., HASILIK, A., VON FIGURA, K., J. Biol. Chem. (1982), **257**, 5323
- (150) POLLITT, R.J., JENNER, F.A., Clin. Chim. Acta. (1969), **45**, 413
- (151) PONTREMOLI, S., MELLONI, E., HORECKER, B.L., In "Lysosomes in Biology and Pathology". (1984). (DINGLE, J.T., DEAN, R.T., SLY, W., Eds). p 141. Elsevier Science Publishers
- (152) PRIEELS, J.P., PIZO, S.V., GLASGOW, L., PAULSON, J.C., HILL, R.L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1978), **75**, 2215
- (153) PRUSCH, R.D., Sciences. (1981), 213, 668
- (154) REARIK, J.I., CHAPMAN, A., KORNFELD, S., J. Biol. Chem. (1981), **256**, 6255
- (155) REEVES, J.P., In "Lysosomes in Biology and Pathology". (1984) (DINGLE, J.T., DEAN, R.T., SLY, W.S., eds) Elsevier Sciences Pub
- (156) REEVES, J.P., In "Lysosomes in Biology and Pathology". (1984) (DINGLE, J.T., DEAN, R.T., SLY, W.S., eds), 175-200, Elsevier Sciences Pub
- (157) REIJNGOUD, D.J., TAGER, J.M., Biochim. Biophys. Acta. (1977), **472**, 419
- (158) REIJNGOUD, D.J., TAGER, J.M., Biochim. Biophys. Acta. (1973), **297**, 174
- (159) REITMAN, M., KORNFELD, S., J. Biol. Chem. (1981), **256**, 4275
- (160) RENLUND, M., TIETZE, F., GAHL, W.A., Science. (1986), **232**, 759
- (161) RENLUND, M., KONAVEN, P.T., RAIVIO, K.O., AULA, P., GAHMBERG, C.G., EHNHOLM, C., J. Clin. Invest. (1986), **77**, 568

- (162) ROBINSON, D., *Enzyme*. (1974), **18**, 114
- (163) ROME, L.H., HIL, D.F., *Biochem. J.* (1986), **235**, 707-713
- (164) ROSENFELD, M.G., KREIBICH, G., POPOV, D., KATO, K., SABATINI, D.D., *J. Cell. Biol.* (1982), **92**, 135
- (165) ROTHMAN, J.E., KATZ, F.N., LODISH, M.F., *Cell*. (1978), **15**, 1447
- (166) SAHAGIAN, G.G., DISTLER, J., JOURDIAN, J.W., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1981), **78**, 4289
- (167) SARKAR, M., LIAO, J., KABAT, E.A., TANABE, T., ASHWELL, G., *J. Biol. Chem.* (1979), **254**, 3170
- (168) SAKAI, M., OGAWA, K., *Histochemistry*. (1982), **76**, 479
- (169) SHACHTER, H., ROSEMAN, S., In "The biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans". (LENNARZ, W.J., eds). Plenum Press N-Y, (1980), 85-160
- (170) SCHLEISINGER, P.H., ROTMAN, J.S., FREY, M., LANG, S., STAHL, P., *Arch. Biochem. Biophys.* (1976), **177**, 606
- (171) SCHLOSSMAN, D.M., SCHMID, S., BRAEL, W., ROTHMAN, J.E., *J. Cell. Biol.* (1984), **99**, 723
- (172) SCHMID, K., BINETTE, J.B., DORLAND, L., Vliegenthart, J.F.G., FOURNET, B., MONTREUIL, J., *Biochim. Biophys. Acta.* (1979), **581**, 356
- (173) SCHNEIDER, J.A., JONAS, A.J., SMITH, M.L., GREEN, A.A., *Biochem. Soc. Trans.* (1984), **12**, 908-910
- (174) SCHNEIDER, Y.J., TULKENS, P., DE DUVE, C., TROUET, A., *J. Cell. Biol.* (1979), **82**, 466-474
- (175) SCHRAM, A.W., TAGER, J.M., *Trends in Biochem. Sci.* (1981), **6**, 328
- (176) SCHWEIGER, H.G., RAPAPORT S., SCHOLTZEL, E., *Nature*. (1956), **178**, 141
- (177) SPIK, G., BAYARD, B., FOURNET, B., STRECKER, G., BOUQUELET, S., MONTREUIL, J., *FEBS Letters* (1974), **50**, 269
- (178) SPIK, G., In "les oligosaccharidoses". (1977). (FARRIAUX, J.P., ed), 31-41, Crouan et Roques Ed
- (179) SPIK, G., STRECKER, G., FOURNET, B., BOUQUELET, S., MONTREUIL, J., DORLAND, L., VAN HAALBECK, H., VIEGENTHART, J.F.G., *Eur. J. Biochem.* (1982), **121**, 413
- (180) STAHL, P., SCHWART, A.L., *J. Clin. Invest.* (1986), **77**, 657
- (181) STAHL, P.D., WILEMAN, T.E., SHEPERD, V.L., In "Molecular Basis of Storage Disorders". (1984). (BARRANGER, J.A., and BRADY, R.O., eds) p 209, Academic Press Ed
- (182) STEINER, A.W., ROME, L.H., *Arch. Biochem. Biophys.* (1982), **241**, 681
- (183) STEINMAN, R.M., BRODIE, S.E., COHN, Z.A., *J. Cell. Biol.* (1976), **68**, 665

- (184) STIRLING, J.L., FEBS Letters. (1974), **39**, 171
- (185) STIRLING, J.L., Biochem. J. (1974), **141**, 597
- (186) STOCKERT, R.J., KRESSNER, M.S., COLLINS, J.C., STERNLIEB, I., MORELL, A.G., Proc. Natl. Acad. Sci. USA.(1982), **79**, 6229
- (187) STOSSEL, T.P., J. Reticuloendothel. Soc. (1976), **19**, 237-245
- (188) STRECKER, G., FOURNET, B., HONDI-ASSAH, T., SPIK, G., MONTREUIL, J., MAROTEAUX, P., DURAND, P., FARRIAUX, J.P., Biophys. Biochim. Acta. (1976), **444**, 349
- (189) STRECKER, G., MICHALSKI, J.C., MONTREUIL, J., FARRIAUX, J.P., Biomedicine. (1976), **25**, 238
- (190) STRECKER, G., MONTREUIL, J., Biochimie. (1979), **61**, 1199
- (191) STRECKER, G., PEERS, M.C., MICHALSKI, J.C., HONDI-ASSAH, T., FOURNET, B., SPIK, G., MONTREUIL, J., FARRIAUX, J.P., MAROTEAUX, P., DURAND, P., Eur. J. Biochem. (1977), **75**, 391
- (192) STRECKER, G., POITEAU, A., J. Chromatog. Biomed. Applic. (1977), **143**, 553
- (193) SWALLOW, D.M., STOKES, D.C., GORNEZ, G., HARRIS, H., Ann. Hum. Genet. (1974), **37**, 287
- (194) TACHIBANA, Y., YAMASHITA, K., KOBATA, A., Arch. Biochem. Biophys. (1982), **214**, 199
- (195) TANABE, T., PRICER, W.E., ASHWELL, G., J. Biol. Chem. (1979), **254**, 1038
- (196) TASHIRO, Y., TREVITHICK, J.R., Can. J. Biochem. (1977), **55**, 249
- (197) TOMINO, S., PAIGEN, K., TULSIANI, D.R.P., TOUSTER, O., J. Biol. Chem. (1975), **250**, 8503
- (198) TROOST, J., VAN DER EIJDEN, M.C.M., STAAL, G.E.J., Clin. Chim. Acta (1976), **73**, 329
- (199) TULSIANI, D.R.P., SIX, H., TOUSTER, O., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1978), **75**, 3080
- (200) TULSIANI, D.R.P., TOUSTER, O., J. Biol. Chem. (1975), **250**, 4770
- (201) TYCKO, B., MAXFIELD, F.R., Cell. (1982), **28**, 643
- (202) VANDIGGELEN, O.P., SCHRAM, A.W., SINNOTT, M.L., SMITH, P., ROBINSON, D., GALJAARD, H., Biochem. J. (1981), **200**, 143
- (203) VARKI, A., KORNFELD, S., J. Biol. Chem. (1980), **255**, 10847
- (204) VARKI, A., KORNFELD, S., J. Biol. Chem. (1983), **258**, 2808
- (205) VAUX, D., GORDON, S., In "Mononuclear Phagocytes : Physiology and Pathology". (1985).(DEAN, and JESSUP Eds) pp 5-25, Elsevier

- (206) VLIAGENTHART, J.F.G., DORLAND, L., VAN HAALBECK, H., Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. (1983), **41**, 209
- (207) WALL, D.A., WILSON, G., HUBBARD, A.L., Cell. (1980), **21**, 79
- (208) WEIGEL, P.H., J. Cell. Biol. (1980), **87**, 855
- (209) WEIGEL, P.H., In "Vertebrate lectins". (1987). p 68 (OLDEN, K., and PARENT, J.B., eds) Van Nostrand Reinhold Company
- (210) WENGER, D.A., SUJANSKY, M.D., FENESSY, P.V., THOMSON, J.N., The New-England Journal of Medicine. (1986), **315**, 1201
- (211) WILKINSON, K.D., AUDHYA, T.K., J. Biol. Chem. (1981), **256**, 9235
- (212) WINCHESTER, B., Trends in Biochem.Sci. (1982), **7**, 71
- (213) YAMASHINA, I., In "Glycoproteins". (1972). (GOTTSCHALK ed) Elsevier Pub Co
- (214) ZIEGLER, M., BACH, G., Biochem. J. (1981), **198**, 505

- (91) KOOISTRA, T., SCHULMAN, J.D., LLOYD, J.B., In "Lysosomes in Biology and Pathology". (1984), (DINGLE, J.T., DEAN, R.T., SLY, W.S., Eds) 443-467. Elsevier
- (92) KRAG, S., ROBBINS, A.R., J. Biol. Chem. (1982), **257**, 8424
- (93) KRESS, B.C., FREEZE, H.H., HERD, J.K., ALDAHEFF, J.A., MILLER, A.L., J. Biol. Chem. (1980), **255**, 955
- (94) KURANDA, M.J., ARONSON, N.N., Proceedings of the VIII International Symposium on the glycoconjugates (1985)
- (95) KURANDA, M.J., ARONSON, N.N., J. Biol. Chem. (1986), **261**, 5803
- (96) LEGER, D., TORDERA, V., SPIK, G., DORLAND, L., HAVERKAMP, J., Vliegenthart, J.F.G., FEBS Letters. (1978), **89**, 149
- (97) LI, Y.T., DE-GASPERI, R., TOWNSEND, R.R., COUSINS, J.C., LEE, Y.C., LI, S.C., Proc. VII th Intern. Symp. Glycoconj. (1985), HOUSTON-USA
- (98) LISMAN, J.J.W., VAN DER WALL, C.J., OVERDIJK, B., Proc VII th Inter. Symp.on Glycoconj. (1983), LUND-SWEDEN
- (99) LISMAN, J.J.W., VAN DER WALL, C.J., OVERDIJK, B., Biochem. J. (1985), **229**, 379
- (100) LOWRY, O.H., ROSEBROUCH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J., J. Biol. Chem. (1951), **193**, 265
- (101) LLOYD, J.B., FORSTER, S., Trends.Biochem.Sci. (1986), **11**, 365
- (102) MAC GOVERN, M.M., AULA, P., DESNIK, R.J., J. Biol. Chem. (1983), **258**, 10743
- (103) MAHADEVAN, S., DILLARD, C.J., TAPPEL, A.L., Arch. Biochem. Biophys. (1969), **129**, 525
- (104) MAHADEVAN, S., TAPPEL, A.L., J. Biol. Chem. (1967), **242**, 4568
- (105) MAKINO, M., TOJIMA, T., OHGUSHI, T., YAMASHINA, I., J. Biochem. (1968), **63**, 186
- (106) MAKINO, M., TOJIMA, T., YAMASCHIMA, Y., Biochem. Biophys. Res. Commun. (1966), **24**, 961
- (107) MARZELLA, L., GLAUMANN, H., Int. Rev. Exp. Path. (1983), **25**, 239
- (108) MATSUURA, F., JONES, M.Z., FRAZIER, S.E., Biochim. Biophys. Acta. (1983), **759**, 67
- (109) MATSUURA, F., LAINE, R.A., JONES, M.Z., Arch. Biochem. Biophys. (1981), **211**, 485
- (110) MAXFIELD, F.R., In "Endocytosis" (1985) (PASTAN & WILLINGHAM Eds) . Plenum Publishing Co
- (111) MAYER, R.J., GASKELL, M.J., EARL, R., BILLETT, E.E., MANGIAPANE, H.E., FERNIG, D., DOHERTY, F.J., Biomed. Biochim. Acta. (1986), **11**, 1591
- (112) MAYER, R.J., DOHERTY, F., FEBS Letters. (1986), **198-2**, 181-193
- (113) MEGO, J.L., In "Lysosomes in Biology and Pathology. (1973) Vol 3, (DINGLE, J.T., Ed) 138-168, North Holland

