

50376  
1990  
127

69571

50376  
1990  
127

N° d'ordre : 485

# THÈSE

présentée à

l'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

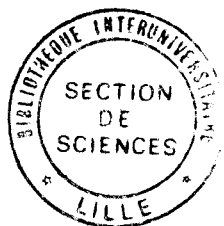
pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR EN BIOCHIMIE**

**Spécialité Sciences de la Vie et de la Santé**

par

Anne LEPERS



## **ETUDE DU TRANSPORT MEMBRANAIRE DES DONNEURS D'ACIDES SIALIQUES AUX SITES DE GLYCOSYLATION**

Présentée le 25 Janvier 1990 devant la Commission d'Examen

Président et Rapporteur :

Rapporteurs :

Examineurs :

Professeur J. MONTREUIL

Professeur R. GOT

Professeur J. ROTH

Professeur R. SCHAUER

Professeur A. VERBERT

Ce travail a été effectué dans le laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille I (U.M.R. n°111, directeur Professeur J. Montreuil) : Relation structure-fonction des constituants membranaires, sous la direction de Monsieur le Professeur A. Verbert.

Il a bénéficié d'une aide du Ministère de la Recherche et de la Technologie ainsi que d'une bourse Erasmus de la Commission Européenne.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Monsieur le Professeur J. Montreuil qui m'a accordé sa confiance en m'accueillant en 1986 dans son laboratoire.

*A ma Famille*

*A Pascal*

Cette thèse est le fruit d'un travail d'équipe et je tiens à exprimer mes très sincères remerciements à :

André et René

Sans vous, cette thèse n'existerait pas. Elle est le résultat d'un travail qui a suscité de multiples soucis mais surtout de nombreuses joies, toujours partagés.

André, vous m'avez guidé tout au long de ce travail en me faisant bénéficier de votre expérience scientifique et de votre bienveillance en toutes circonstances. C'était un challenge, dirais-je un entêtement? Mais vous m'avez accordé toute votre confiance et je veux aujourd'hui vous en remercier très sincèrement.

René, vous avez su me faire partager votre goût et votre profond enthousiasme pour la recherche. Votre intérêt constant pour ce travail, vos conseils avisés et vos discussions fructueuses m'ont été infiniment précieuses. "C'est un des buts de ce laboratoire" me direz-vous. Je garderai le plus vif souvenir de vos encouragements et de votre bonne humeur permanente. Pour tout cela et du fond du coeur, merci.

à Monsieur le Professeur J. Montreuil :

Je trouve ici l'occasion de vous remercier très vivement pour l'aide et la confiance que vous m'avez accordées en m'accueillant, il y a quatre ans dans votre laboratoire et tout au long de l'élaboration de ce travail.

Consciente de l'énorme tâche et des lourdes responsabilités scientifiques qui sont les vôtres, permettez-moi de vous dire combien je suis fière et reconnaissante de l'honneur que vous me faites de présider aujourd'hui cette thèse.

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

à Monsieur le Professeur R. Got

Vous avez accepté de me faire profiter de votre haute compétence scientifique dans le domaine des glycoconjugués en jugeant ce travail. Je suis très honorée de votre présence parmi les membres du Jury en tant que rapporteur et vous en remercie vivement.

Herrn Professor R. Schauer

Part of this work is the result of a close collaboration with your group. You have been extremely kind to wellcome me at your laboratory in Kiel for six weeks, and I really took great advantages of the knowledges you have on sialic acid metabolism. I take this opportunity to express my deep gratitude for your advices and the kindness you showed me. I would like also to associate to my acknowledgements your coworkers and especially Lee Shaw for his help and kindness during my stay in Kiel

à Monsieur le Professeur J. Roth

Vous me faites l'honneur de bien vouloir juger cette thèse et vous en remercie sincèrement. Votre haute compétence dans le domaine de la microscopie électronique et votre connaissance de l'organisation subcellulaire de la glycosylation dans les cellules de mammifères me font solliciter votre indulgence pour juger ce travail.

Enfin, j'adresse tous mes remerciements les plus sincères à tous ceux qui de près ou de loin, par leur conseils, leur expérience, leur collaboration m'ont aidé à réaliser cette étude.

Aux membres "anciens" de l'équipe

Bernard Hoflack, qui m'a fait profiter de son expérience et de ces conseils éclairés.

Roméo Cecchelli, pour toutes les découvertes que j'ai faites.... sans lui mais en poursuivant son oeuvre et en tenant le plus grand compte de ces critiques constructives.

et les membres "présents" :

Myriam Coniez, pour avoir soigné "amoureusement" nos cellules tout au long de ces trois années

Michel Bélard, pour ses enseignements si minutieux et son amitié cordiale

Odette Labiau, un grand merci pour les multiples services rendus avec tant de gentillesse.

Madame Celen, pour la concrétisation matérielle de ce manuscrit

Joel Mazurier, Hervé PrévotEAU, Mesdames Dondeyne et Moerman qui à des titres divers m'ont accordé leur aide et leur amitié.

Nous remercions également vivement

Pamela Stanley (Albert Einstein College of medicine of Yeshiva University 1300 Morris Park Avenue, Bronx, N.Y. 10461) qui nous a fourni les deux lignées cellulaires CHO Pro<sup>-5</sup> et les Lec2

Eliane Porchet-Henneré et son équipe (laboratoire de chimie des invertébrés 59655 Villeneuve d'Ascq) qui ont effectué les différents contrôles en microscopie électronique.

## ABREVIATIONS

ADP : Adénosine diphosphate  
AMP : Adénosine monophosphate  
Asn : L-Asparagine  
ATP : Adénosine triphosphate  
CDP : Cytidine diphosphate  
CHO : Chinese Hamster Ovary  
CMP : Cytidine monophosphate  
CMP-Neu5Ac : Cytidine monophosphate acide N-acétylneuraminique  
CMP-Neu5Gc : Cytidine monophosphate acide N-glycoloylneuraminique  
CTP : Cytidine triphosphate  
DIDS : Acide 4,4'-diisothiocyanostilbène-2,2'-disulphonique  
Dol : Dolichol  
Fuc : L-Fucose  
Gal : D-Galactose  
GalNAc : N-acétylgalactosamine  
GDP : Guanosine diphosphate  
GDP-Fuc : Guanosine diphosphate fucose  
GDP-Man : Guanosine diphosphate mannose  
Glc : D-glucose  
GlcNAc : N-acétylglucosamine  
GlcNAc-P-P-Dol : Dolichol diphosphate N-acétylglucosamine  
GMP : Guanosine monophosphate  
GTP : Guanosine triphosphate  
Man : D-mannose  
Man-P-Dol : Dolichol phosphate mannose  
Neu5Ac : Acide N-acétylneuraminique  
Neu5Gc : Acide N-glycoloylneuraminique  
PAPS : Adénosine 3'phosphate 5'phosphosulfate  
SITS : Acide 4-acétamido-4'-isothiocyanostilbène-2,2'-disulfonique  
UDP : Uridine diphosphate  
UDP-Glc : Uridine diphosphate glucose  
UDP-GalNAc : Uridine diphosphate N-acétylgalactosamine  
UDP-GlcUA : Uridine diphosphate acide glucuronique  
UDP-Xyl : Uridine diphosphate xylose  
UMP : Uridine monophosphate  
UTP : Uridine triphosphate

INTRODUCTION	p 1
GENERALITES	p 5
I-LA SIALYLATION	p 6
A- La réaction de sialylation	p 6
B- Les éléments de la réaction	p 6
1- Les donneurs d'acide sialique	p 6
a- Les divers acides sialiques	p 6
$\alpha$ - Structure	p 6
$\beta$ - Biosynthèse	p 8
b- Synthèse du CMP-Neu5Ac	p 8
c- Modification enzymatique du Neu5Ac	p 10
$\alpha$ - Le CMP-Neu5Gc	p 10
$\beta$ - Les dérivés O-acétylés du Neu5Ac	p 11
2- Les accepteurs	p 12
a- Les glycoprotéines	p 12
$\alpha$ - Les O-glycosylprotéines	p 12
$\beta$ - Les N-glycosylprotéines	p 16
* Les glycanes de type oligomannosidique	p 17
* Les glycanes de type N-acétyllactosaminiques	p 17
* Les glycanes de type mixte ou hybride	p 19
b- Les glycolipides	p 19
$\alpha$ - Les glycosyldiacylglycérols	p 19
$\beta$ - Les glycosphingolipides	p 19
* Les cérébrosides	p 19
* Les sulfatides	p 19
* Les gangliosides	p 19
3- Les sialyltransférases	p 22
a- Propriétés	p 22
b- Localisation	p 23
c- Caractérisation	p 25
d- Intérêt des sialyltransférases purifiées	p 26
e- Conclusion	p 27
4- Rôles des sialoglycoconjugués	p 28
5- Conclusion	p 29
II- La topologie de la réaction	p 30
A- Le transport de substances au travers d'une membrane biologique	p 30



1- La diffusion passive .....	p 30
2- La diffusion facilitée .....	p 31
3- Le transport actif .....	p 33
a- Les transports actifs primaires .....	p 34
b- Les transports actifs secondaires .....	p 34
* Symport .....	p 34
* Antiport .....	p 35
* Uniport .....	p 35
B- Le transport des glycosyl-nucléotides aux sites de glycosylation .....	p 35
1- Utilisation de fractions subcellulaires .....	p 36
a- Principe .....	p 36
b- Transport du CMP-Neu5Ac, du GDP-Fuc, et du PAPS .p	36
$\alpha$ - Mise en évidence .....	p 36
$\beta$ - Mécanisme du transport .....	p 39
$\tau$ - Purification du transporteur de CMP-Neu5Ac .p	41
c- Transport de l'UDP-Xyl, l'UDP-GlcUA et de l'UDP-GalNAc .....	p 42
d- Transport de l'UDP-Gal .....	p 43
e- Transport de l'UDP-GlcNAc, de l'UDP-Glc et du GDP-Man .....	p 44
f- Transport de l'ATP .....	p 46
g- Conclusion .....	p 46
2- L'utilisation de cellules perméabilisées .....	p 48
a- Principe .....	p 48
b- Les transporteurs de glycosyl-nucléotides .....	p 49
$\alpha$ - Formation de réserves intracisternales de glycosyl-nucléotides .....	p 49
$\beta$ - Transport de l'UDP-GlcNAc .....	p 49
$\tau$ - Mécanisme d'entrée des glycosyl-nucléotides p	50
3- Signification physiologique des transporteurs de glycosyl-nucléotides dans les vésicules de l'appareil de Golgi .....	p 52
III- Conclusion générale .....	p 53
TRAVAUX PERSONNELS .....	p 55
Introduction .....	p 55

## Chapitre I

I-	Choix d'un modèle cellulaire: les cellules perméabilisées	p 56
A-	Le type cellulaire	p 56
B-	Perméabilisation de la membrane plasmique par choc thermique	p 57
1-	Effet sur la membrane plasmique	p 57
2-	Effets sur les membranes intracellulaires	p 59
II-	Choix des cellules perméabilisées pour la caractérisation du passage du CMP-Neu5Ac dans les vésicules intracellulaires	p 61
A-	Variation du transport du CMP-Neu5Ac au cours du temps	p 61
B-	Caractérisation du passage du CMP-Neu5Ac dans les vésicules intracellulaires	p 64
1-	Effet de la variation de la concentration en CMP-[ <sup>14</sup> C]Neu5Ac	p 65
2-	Effet de la température	p 68
3-	Propriétés du système de transport du CMP-Neu5Ac	p 68
a-	Spécificité du substrat transporté	p 68
b-	Effets des différents nucléotides	p 70
c-	Inhibition du transport par des agents non pénétrants	p 71
4-	Conclusion	p 73
C-	Mécanisme du transport du CMP-Neu5Ac	p 74
1-	Echange CMP/CMP-Neu5Ac	p 75
2-	Réversibilité de l'échange	p 78
3-	Spécificité de l'échange	p 79
4-	Conclusion	p 79
D-	Transport du CMP-Neu5Ac et sialylation des glycoconjugués	p 80
E-	Localisation de l'antiport	p 83
III-	Conclusion	p 86

## Chapitre II

I-	Les vésicules golgiennes purifiées, un "outil" dans l'étude du transport du CMP-Neu5Ac	p 88
A-	Préparation d'une fraction enrichie en vésicules golgiennes	p 88
B-	Caractérisation des vésicules golgiennes	p 89
1-	Microscopie électronique	p 89
2-	Topologie des vésicules golgiennes obtenues	p 90

II- Les vésicules golgiennes des cellules CHO dans l'étude du transport du CMP-Neu5Ac .....	p 91
A- Résultats .....	p 91
B- Conclusion .....	p 92
III- Transport du CMP-Neu5Gc dans les vésicules golgiennes des cellules CHO .....	p 93
 Chapitre III : Transport du CMP- acide N-glycoloylneuraminique dans les vésicules golgiennes de foie de Souris ...	p 93
 DISCUSSION ET CONCLUSIONS GENERALES .....	p 106
 MATERIELS ET METHODES .....	p 109
 ANNEXE .....	p 122
 BIBLIOGRAPHIE .....	p 129

# Introduction

Longtemps, les sucres et leurs polymères ont été considérés comme des substances de soutien et des composés permettant le stockage de l'énergie de la cellule. Depuis ces vingt dernières années, la chimie et la biochimie des glycoconjugués ont acquis une importance aussi grande que celles des protéines et des acides nucléiques.

Les glycoconjugués regroupent à la fois les glycoprotéines et les glycolipides. Ce sont des composés très largement répandus, tant dans les tissus animaux, végétaux que dans les microorganismes. Les glycoprotéines, en particulier, se trouvent dans tous les liquides de l'organisme, dans tous les organes et sont localisés aussi bien dans le milieu extracellulaire que dans le milieu intracellulaire. Ce caractère d'ubiquité laisse pressentir une importance biologique très marquée.

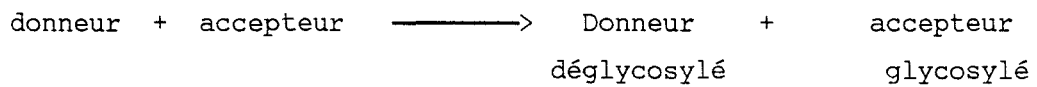
L'engouement suscité actuellement par les glycoconjugués, et tout particulièrement par les glycoprotéines, réside certainement encore, dans l'aspect séduisant des différentes théories émises à propos de leur fonction biologique. Des rôles nombreux et variés leur sont en effet attribués:

Les glycoprotéines intégrées dans les membranes plasmiques et exposant leurs glycannes vers le milieu extérieur interviennent dans la vie sociale des cellules: ce sont des signaux de reconnaissance qui assurent les contacts intercellulaires, l'adhésivité des cellules et sont impliqués dans le phénomène de l'inhibition de contact.

Les glycoprotéines peuvent être solubles, ce sont par exemple, des transporteurs (transferrine), mais aussi des hormones (gonadotrophine chorionique, les hormones gonadotropes LH et FSH ...), ou encore des enzymes (RNase, DNase).

Parallèlement à ces observations, et grâce à la mise au point de méthodes analytiques de plus en plus fines et rapides, de nombreuses structures primaires de la partie glucidique ont été déterminées. S'appuyant sur ces précieuses données structurales, les grandes lignes des mécanismes généraux de la biosynthèse des glycoprotéines sont aujourd'hui élucidées. En effet, la biosynthèse des glycoconjugués met

en jeu un donneur de sucre et un accepteur, selon la réaction suivante:



réaction qui est catalysée par des enzymes spécifiques: les glycosyltransférases.

Dans la cellule eucaryote, ce processus de glycosylation se déroule dans le système membranaire du reticulum endoplasmique rugueux (RER) aux vésicules golgiennes. Ces membranes séparent le milieu cytoplasmique contenant les glycosyl-nucléotides (les donneurs de sucre dans la réaction de glycosylation), de la lumière de ces organites où se trouvent les produits de la glycosylation. Cette ségrégation des molécules glycosylées dans un compartiment subcellulaire pose immédiatement le problème du passage des résidus glycosyl vers le lieu de la glycosylation.

Le thème général de nos recherches porte sur l'étude de la biosynthèse des glycoconjugués et nous nous sommes plus particulièrement intéressée au problème du transport des précurseurs donneurs d'acide sialique, vers les sites de glycosylation.

Nos objectifs principaux ont été:

\* La mise au point d'un modèle d'étude des mécanismes de transport des molécules de CMP-acide sialique au travers de la membrane golgienne pour atteindre le site actif des sialyltransférases dirigés vers la lumière du Golgi. Ce modèle est fondé sur l'utilisation de cellules animales dont la membrane plasmique a été sélectivement perméabilisée.

\* Ce modèle établi, il nous a été possible d'étudier plus en détail le mécanisme du transport du CMP-Neu5Ac dans les vésicules intracellulaires.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressée à des méthodes de fractionnement cellulaire dans le but de repérer et de localiser plus exactement le transporteur de CMP-Neu5Ac. Ce nouveau modèle s'est avéré fort utile pour préciser le mécanisme d'entrée et d'utilisation dans les vésicules golgiennes d'un analogue naturel du CMP-Neu5Ac: le CMP-Neu5Gc.

Mais, avant d'aller plus loin dans la description des résultats de nos recherches, nous rappellerons au cours de la première partie de ce mémoire, l'état des connaissances actuelles concernant la réaction de sialylation des glycoconjugués et la topologie de cette réaction. Dans la seconde partie, nous exposerons les résultats de nos recherches. L'ensemble de nos travaux a fait l'objet des publications suivantes:

\* en rapport avec ce mémoire

1- Lepers, A., Shaw, L., Cacan, R., Schauer, R., Montreuil, J. and Verbert, A. (1989) FEBS Letters 250, 245-250. Transport of CMP-N-Glycoloyl neuraminic acid into mouse liver Golgi vesicles.

2- Lepers, A., Cacan, R. and Verbert, A. (1989) accepté dans Biochimie. Permeabilized cells as a way to gain access to intracellular organelles: An approach to glycosylation reactions.

\* En outre, nous avons collaboré au travail suivant:

1- Cacan, R., Lepers, A., Belard, M. and Verbert, A. (1989) Eur. J. Biochem. 185, 173-179. Catabolic pathway of oligosaccharidyl pyrophosphodolichol. Subcellular sites of the degradation of the oligosaccharidic moiety.

\* Les communications suivantes ont été présentées:

1- Cecchelli, R., Lepers, A., Cacan, R. and Verbert, A. in "proceedings of the International Colloque on Glycoproteins Biosynthesis" in Aussois, France, March 16-22, 1986. Use of plasma membrane permeabilized cells to study transport into intracellular vesicles; Studies with Digitonin treated BHK cells.

2- Lepers, A., Cacan, R. and Verbert, A. XIV Forum des jeunes chercheurs, Villeurbanne, France, Septembre 1-4, 1987. Etude du transport du CMP-Neu5Ac vers les sites de glycosylation dans les cellules CHO.

3- Lepers, A., Cacan, R. and Verbert, A. in "*proceedings of the Japanese-German Symposium on Sialic acids*", Berlin (R. Schauer and T. Yamakawa). Study of the mechanism of CMP-Neu5Ac transport in normal and CMP-Neu5Ac carrier deficient CHO cells using plasma membrane permeabilization technique.

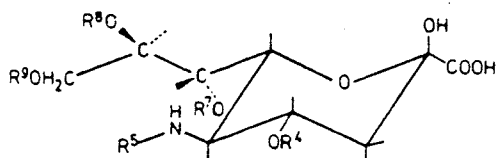
4- Lepers, A., Shaw, L., Cacan, R., Schauer, R., Montreuil, J. and Verbert, A. in "*proceedings of the International Colloque on Structure Metabolism and Genetics of Glycoconjugates*", Aussois, France, May-June 29-3, 1989. Transport of CMP-N-Glycoloylneuraminic acid into mouse liver Golgi vesicles.

5- Haeuw, J-F., Lepers, A., Wieruszkeski, J-M., Strecker, G., Verbert, A., Montreuil, J. and Michalski, J-C. in "*proceedings of the International Colloque on Structure, Metabolism and Genetics of Glycoconjugates* ", Aussois, France, May-June 29-3, 1989.

6- Lepers, A., Shaw, L., Verbert, A. and Schauer, R. in "*proceedings of the 19<sup>th</sup> meeting of the federation of European Biochemical Societies* ", Rome, Italy, July 2-7, 1989. Studies on factors influencing N-Glycoloylneuraminic acid biosynthesis and incorporation in mouse and rat liver.



# Généralités



R <sup>5</sup>	R <sup>4,7,8,9</sup>	
$\begin{array}{c} -C-CH_3 \\    \\ O \end{array}$	-H	(4,7,8,9)
$\begin{array}{c} -C-CH_2 \\    \\ O \end{array}$	$\begin{array}{c} -C-CH_3 \\    \\ O \end{array}$	(4,7,8,9)
$\begin{array}{c} -C-CH_2 \\    \\ O \\   \\ O \\   \\ C=O \\   \\ CH_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} -C-CH-CH_3 \\    \quad   \\ O \quad OH \end{array}$	(9)
	-CH <sub>3</sub>	(8)
	-SO <sub>3</sub> H	(8)
	-PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	(9)

N-acetylneuraminic acid	Neu5Ac
N-acetyl-4-O-acetylneuraminic acid	Neu4,5Ac <sub>2</sub>
N-acetyl-7-O-acetylneuraminic acid	Neu5,7Ac <sub>2</sub>
N-acetyl-8-O-acetylneuraminic acid	Neu5,8Ac <sub>2</sub>
N-acetyl-9-O-acetylneuraminic acid	Neu5,9Ac <sub>2</sub>
N-acetyl-4,9-di-O-acetylneuraminic acid	Neu4,5,9Ac <sub>3</sub>
N-acetyl-7,9-di-O-acetylneuraminic acid	Neu5,7,9Ac <sub>3</sub>
N-acetyl-8,9-di-O-acetylneuraminic acid	Neu5,8,9Ac <sub>3</sub>
N-acetyl-7,8,9-tri-O-acetylneuraminic acid	Neu5,7,8,9Ac <sub>4</sub>
N-acetyl-9-O-lactoylneuraminic acid	Neu5Ac9Lt
N-acetyl-4-O-acetyl-9-O-lactoylneuraminic acid	Neu4,5Ac <sub>2</sub> 9Lt
N-acetyl-8-O-methylneuraminic acid	Neu5Ac8Me
N-acetylneuraminic acid 9-phosphate	Neu5Ac9P
N-acetylneuraminic acid 8-sulfate	Neu5Ac8S
2-deoxy-2,3-didehydro-N-acetylneuraminic acid	Neu5Ac2en
2-deoxy-2,3-didehydro-N-acetyl-9-O-acetylneuraminic acid	Neu5,9Ac <sub>2</sub> 2en
2-deoxy-2,3-didehydro-N-acetyl-9-O-lactoylneuraminic acid	Neu5Ac2en9Lt
N-glycoloylneuraminic acid	Neu5Gc
N-glycoloyl-4-O-acetylneuraminic acid	Neu4Ac5Gc
N-glycoloyl-7-O-acetylneuraminic acid	Neu7Ac5Gc
N-glycoloyl-9-O-acetylneuraminic acid	Neu9Ac5Gc
N-glycoloyl-7,9-di-O-acetylneuraminic acid	Neu7,9Ac <sub>2</sub> 5Gc
N-glycoloyl-8,9-di-O-acetylneuraminic acid	Neu8,9Ac <sub>2</sub> 5Gc
N-glycoloyl-7,8,9-tri-O-acetylneuraminic acid	Neu7,8,9Ac <sub>3</sub> 5Gc
N-(O-acetyl)glycoloylneuraminic acid	Neu5GcAc
N-glycoloyl-9-O-lactoylneuraminic acid	Neu5Gc9Lt
N-glycoloyl-8-O-methylneuraminic acid	Neu5Gc8Me
N-glycoloylneuraminic acid 8-sulfate	Neu5Gc8S
2-deoxy-2,3-didehydro-N-glycoloylneuraminic acid	Neu2en5Gc
2-deoxy-2,3-didehydro-N-glycoloyl-9-O-acetylneuraminic acid	Neu9Ac2en5Gc
2-deoxy-2,3-didehydro-N-glycoloyl-9-O-lactoylneuraminic acid	Neu2en5Gc9Lt
2-deoxy-2,3-didehydro-N-glycoloyl-8-O-methylneuraminic acid	Neu2en5Gc8Me
N-acetylneuraminic acid methyl ester	Neu5Ac1Me
N-acetylneuraminic acid β-methyl glycoside	Neu5Acβ2Me

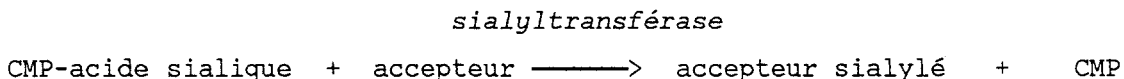
Fig. 1: Structure des acides sialiques naturels, N- et O- substitués de l'acide neuraminique en conformation chaise <sup>2</sup>C<sub>5</sub>: leurs substituants, leur nom et leur abréviation sont indiqués dans cette figure. (D'après Reutter et Schauer -2-)

Nous nous proposons au cours de cette première partie de notre mémoire de rappeler l'essentiel de nos connaissances quant à la sialylation des glycoconjugués et à la signification biologique de ce processus.

## I- LA SIALYLATION

### A- La réaction de sialylation

Les résidus d'acide sialique sont transférés aux extrémités non réductrices de glycannes portés par une protéine (glycoprotéine) ou par un lipide (glycolipide). Cette réaction est catalysée par des enzymes spécifiques, du donneur de sucre et de l'accepteur qu'elles reconnaissent et spécifiques de la liaison qu'elles forment, selon le schéma suivant:



### B- Les éléments de la réaction

#### 1- Les donneurs d'acide sialique

Le donneur de sucre dans la réaction de sialylation est toujours un dérivé monophosphorylé de la cytidine: le CMP- acide sialique.

#### a- Les divers acides sialiques

##### α- Structure

Le terme d'acide sialique désigne les membres d'une famille comprenant plus de 20 dérivés naturels de l'acide neuraminique. (voir figure 1). Il s'agit d'un deoxy-sucre aminé et acide, à 9 carbones, sous forme pyranose, dont le nom systématique est l'acide 5-amino-3,5-dideoxy-D-glycéro-D-galacto-2-nonulopyranose-1-onique.

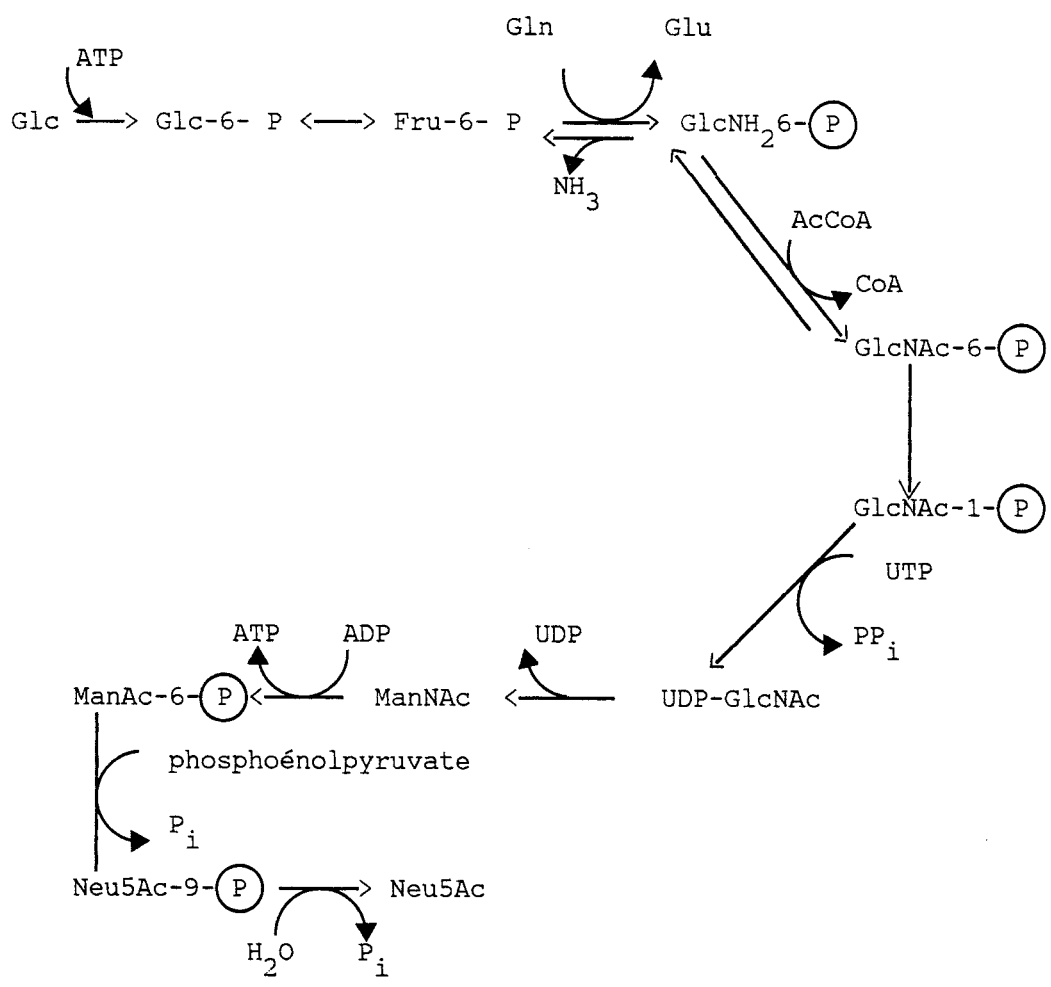


Fig. 2: Biosynthèse de l'acide N-acétylneuraminique.

En fait, dans la nature, ce composé est toujours substitué; Ce peut être

\* sur son groupement aminé R<sub>5</sub> par un résidu acétyl ou glycoloyl

\* sur ces groupements hydroxyl, R<sub>4,7,8,9</sub>, il peut être méthylé ou estérifié par un groupement acétyl, lactyl, sulfate ou phosphate.

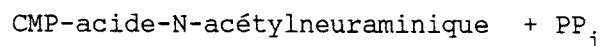
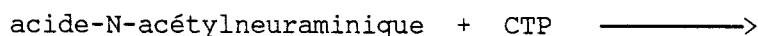
Parfois, plusieurs de ces substituants sont présents sur une même molécule d'acide sialique donnant lieu aux acides sialiques décrits dans la figure 1. (Schauer, (1985) [1], Reutter et Schauer [2]).

### β- Biosynthèse

Chacune des étapes conduisant à la biosynthèse des acides sialiques furent élucidées dans les laboratoires de Roseman (1962) [3] et Warren (1966). Elles sont résumées dans la figure 2 et ont fait l'objet de plusieurs revues (Mc Guire [4], Schauer (1982) [5], Corfield et Schauer [6]). Ce sont des réactions localisées dans le cytoplasme.

#### b- Synthèse du CMP-Neu5Ac

Avant que les acides sialiques ne soient incorporés dans des macromolécules, ils doivent être activés sous la forme de CMP-acide sialique. La synthèse du CMP-Neu5Ac a été particulièrement étudiée. Elle se déroule selon le schéma suivant:



Contrairement aux autres glycosyl-nucléotides, c'est le sucre libre et non pas le sucre-1-phosphate qui est activé. Cette réaction est, de ce point de vue, unique. D'autre part, le glycosyl-nucléotide formé est le dérivé monophosphate présentant l'anométrie β et non pas le dérivé diphosphate sous forme α comme c'est le cas pour les autres donneurs de sucres (GDP-αMan, GDP-αFuc, UDP-αGal, UDP-αGlc ...) dans les réactions de glycosylation (Mc Guire [7]).

Ce type de réaction est catalysé par une CMP-Neu5Ac synthétase. Cet enzyme a été purifié à partir de *Neisseria meningitidis*

(Warren et Blacklow [8]), mais également des glandes sous-maxillaires de Sanglier (Kean et Roseman [9], Roseman [10]), et des études plus récentes ont montré qu'il était présent dans de nombreux tissus animaux. Un aspect particulièrement étonnant de cette enzyme est sa localisation subcellulaire. Cette question a été principalement étudiée dans les hépatocytes de Rat, et la majeure partie de l'activité CMP-Neu5Ac synthétase (85%) a été trouvée associée au noyau (Creek et al. [11], Ferwerda et al. (1983) [12], Coates et al. [13], Ferwerda et al. (1986) [14]). D'un point de vue topologique, la signification de cette distribution n'est pas encore connue, et soulève un certain nombre de questions:

\* Les activités CMP-Neu5Ac synthétase trouvées dans le noyau (85%) et dans le cytoplasme (15%) sont-elles distinctes?

\* Ont-elles toutes les deux, un rôle physiologique?

\* Comment cette CMP-Neu5Ac synthétase nucléaire est-elle en relation avec le Neu5Ac synthétisé dans le cytoplasme, et enfin, comment le CMP-Neu5Ac nouvellement synthétisé est-il transporté dans le cytoplasme?

Remarquons encore que les acides sialiques sont en concentration très faible dans le noyau; toute cette disposition pourrait indiquer un haut degré de régulation du métabolisme de l'acide sialique.

Enfin récemment, cet enzyme a été purifié d'E. Coli (*Escherichia Coli* 018. K1), par des techniques de chromatographies (d'échange d'ions et d'affinité). Ses propriétés ont été étudiées, la localisation génétique du gène de l'enzyme a été déterminée par cartographie (Vann et al. [15]), et, enfin, la séquence nucléotidique complète du gène codant pour la CMP-Neu5Ac synthétase a été déterminée (Zapata et al. [16]).

Soulignons encore l'utilisation de la CMP-Neu5Ac synthétase partiellement purifiée de foie de Grenouille (Corfield et al. (1979) [17], Schauer et al. (1980) [18]), ou de cerveau de Boeuf (Van den Eijden et Van Dijk [19], Gross et al. (1984) [20], Gross et al. (1987) [21]) dans la préparation de dérivés du CMP-Neu5Ac; Ainsi, l'acide-N-acétyl-4-deoxy-D-neuraminique est activé sous forme de

CMP-acide sialique grâce à l'enzyme isolée de cerveau de boeuf (Gross et Brossmer (1983) [22]). Ou encore, Brossmer décrit la synthèse du CMP-9 fluoresceinyl-Neu5Ac, grâce à la CMP-Neu5Ac synthétase partiellement purifiée du cerveau de Boeuf. Ce procédé lui permet d'introduire un marquage fluorescent sur certaines glycoprotéines (Gross et Brossmer (1988) [23]).

#### c- Modification enzymatique du Neu5Ac

Contrairement au Neu5Ac, les voies de synthèse conduisant aux autres acides sialiques naturels, en particulier les dérivés O-acétylés des acides N-glycoloylneuraminique (Neu5Gc) et N-acétylneuraminique (Neu5Ac) ne sont pas encore parfaitement connues. Ce n'est que très récemment que Schauer et son équipe ont élucidé certains points de la biosynthèse du CMP-Neu5Gc.

#### α- Le CMP-Neu5Gc

L'acide N-glycoloylneuraminique (Neu5Gc) est un acide sialique que l'on rencontre dans tout le règne animal. Bien qu'il soit absent des tissus humains normaux, on le rencontre en faible quantité dans les glycolipides extraits de tumeurs cancéreuses du colon humain. La biosynthèse du Neu5Gc a fait l'objet de nombreuses études. Il a tout d'abord été suggéré que le groupement glycoloyl du glycoloyl-CoA était transféré au cours de la synthèse de l'acide sialique (Jourdian et Roseman [24]).

Puis il a été proposé que le Neu5Gc résultait de l'hydroxylation du Neu5Ac libre présent dans le cytosol par l'intervention d'une hydroxylase nécessitant la présence d'ions  $Fe^{2+}$ , de NADPH  $H^+$  ou d'acide ascorbique et d' $O_2$  (Schoop et al. [25], Schauer (1970) [26]).

Les propriétés de cet enzyme, encore appelé N-acétylneuraminase monooxygénase (EC 1.14.99.18) ( Enzyme Nomenclature [27]), extrait des glandes sous-maxillaires de Porc sont décrites par R. Schauer (1978) [28]. Il a été montré également, dans des fractions enrichies en membranes golgiennes isolées de glandes sous-maxillaires de Porc que le Neu5Ac lié de façon covalente aux glycoprotéines pouvait être hydroxylé en Neu5Gc (Schauer et Buscher[29], Schauer et al. (1972) [30]).

Enfin, tout récemment, Shaw et al. [31] démontrent l'existence d'une activité hydroxylasique présente à 85% dans le surnageant postmicrosomal isolé de glandes sous-maxillaires de Porc, permettant l'hydroxylation du CMP-Neu5Ac en CMP-Neu5Gc.

La CMP-Neu5Ac hydroxylase a été mise en évidence dans le surnageant post-microsomal de foie de Grenouille, de foie de Rat et de rate de Mouton mais également dans le foie de Souris. Les conditions requises pour le bon fonctionnement de ce dernier enzyme sont les mêmes que pour ceux déjà décrits dans les glandes sous-maxillaires de Porc (substrats, cofacteurs).

### $\beta$ - Les dérivés O-acétylés du Neu5Ac

Bien que l'on ne connaisse encore que peu de choses sur les N-acylneuraminate O-acétyl transférases, celles-ci semblent cependant largement distribuées dans la nature. Plus de 30 acides sialiques différents ont été isolés et décrits, dont la plupart sont O-acétylés sur le C<sub>4,7,8</sub>, et/ou C<sub>9</sub> (Corfield et Schauer [32]). Une O-acétyl transférase (EC 2.3.1.44) a été trouvée dans les glandes sous-maxillaires de Cheval. Elle transfère un groupe acétate sur la position 4 de résidus Neu5Ac ou Neu5Gc. L'acétylation de la chaîne latérale de l'acide sialique (queue glycérol) semble être plus complexe et ferait intervenir une autre O-acétyl transférase (Kamerling et al. [33]). Ces enzymes ont été étudiés dans la glande sous-maxillaire bovine. Le site principal où se déroule la O-acétylation dans les tissus semble être le cytosol bien qu'une activité associée aux membranes intracellulaires soit mise en évidence également. Ces études ont été réalisées aussi bien avec des substrats exogènes (Neu5Ac libre) ou endogènes Neu5Ac ou Neu5Gc liés de façon covalente à des glycoprotéines cytosoliques ou membranaires (Schauer et al. [34]).

La présence de ce groupe acétyl sur le C<sub>9</sub> confère à la molécule sialylée une plus grande résistance aux sialidases, prolongeant ainsi sa durée de vie (Schauer (1982) [35], Corfield et al. (1986) [36]).



## 2- Les accepteurs

Les glycoconjugués accepteurs d'acide sialique regroupent des glycolipides et des glycoprotéines, macromolécules qui résultent de l'association d'une copule glucidique ou glycanne avec un lipide ou une protéine. Pour une information plus précise, voir les revues de Montreuil [37,38], Spiro [39] et Kornfeld, R. et Kornfeld, S. [40,41].

Dans ce chapitre, nous donnerons quelques exemples de ces structures glycoprotéiniques ou glycolipidiques sialylées.

### a- Les glycoprotéines

D'une façon générale, les glycoprotéines sont classées en fonction de la nature de la liaison covalente glycanne-protéine, et sont réparties en deux grands groupes:

\* Les O-glycosylprotéines: le glycanne est conjugué à la chaîne peptidique par une liaison O-glycosidique.

\* Les N-glycosylprotéines: c'est une liaison N-glycosidique qui assure le lien entre le glycanne et un résidu asparagine (Asn) de la chaîne peptidique.

#### α- Les O-glycosylprotéines

Les liaisons O-glycosidiques conduisant aux O-glycosylprotéines sont très variées selon la nature du monosaccharide et de l'acide aminé hydroxylé intervenant dans la liaison peptide-glycanne. On subdivise les O-glycosylprotéines en deux grands sous-groupes:

\* celles dont le glycanne est lié à la sérine ou à la thréonine, et parmi elles citons la liaison O-glycosidique faisant intervenir un résidu de N-acétylglucosamine et de la sérine décrit très récemment par Torres et Hart [42].

\* d'autre part, celles dont la copule glucidique est conjuguée à l'hydroxyllysine ou à l'hydroxyproline.

TABLEAU II: Structure des glycanes des mucines

<u>REGIONS</u>	<u>STRUCTURES</u>
<p>CORE: région qui comprend la liaison à l'axe peptidique, et les premiers résidus osidiques fixés sur la GalNAc de la liaison (Carlson [43], Carlsson et al. [44])</p> <p>Ces quatre cores permettent de classer la majorité des structures glycaniques isolées de mucines. Néanmoins, il existe d'autres cores plus rares, rencontrés</p> <p>* dans les mucines salivaires d'hirondelles <i>Collocalia</i>, Wieruszkeski et al. [45]</p> <p>* dans les mucines gastriques humaines (Slomiany et al. [46]):</p>	<p><u>Core 1:</u></p> <pre>       GalNAc        / Gal(β1-3)     </pre> <p><u>Core 2:</u></p> <pre>       GlcNAc(β1-6) \                     GalNAc       Gal(β1-3) /     </pre> <p><u>Core 3:</u></p> <pre>       GalNAc        / GlcNAc(β1-3)     </pre> <p><u>Core 4:</u></p> <pre>       GlcNAc(β1-6) \                     GalNAc       GlcNAc(β1-3) /     </pre> <p>GalNAc(α1-3)</p> <pre>       GalNAc        / GalNAc(α1-3)     </pre> <p>Gal(β1-6)GalNAc</p> <pre>       Gal(β1-3) /                 Gal(β1-6)GalNAc     </pre>
<p><u>SQUELETTE:</u> le squelette est formé de sous-unité saccharidiques comportant un résidu Gal et un de GlcNAc. L'association de ces sous-unités s'effectue linéairement, avec ou sans branchement.</p>	<p><u>type 1:</u></p> <p>(Gal(β1-3)GlcNAc)</p> <p><u>type 2:</u></p> <p>(Gal(β1-4)GlcNAc)</p>
<p><u>PERIPHERIE:</u> à la périphérie de ces motifs glycaniques, des résidus de fucose, de N-acétylgalactosamine, de galactose, d'acide sialique ou de sulfate peuvent venir s'additionner à ces différentes structures.</p>	

Voir la classification des O-glycosylprotéines, donnée dans le tableau I.

TABLEAU I: Classification des O-glycosylprotéines

Type de O-glycosylprotéines	Type de liaison	
	monosaccharide du point d'attache	acide aminé
mannane (levures)	Man	Ser, Thr
mucine	GalNAc	Ser, Thr
protéoglycane	Xyl	Ser
glycoprotéines nucléaires	GlcNAc	Ser
Collagène	Gal	OH-Lys
Extensine (végétaux)	Ara	OH-Pro

Seules les O-glycosylprotéines de type mucine sont trouvées sialylées. La structure générale des O-glycannes des mucines est rappelée succinctement dans le tableau II.

Dans ces structures O-glycanniques que nous venons de décrire, nous retrouvons les types de liaisons des acides sialiques suivants:

( $\alpha$ 2-3)	—————>	NeuAc( $\alpha$ 2-3)Gal
( $\alpha$ 2-4)	—————>	NeuAc( $\alpha$ 2-4)GlcNAc
( $\alpha$ 2-6)	—————>	NeuAc( $\alpha$ 2-6)GalNAc ou Gal
( $\alpha$ 2-8)	—————>	NeuAc( $\alpha$ 2-8)NeuAc

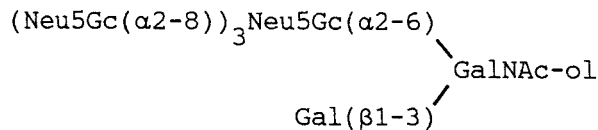
\* Les liaisons Neu5Ac(α2-4)GlcNAc et Neu5Ac(α2-6)Gal

Elles sont rares. Elles ont été décrites dans les structures de mucines sublinguales de Rat (Slomiany et Slomiany [47]), de mucines du colon (Slomiany et al. (1980) [48]).



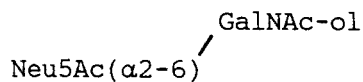
\* Les liaisons Neu5Ac(α2-8)Neu5Ac

Elles se rencontrent dans les polysialoglycoprotéines d'oeuf de poisson. Il est à remarquer ici que les résidus d'acide sialique rencontrés sont de l'acide N-glycoloylneuraminique et non de l'acide N-acétylneuraminique (Kitajima et al. [49]).

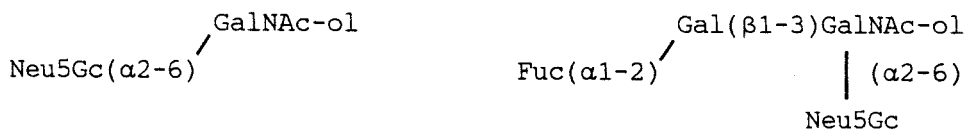


\* Les liaisons Neu5Ac(α2-3)Gal et Neu5Ac(α2-6)GalNAc

Les structures les plus simples sont trouvées dans les mucines salivaires bovines et ovines, après β-élimination en milieu réducteur (Carlson [50], Gottschalk et Bhargava [51]):



mais aussi dans les mucines sous-maxillaires de Porc (Savage et al. [52]),





Les différentes structures glycaniques se créent par substitution de ce noyau pentasaccharidique par des monosaccharides divers qui peuvent être le mannose, la N-acétylglucosamine, le fucose, les acides neuraminiques (N-acétyl-, N-glycoloyl-), le glucose et la N-acétylgalactosamine. On distingue trois grands types de glycanes, voir Montreuil [57,58]:

\* Les glycanes de type oligomannosidique.

Ces glycanes ne renferment que de la N-acétylglucosamine et du mannose mais aucun résidu d'acide sialique.

\* Les glycanes de type N-acétyllactosaminique.

Dans cette seconde famille de glycanes, les mannoses 4 et 4' du noyau pentasaccharidique peuvent être substitués par un nombre variable (de 1 à 6) résidus de N-acétyllactosamine Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc, conduisant aux structures mono-, bi-, tetra- et pentaantennées et aux polylactosaminoglycanes.

A cette variabilité structurale due au nombre d'antennes, un autre type de variabilité vient s'ajouter, selon:

1- les substitutions des N-acétyllactosamines par des résidus de galactose, d'acide sialique, de fucose, de N-acétylglucosamine ou de N-acétylgalactosamine.

2- la présence d'une N-acétylglucosamine intercalaire, substituant le mannose en 3, et/ou d'un résidu de fucose sur la N-acétylglucosamine 1.

3- Le degré de maturation des glycanes qui peuvent porter des antennes incomplètes réduites à un résidu de N-acétylglucosamine, comme dans le cas de l'ovotransferrine de poule (Spik et al. [59]). La figure 4 présente quelques-unes de ces structures:

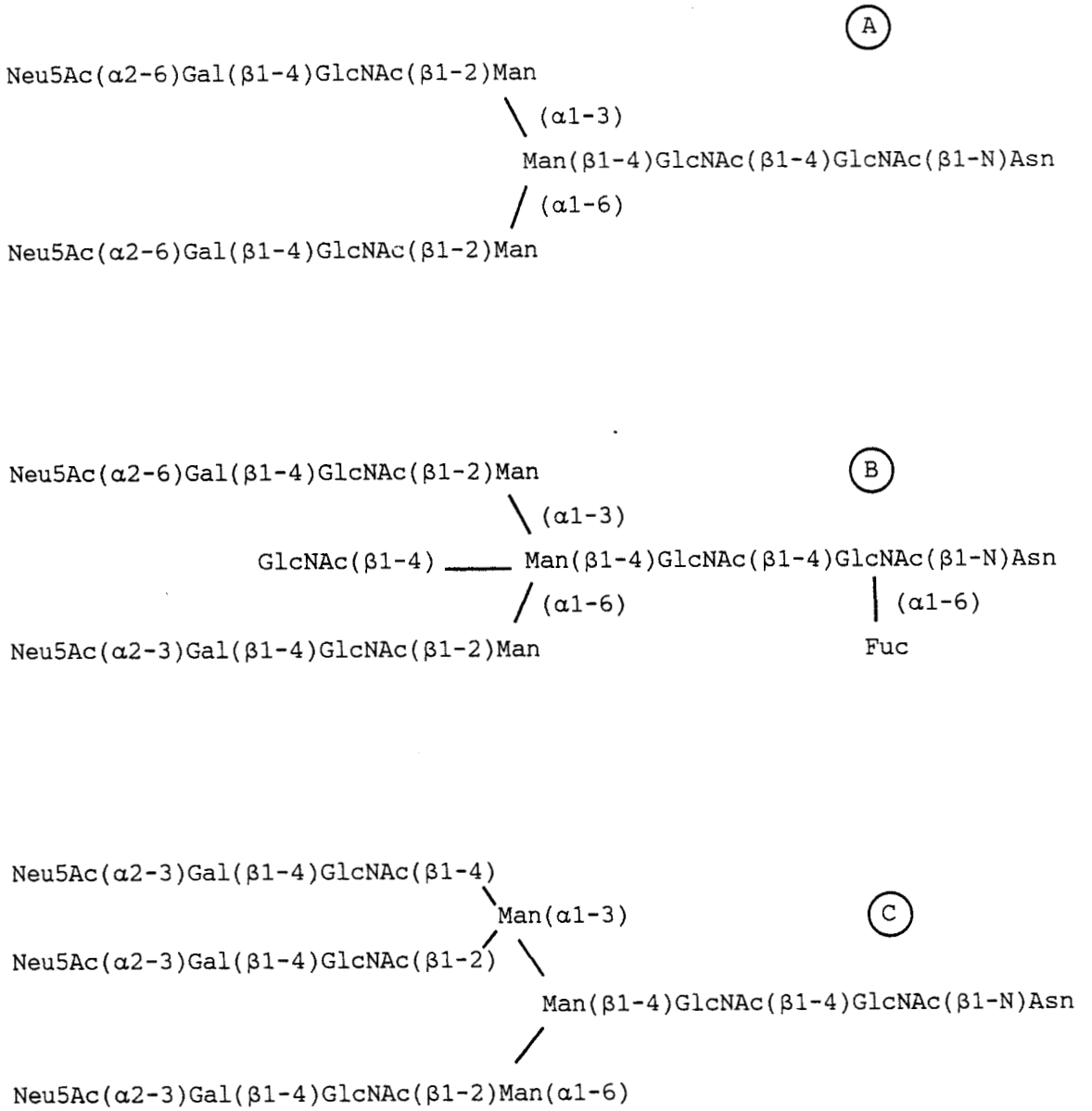


Fig. 4: Exemples de structures de glycannes de type N-acétyllactosaminique

- A- glycanne de la sérotransferrine (Spik et al. [60])
- B- glycanne d' IgG sérique humaine (Baenziger et al. [61], Baenziger et Kornfeld [62])
- C- glycanne de la fétuine (Nilsson et al. [63])

\* Les glycannes de type mixte ou hybride.

Ce type de glycannes renferme à la fois une structure de type oligomannosidique et de type N-acétyllactosaminique, mais ce ne sont pas des structures accepteurs d'acide sialique.

b- Les glycolipides

α- Les glycosyldiacylglycérols

Les glycolipides chez les bactéries et les plantes sont généralement des glycosyldiacylglycérols. Il s'agit d'un mono- ou oligosaccharide lié par sa fonction réductrice en position 3 du 1,2-diacylglycérol.

Ces glycosyldiacylglycérols sont également trouvés chez les animaux mais en très faible quantité et ne sont pas sialylés.

β- Les glycosphingolipides

Les glycolipides majeurs chez les animaux sont les glycosphingolipides, de localisation membranaire. Un ose, ou oligosaccharide peut être lié par sa fonction réductrice à la fonction alcool primaire de la sphingosine. La sphingosine (ou sphingénine) est un amino-glycol éthylénique en C<sub>18</sub> qui, substitué par des acides gras (le plus souvent les acides palmitique et stéarique), porte le nom de céramide. Cet assemblage donne lieu aux différentes catégories de glycosphingolipides:

\* **Les cérébrosides**, qui ne renferment pas d'acide sialique.

\* **Les sulfatides**, qui ne possèdent pas non plus d'acide sialique.

\* **Les gangliosides**.

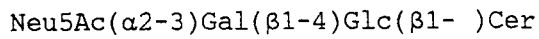
Ces glycosphingolipides furent isolés pour la première fois d'un sujet atteint de la maladie de Tay-Sachs par Klenk en 1942. Ce sont des



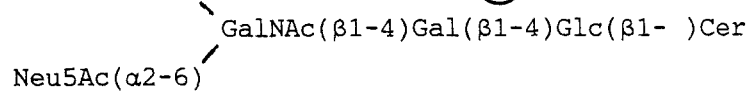
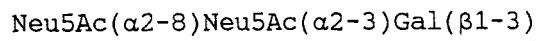
composés acides, contenant une ou plusieurs molécules d'acide sialique, qui peut être l'acide N-acétylneuraminique ou l'acide N-glycoloylneuraminique lié en ( $\alpha$ 2-3) sur le Gal ou en ( $\alpha$ 2-6) sur le GalNAc ou le Gal ou encore ( $\alpha$ 2-8) sur le Neu5Ac. On note ces composés G (pour gangliosides) suivis de M, D ou T selon qu'ils possèdent 1,2 ou 3 molécules d'acide sialique. Les gangliosides se subdivisent en trois sous-classes:

- 1- les gangliosides de la série *ganglio*
- 2- les gangliosides de la série *lacto*
- 3- les gangliosides de la série *globo*

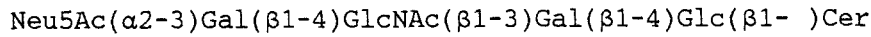
La figure 5 présente quelques unes de ces structures.



(A)



(B)



(C)

(D)

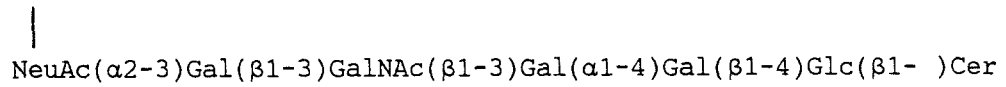
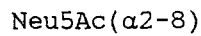


fig. 5: Exemples de structures de gangliosides

- A-  $II^3$  Neu5Ac-Lac-Cer =  $GM_3$  , gangliosides de la série ganglio
- B-  $IV^3$  Neu5Ac<sub>2</sub>,  $III^6$  Neu5Ac-GgOse<sub>4</sub>-Cer , gangliosides de la série ganglio
- C-  $IV^3$  Neu5Ac-nLcOse<sub>4</sub>-Cer , gangliosides de la série lacto
- D-  $V^3$  Neu5Ac<sub>2</sub>-GbOse<sub>5</sub>-Cer , gangliosides de la série globo

D'après H. Wiegandt [64]

### 3- Les sialyltransférases

#### a- Propriétés

Les sialyltransférases (E.C. 2.4.99.1) appartiennent au groupe des glycosyltransférases, et de ce fait, possèdent un certain nombre de caractéristiques en commun avec les autres enzymes de ce groupe. Ce sont les enzymes spécifiques qui transfèrent les acides sialiques sur différents accepteurs. La réaction générale s'écrit:



1- Le glycosyl-nucléotide reconnu par la transférase ( le CMP-acide sialique) présente une anomérie  $\beta$ .

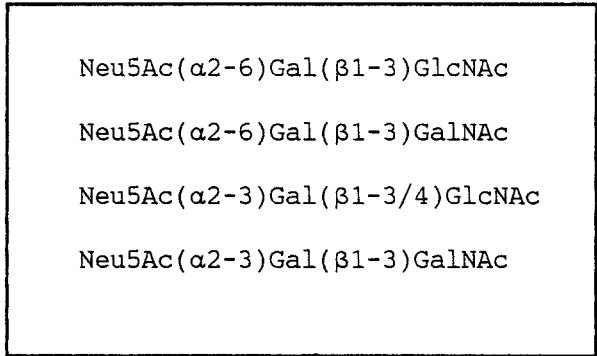
2- L'acide sialique est transféré à l'extrémité non réductrice d'un oligosaccharide accepteur qui peut être une glycoprotéine ou un glycolipide.

3- Une fois transféré, l'acide sialique présente une anomérie  $\alpha$ . Il y a eu inversion de l'anométrie au cours du transfert.

4- Certains ions métalliques ( $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) sont des activateurs des systèmes enzymatiques de glycosylation (Chabaud et al. [65]). En ce qui concerne les sialyltransférases de tissus divers, le manganèse, le magnésium et le calcium ont une influence soit activatrice, soit nulle (Shah et Ragupathy [66], Bauvois et al. [67]).

Les glycosyltransférases sont hautement spécifiques de la base qu'elles reconnaissent, du sucre qu'elles transfèrent, de la liaison qu'elles forment et de l'accepteur. Ces diverses observations ont conduit au concept énoncé en ces termes: "une liaison, un enzyme". En se fondant sur cette hypothèse, et compte tenu des nombreuses possibilités de fixation de l'acide sialique sur les diverses structures

oligosaccharidiques, l'existence d'un nombre au minimum identique de sialyltransférases distinctes a été postulée. Il apparaît, en outre, que le type d'oligosaccharide (N-glycosylprotéine, O-glycosylprotéine ou glycolipide) ainsi que la nature de la liaison glycosidique du pénultième sucre de l'accepteur, influence l'activité sialyltransférase. Ainsi les structures:



sont synthétisées par des enzymes différents (Paulson et al. (1977) [68], Aminoff et al. [69], Rearick et al. [70], Weinstein et al. (1982) [71]). Pour revues, voir Montreuil (1982) [72] et Schauer (1982) [73].

r

#### b- Localisation

La plupart des glycosyltransférases sont liées aux membranes intracellulaires. Les sialyltransférases sont localisées dans l'appareil de Golgi (Fleisher et al. (1969) [74], Munro et al. [75]) et leur site actif est dirigé vers l'intérieur de la lumière golgienne (Fleisher (1981) [76], Carey et Hirschberg [77]).

Certaines glycosyltransférases, en particulier des sialyltransférases (mais aussi des fucosyltransférases) ont été décrites en périphérie de la cellule, associée à la membrane plasmique (Cacan [78]). Pour beaucoup de cellules, ces ectoenzymes ne représentent qu'une faible proportion de l'ensemble de ces mêmes enzymes cellulaires totaux, et leur rôle reste à définir.

Enfin, une activité sialyltransférasique extracellulaire a été détectée dans le colostrum, le lait, mais aussi dans le serum de patients souffrants de tumeurs (Fox et al. [79], Schachter et Roseman [80], Beyer et al. [81]).

Finalement, nous ne connaissons encore que peu de choses sur la compartimentation intracellulaire de ces glycosyltransférases et pourquoi elles sont retrouvées dans les sécrétions extracellulaires. Toutefois, il est supposé que les enzymes intracellulaires sont enchassés dans les membranes et que ceux trouvés dans les sécrétions résulteraient de leur dégradation protéolytique.

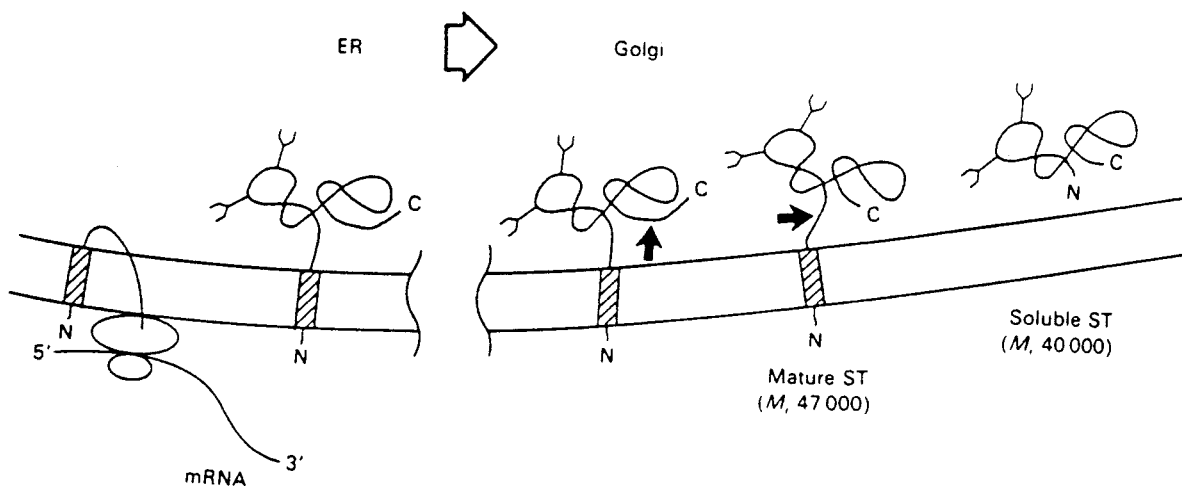




Fig 6: Schématisation de la biosynthèse, topologie et des modifications posttraductionnelles de la  $\beta$ -galactoside  $\alpha$ 2,6sialyltransférase selon Paulson et al. (1987) [82].

Légende:  protéase golgienne  
 N-glycane

c- Caractérisation

Depuis la première description d'une sialyltransférase (cytidine monophosphate-N-acétylneuraminique acide: D-galactosyl-glycoprotéine N-acétylneuraminyltransférase E.C. 2.4.99.1), d'origine bactérienne (Kundig et al. [83]), de très nombreuses sialyltransférases ont pu être caractérisées (Schauer (1982) [84]). Parmi toutes ces transférases d'origines diverses, quelques-unes parmi les plus connues et les plus faciles à isoler ont été purifiées en plusieurs étapes, entre autres par chromatographie d'affinité (sur CDP-hexanolamine-Sépharose par exemple). Les principales sialyltransférases purifiées sont présentées dans le tableau suivant:

TABLEAU III: Exemples de sialyltransférases purifiées.

<u>Structure acceptrice</u>	<u>Liaison formée</u>	<u>Source</u>	<u>Référence</u>
Gal( $\beta$ 1-3/4)GlcNAc-R	$\alpha$ 2-3	foie de Rat	Weinstein <u>et al.</u> [85]
Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc-R	$\alpha$ 2-6	foie de Rat	Miagi <u>et al.</u> [86]
Asialo- $\alpha$ <sub>1</sub> -glyco-protéine acide	$\alpha$ 2-6	colostrum de Vache	Paulson <u>et al.</u> [87] Hesford <u>et al.</u> [88]
GalNAc-Ser	$\alpha$ 2-6	glandes sous-maxillaires de Porc	Sadler <u>et al.</u> [89] Weinstein <u>et al.</u> [90]
asialomucine sous-maxillaire ovine	$\alpha$ 2-6	glandes sous-maxillaire bovine	Higa <u>et al.</u> [91]
Gal( $\beta$ 1-3)GalNAc-Ser	$\alpha$ 2-3	glandes sous-maxillaire de Porc	Sadler <u>et al.</u> [92]

d- Intérêt des sialyltransférases purifiées

L'utilisation de sialyltransférases pures a permis de restaurer l'activité biologique de certains glycoconjugués désialylés, de déterminer leur spécificité vis-à-vis du substrat et vis-à-vis de l'accepteur, spécificité qui d'ailleurs n'est pas limitée au Neu5Ac mais

s'étend également aux autres acides sialiques, en particulier le Neu5Gc (Schauer et al. (1972) [93], Schauer et Wember [94], Joziassse et al. [95]).

Roth et al. (1985) [96] utilisent des anticorps spécifiques dirigés contre la Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc  $\alpha$ 2-6 sialyltransférase pour localiser une activité sialyltransférasique dans les hépatocytes de Rat. Ils détectent un marquage immunologique dans les saccules du trans-Golgi ainsi que dans un réseau de membranes attenant au trans-Golgi (TGN = Trans Golgi Network). Aucun marquage immunologique n'est détecté dans le reticulum endoplasmique rugueux, ni dans les lysosomes, ni encore sur la membrane plasmique. De même, les sialyltransférases ont été localisées en microscopie électronique dans les saccules du trans-Golgi de cellules caliciformes intestinales (Roth et al. (1984) [97], Roth et al. (1984) [98], Roth et al. (1986) [99]). Au contraire, dans les cellules entérocytaires de ces mêmes préparations intestinales, les activités sialyltransférasiques sont réparties tout au long du cis- médian- et trans-Golgi. Ces résultats traduisent une variabilité de la répartition des activités sialyltransférasiques tout au long de l'appareil de Golgi selon le type cellulaire étudié.

Très récemment enfin, la structure primaire de la  $\beta$ -galactoside  $\alpha$ 2-6 sialyltransférase de foie de Rat a été déterminée par clonage d'un cDNA (Weinstein et al. (1987) [100]), permettant de clarifier les relations existant entre la forme liée aux membranes et la forme soluble des sialyltransférases. Ces observations suggèrent encore que d'autres glycosyltransférases pourraient partager une topologie similaire.

#### e- Conclusion

Comme nous venons de le voir, il existe un grand nombre de sialyltransférases dont l'expression est sous contrôle génétique. Ces enzymes ont une répartition différente selon les tissus, selon les cellules. L'ensemble de ces observations amène à se poser la question du rôle des acides sialiques liés aux glycoconjugués.



#### 4- Rôles des sialoglycoconjugués

Les acides sialiques sont transférés, en position terminale non réductrice, de glycanes de nombreux glycoconjugués solubles ou membranaires. Il est rapidement apparu que ces composés pouvaient participer de manière active aux phénomènes biologiques régissant les fonctions cellulaires et ceci pour plusieurs raisons:

- \* leur position terminale sur la chaîne oligosaccharidique
- \* leur forte charge électronégative
- \* le nombre élevé de substitutions possibles selon la liaison établie sur l'oligosaccharide, spécifiques de certaines espèces ou de certains tissus
- \* les modifications du comportement biologique des cellules et des molécules désialylées

En fait, la signification biologique des acides sialiques a fait l'objet de nombreuses recherches et revues (Reutter *et al.* (1982) [101], Schauer (1982) [102], Jeanloz et Coddington [103]). C'est pourquoi nous ne citerons que brièvement quelques fonctions principales des acides sialiques, par ailleurs largement décrites par Schauer (1985) [104].

1- Du fait de leur forte charge négative, ils interviennent dans la fixation et le transport des composés chargés positivement (d'ions potassium, ou encore calcium mais aussi des acides aminés...Schauer (1982) [105]).

2- Ils influencent la conformation des protéines. Les acides sialiques confèrent aux sialoglycoprotéines une résistance à la dégradation protéolytique et assurent le maintien d'une activité enzymatique à ces protéines. Par exemple, la présence de résidus d'acides sialiques augmente la viscosité intrinsèque des mucines. Cet effet serait dû aux forces de répulsion qu'engendrent entre elles les molécules d'acide sialique conférant à ces glycoprotéines de haut poids moléculaire cette structure allongée en "forme de batonnet".

3- Les dérivés N- et O-acylés de l'acide neuraminique sont des déterminants antigéniques. Ainsi, le Neu5Gc d'ordinaire absent chez l'homme, est retrouvé dans divers tissus cancéreux humains (antigène de

Hanganutziu-Deicher) (Higashi et al. [106]), où l'on a démontré parallèlement la présence d'anticorps spécifiques. Ils contribuent également à la spécificité des groupes sanguins M et N (Sadler et al. [107]).

4- Les acides sialiques participent au transfert d'informations. En effet, les sialoglycoconjugués jouent un rôle dans les interactions des cellules avec certaines hormones ("thyroid-stimulating hormone": TSH, la gonadotrophine ...), toxines (du tétanos, du choléra ...), ou avec certains virus (Sendai, Influenza) et mycoplasmes.

5- Inversement, et c'est peut être le rôle le plus important des acides sialiques, ceux-ci peuvent masquer un site spécifique de reconnaissance sur un résidu galactose, sur un récepteur ou encore sur un antigène (pour revue voir Schauer et al. (1988) [108]).

#### 5- Conclusion

Les acides sialiques, constituants essentiels de nombreux glycoconjugués, sont donc associés à un certain nombre de processus biologiques, en termes d'effets directs ou indirects.

\* Les effets directs qui sembleraient résulter essentiellement des propriétés chimiques de l'acide sialique (en particulier de son groupe carboxylique) qui joue le rôle d'un "récepteur" de molécules solubles (Schauer et al. (1988) [109]).

\* Les effets indirects sont attribués au "masque" que constitue l'acide sialique pour les structures environnantes.

A l'issue de ce premier chapitre, il apparaît que les différents intervenants de la réaction de sialylation sont synthétisés et localisés dans différents compartiments subcellulaires. Ainsi, dans la cellule eucaryote, le processus de sialylation se déroule dans les lumières de l'appareil de Golgi où se trouvent sialyltransférases et structures acceptrices, alors que les donneurs d'acide sialique sont localisés dans

le cytoplasme. Cette ségrégation des molécules glycosylées dans un compartiment subcellulaire pose immédiatement le problème du passage des résidus glycosyl sur le lieu de glycosylation.

Au cours du chapitre suivant, nous rappellerons brièvement les différents modes de passage utilisés par diverses substances pour passer au travers d'une membrane biologique et nous résumerons l'état de nos connaissances concernant le transport des glycosyl-nucléotides aux sites de glycosylation.

## II- LA TOPOLOGIE DE LA REACTION DE SIALYLATION

### A- Le transport de substances au travers d'une membrane biologique

Le rôle premier d'une membrane biologique est de permettre le maintien des propriétés différentes de part et d'autre de la membrane et d'établir ainsi l'apparition de compartiments. La présence d'une membrane biologique s'oppose à la libre diffusion des macromolécules et son caractère hydrophobe freine fortement la diffusion passive des solutés hydrophiles et des ions. Le flux de ces molécules au travers des membranes biologiques est régulée de façon très précise par des systèmes de transports spécifiques. Pour revue, voir Schechter [110].

#### 1- La diffusion passive

Dans le cas d'une diffusion passive, les molécules passent l'écran lipidique sans intervention de transporteurs et sans apport d'énergie métabolique.

Le mouvement net des molécules se fait selon le gradient de concentration, et la vitesse de diffusion s'arrête spontanément lorsque les concentrations sont égales de part et d'autre de la membrane. Dans le cas d'une substance chargée, le potentiel électrique transmembranaire doit être également pris en compte. Plus la densité de charge électrique est grande, plus la vitesse de diffusion est lente. Il existe aussi une

corrélation étroite entre le coefficient de perméabilité d'une part et la liposolubilité de la substance d'autre part. La vitesse de pénétration d'une substance dans la bicouche lipidique est d'autant plus grande que sa liposolubilité est grande.

## 2- La diffusion facilitée

Le transport de certains solutés présente des caractéristiques incompatibles avec une diffusion passive:

\* Ils diffusent beaucoup plus vite que ne le laisse prévoir leur caractère hydrophile ou leur taille.

\* La vitesse de diffusion présente une saturation lorsque la concentration externe du soluté augmente.

Les lois classiques de la diffusion ne rendent pas compte de ce phénomène. L'expression la plus adéquate des cinétiques observées est voisine du traitement mathématique proposé par Michaelis et Menten pour la catalyse enzymatique. Elle admet une interaction spécifique entre le soluté et un constituant membranaire, le plus souvent une protéine qui reconnaît et fixe de manière plus ou moins spécifique le soluté et en accélère son transport. Cette représentation permet de définir par le biais de la notation inverse (Lineweaver et Burk) avec précision une vitesse maximale  $V_{max}$  et une constante d'affinité apparente  $K_m$  qui correspond à la concentration du soluté pour laquelle  $v = V_{max}/2$

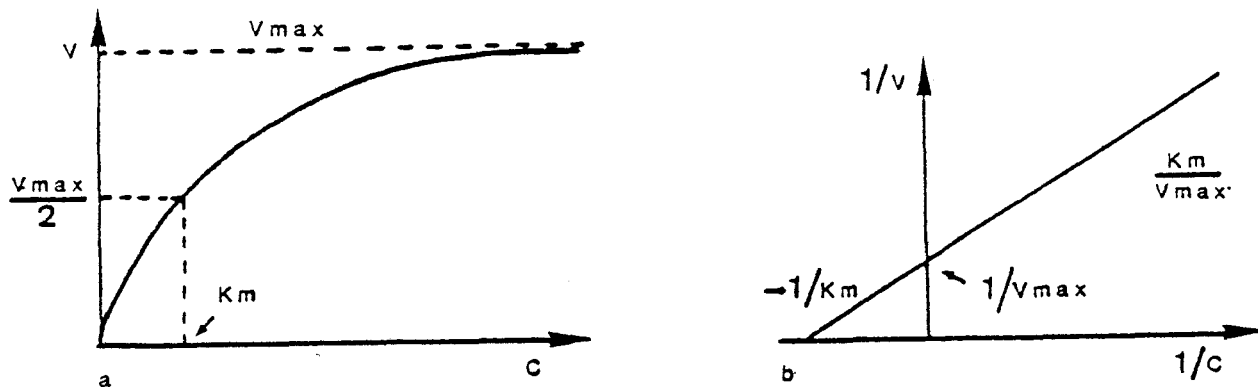


Fig. 7: Relation entre le flux  $v$  et la concentration  $C$  du soluté

a- Evolution du flux transmembranaire en fonction de la concentration en soluté perméant.

b- Représentation en double inverse selon Lineweaver et Burk donnant

\* ordonnée à l'origine:  $1/v_{\max}$

\* abscisse à l'origine:  $1/K_m$

\* pente:  $K_m/v_{\max}$

Cependant, cette représentation ne doit pas être considérée comme décrivant strictement les mécanismes du transport, mais plutôt comme une manière commode de caractériser et de comparer différentes préparations biologiques qui effectuent le même type de transport (dans le cas des canaux ioniques par exemple, il n'y a pas d'interaction type enzyme-substrat entre l'ion et le canal).

En plus du phénomène de saturation, la diffusion facilitée présente d'autres caractéristiques:

\* Ce type de transport est fortement dépendant de la température. Dans la mesure où une protéine est impliquée dans ce phénomène de transport, il y a activation exponentielle du transport puis dénaturation du transporteur avec l'augmentation de la température (l'effet du pH est similaire)

\* Le transport par diffusion facilitée est fortement spécifique: la molécule de transporteur présente une structure adaptée à une seule substance, parfois à quelques composés chimiquement voisins. Cette spécificité est telle que la distinction existe parfois entre des isomères optiques de certains solutés. Ainsi, le L-glucose n'est pas transporté alors que le D-glucose est rapidement transféré dans les hématies. De ce fait, il existe une inhibition compétitive de certains transports facilités, c'est à dire que des analogues structuraux de certains solutés entrent en compétition pour les mêmes sites de fixation sur le transporteur. Par exemple, la L-leucine inhibe la diffusion facilitée de la L-alanine.

Cependant, la répartition de certaines substances ne peut s'expliquer uniquement en termes d'équilibre passif et de diffusion facilitée qui conduisent toujours à un équilibre des concentrations. Il existe un mécanisme capable de maintenir des différences de concentration importantes de part et d'autre de la membrane plasmique: c'est le transport actif.

### 3- Le transport actif

Le transport actif est un mécanisme qui permet de maintenir des différences de concentration de part et d'autre d'une membrane. Il requiert un apport d'énergie, ne peut avoir lieu spontanément et est toujours lié à une réaction exergonique. Selon la nature de cette réaction exergonique, on définit deux grandes classes de transports actifs:

- \* Les transports actifs primaires
- \* Les transports actifs secondaires

a- Les transports actifs primaires

Dans la majorité des cas, la réaction exergonique qui apporte de l'énergie est l'hydrolyse de l'ATP. C'est une ATPase membranaire qui sert d'intermédiaire commun c'est-à-dire qu'elle catalyse deux transformations:

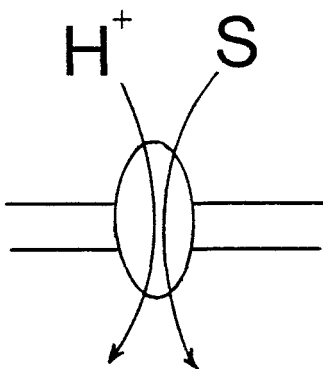
- \* L'hydrolyse de l'ATP
- \* Le transport des ions

La transformation exergonique à laquelle est couplé le transport actif primaire d'ions peut aussi être une succession d'oxydo-réductions. Dans ce cas, c'est un complexe enzymatique membranaire qui sert d'intermédiaire commun. Citons la chaîne respiratoire mitochondriale où l'ion transporté activement est l'ion  $H^+$ .

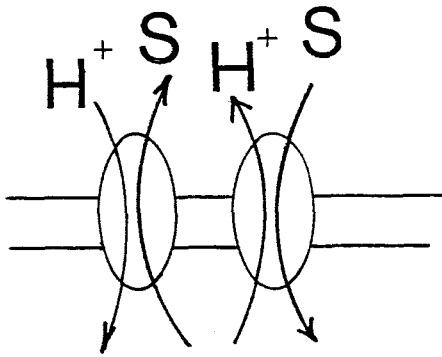
b- Les transports actifs secondaires

Le transport actif secondaire est le transport actif d'un soluté couplé à la diffusion d'un second soluté. La diffusion de ce second soluté se fait dans le sens de son potentiel électrochimique décroissant. C'est l'ion moteur. Le transporteur qui permet le couplage entre la diffusion facilitée de l'ion moteur et le transport actif d'un soluté est appelé un port (il s'agit d'un port, lieu d'entrée et non d'un pore).

\* SYMPORT



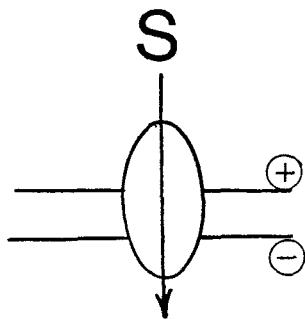
Si la diffusion de l'ion et le transport actif se font dans la même direction, on parle d'un symport ou d'un cotransport. C'est le cas par exemple du cotransport du L-lactate et du  $Na^+$  dans les membranes de la bordure en brosse de vésicules de rein de Cheval (Mengual et al. [111]).



\* ANTIPOORT

Si la diffusion de l'ion et le transport actif du soluté s'effectuent en sens opposés on parle d'un antiport ou d'un contretransport. Un exemple de ce système nous est donné par l'antiport cation-proton trouvé dans le placenta humain (Ganapathy et al. [112]).

\* UNIPOORT



La notion du transport actif secondaire peut s'étendre au transport actif d'un soluté non couplé directement à la diffusion d'un ion moteur. En effet, un soluté chargé peut s'accumuler en réponse à une différence de potentiel électrique transmembraire créée par le transport actif primaire d'un ion. Le transporteur qui catalyse le transport de ce soluté à travers la membrane est un uniport. C'est le cas de l'uniport au  $Ca^{++}$  trouvé dans les mitochondries de foie de Rat (Krönen [113]).

Enfin, précisons encore que le transport peut être électroneutre ou électrogénique. Il est électroneutre si le transport du soluté par l'intermédiaire du transporteur s'effectue sans transport net de charge, il est électrogénique dans le cas contraire.

**B- Le transport des glycosyl-nucléotides aux sites de glycosylation**

Comme nous l'avons souligné auparavant, dans les cellules, la plupart des glycosyltransférases sont localisées dans la lumière des vésicules intracellulaires (lumière du reticulum endoplasmique rugueux et lumière de l'appareil de Golgi) (Carey et Hirschberg [114], Fleisher



[115]), tandis que les glycosyl-nucléotides sont présents dans le cytoplasme, de l'autre côté de la barrière membranaire. Ceci soulève la question du **passage des glycosyl-nucléotides au travers de la membrane**. Celui-ci peut se faire de deux manières différentes soit par simple diffusion, soit via un transporteur.

Deux stratégies de recherche ont été utilisées pour étudier le mécanisme du passage des glycosyl-nucléotides dans les vésicules intracellulaires:

- 1- L'utilisation de fractions subcellulaires
- 2- L'utilisation de cellules perméabilisées

#### 1- L'utilisation de fractions subcellulaires

##### a- Principe

L'utilisation de fractions enrichies en vésicules dérivées de l'appareil de Golgi ou de reticulum endoplasmique rugueux de foie de Rat (ou de Souris) a permis à Hirschberg et son équipe de mettre en évidence un transporteur spécifique de l'UDP-GlcNAc, de l'UDP-GalNAc, de l'UDP-Xyl, de l'UDP-GlcUA, du PAPS, du CMP-Neu5Ac et du GDP-Fuc. Bien que les conditions d'expérimentation ne soient pas identiques dans chaque cas, le principe de base est similaire, voir Perez et al. (1987) [116], et peut se résumer comme suit:

Les vésicules dérivées du Golgi (ou du RER), dont on a prouvé l'intégrité et la même orientation qu'*in vivo*, sont incubées avec le donneur de sucre marqué. Après incubation, la réaction est arrêtée par dilution, les vésicules sont lavées et à nouveau isolées par plusieurs cycles d'ultracentrifugation. L'utilisation d'agents pénétrants, le [2-<sup>3</sup>H] deoxyglucose par exemple, permet le calcul du volume interne des vésicules donc des concentrations intravésiculaires en glycosyl-nucléotides.

Cependant, ce premier type d'approche fait apparaître deux inconvénients majeurs:

\* D'une part, jusqu'à présent, aucune méthode ne permet d'obtenir des fractions golgiennes ou du RER parfaitement pures qui ne soient absolument pas contaminées par d'autres éléments subcellulaires possédant une ou des activités glycosyltransférasiques. Il est donc nécessaire de connaître le degré de pureté des fractions utilisées, ce qui se fait par détection de l'activité enzymatique d'enzymes marqueurs de chacun des compartiments cellulaires.

\* D'autre part, la manipulation de fractions subcellulaires nécessite des ultracentrifugations de longue durée, qui conduisent inévitablement à la dégradation des précurseurs marqués utilisés. Pour limiter cette cause d'erreurs, une autre technique a été décrite par Fleischer, [117] qui sépare rapidement les vésicules de leur milieu d'incubation par filtration sur filtres Millipore de 0,22  $\mu\text{m}$ .

#### b- Transport du CMP-Neu5Ac, du GDP-Fuc et du PAPS

##### $\alpha$ - Mise en évidence

Dès 1980, Carey et al. (1980) [118], montrent l'existence d'un passage du CMP-Neu5Ac dans les microsomes de foie de Souris, d'une manière suggérant la présence d'un transporteur. Sommers et Hirschberg [119] poursuivent avec plus de précision l'étude de ce transport, dans des vésicules dérivées de l'appareil de Golgi de foie de Rat. Il est dépendant de la température, inhibé par des analogues de substrats, le 5'CMP en particulier, mais encore le 5'UMP ou le CDP (Capasso et Hirschberg (1984) [120]) et est saturable pour de fortes concentrations en CMP-Neu5Ac. Ils déterminent une affinité apparente de 2,4  $\mu\text{M}$  et une vitesse maximale 150 pmol/mg protéine/min.

De la même manière, ils mettent en évidence un transport spécifique de GDP-Fuc dans les vésicules golgiennes de foie de Rat, dépendant de la température, saturable (affinité apparente de 7,4  $\mu\text{M}$  et une vitesse maximale de 14 pmol/mg protéine/min.), inhibé par des analogues de substrat (le GDP en particulier, mais notons également l'effet du GMP et du GTP) (Capasso et Hirschberg (1984) [121]).

Le passage de l'adénosine 3'-phosphate 5'phosphosulfate (PAPS) dans des vésicules dérivées de Golgi de foie de Rat a été également décrit par Schwarz et al. [122]. Ce nucléotide synthétisé à partir d'ATP et de sulfate inorganique, dans le cytosol (Robbins et Lipmann [123]), est le donneur de sulfate dans la biosynthèse de composés tels que les glycosaminoglycannes, des glycosphingolipides ou de certaines hormones stéroïdes, réactions qui sont localisées dans la lumière golgienne (Carey et Hirschberg [124]). Ils montrent que la molécule de PAPS, dans son entier, est transportée dans la lumière du Golgi. Ce transport dépend de la température, est saturable (affinité apparente de 0,7  $\mu\text{M}$  et vitesse maximale de 25 pmol/mg protéine/10 min.), est inhibé par des analogues de substrats (en particulier le 3'5'ADP), mais est très peu inhibé par le 3'AMP ou le 2'5'ADP (Capasso et Hirschberg (1984) [125]).

Un prétraitement des vésicules golgiennes à la pronase, dans des conditions où les sialyltransférases, enzymes marqueurs du Golgi ne sont pas affectées (Carey et Hirschberg [126]), inhibe le transport de ces glycosyl-nucléotides de 80 à 90%: les transporteurs seraient des protéines membranaires, dont une partie serait accessible face cytoplasmique.

Le GDP-Fuc, le CMP-Neu5Ac et le PAPS sont sous forme anionique à pH physiologique. C'est pourquoi, Capasso et Hirschberg ont utilisé des inhibiteurs du transport des anions, tel que l'acide 4,4'-diisothiocyanostilbène-2,2'-disulfonique (DIDS) ou l'acide 4-acétamido-4'-isothiocyanostilbène-2,2'-disulfonique (SITS), dans le but d'identifier voire même d'isoler l'un de ces transporteurs. Ils constatent une inhibition du transport de ces glycosyl-nucléotides; Cependant, ces inhibiteurs n'étant pas spécifiques d'un transporteur particulier, leur intérêt s'en est trouvé fort amoindri (Capasso et Hirschberg [127]).

Le palmitoyl coenzyme A, l'atractyloside et le carboxyatractyloside sont de puissants inhibiteurs de la translocase ATP/ADP des mitochondries. Ils inhibent aux mêmes concentrations qu'ils affectent le transport ATP/ADP, le transport du PAPS à l'intérieur des vésicules golgiennes. Ces inhibiteurs sont spécifiques du transport du

nucléotide-sulfate et le transport des glycosyl-nucléotides n'est pas affecté. Le transporteur du PAPS présenterait donc des analogies structurales avec la translocase ATP/ADP. Mais ces deux transporteurs sont deux entités différentes car le PAPS n'est pas transporté à l'intérieur des mitochondries.

#### β- Mécanisme du transport

Les études de Capasso et Hirschberg (1984) [128] ont apporté un certain nombre d'éléments concernant la reconnaissance des glycosyl-nucléotides et du nucléotide-sulfate par le transporteur. D'après ces auteurs, le résultat le plus intéressant de leurs travaux est l'observation que le type de nucléoside (purique ou pyrimidique), et non le sucre du glycosyl-nucléotide est l'élément indispensable permettant la liaison au transporteur. Ainsi, l'UMP et le CMP mais non l'AMP inhibent de manière compétitive le transport du CMP-Neu5Ac. Par contre, le Neu5Ac lui, n'a aucun effet.

La position du groupement phosphate est un autre point structural important dans le phénomène de reconnaissance: ainsi, le 5'-CMP, mais non le 3'-CMP, ni le 2'-CMP, inhibe le transport du CMP-Neu5Ac.

Mais quelle est la "force motrice" de ce transport permettant l'entrée du glycosyl-nucléotide dans les saccules golgiens et parfois même son accumulation?

\* S'agit-il d'un transport actif, nécessitant un apport direct d'ATP? Capasso et Hirschberg montrent que l'apport de concentrations importantes en ATP n'affecte en rien le transport des glycosyl-nucléotides (Capasso et Hirschberg [129]).

\* S'agit-il d'un transport facilité par mise en jeu d'un gradient de concentration ou d'un couplage avec un gradient électrochimique?

L'incubation de vésicules golgiennes avec de la valinomycine à 20 µg/ml, ou de la nigéricine à 10 µg/ml, ou du carbonyl cyanide

p-trifluoro-méthoxy phényl hydrazone à 10  $\mu$ M, ou de l'insuline à une unité/ml, ou de la cytochalasine B à 2  $\mu$ g/ml, ou de la monensine à 20  $\mu$ M n'a pas d'effet notable sur le transport du PAPS.

Or la valinomycine, ionophore à ions potassium, abolit les gradients de potassium, et la nigrécine, elle, abolit les gradients de protons (Hale et Williamson [130]).

Quant à la monensine, c'est un ionophore carboxylique pour les cations monovalents qui inhibe par ailleurs les transports intracellulaires des protéines de sécrétion.

L'insuline à court ou à moyen terme module l'activité de la membrane plasmique (potentiels membranaires, transport des sucres, des acides aminés et des ions).

Enfin, la cytochalasine B est un inhibiteur réversible de la motilité cellulaire. Cette substance agit au niveau des microfilaments d'actine qu'elle dépolymérise et de la membrane plasmique en décrochant les microfilaments d'actine.

L'ensemble de ces résultats suggère donc que le transport des glycosyl-nucléotides ne nécessite pas d'apport direct d'énergie et qu'il n'est pas couplé à un gradient de protons.

Capasso et Hirschberg [131] proposent un mécanisme pour l'entrée du GDP-Fuc dans des vésicules dérivées de l'appareil de Golgi. Le transport du GDP-Fuc résulterait d'un échange équimolaire entre une molécule de GDP-Fuc qui entrerait dans les vésicules et une molécule de GMP qui retournerait dans le cytoplasme. L'existence d'un antiport semblable permettant l'entrée des glycosyl-nucléotides grâce à un échange avec le nucléoside monophosphate correspondant a été ainsi suggéré pour le CMP-Neu5Ac/CMP, l'UDP-GlcNAc/UMP, le PAPS/AMP. Ces faits sont réunis dans le schéma de la figure 8.

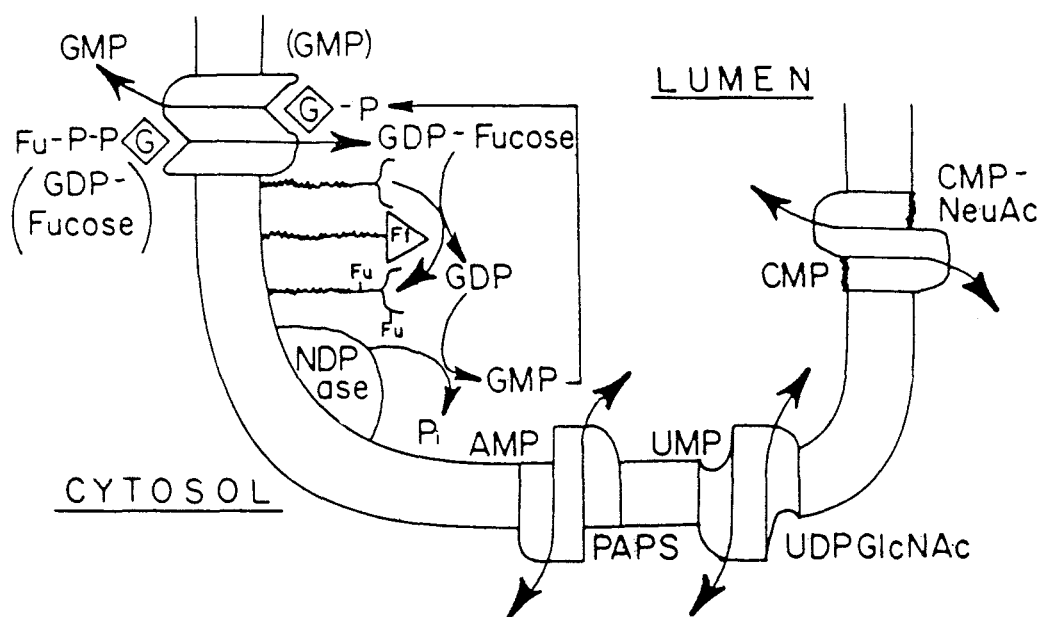


Fig. 8: Mécanisme de transport des glycosyl-nucléotides et du PAPS au travers des membranes golgiennes (d'après Capasso et Hirschberg -131-)

#### τ- Purification du transporteur de CMP-Neu5Ac

Bien des questions demeurent encore, entre autres:

\* Quelle est la localisation précise des transporteurs dans l'appareil de Golgi et quelle est leur relation avec les glycosyltransférases correspondantes?

\* Ces transporteurs sont-ils soumis à une régulation qui par là-même modifierait le taux de glycosylation ou de sulfatation des lipides et protéines?

C'est à ces questions qu'ont tenté de répondre Milla et Hirschberg en réintégrant dans des protéoliposomes de phosphatidylcholine, les transporteurs de CMP-Neu5Ac et du PAPS (Milla et Hirschberg [132]). Ils parviennent ainsi à reconstituer le transport du CMP-Neu5Ac et du PAPS dont les caractéristiques sont très similaires à celles déjà décrites dans les vésicules dérivées de l'appareil de Golgi. En fait, il s'agit

là d'une première étape dans la purification et la caractérisation complète des transporteurs. Cette purification devrait permettre de répondre à toutes ces questions.

c- Transport de l'UDP-Xyl, l'UDP-GlcUA et de l'UDP-GalNAc

Ces trois glycosyl-nucléotides sont les donneurs de sucre dans la réaction de biosynthèse des O-glycosylprotéines; Le xylose et la N-acétylgalactosamine sont les monosaccharides intervenant dans la liaison peptide-glycane des mucines et des protéoglycannes respectivement. Des transporteurs spécifiques de chacun de ces trois glycosyl-nucléotides ont été localisés par l'équipe d'Hirschberg dans les membranes de vésicules dérivant de l'appareil de Golgi de foie de Rat (Abeijon et Hirschberg [133]).

Ces auteurs décrivent également un transport d'UDP-GalNAc dans des vésicules purifiées du RER de foie de Rat. Toutefois la vitesse maximale de ce transport est 4 à 6 fois moins importante que celle du transport golgien, et comme l'activité N-acétylgalactosaminyltransférase sur accepteurs endogènes est localisée uniquement dans les vésicules golgiennes, ces observations ont conduit les auteurs à émettre l'hypothèse d'un passage non spécifique de l'UDP-GalNAc dans le RER. On pourrait penser que l'UDP-GalNAc emprunte un autre transporteur localisé dans les membranes du RER.

De même, Nuwayhid et al. [134] décrivent une entrée de l'UDP-Xyl dans les vésicules du RER et l'expliquent par la mise en jeu du transporteur d'UDP-Glc.

En ce qui concerne l'UDP-GlcUA, Nuwayhid et al. en localisent le transport dans le Golgi essentiellement, mais font référence à un transport 10 à 25 fois moins important dans les vésicules du RER. Cette étude sera reprise par Hauser et al. qui caractérisent ce transporteur dans les vésicules du RER de foie de Rat. L'UDP-GlcNAc ainsi transporté sert de substrat aux glucuronosyltransférases dans la réaction de glucuronosylation de la bilirubine ou des acides biliaries, par exemple (Hauser et al. [135]).

d- Transport de l'UDP-Gal

Utilisant des vésicules golgiennes de glandes mammaires de Ratte en lactation, Kuhn et White [136-138] ont suggéré que l'UDP-Gal pénétrait de manière spécifique, probablement par transport facilité, au travers des membranes golgiennes, permettant ainsi la synthèse du lactose (voir figure 9).

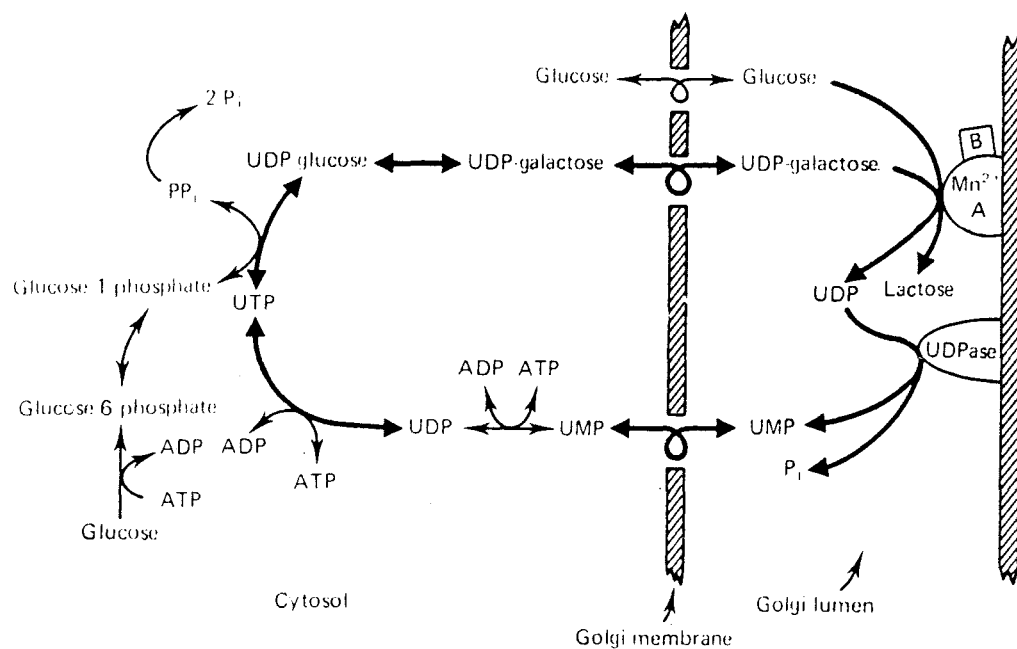


Fig. 9: Schéma hypothétique de la synthèse du lactose montrant les relations entre la lumière golgienne et le cytoplasme (d'après Kuhn et White -138-) A: Galactosyltransférase; B: α-lactalbumine;  $\leftrightarrow$  Transport facilité.

Fleischer met en évidence, dans des vésicules golgiennes de foie de Rat, la présence d'une réserve intravésiculaire d'UDP-Gal. Elle suggère que ce glycosyl-nucléotide traverserait les membranes de l'appareil de Golgi grâce à un transporteur spécifique et servirait de substrat à la galactosyltransférase intraluminale (voir figure 10) (Fleisher (1983) [139]).



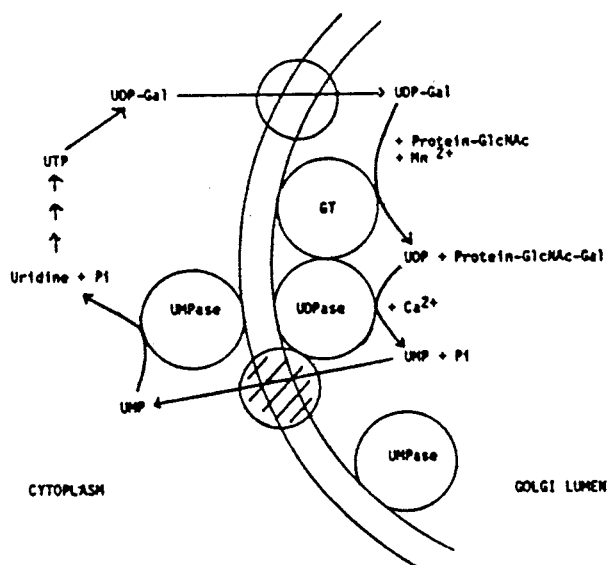


Fig. 10: Représentation schématique de la localisation des transporteurs et des enzymes dans la membrane golgienne de foie de Rat (d'après Fleischer -139-) GT: Galactosyltransférase.

L'UDP-Gal est transporté par une protéine intégrée dans les membranes golgiennes, dont une partie fait face au cytoplasme, à l'intérieur des vésicules golgiennes où il servira de substrat pour la synthèse du ganglioside GM1 (Yusuf et al. [140]). Après action de la galactosyltransférase, l'UDP libéré est rapidement dégradé par une UDPase intracisternale et l'UMP formé à l'intérieur des vésicules retourne dans le cytoplasme, permettant l'élimination de l'UDP, puissant inhibiteur de la galactosyltransférase.

e- Transport de l'UDP-GlcNAc, de l'UDP-Glc et du GDP-Man

Perez et Hirschberg (1984) [141] ont montré l'existence d'un transporteur de l'UDP-GlcNAc dans des vésicules dérivées du reticulum endoplasmique rugueux de foie de Rat ainsi que dans des vésicules dérivées du Golgi de foie de Rat. Des résultats préliminaires ont montré que l'UDP-GlcNAc entré dans les vésicules grâce à un échange avec de l'UMP intraluminal. Toutefois, la question de la signification physiologique du transport de l'UDP-GlcNAc dans les vésicules du RER reste posée. En effet, la topologie des réactions qui conduisent à la synthèse de l'oligosaccharidyl pyrophospho-dolichol n'est pas encore clairement établie (figure 11)

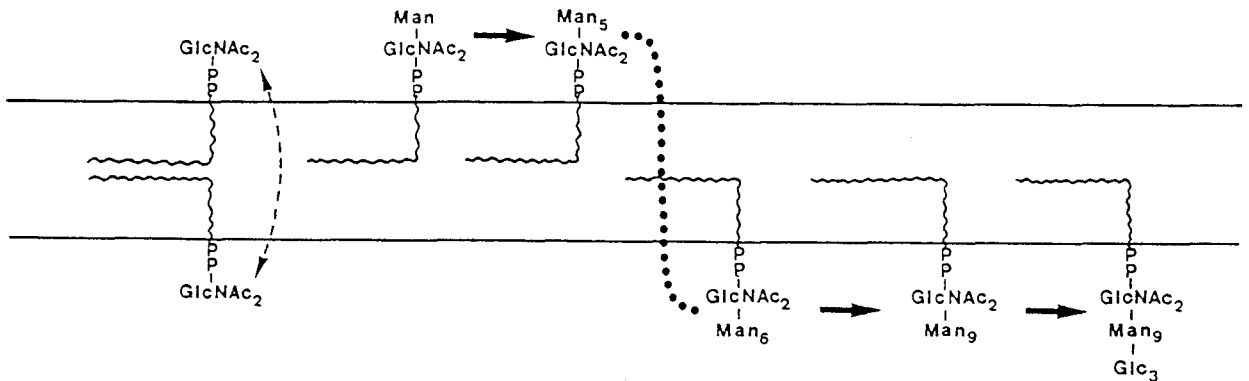


Fig. 11: Schéma possible du passage des intermédiaires lipidiques dans la lumière du RER.

Perez et Hirschberg (1986) [142] suggèrent que l'UDP-GlcNAc est transporté dans la lumière du RER, la formation du Dol-PP-GlcNAc s'effectuant dans la lumière du RER et non du côté cytosolique comme l'ont suggéré Lennarz et al. [143].

Le groupe de Got (Persat et al. [144]) a décrit un couplage entre la synthèse de l'UDP-Glc par la pyrophosphorylase et son transport à l'intérieur des vésicules golgiennes de foie de Chat. Ce couplage serait réalisé par un voisinage étroit entre le site de synthèse du glycosyl-nucléotide et le site de reconnaissance du transporteur, conférant ainsi un avantage cinétique au transporteur. Cette synthèse locale s'avèrerait indispensable pour fournir efficacement aux saccules golgiens le glycosyl-nucléotide lorsqu'il est également utilisé de façon importante dans le cytoplasme.

Ainsi, Coste [145] démontre la synthèse de glucoside céramides marqués sur la face cytoplasmique de vésicules golgiennes lorsque celles-ci sont incubées en présence d'UDP-[<sup>14</sup>C]Glc.

Citons enfin les travaux de Perez et Hirschberg [146] concernant l'entrée de l'UDP-Glc. Ils décrivent une accumulation de l'UDP-Glc 4,5 fois moins importante dans des vésicules golgiennes de foie de Rat que dans des vésicules du RER. Selon eux, l'UDP-Glc ne semble pas faire

l'objet d'un transport dans l'appareil de Golgi.

Au cours de la même étude, ils constatent que le GDP-Man n'est pas transporté ni dans le RER , ni dans le Golgi de foie de Rat.

#### f- Transport de l'ATP

La phosphorylation des protéoglycannes et des protéines de sécrétion telles que les caséines ou la vitellogénine est une modification post-traductionnelle intervenant sans doute dans la lumière du Golgi. Très récemment, Capasso et al. (1989) [147] ont montré l'existence d'un transport d'ATP, le donneur de phosphate, dans des vésicules dérivées de l'appareil de Golgi de foie de Rat et de glande mammaire. La molécule entière d'ATP passe dans la lumière de l'appareil de Golgi selon un processus saturable, dépendant de la température, en échange d'une molécule d'AMP intraluminale.

#### g- Conclusion

Le tableau IV récapitule l'ensemble des résultats obtenus in vitro sur des vésicules isolées pour les différents glycosyl-nucléotides intervenant dans la biosynthèse des glycoconjugués.

TABLEAU IV: Récapitulatif des différents transporteurs mis en évidence  
leur localisation intracellulaire et leurs caractéristiques  
cinétiques

molécule transportée	molécule échangée	localisation	affinité apparente	vitesse maximale	références
			Km ( $\mu\text{M}$ )	Vmax (pmol/mg/min)	
UDP-GalNAc	UMP	Golgi (foie Rat)	10	380	Abeijon [148]
UDP-Xyl	UMP	Golgi (foie Rat)	4,1	114,5	Nuwayhid [149]
UDP-GlcUA	UMP	Golgi (foie Rat)	4,9	171,5	"
UDP-GlcUA	?	RER (foie Rat)	1,9	443	Hauser [150]
UDP-GlcUA	?	SER (foie Rat)	1,3	503	"
PAPS	AMP	Golgi (foie Rat)	0,7	2,5	Schwarz [151]
UDP-GlcNAc	?	RER (foie Rat)	2,5	17,8	Perez [152]
UDP-GlcNAc	?	Golgi (foie Rat)	8,1	349	"
CMP-Neu5Ac	CMP	Golgi (foie Rat)	2,4	15	Sommers [153]
CMP-Neu5Ac	?	Microsomes (foie Souris)	0,6	1,2	Carey [154]
GDP-Fuc	GMP	Golgi (foie Rat)	7,5	1,4	Sommers [155]
UDP-Gal	UMP	Golgi (CHO)	2,5	0,91	Deutscher [156]
UDP-Glc	UMP	Golgi (foie Rat)	75	0,13	Persat [157]
		RER (foie Rat)	3,8	9,7	Perez [158]

Selon Hirschberg, le transport d'un glycosyl-nucléotide dans les vésicules intracellulaires répond aux caractéristiques suivantes (Perez et Hirschberg (1986) [159]):

- \* Le transport doit être spécifique d'un organite
- \* Il doit être saturable, dépendant de la température et inhibé par des analogues de substrat
- \* Le glycosyl-nucléotide doit être transporté intact
- \* Le transport dans la lumière doit être suivi par le transfert du sucre sur des accepteurs endogènes
- \* Le transport doit être inhibé par un prétraitement par les protéases dans les conditions où les sialyltransférases ne sont pas affectées
- \* Le transport doit être spécifique d'un glycosyl-nucléotide donné, ce qui implique donc l'existence de différents transporteurs
- \* Le transport s'effectue via un antiport entre le glycosyl-nucléotide et le nucléoside monophosphate correspondant.

## 2- L'utilisation de cellules perméabilisées

### a- Principe

La seconde méthodologie d'approche dans l'étude de la glycosylation concerne l'utilisation de cellules perméabilisées. Différents types de traitement permettent de rendre la membrane plasmique perméable aux macromolécules exogènes d'ordinaire non perméantes. Ainsi Cecchelli et al. décrivent l'utilisation de thymocytes de Souris dont la membrane plasmique a été rendue perméable par un traitement au chlorure d'ammonium 0,154 M à 20°C, pendant 30 minutes, Cecchelli et al. (1983) [160]. Les cellules ainsi perméabilisées sont incubées en présence du glycosyl-nucléotide radiomarqué. Après lavages et centrifugations à basse vitesse, la radioactivité accumulée dans les vésicules est déterminée. Ce modèle d'étude simple et très rapide a permis de mettre en évidence le transport des glycosyl-nucléotides dans les vésicules intracellulaires, conduisant à la formation d'une réserve de donneurs de sucres directement utilisables par les glycosyltransférases, Cacan et al. (1984) [161]. Il permet l'étude des phénomènes de transport *in situ*,

sans recourir à l'utilisation de fractions membranaires. Cette technique permet également de modifier le contenu du cytosol, sans toutefois faire varier de façon trop importante la composition à l'intérieur des vésicules, ce que ne permet pas la technique de fractionnement cellulaire, comme le soulignent eux-même Perez et Hirschberg (1986) [162]. Ce modèle a cependant des limites; il est, en effet impossible de faire la différence entre les vésicules du reticulum endoplasmique rugueux et les vésicules de l'appareil de Golgi. Ceci a amené les auteurs à utiliser d'autres approches (la monensine en particulier) pour localiser plus précisément les transporteurs, Cecchelli et al. (1986) [163].

#### b- Les transporteurs de glycosyl-nucléotides

α- Formation de réserves intracisternales de glycosyl-nucléotides.

Les thymocytes de Souris, perméabilisés par traitement au chlorure d'ammonium 0,154 M, ont permis de confirmer et compléter les travaux d'Hirschberg quant à l'existence de transporteurs spécifiques du CMP-Neu5Ac, du GDP-Fuc et de l'UDP-Gal. Ces transports sont saturables en fonction de la concentration en substrat, inhibés par des analogues de substrat et dépendant de la température. Cacan et al. (1984) [164] ont montré, en outre, qu'ils conduisaient à la formation d'une réserve intracisternale de précurseurs tout au moins pour le GDP-Fuc et le CMP-Neu5Ac. Car, dans le cas de l'UDP-Gal, l'activité de son transporteur ne permet pas *in vitro* comme *in vivo* la formation d'une réserve intravésiculaire d'UDP-Gal. L'absence d'une réserve endogène d'UDP-Gal pourrait s'expliquer par une vitesse de transfert des résidus galactosyl supérieure à la vitesse d'entrée de ce glycosyl-nucléotide à l'intérieur des vésicules. C'est le transport qui limite le transfert du sucre sur les accepteurs.

#### β- Transport de l'UDP-GlcNAc

Grâce à ce même modèle de thymocytes de Souris dont la membrane plasmique a été perméabilisée par traitement au chlorure d'ammonium, la présence d'un transporteur de l'UDP-GlcNAc répondant aux mêmes

caractéristiques que les précédents, a été démontrée par Cecchelli et al. (1985) [165]. Dans le même temps, cette présence fut confirmée par Perez et Hirschberg dans des vésicules du RER de foie de Rat (1985) [166]. Il a été également constaté que l'UDP-GlcNAc entré, constituait une réserve intragolgienne d'UDP-GlcNAc, tant *in vitro*, qu'*in vivo*. Mais l'existence d'un transporteur d'UDP-GlcNAc dans le reticulum endoplasmique rugueux ne peut être écarté, Cecchelli et al. (1986) [167].

#### τ- Mécanisme d'entrée des glycosyl-nucléotides

L'existence d'antiports pour chacun des glycosyl-nucléotides postulée par Capasso et Hirschberg [168], a pu être démontrée, grâce à ce modèle, pour l'UDP-Gal et l'UDP-GlcNAc. Utilisant des thymocytes dont la membrane plasmique a été perméabilisée par traitement au chlorure d'ammonium, Cecchelli et al. montrent qu'après avoir "chargé" les vésicules intracellulaires en glycosyl-nucléotide, l'addition du nucléoside diphosphate correspondant à une concentration supérieure à celle du glycosyl-nucléotide dans le milieu d'incubation provoque une sortie rapide du glycosyl-nucléotide contenu dans les vésicules intracellulaires. Cette sortie est strictement dépendante du nucléoside diphosphate correspondant, conduisant à un échange électrogénique. L'expérience inverse a été aussi réalisée, montrant que l'entrée du glycosyl-nucléotide est corrélée à la sortie du nucléoside diphosphate correspondant (Cecchelli et al. (1986) [169]).

L'antiport précédemment décrit par Hirschberg reposait sur un échange entre le glycosyl-nucléotide et le nucléoside monophosphate, conduisant là, à un échange électroneutre. Comment expliquer cette différence? Elle peut se justifier par les modifications dans la composition ionique, et enzymatique des milieux intravésiculaires lors de leur préparation. L'isolement de fractions membranaires entraîne la concentration d'enzymes associées à ces fractions membranaires en particulier, des UDPases ou GDPases golgiennes (Capasso et Hirschberg [170]). Leur activité enzymatique conduit à la dégradation rapide des nucléosides diphosphate en nucléosides monophosphate correspondants, soulevant la question du devenir des phosphates à l'intérieur des microsomes lors de cette dégradation.

Avec le modèle des cellules perméabilisées, les antiports suivants ont été mis en évidence:

UDP-GlcNAc/UDP

UDP-Gal/UDP

et des travaux complémentaires ont démontré l'existence d'antiports

CMP-NeuAc/CMP

GDP-Fuc/GDP

Ces faits sont résumés dans la figure 12

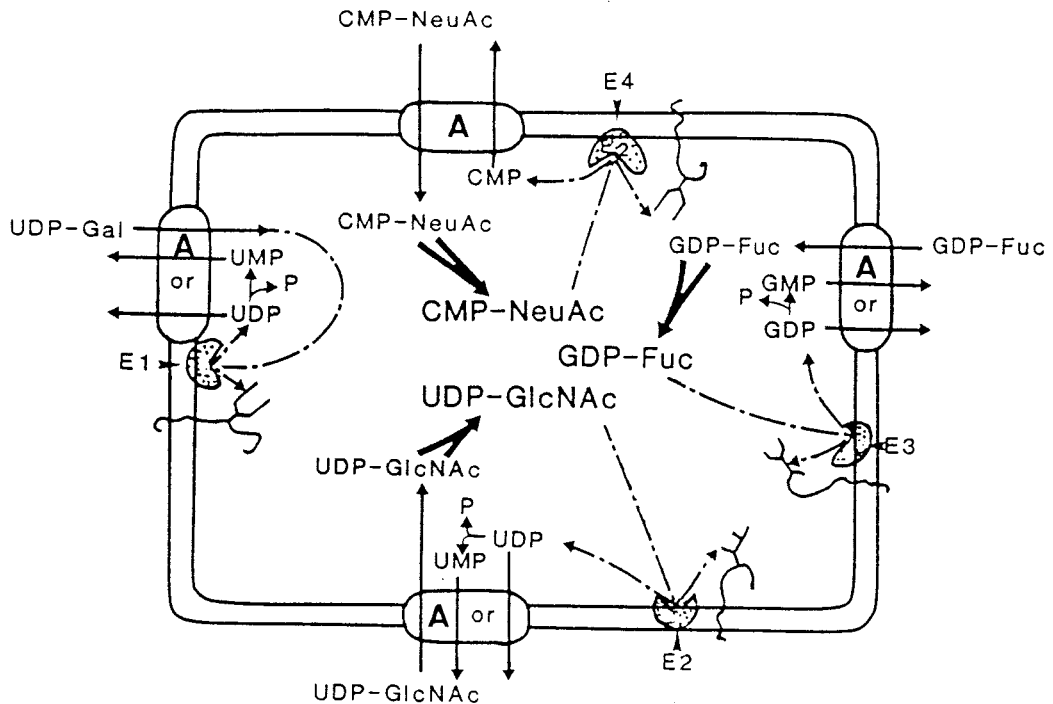


Fig. 12: Mécanisme d'entrée des glycosyl-nucléotides dans les vésicules golgiennes et formation de réserves intracisternales.

A: antiport

E<sub>1</sub>: galactosyltransférase

E<sub>2</sub>: N-acétylglucosaminyltransférase

E<sub>3</sub>: fucosyltransférase

E<sub>4</sub>: sialyltransférase



### 3- Signification physiologique des transporteurs de glycosyl-nucléotides dans les vésicules de l'appareil de Golgi

Suite à la découverte de ces transporteurs de glycosyl-nucléotides dans les membranes de l'appareil de Golgi, de nombreuses questions ont été soulevées, en particulier, quant à l'importance physiologique de ces transporteurs.

La mise au point de souches cellulaires mutantes déficientes dans une réaction particulière de glycosylation est d'un intérêt inestimable pour les études biochimiques, génétiques et des fonctions des glycanes Stanley (1987) [171]. Plusieurs clones de cellules d'ovaires de Hamster Chinois ont été sélectionnés pour leur résistance aux effets toxiques d'une lectine du germe de blé (Wheat Germ Agglutinin: WGA), dont les clones 13 et 1021.

Bien que les activités sialyltransférasiques et le nombre d'accepteurs soient identiques à ceux rencontrés chez les cellules sauvages (CHO), les mutants 1021 présentent une réduction d'environ 90% de la sialylation des glycoprotéines et des glycolipides. De même les clones 13, dont l'activité galactosyltransférasique et le nombre d'accepteurs sont normaux, montrent une réduction de 80% à 90% de la galactosylation et de la sialylation de leurs glycolipides et de leurs glycoprotéines (Briles et al. [172], Stanley (1980) [173]).

Le groupe d'Hirschberg a montré que les cellules Lec 2, qui appartiennent au même groupe de complémentation que le clone 1021 décrit par Briles et al. , ne transportent le CMP-Neu5Ac qu'à environ 2% du taux du transport observé dans les vésicules isolées à partir de cellules de type sauvage. Quoiqu'il en soit, le transport des autres glycosyl-nucléotides n'est pas affecté, ce qui confirme la spécificité des transporteurs pour un glycosyl-nucléotide donné. Ce résultat montre qu'il existe bien *in vivo* un transporteur de CMP-Neu5Ac, et que le phénotype Lec 2 est dû à une déficience du transporteur lui-même (Deutscher et al. [174]).

L'équipe d'Hirschberg a également montré que les cellules mutantes Lec 8 qui appartiennent au même groupe de complémentation que le clone 13, sont déficientes dans le transport de l'UDP-Gal, alors que le transport des autres glycosyl-nucléotides n'est pas affecté (Deutscher et Hirschberg [175]). Cette dernière observation renforce l'idée de transporteurs spécifiques existant pour chacun des glycosyl-nucléotides.

Ces transporteurs pourraient faire eux-mêmes l'objet d'une régulation et ainsi contrôler le degré de sialylation des protéines et des lipides dans la cellule.

### III- CONCLUSION GENERALE

Les chapitres précédents rapportent de façon synthétique les données actuelles concernant la sialylation des glycoconjugués. Les acides sialiques sont successivement synthétisés, activés, modifiés, transportés et intégrés dans les glycoconjugués. Ceci soulève un certain nombre de questions loin d'être résolues.

Les enzymes de la biosynthèse de l'acide N-acétylneuraminique ont été localisés dans le cytosol, mais l'on connaît très peu de choses sur la régulation de cette synthèse, sur l'intervention possible d'hormones, ou d'autres effecteurs. Les acides sialiques sont ensuite activés par le CTP sous forme de CMP-acide sialique dans le noyau des cellules. Cette localisation particulière de la CMP-Neu5Ac synthétase n'est pas encore comprise, mais pourrait être interprétée comme une forme de régulation de la biosynthèse des sialoglycoconjugués.

Interviennent alors différentes modifications de ces donneurs d'acide sialique, en particulier l'une d'elles fait l'objet de nombreuses recherches actuelles; l'hydroxylation du CMP-Neu5Ac conduisant à la formation du CMP-Neu5Gc: la réaction est catalysée par une monooxygénase (EC. 1.14.99.18) dépendante du  $\text{NAD(P)H, H}^+$ , de l'oxygène et des ions ferreux  $\text{Fe}^{2+}$ . Elle est localisée dans le cytoplasme. Son activité spécifique détermine-t-elle le taux de Neu5Gc ou Neu5Ac sur les glycoconjugués ?

Puis les CMP-acides sialiques passent du compartiment cytosolique, aux sites de glycosylation par l'intermédiaire d'un transporteur localisé dans les membranes de l'appareil de Golgi. Enfin, dans l'appareil de Golgi se trouvent des sialyltransférases spécifiques qui assurent leur transfert sur des accepteurs endogènes.

Nous nous sommes plus particulièrement intéressée à l'une de ces étapes: le transport des acides sialiques du cytoplasme aux sites de glycosylation. Notre but à long terme était de purifier le transporteur du CMP-Neu5Ac. Mais, pour aller plus en avant dans notre projet, il nous fallait au préalable déterminer les paramètres de fonctionnement de ce transporteur, les spécificités de substrat, pour envisager à plus long terme son repérage parmi les autres constituants membranaires et son isolement.

# Travaux Personnels

INTRODUCTION:

Notre but était l'étude du transport des CMP-acides sialiques du cytoplasme aux sites de glycosylation.

Il nous fallait, dans un premier temps, rechercher un modèle d'étude qui nous permettrait d'étudier ce phénomène de transport du CMP-Neu5Ac *in situ*, en limitant au maximum les altérations de l'organisation interne de la cellule, sans recourir à l'utilisation de fractions membranaires. La méthode des cellules perméabilisées nous est apparue comme étant la plus adéquate: les enzymes et les transporteurs impliqués dans la réaction de sialylation conservent leur place originelle dans la cellule et les réactions ainsi mesurées se rapprochent beaucoup de celles mesurées *in vivo*. En outre, nous avons utilisé des cellules ovariennes de Hamster chinois (CHO), dont l'une des souches, les cellules Lec 2 présentent une déficience dans le transport du CMP-Neu5Ac dans l'appareil de Golgi. Ces cellules mutantes nous ont ainsi servi de témoins négatifs.

Dans un second temps, la préparation de vésicules golgiennes purifiées nous a permis de distinguer la contribution des diverses membranes impliquées et d'étudier le transporteur du CMP-Neu5Ac, sans interférence avec le métabolisme cellulaire.

Enfin, nous avons montré que le CMP-Neu5Gc, synthétisé dans le cytoplasme à partir du CMP-Neu5Ac par une hydroxylase, est transporté dans des vésicules golgiennes dérivées des hépatocytes de Souris. De plus, nos résultats ont prouvé que le CMP-Neu5Gc partage le même transporteur que le CMP-Neu5Ac.

## CHAPITRE I

### I- CHOIX D'UN MODELE CELLULAIRE: LES CELLULES PERMEABILISEES.

#### A- le type cellulaire

Pour l'étude du transport des CMP-acides sialiques, nous avons utilisé des cellules fibroblastiques, les CHO.

\* La lignée parentale est auxotrophe pour la proline et est notée Pro<sup>-5</sup>. L'intérêt de l'utilisation d'un tel matériel réside dans le fait que ces cellules poussent en culture, soit en monocouche, soit en suspension. Elles sont alors, facilement contrôlables dans leur morphologie, leur nombre, leur état physiologique et surtout, peuvent être rapidement disponibles pour utilisation et ceci sans traitement enzymatique. D'autre part, elles ne sont pas soumises à régulation par des systèmes hormonaux ou immunologiques comme dans un organisme.

\* De plus, l'existence de mutants cellulaires des cellules CHO dont le génotype implique une déficience dans la glycosylation, a définitivement orienté notre choix vers l'utilisation de ces cellules. Briles et al. [175] ont montré que les cellules CHO mutantes Lec 2 sont hyposialylées alors qu'elles possèdent un taux normal d'accepteurs glycoprotéiniques et glycolipidiques, de précurseurs donneurs de sucres (le CMP-Neu5Ac) et de sialyltransférases. Il s'avère que les CHO mutantes sont déficientes dans le transport du CMP-Neu5Ac du compartiment cytoplasmique aux sites de glycosylation comme l'ont montré Deutscher et al. [176], dans des expériences réalisées *in vitro*.

---

Les cellules CHO Pro<sup>-5</sup> et Lec 2 nous ont été fournies par P. Stanley (Albert Einstein College of Medicine of Yeshiva University 1300 Morris Park Avenue, Bronx, N. Y. 10461) que nous remercions.

Les cultures de cellules CHO Pro<sup>-5</sup> et Lec2 ont été réalisées par Mme M. Coniez que nous remercions.

Le type cellulaire à utiliser étant déterminé, il nous fallait perméabiliser les cellules CHO, de façon à ce que les substrats radioactifs (CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac, CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Gc...) deviennent accessibles aux transporteurs golgiens. En essayant divers procédés de perméabilisation de la membrane plasmique applicables aux cellules CHO, il nous est apparu qu'il n'existait pas une méthode standard de perméabilisation, et que le choix de cette méthode dépendait du type cellulaire et de la composition de la membrane cellulaire (voir annexe).

## **B- Perméabilisation de la membrane plasmique par choc thermique**

Nous avons recherché un moyen efficace et rapide à mettre en oeuvre pour perméabiliser sélectivement la membrane plasmique de ces cellules, sans affecter l'intégrité des membranes intracellulaires. La méthode des chocs thermiques s'est avérée être une méthode de choix dans la perméabilisation de la membrane plasmique des cellules CHO, voir annexe.

### **1- Effet sur la membrane plasmique**

Les cellules sauvages sont cultivées en suspension puis scindées en deux lots. Après centrifugation à basse vitesse, une première population est congelée à -80°C puis rapidement décongelée. La seconde n'est pas soumise au choc thermique, et sert ainsi de référence.

Les cellules sont alors incubées 2 minutes à 37°C en présence de 20 µM de CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac radioactif dont on veut mesurer le transport dans les vésicules intracellulaires. Les culots cellulaires sont alors lavés plusieurs fois par la solution tampon décrite par Cox et Peters [177], dans le but d'éliminer toute radioactivité extracellulaire et cytoplasmique (puisque la membrane plasmique est rendue perméable).

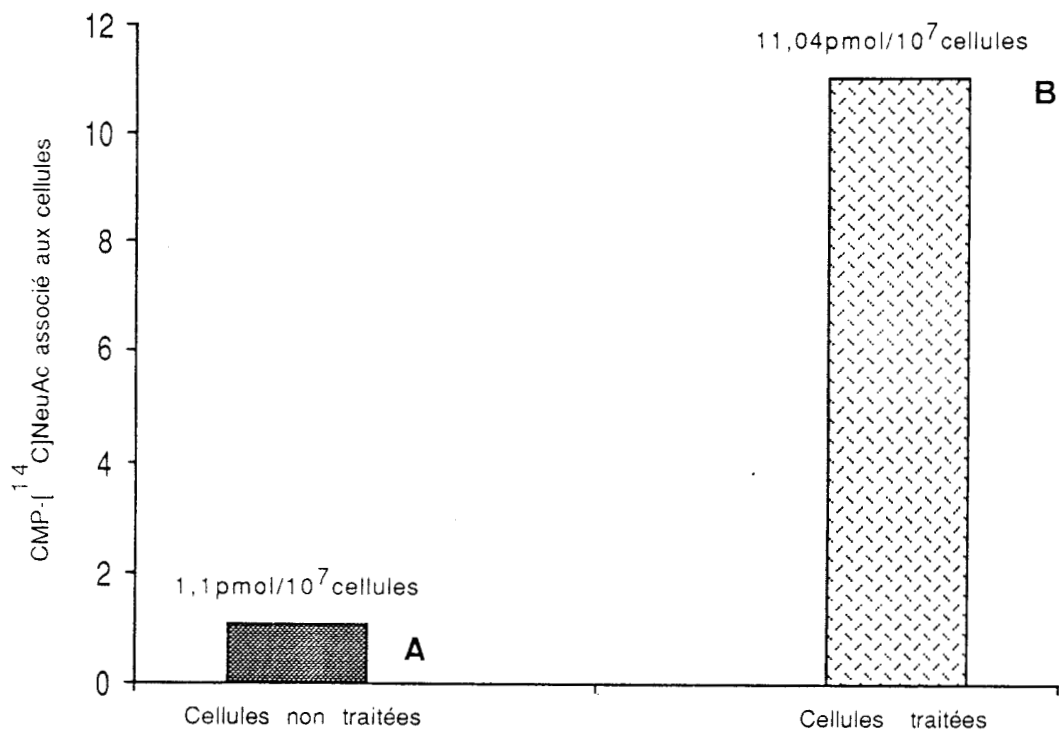


Fig. 13: Effet du choc thermique sur la membrane plasmique.

A : cellules n'ayant pas subi de chocs thermiques

B : cellules traitées par congélation/décongélation

Sur ce graphe nous constatons que 10 fois plus de matériel radioactif reste piégé dans les vésicules intracellulaires des cellules CHO ayant subi un choc thermique, que dans les cellules CHO non traitées.

Cette observation nous amène à conclure que le choc thermique permet l'entrée et l'utilisation du CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac dans des compartiments intracellulaires. La membrane plasmique a donc été perméabilisée, comme en atteste par ailleurs le test d'exclusion au bleu Trypan (voir matériels et méthodes). Le CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac radioactif devient alors accessible aux transporteurs des membranes intracellulaires.



Bien sûr, de telles expérimentations suscitent un certain nombre de questions, entre autres:

\* Le CMP-Neu5Ac est-il bien entré dans un compartiment sub-cellulaire? N'est-il pas adsorbé sur la membrane plasmique ou sur les membranes intracellulaires?

\* Les lavages par centrifugations à basse vitesse sont-ils efficaces?

Pour répondre à toutes ces questions, nous avons incubé des cellules CHO perméabilisées par congélation/décongélation en présence de CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac et d'inuline [<sup>3</sup>H]. L'inuline est une molécule hydrosoluble qui, comme le CMP-Neu5Ac, ne pénètre pas, d'ordinaire, dans les cellules intactes. Ce fructosane de haut poids moléculaire ne pénètre pas non plus dans les vésicules intracellulaires du RER ou de l'appareil de Golgi mais demeure dans le compartiment cytoplasmique des cellules perméabilisées, constituant ainsi un marqueur du milieu extramicrosomal. De fait, après lavages répétés des cellules perméabilisées, la totalité du tritium est éliminée de la cellule, alors que le carbone 14 reste associé à la cellule. Le CMP-[<sup>14</sup>C]NeuAc entre dans un compartiment subcellulaire où il demeure enfermé alors que l'insuline est éliminée lors des lavages par centrifugations à basse vitesse.

## 2- Effets sur les membranes intracellulaires

Nous avons également vérifié que l'intégrité des membranes intracellulaires et la répartition des sialyltransférases n'étaient pas affectées dans les cellules CHO perméabilisées (des 2 types sauvage et mutant), par congélation/décongélation. Ceci a été réalisé par des expériences de latence des sialyltransférases.

TABLEAU V: *Activité sialyltransférasiques des cellules CHO type sauvage et type mutant.*

Les essais sont réalisés comme décrit dans la section matériels et méthodes, en présence 4,2  $\mu\text{M}$  de CMP- $^{14}\text{C}$ Neu5Ac radioactif, avec ou sans accepteur macromoléculaire exogène (1 mg d'asialofétuine). Les cellules perméabilisées sont incubées dans ce milieu réactionnel, en présence ou non de Triton X-100 (1% final) dans un volume total de 100  $\mu\text{l}$ , pendant 10 minutes à 37°C. Les résultats présentés sont une moyenne + ou - SD (déviation standard, indiquée entre parenthèses) en CPM pour  $10^7$  cellules.

	sans accepteur exogène	avec accepteur exogène (asialofétuine)		latence
	+	-	+	
Cellules sauvages	166 (34,6)	1150 (42)	11115 (1506)	98,5
Cellules mutantes	886 (24)	1935 (177)	12510 (2705)	92,9

Ce tableau montre que les sialyltransférases, dont le site actif est dirigé vers la lumière des vésicules golgiennes, voient leur activité enzymatique libérée après action du Triton X-100, à 1%. Le Triton X-100 est un détergent non ionique qui solubilise les membranes. La latence des sialyltransférases sur accepteur exogène (l'asialofétuine) est importante puisqu'elle est respectivement de 98,5% et de 92,9% dans les cellules sauvages et les cellules mutantes. La perméabilisation de la membrane plasmique par congélation/décongélation n'entraîne pas celle des membranes intracellulaires et ne perturbe pas l'activité enzymatique des sialyltransférases. Les compartiments intracellulaires restent scellés et conservent la même orientation qu'*in vivo*.

Il est à remarquer que l'activité sialyltransférase est cinq fois supérieure sur accepteur endogène et en présence de Triton X100 à 1%, dans les cellules CHO de type mutant (par rapport aux cellules de type sauvage), alors que cette activité sur accepteur exogène en présence de Triton X100 est sensiblement la même dans les deux types cellulaires. Ceci peut s'expliquer par le taux de sialylation différent des accepteurs endogènes de chaque type cellulaire: les glycoconjugués des cellules CHO mutantes ne sont pas ou peu sialylés et possèdent, de ce fait, plus de sites disponibles pour la sialylation. Mais nous reviendrons ultérieurement sur ce point.

## **II- CHOIX DES CELLULES PERMEABILISEES POUR LA CARACTERISATION DU PASSAGE DU CMP-Neu5Ac DANS LES VESICULES INTRACELLULAIRES.**

Nous avons montré que les cellules CHO perméabilisées par congélation/décongélation constituent un modèle de choix pour étudier le passage du CMP-Neu5Ac dans les vésicules intracellulaires.

### **A- Variation du transport du CMP-Neu5Ac au cours du temps**

La figure 14 montre que le passage du CMP-Neu5Ac radioactif dans les vésicules intracellulaires est fonction du temps d'incubation des cellules CHO perméabilisées avec le CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac.

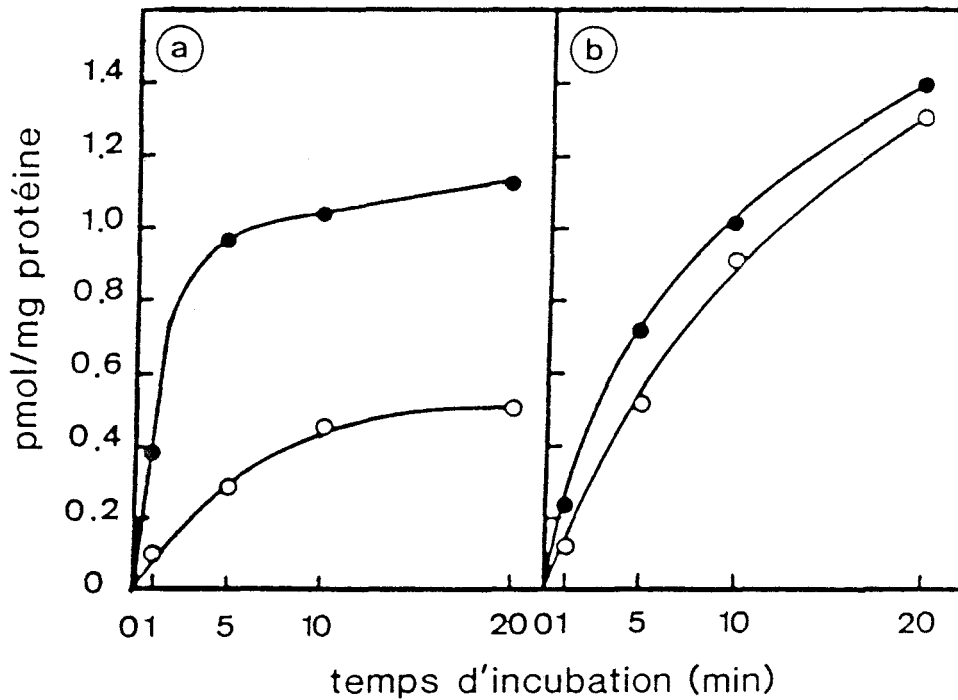


Fig. 14: Etude cinétique du transport et du transfert du CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac dans les cellules CHO de type sauvage (a) et mutantes (b)

Les incubations sont réalisées comme décrit dans la section matériels et méthodes, en présence de CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac 4,2  $\mu$ M. La totalité de la radioactivité associée aux cellules (transport ●—●) et la radioactivité liée de façon covalente aux protéines (transfert ○—○) sont mesurées.

Nous constatons que l'entrée du CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac radioactif dans les vésicules intracellulaires des cellules perméabilisées est très rapide les quatre premières minutes et se stabilise ensuite. Ceci traduit la rapidité du phénomène d'entrée du CMP-Neu5Ac dans les vésicules intracellulaires, ce qui nous a conduit à utiliser des temps courts d'incubation, de l'ordre de quatre minutes, pour respecter les conditions de vitesse initiale.

Mais le fait le plus intéressant est qu'il existe pour chaque temps d'incubation, une différence entre la radioactivité totale associée aux cellules (le transport) et la radioactivité liée de façon covalente aux accepteurs endogènes (le transfert). Autrement dit, il existe une radioactivité acido-soluble, accumulée dans les vésicules intracellulaires que des lavages répétés de la cellule perméabilisée n'ont pas éliminée.

Afin de connaître la nature de cette radioactivité présente dans les vésicules intracellulaires, nous avons procédé à son analyse par chromatographie descendante sur papier Whatman 3 dans le système solvant 7/3 (éthanol/acétate d'ammonium 1 M, pH 7,5), (v/v). Les cellules CHO de type sauvage, perméabilisées sont incubées deux minutes en présence de CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac 8,2 µM. Après plusieurs lavages des cellules par le tampon décrit par Cox et Peters, la radioactivité piégée dans les vésicules est extraite par un mélange 2/1 (éthanol/eau), (v/v). Pour suivre le devenir du CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac dans le milieu extracellulaire, nous avons également analysé une fraction prélevée du premier milieu de lavage du culot cellulaire. Les pistes de migration sont révélées par l'orcinoïl (voir section matériels et méthodes). Cette identification montre que 98% de la radioactivité trouvée dans les vésicules intracellulaires correspond au CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac sous sa forme non dégradée. Le CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac entré dans les vésicules intracellulaires, n'est pas dégradé contrairement à ce qui est observé dans le compartiment extravésiculaire (analyse du milieu d'incubation) où l'on constate que 20% du CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac est dégradé en [<sup>14</sup>C]NeuAc.

Soulignons encore que, contrairement à ces résultats, Hirschberg décrit une telle dégradation du CMP-Neu5Ac à l'intérieur même de microsomes golgiens (Carey et al. [178]). Afin de savoir si cette accumulation de [<sup>14</sup>C]NeuAc libre est le résultat de l'hydrolyse du glycosyl-nucléotide après son transport dans les vésicules golgiennes, ou s'il fait lui-même l'objet d'un transport, Hirschberg incube des préparations golgiennes avec le sucre libre [<sup>14</sup>C]NeuAc à des concentrations comparables à celles trouvées dans le milieu d'incubation. Il n'en résulte aucune accumulation significative du soluté radioactif dans les vésicules, ce qui a permis de conclure que ces composés provenaient du transport du CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac et de sa dégradation intraluminale (Sommers et Hirschberg [179]). Vraisemblablement, la purification de fractions membranaires entraîne-t-elle une concentration en CMPase associée à ces membranes, dont l'action est encore favorisée par les temps longs de réactions et de centrifugations employés.

Sur le graphe (b) de la figure 14 , nous constatons que les cellules CHO Lec 2 perméabilisées, pourtant déficientes dans le transport du CMP-Neu5Ac, sont capables d'utiliser le CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac pour la sialylation de leurs accepteurs endogènes. Le CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac pénètre donc dans les vésicules intracellulaires des cellules CHO mutantes dont nous avons vérifié au préalable l'intégrité et la bonne orientation par l'étude des latences d'enzymes. Ce substrat parvient ainsi aux transférases, qui l'utilisent aussitôt, par un processus qu'il nous reste à préciser puisqu'il n'y a pas ou peu de différence entre le transport et le transfert.

Ces résultats ont permis de montrer que le CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac radioactif pénètre dans les cellules CHO (des deux types) dont la membrane plasmique a été perméabilisée par congélation/décongélation. Cette molécule entre dans les vésicules intracellulaires des cellules CHO par des mécanismes différents qu'il nous reste à préciser.

En second lieu, nous avons constaté qu'une partie de ce donneur de sucre reste piégée dans les vésicules intracellulaires des cellules CHO sauvages, constituant ainsi une réserve intracisternale pour les sialyltransférases. Par contre, cette réserve n'existe pas, ou est très réduite dans les cellules mutantes où le CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac radioactif est tout de suite transféré aux accepteurs endogènes.

#### B- Caractérisation du passage du CMP-Neu5Ac dans les vésicules intracellulaires

Pour savoir si le passage à l'intérieur des vésicules intracellulaires du CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac dans les deux types de cellules CHO perméabilisées se fait par simple diffusion ou par l'intermédiaire d'un transporteur, nous avons examiné quelques critères expérimentaux reconnus pour caractériser un mécanisme de transport, à savoir:

- \* Présenter une courbe de saturation vis-à-vis du substrat
- \* Etre dépendant de la température
- \* Etre spécifique du substrat transporté
- \* Etre inhibé par des analogues du substrat

### 1- Effet de la variation de la concentration en CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac

Un moyen de déterminer si l'entrée d'une substance dans un compartiment se fait par l'intermédiaire d'un transporteur est d'étudier l'effet de la concentration croissante en substrat sur la vitesse de son transport. Nous avons donc étudié la variation du flux du CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac du compartiment cytoplasmique dans la lumière microsomale des cellules CHO des deux types, sauvage et mutant, perméabilisées, en fonction de la concentration en CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac.

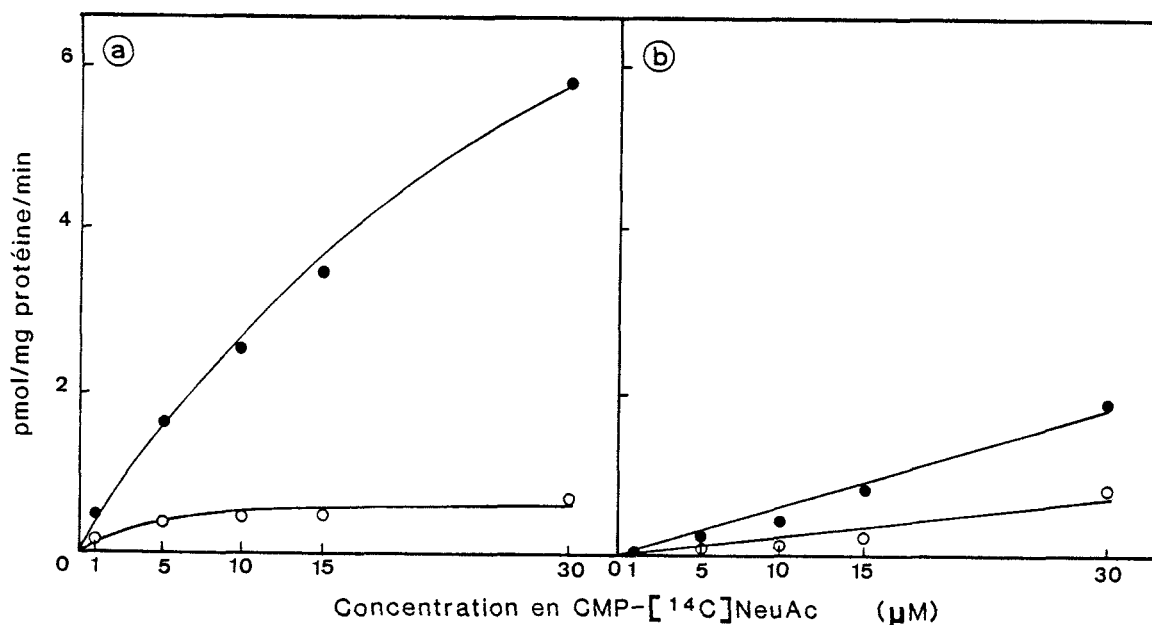
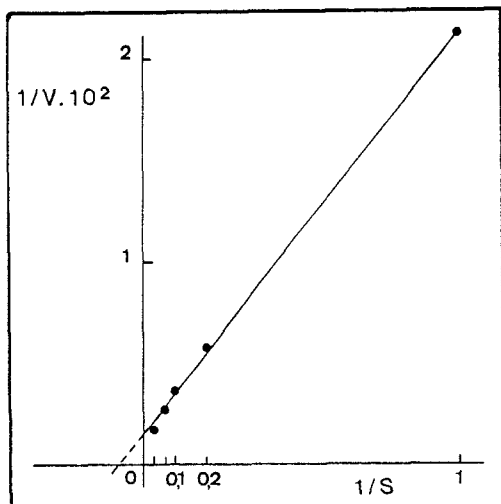


Fig. 15: Effet de la variation de la concentration en CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac.

Les cellules CHO perméabilisées de type sauvage et de type mutant sont incubées 2 minutes à 37°C avec des concentrations variables (1 à 30 µM) de CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac. Après incubation, la radioactivité totale associée aux cellules (transport) (●—●) est déterminée, ainsi que la radioactivité liée de façon covalente aux protéines (transfert) (○—○) comme décrit dans la section matériels et méthodes.

La figure 15 (a) montré que la variation de l'entrée du CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac dans les vésicules intracellulaires des cellules CHO sauvages perméabilisées est saturable. Cette courbe hyperbolique est le reflet de la loi générale de transport d'un substrat par diffusion facilitée. A partir de cette courbe, il est possible de calculer les deux constantes cinétiques qui décrivent ce processus de transport (par analogie au traitement mathématique proposé par Michaelis-Menten pour la catalyse enzymatique. La constante de Michaelis-Menten (Km) représente l'affinité apparente du transporteur pour son substrat, et correspond à la concentration de substrat nécessaire pour atteindre la moitié de la vitesse maximale (Vmax) qui est atteinte par le système de transport dans les conditions d'étude à pH, force ionique et température données.



La représentation en double inverse de Lineweaver et Burk est en faveur d'un système de transport spécifique pour le passage du CMP-Neu5Ac dans la lumière des vésicules intracellulaires. Les constantes cinétiques (la constante d'affinité apparente Km et la vitesse maximale Vmax) sont calculées par régression linéaire des résultats de la représentation de Lineweaver et Burk. Le Km est de 12,6  $\mu$ M et la Vmax de 6,53 pmol/mg protéines/min.

La figure 15 (b) indique que l'entrée du CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac dans les vésicules intracellulaires des cellules CHO type mutant varie linéairement en fonction de la concentration du substrat transporté. Cette réaction d'ordre 1 vis-à-vis du substrat élimine l'hypothèse de la présence d'un transporteur du CMP-Neu5Ac dans les vésicules intracellulaires. D'autre part, il s'agit d'un phénomène beaucoup plus lent que le phénomène saturable observé pour les cellules CHO sauvages, ne repr sant que 12 à 22% du transport observé dans les cellules sauvages (voir figure 15).



Il est à remarquer encore que ces entrées du CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac par des voies différentes dans chacun de deux types cellulaires conduisent également à des allures de courbes différentes pour le transfert du [<sup>14</sup>C]NeuAc sur les accepteurs endogènes. Rapidement, l'ensemble des sites accepteurs d'acide sialique des cellules sauvages sont sialylés (la courbe s'infléchit et atteint un plateau) et il y a une accumulation croissante du CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac libre dans les vésicules.

Par contre, pour les cellules CHO mutantes, le CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac entré dans les vésicules intracellulaires est immédiatement utilisé par les sialyltransférases. Le CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac ne s'accumule pratiquement pas dans les vésicules intracellulaires des cellules CHO mutantes, sauf toutefois pour de très fortes concentrations en substrat. Ces résultats s'expliquent par la qualité des accepteurs endogènes présents dans les vésicules intracellulaires des deux types de cellules.

Nous avons vérifié l'hyposialylation des glycoconjugués des cellules CHO mutantes par la résistance qu'elles acquièrent aux effets toxiques de la lectine de germe de blé (wheat germ agglutinin: WGA). Il s'agit d'ailleurs d'un test de sélection de ces cellules mutantes utilisé par Briles et al. [180]., et nous avons constaté qu'en effet, la WGA n'a aucun effet toxique sur les cellules CHO mutantes. La WGA reconnaissant et se fixant sur les structures sialylées, nous avons conclu, en première approximation, à une hyposialylation des cellules CHO mutantes. Ces résultats ont été confirmés par l'analyse du contenu en acide sialique des glycoprotéines des deux types cellulaires. Après hydrolyse des acides sialiques par un mélange H<sub>2</sub>O/acide formique, pH 2, 1 heure à 80°C, nous avons réalisé le microdosage du chromophore formé par la réaction de Warren en HPLC selon la méthode décrite par Powell et Hart [181]. L'acide sialique représente 1,99 (+ ou - 0,15 nmol/mg prot.) pour les cellules CHO de type mutant et 9,38 (+ ou - 0,78 nmol/mg prot.) pour les cellules CHO de type sauvage. Ces résultats montrent le faible niveau d'utilisation du CMP-Neu5Ac *in vivo* dans les cellules CHO mutantes conduisant à 20% de sialylation des glycoprotéines par rapport aux cellules CHO sauvages.

## 2- Effet de la température

Un mécanisme de transport présente une température optimale; En deçà et au-delà, l'activité de transport diminue, inhibée par le froid ou la chaleur. Ainsi à 4°C, l'activité du transport du CMP-Neu5Ac dans les cellules CHO type sauvage perméabilisées représente 7% de l'activité de transport du CMP-Neu5Ac à 37°C, qui est la température optimale.

## 3- Propriétés du système de transport du CMP-Neu5Ac

### a- Spécificité du substrat transporté

Outre qu'il présente un phénomène de saturation pour des concentrations élevées en substrat, un système faisant intervenir un transporteur se caractérise encore par une haute spécificité en substrat; Seules, quelques molécules de structures voisines sont acceptées par un transporteur donné et peuvent se comporter l'une par rapport à l'autre, comme des inhibiteurs par compétition pour les mêmes sites de fixation sur le transporteur.

Nous avons réalisé une série d'études sur l'effet produit par différents substrats non radioactifs (glycosyl-nucléotides et des analogues de substrats du CMP-Neu5Ac) sur l'entrée du CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac dans les cellules perméabilisées. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau VI.

TABLEAU VI: Effets de différents substrats sur l'entrée du CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac dans les vésicules intracellulaires des cellules CHO type sauvage, perméabilisées.

L'entrée du CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac dans les vésicules intracellulaires des cellules CHO type sauvage perméabilisées est mesurée comme décrit dans la section matériels et méthodes. La concentration du CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac radioactif est de 8 µM et celle des substrats inhibiteurs de 1 mM. La déviation standard est indiquée entre parenthèses.

Inhibiteur	Transport du CMP-[ <sup>14</sup> C]Neu5Ac	
	pmol/10 <sup>7</sup> cellules. min.	%
Aucun	8,58 (0,92)	100
UDP-Gal	5,85 (0,06)	68,2
UDP-GlcNAc	6,59 (0,02)	76,9
UDP-Glc	7,5 (0,20)	87,4
GDP-Man	6,11 (0,67)	71,3
CDP-Choline	3,33 (0,08)	38,8
CMP-Neu5Ac	0,90 (0,24)	10,5

Le CMP-Neu5Ac non marqué entre fortement en compétition avec le CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac radioactif pour l'entrée dans les vésicules intracellulaires des cellules CHO sauvages perméabilisées. A 1 mM, le CMP-Neu5Ac non radioactif inhibe à 90 % l'entrée des 8 µM de CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac.

L'UDP-Gal, l'UDP-GlcNAc, le GDP-Man n'inhibent pas ou peu l'entrée du CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac radioactif dans les vésicules intracellulaires des cellules CHO sauvages perméabilisées. Ces résultats suggèrent l'existence de transporteurs individuels, distincts pour chacun des glycosyl-nucléotides et confirment les études de Deutscher *et al.* [182].

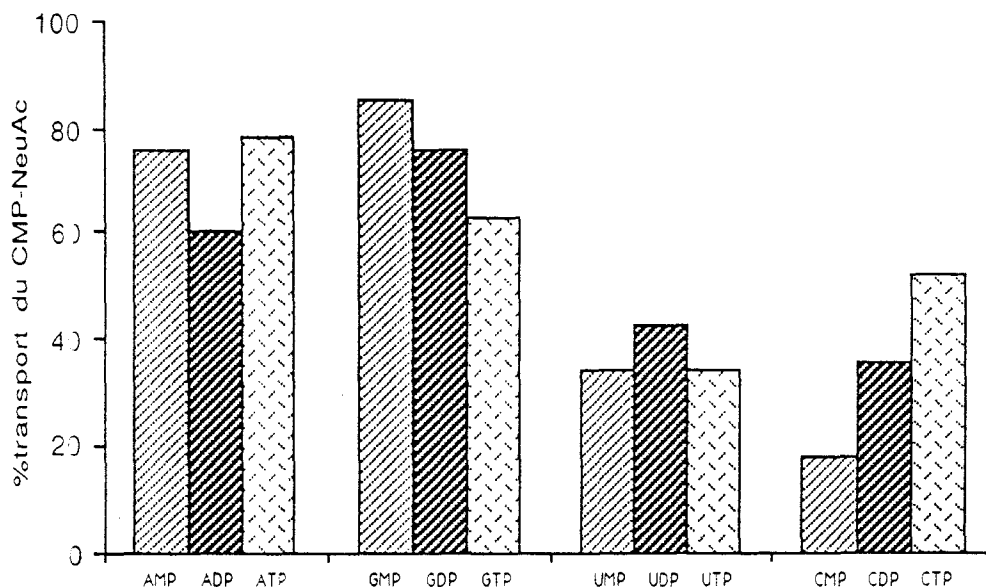
Des vésicules golgiennes préparées à partir de cellules CHO déficientes dans le transport du CMP-Neu5Ac ne présentent aucune déficience dans le transport des autres glycosyl-nucléotides prouvant que leur entrée résulte de la mise en jeu de transporteurs distincts.

b- Effets de différents nucléotides

Les effets de différents nucléotides sont rassemblés dans le tableau VII

TABLEAU VII: Effets de différents nucléotides sur l'entrée du CMP- $^{14}\text{C}$ Neu5Ac dans les vésicules intracellulaires des cellules CHO sauvages perméabilisées.

L'entrée du CMP- $^{14}\text{C}$ Neu5Ac dans les vésicules intracellulaires des cellules CHO perméabilisées est mesurée comme décrit dans la section matériels et méthodes. La concentration du CMP- $^{14}\text{C}$ Neu5Ac radioactif est de 4  $\mu\text{M}$  et celle des substrats inhibiteurs de 1 mM. Les résultats représentent une moyenne de deux manipulations.



L'examen des résultats obtenus nous a conduit aux conclusions suivantes:

\* Le type de la base du nucléotide, purique ou pyrimidique est reconnu, et ainsi le transport du CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac radioactif est inhibé par les nucléotides pyrimidiques seulement: l'UMP et le CMP surtout, sont de ces inhibiteurs compétitifs, alors que l'AMP ou le GMP n'ont pratiquement pas d'effet.

\* Le nombre de groupement phosphate en position 5' du nucléotide inhibiteur semble être de moindre importance sur le transport du CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac. Ainsi, l'effet inhibiteur de l'UMP, l'UDP ou l'UTP sur le transport du CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac est très similaire. Toutefois, la remarque ne s'applique pas au CMP qui est plus inhibiteur que le CDP, lui-même plus inhibiteur que le CTP.

\* Nous avons également vérifié que la fraction glycosyl du glycosyl-nucléotide, en l'occurrence le Neu5Ac utilisé à 1 mM n'inhibait pas ou peu (24%) le transport du CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac radioactif dans les vésicules intracellulaires des cellules CHO sauvages perméabilisées.

c- Inhibition du transport par des agents non pénétrants

Dans le but de déterminer la topologie de l'interaction du CMP-Neu5Ac avec les vésicules intracellulaires des cellules CHO, nous avons utilisé le CMP-2',3'-dialdéhyde qui inactive irréversiblement les enzymes CMP-dépendants, par formation de liaisons covalentes entre les groupements aldéhydiques et les fonctions -NH<sub>2</sub> présentes sur les protéines. Nous avons recherché si cet agent non pénétrant pouvait inhiber le transport du CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac dans les vésicules intracellulaires de cellules CHO perméabilisées.

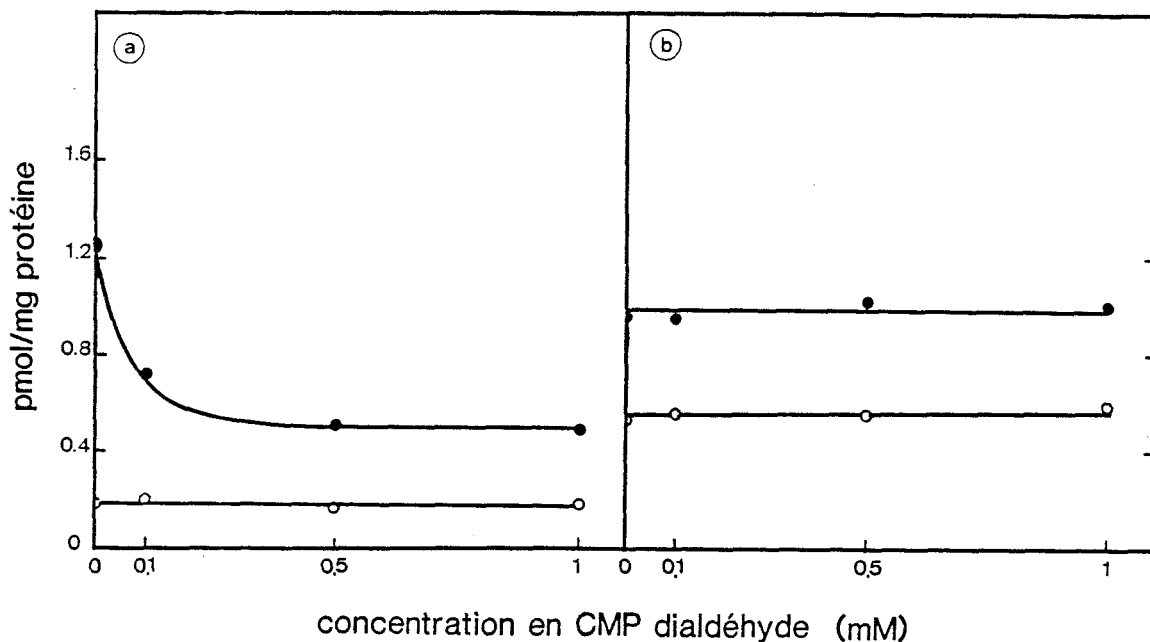


Fig. 16: Effet du CMP-dialdéhyde sur l'entrée du CMP-Neu5Ac dans les cellules CHO perméabilisées.

Les cellules CHO des deux types sont perméabilisées par congélation/décongélation. Après incubation de 20 minutes avec le CMP-dialdéhyde, les cellules sont lavées pour éliminer les molécules qui ne sont pas liées de façon covalente. Le transport (●—●) du CMP- $[^{14}\text{C}]$ Neu5Ac et le transfert (○—○) du  $[^{14}\text{C}]$ Neu5Ac sont déterminés après incubation de 2 minutes à 37°C en présence de CMP- $[^{14}\text{C}]$ Neu5Ac 4,2  $\mu\text{M}$  comme décrit dans la section matériels et méthodes, dans les cellules sauvages (a) et dans les cellules mutantes (b).

Il apparaît sur la figure 16 (a) que le CMP-3',5'-dialdéhyde inhibe l'entrée du CMP- $[^{14}\text{C}]$ Neu5Ac dans les vésicules intracellulaires des cellules CHO sauvages perméabilisées. On obtient 50 % d'inhibition pour une concentration de 100  $\mu\text{M}$  en CMP-dialdéhyde.

Notons encore que l'effet du CMP-3',5'-dialdéhyde sur le transporteur n'a aucune répercussion sur l'activité

sialyltransférase: le transfert du [ $^{14}\text{C}$ ]Neu5Ac sur accepteur endogène demeure inchangé quelle que soit la concentration en CMP-dialdéhyde utilisée.

Ces résultats montrent que le transporteur du CMP-Neu5Ac peut être bloqué par un analogue de substrat non perméant, sans affecter les sialyltransférases. L'entrée du CMP-Neu5Ac et l'accumulation de ce donneur de sucre dans les vésicules intracellulaires sont suffisantes pour assurer le fonctionnement des sialyltransférases lumineales.

En ce qui concerne les cellules CHO mutantes perméabilisées et incubées dans les mêmes conditions en présence de différentes concentrations de CMP-dialdéhyde, il s'avère que cette molécule n'a aucun effet sur le passage du CMP-Neu5Ac dans les vésicules intracellulaires, ni sur son utilisation par les sialyltransférases. (figure 16 (b) ). Ce nouveau résultat renforce l'idée de l'absence de transporteur spécifique et fonctionnel du CMP-Neu5Ac dans les cellules CHO mutantes et suggère une diffusion passive des molécules de CMP-Neu5Ac au travers de la bicouche lipidique, non dépendante d'un transporteur protéique.

#### 4- Conclusion

Il ressort de ces différentes études que le processus de pénétration du CMP- $^{14}\text{C}$ Neu5Ac dans les lumières des vésicules intracellulaires des cellules CHO sauvages perméabilisées relève d'un mécanisme plus complexe que la simple diffusion de cette molécule au travers de la bicouche lipidique. Il s'explique par l'intervention directe d'un constituant de la membrane. A la lumière des observations faites, nous avons pu conclure à l'existence d'un transporteur saturable pour de fortes concentrations en substrat, inhibé par utilisation d'analogues de substrat, spécifique du CMP-Neu5Ac. La première étape du mécanisme de translocation du CMP-Neu5Ac à travers les membranes golgiennes des cellules CHO sauvages perméabilisées a été précisée. Au cours de cette étape, le glycosyl-nucléotide est reconnu par le transporteur par sa fraction nucléotidique.

Par contre, les cellules CHO mutantes perméabilisées ne répondent à aucun de ces critères de mise en évidence d'un constituant membranaire jouant le rôle de transporteur de CMP-Neu5Ac. Les mouvements transmembranaires du CMP-Neu5Ac qui existent pourtant puisque l'on mesure une activité sialyltransférase dans des vésicules intracellulaires closes, ne peuvent s'expliquer que par la pénétration des molécules à travers le film lipidique des membranes intracellulaires.

Ces mouvements transmembranaires s'effectueraient par suite de la différence de concentrations entre les deux faces des membranes intracellulaires des cellules CHO mutantes perméabilisées, conduisant à un transport passif du CMP-[<sup>14</sup>C]NeuAc dans les vésicules intracellulaires de ces cellules.

#### C- Mécanisme du transport du CMP-Neu5Ac

Une question, cependant s'est rapidement posée: quelle source énergétique permet ce mouvement de molécules "non électrolytes" que sont les glycosyl-nucléotides à travers les membranes intracellulaires, contre leur gradient de concentration?

De fait, Sommers et Hirschberg [183] décrivent aussi une accumulation et la formation d'une réserve intracisternale de CMP-Neu5Ac dans les vésicules golgiennes de foie de Rat. Le CMP-Neu5Ac s'y accumule jusqu'à atteindre une concentration 75 fois plus importante que dans le milieu d'incubation. Le CMP-Neu5Ac entre donc dans les vésicules intracellulaires contre son gradient électrochimique. Un apport d'énergie va donc être nécessaire pour libérer le CMP-Neu5Ac sur la face où la concentration est la plus élevée.



Pour déterminer la nature de cette énergie, les effets de différents agents susceptibles de perturber le transport du CMP-Neu5Ac ont été testés:

L'ATP n'affecte en rien le transport du CMP-Neu5Ac pas plus que les poisons empêchant le bon fonctionnement de la chaîne respiratoire et de la phosphorylation oxydative tels que l'azide de sodium ou le cyanure de potassium, utilisés à 1 mM. Il ne s'agit donc pas là d'un transport actif primaire.

La valinomycine (40 µg/ml) qui perméabilise les membranes au potassium, créant ainsi un potentiel négatif à l'intérieur des vésicules, n'a également aucun effet sur le transport du CMP-Neu5Ac. Ce n'est donc pas une différence de potentiel membranaire qui implique le passage du CMP-Neu5Ac dans les vésicules intracellulaires.

Enfin, nous avons utilisé la N-éthylmaléimide qui modifie les groupements thiols. Son utilisation permet de déterminer si le site catalytique du transporteur du CMP-Neu5Ac contient des groupements thiols réactifs. Il s'avère que le NEM n'a aucun effet sur le transport du CMP-Neu5Ac, ce qui pourrait indiquer qu'aucun groupe sulfhydryl n'est impliqué dans le transport du CMP-Neu5Ac.

En fait, nous avons montré que cette énergie nécessaire à l'entrée du CMP-Neu5Ac dans les vésicules intracellulaires des cellules CHO perméabilisées était fournie par un gradient électrochimique de CMP: l'entrée du CMP-Neu5Ac dans les vésicules intracellulaires est couplée à la sortie du CMP. Ceci correspond à un transport actif secondaire encore dénommé **antiport**.

#### 1- Echange CMP/CMP-Neu5Ac

Pour montrer le rôle moteur joué par le CMP, l'effet d'une préincubation des cellules CHO en présence de CMP sur le transport du CMP-Neu5Ac a été étudié.

Au préalable, nous avons vérifié la capacité des cellules perméabilisées à prélever le CMP présent dans le milieu d'incubation. Les cellules CHO de type mutant et de type sauvage sont perméabilisées par congélation/décongélation. Elles sont alors incubées en présence de 5  $\mu\text{M}$  de [ $^{14}\text{C}$ ]CMP. L'entrée du [ $^{14}\text{C}$ ]CMP est arrêtée par dilution du milieu d'incubation, les cellules sont lavées plusieurs fois et le [ $^{14}\text{C}$ ]CMP accumulé dans les vésicules intracellulaires quantifié. Nous avons constaté que les vésicules intracellulaires sont capables de prélever et d'accumuler rapidement le [ $^{14}\text{C}$ ]CMP du milieu d'incubation.

Ces résultats sont à corrélés à ceux de Fleischer [184] qui décrit l'existence d'un transporteur de l'UMP dans les membranes golgiennes de foie de Rat, transporteur qu'emprunterait également le CMP et qui est différent du transporteur spécifique du CMP-Neu5Ac.

Cette vérification effectuée, des cellules CHO perméabilisées par congélation/décongélation, lavées dans le tampon de Cox et Peters pour éliminer tout substrat extravésiculaire exogène, sont partagées en deux lots:

\* le premier lot, servant de référence n'est pas incubé avec le CMP.

\* le second lot est chargé en CMP par incubation 10 minutes à 37°C en présence de 100  $\mu\text{M}$  de CMP.

Les cellules sont à nouveau lavées par le même tampon, afin d'éliminer toute trace extravésiculaire de CMP. Il s'est donc créé un gradient électrochimique de CMP propice à l'entrée du CMP-Neu5Ac. Les cellules sont alors incubées en présence de CMP-[ $^{14}\text{C}$ ]Neu5Ac 10  $\mu\text{M}$ .

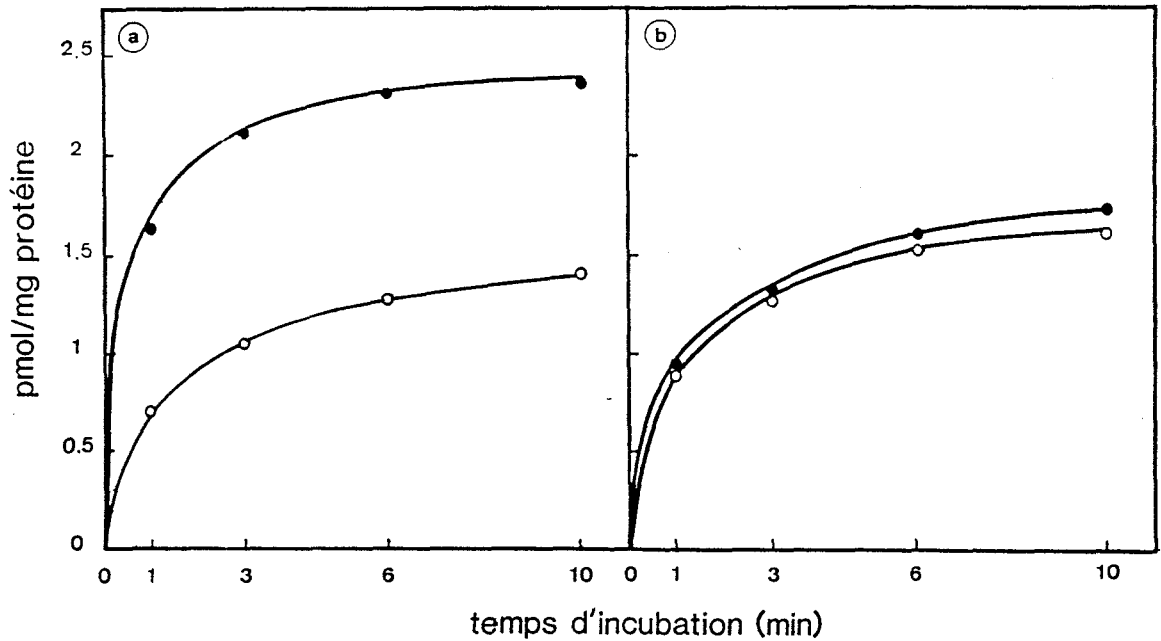


fig. 17: Effet d'une préincubation avec du CMP sur le transport du  $CMP-[^{14}C]Neu5Ac$ .

Les cellules CHO type sauvage (a) ou mutant (b) perméabilisées sont chargées (●—●) ou non (○—○) en  $CMP\ 100\mu M$ . Après lavage, les cellules sont réincubées en présence de  $CMP-[^{14}C]Neu5Ac\ 10\mu M$ . Le transport du  $CMP-[^{14}C]Neu5Ac$  est mesuré comme décrit dans la section matériels et méthodes.

Dans le cas des cellules sauvages, un tel traitement a pour effet d'augmenter le transport du  $CMP-[^{14}C]Neu5Ac$  dans les vésicules intracellulaires par rapport aux mêmes cellules non incubées en présence de  $CMP$ . Ce résultat suggère un échange entre le  $CMP$  intraluminal et le  $CMP-[^{14}C]Neu5Ac$  extravésiculaire. Cet effet n'est pas retrouvé dans les cellules CHO mutantes. L'entrée du  $CMP-[^{14}C]Neu5Ac$  dans les vésicules intracellulaires de ces cellules mutantes ne dépend donc pas d'un gradient de  $CMP$ .

## 2- Réversibilité de l'échange

Nous nous sommes alors posé la question de savoir si cet échange était réversible; à savoir, si le  $\text{CMP}-[^{14}\text{C}]\text{Neu5Ac}$ , une fois entré dans les vésicules intracellulaires pouvait être à nouveau échangé avec du  $\text{CMP}$  extravésiculaire. Des cellules CHO, type sauvage, perméabilisées ont donc été incubées 10 minutes en présence de  $\text{CMP}-[^{14}\text{C}]\text{Neu5Ac}$   $6,2 \mu\text{M}$ , concentration suffisante pour conduire à l'accumulation d'une radioactivité acido-soluble dans les vésicules intracellulaires de ces cellules. Comme nous l'avons montré précédemment, il s'agit pour la quasi totalité de la radioactivité piégée, de  $\text{CMP}-[^{14}\text{C}]\text{Neu5Ac}$  non dégradé. L'addition de  $5\text{mM}$   $\text{CMP}$  dans le milieu d'incubation, provoque la sortie en une minute de  $66\%$  du  $\text{CMP}-[^{14}\text{C}]\text{Neu5Ac}$  accumulé (voir figure 18).

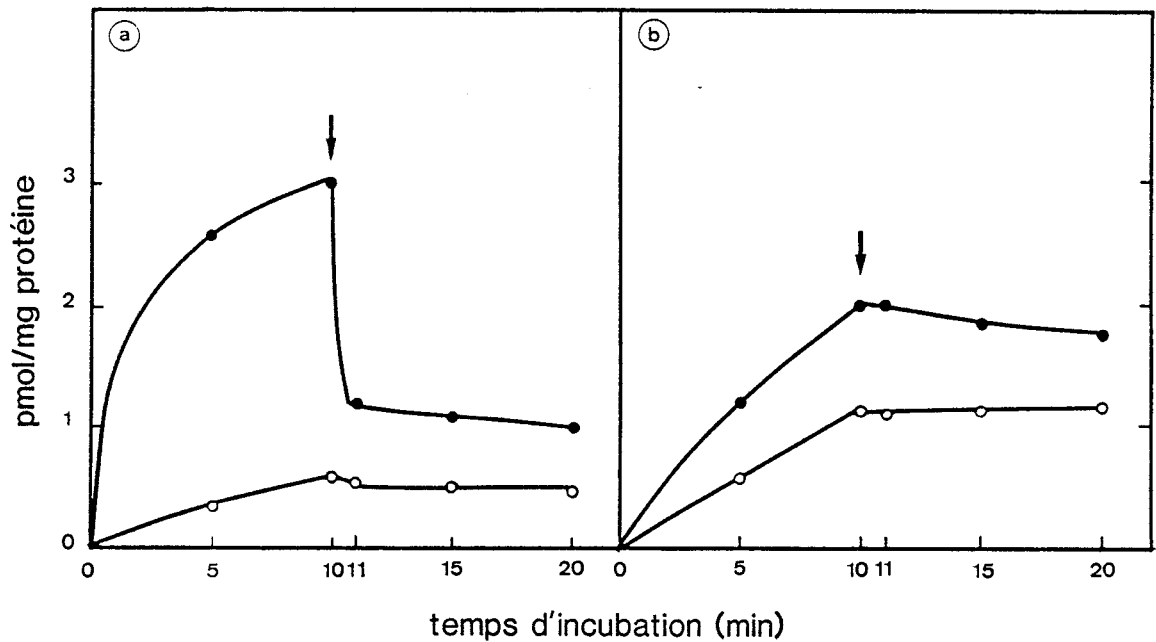


Fig. 18: Chasse du  $\text{CMP}-[^{14}\text{C}]\text{Neu5Ac}$  accumulé, par le  $\text{CMP}$ .

Les cellules CHO sauvages (a) ou mutantes (b) perméabilisées, sont incubées en présence de  $\text{CMP}-[^{14}\text{C}]\text{Neu5Ac}$   $6,5 \mu\text{M}$ , 10 minutes. Le transport du  $\text{CMP}-[^{14}\text{C}]\text{Neu5Ac}$  (●-●) et le transfert (○-○) du  $[^{14}\text{C}]\text{Neu5Ac}$  sur accepteurs endogènes, sont mesurés avant et après addition de  $5\text{mM}$   $\text{CMP}$  (flèche).

Par contre, pour les cellules CHO de type mutant, cette chasse du CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac des vésicules intracellulaires, n'est pas retrouvée. Tout au plus, l'entrée du CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac est-elle inhibée par la présence de 5 mM CMP dans le milieu.

Le passage du CMP-Neu5Ac dans les vésicules intracellulaires des cellules CHO mutantes ne résulte pas d'un échange entre le CMP et le CMP-Neu5Ac, ni dans un sens, ni dans l'autre.

### 3- Spécificité de l'échange.

Cet échange qui implique le CMP et le CMP-Neu5Ac peut-il se faire avec d'autres nucléotides?

Pour le vérifier, des cellules CHO de type sauvage perméabilisées ont été incubées en présence de CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac 6,2 μM, pendant 10 minutes à 37°C, ce qui conduit à la formation d'une réserve intracisternale de CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac. Dans ces conditions, nous avons constaté que l'addition de 1 mM AMP, 1 mM UMP ou 1 mM CMP, conduisait respectivement à la sortie de 22%, 33% ou 65% du CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac précédemment accumulé.

Ces résultats sont en accord avec les conditions avancées précédemment: la base azotée du nucléotide est reconnue par le transporteur et permet sa fixation sur ce dernier; le transport d'un glycosyl-nucléotide à base pyrimidique (le CMP-Neu5Ac) est entravé voire inhibé par les nucléotides à base pyrimidique qui entrent en compétition pour les mêmes sites de fixation sur l'échangeur.

### 4- Conclusion.

Au cours des expériences décrites auparavant, nous avons montré que la force motrice qui permet au CMP-Neu5Ac d'entrer dans les cellules CHO sauvages perméabilisées est l'existence d'un gradient électrochimique de CMP. Le mécanisme de transport mis en jeu est celui d'un antiport: le transport du substrat, le CMP-Neu5Ac et du soluté moteur qui lui est associé, le CMP se fait dans des directions opposées. L'intérêt

physiologique de cet antiport est double: il permet,

\* au CMP-Neu5Ac de franchir la barrière formée par les membranes intracellulaires et de s'accumuler dans les vésicules intracellulaires contre son gradient de concentration.

\* d'autre part, d'expulser hors des vésicules, le CMP produit après transfert du Neu5Ac sur les accepteurs endogènes et qui est un puissant inhibiteur des sialyltransférases.

Enfin, cet antiport est spécifique du CMP et du CMP-Neu5Ac.

Un tel mécanisme d'échange entre le CMP-Neu5Ac et le CMP n'a pas pu être mis en évidence dans les cellules CHO mutantes incubées dans les mêmes conditions. Il apparaît clairement que le CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac pénètre dans les vésicules intracellulaires des cellules CHO mutantes par un processus qui ne fait pas intervenir de transporteur spécifique mais plutôt par diffusion passive. Cette entrée n'est pas saturable, n'est pas inhibée par des analogues de substrat, et il ne s'agit pas d'un échange du CMP-Neu5Ac et du CMP. Ces résultats rendent compte du faible taux d'acide sialique trouvé sur les glycoconjugués de ces cellules.

Il est vraisemblable que cette diffusion passive du CMP-Neu5Ac existe dans les deux types cellulaires mais qu'elle soit masquée dans les cellules CHO sauvages par le fonctionnement de l'antiport.

#### D- Transport du CMP-Neu5Ac et sialylation des glycoconjugués

Nous avons vu que le transport du CMP-Neu5Ac dans les cellules CHO sauvages perméabilisées conduisait à la formation d'une réserve intraluminale de ce précurseur pour les différentes sialyltransférases. Cette réserve de CMP-Neu5Ac sert à la sialylation d'un groupe hétérogène d'accepteurs et nous nous sommes posé la question de savoir quelle était la part des glycoprotéines et des glycolipides.

Les CMP-acides sialiques qui sont donneurs de sucre dans ces différentes biosynthèses utilisent-ils le même transporteur? S'agit-il

de molécules différentes ou sont-elles identiques pour un glycosyl-nucléotide donné quelle que soit la synthèse étudiée?

Pour répondre à toutes ces questions, nous avons étudié par comparaison des cellules CHO mutantes et sauvages perméabilisées, le transport du CMP-Neu5Ac par échange avec du CMP et le transfert du Neu5Ac. La sialylation des accepteurs endogènes glycoprotéiques et glycolipidiques a été suivie par leur extraction séquentielle selon la méthode décrite par Hoflack et al. [185], qui se trouve résumée dans la section matériels et méthodes.

Les deux types de cellules CHO, perméabilisées et lavées pour éliminer tout substrat extravésiculaire ont été scindées en deux lots:

- \* l'un servant de référence, n'est pas préincubé avec le CMP.
- \* l'autre lot est "chargé" en CMP par préincubation 10 minutes à 37°C en présence de 100 µM de CMP.

L'excès de CMP extravésiculaire est éliminé par lavages des cellules perméabilisées créant ainsi le gradient électrochimique en CMP propice à l'entrée du CMP-Neu5Ac. Les cellules sont alors incubées en présence de CMP-[<sup>14</sup>C]NeuAc 10 µM.

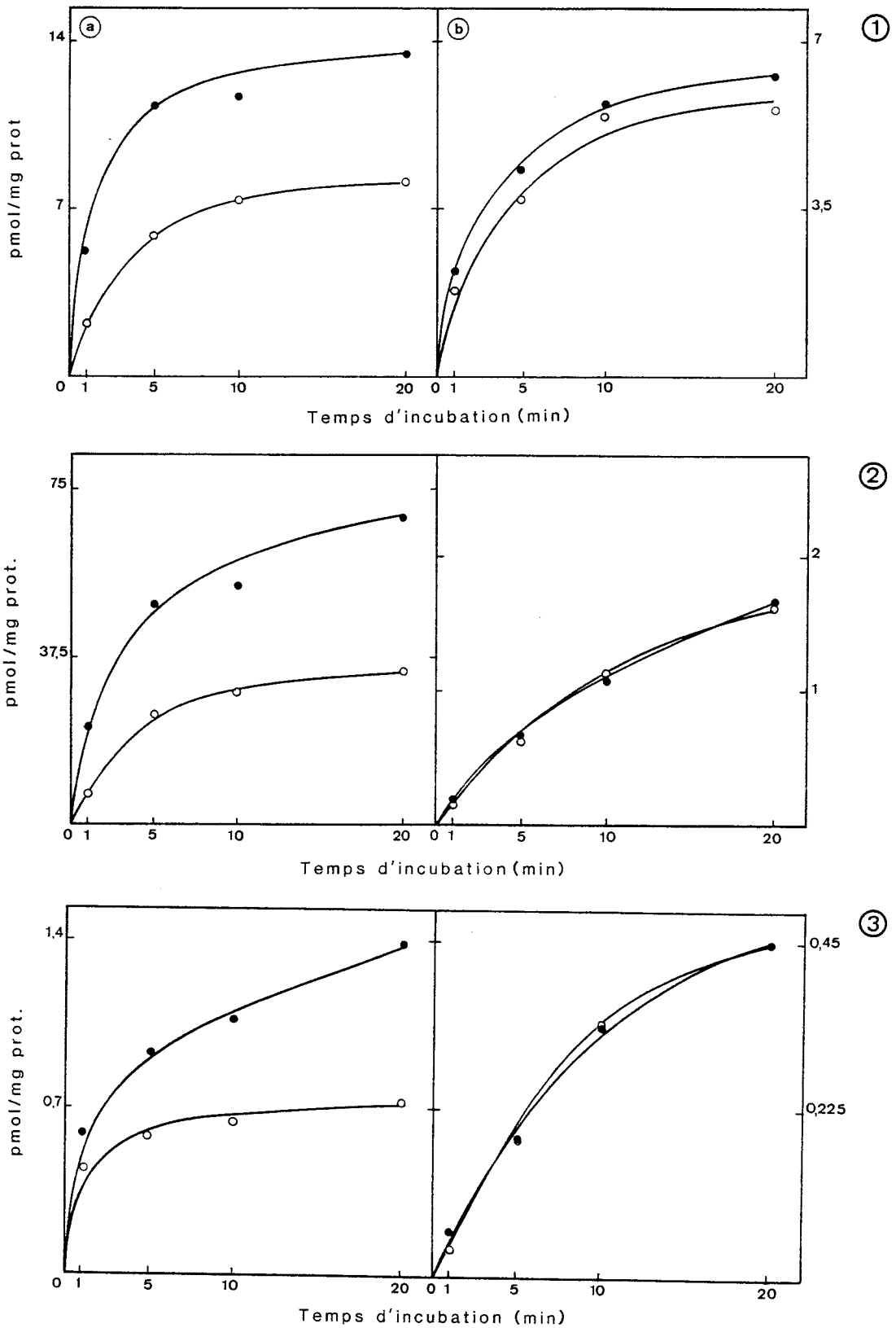


Fig. 20: Transport du CMP-Neu5Ac et sialylation des différents glycoconjugués:

les cellules CHO type sauvage (a) ou mutant (b) perméabilisées sont chargées (●-●) ou non (○-○) en CMP 100 μM. Le transport du CMP-[<sup>14</sup>C]NeuAc ① le transfert du [<sup>14</sup>C]NeuAc sur les glycoprotéines ② ou sur les glycolipides ③ sont mesurés comme décrit dans la section matériels et méthodes.



De ces résultats se dégage un certain nombre d'enseignements:

\* Comme nous l'avions constatée auparavant, une préincubation des cellules sauvages avec du CMP stimule l'entrée du CMP-Neu5Ac et le transfert du Neu5Ac sur les glycoconjugués (aussi bien les glycoprotéines que les glycolipides). Le passage du CMP-Neu5Ac dans les microsomes des cellules CHO sauvages fait intervenir un antiport CMP/CMP-NeuAc pour la sialylation des glycoprotéines et des glycolipides.

\* Par contre, une préincubation des cellules mutantes avec du CMP, n'a aucun effet sur l'entrée ultérieure du CMP-Neu5Ac ni même sur son utilisation. Ni le transfert sur les glycoprotéines, ni celui sur les glycolipides ne sont stimulés par le CMP. Le même transporteur de CMP-Neu5Ac (déficient dans les cellules mutantes) sert dans la sialylation des glycolipides et des glycoprotéines.

\* Enfin, l'accumulation du CMP-Neu5Ac dans les vésicules intracellulaires des cellules mutantes ne représente qu'environ un dixième de celle trouvée dans les cellules sauvages renforçant l'idée d'une diffusion passive du CMP-Neu5Ac rendant compte des 10% de sialylation décrits pour les glycoprotéines et les glycolipides.

Soulignons enfin, que notre modèle d'étude des cellules perméabilisées ne nous permet pas de distinguer entre les vésicules intracellulaires golgiennes et celles du reticulum endoplasmique. Pour tenter de préciser la localisation de l'antiport mis en évidence, nous avons utilisé la monensine.

#### E- Localisation de l'antiport

La monensine est un ionophore carboxylique de cations, bien connue pour ses multiples effets au niveau cellulaire entre autres, pour sa capacité à interrompre les activités de sécrétion des protéines (Ledger et al. [186], Tartakoff et Vassali (1971) [187], Tartakoff et Vassali

(1978) [188], Strous et Loddish [189], Uchida et al. [190]). Malgré la très large utilisation qui en est faite, on ne connaît encore que peu de chose quant au mode d'action de la monensine. On pense cependant que, les ionophores carboxyliques, tels que la monensine ou la nigéricine, pourraient exercer leurs effets en augmentant le pH à l'intérieur des vésicules intracellulaires (Oda et al. [191]).

Le point d'impact majeur de la monensine est l'appareil de Golgi. On observe au microscope électronique, que la monensine cause une dilatation énorme des éléments constitutifs du Golgi. Cet effet est localisé au point de sortie des protéines de sécrétion. Apparaît une population abondante de vacuoles à surface lisse, dont les dimensions sont celles de granules d'accumulation. Les saccules golgiens, qui sont dans les cellules normales, empilés et compressés, diminuent en nombre et à leur place se forment des vacuoles dilatées qui se joutent étroitement. On suppose l'existence de pompes  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  spécifiques, de localisation golgienne (provoquant normalement un efflux d'eau) qui bloquées par la monensine, induiraient un tel gonflement golgien (Van Kerkof et al. [192]).

Après un traitement d'une heure à 37°C en présence de 10  $\mu\text{M}$  de monensine, les cellules CHO sont perméabilisées par congélation-décongélation puis incubées en présence de CMP-[ $^{14}\text{C}$ ]Neu5Ac 4,2 $\mu\text{M}$ . Une étude cinétique nous permet de suivre les variations de la radioactivité totale associée à la cellule (le transport) et celles de la radioactivité acido-précipitable (le transfert).

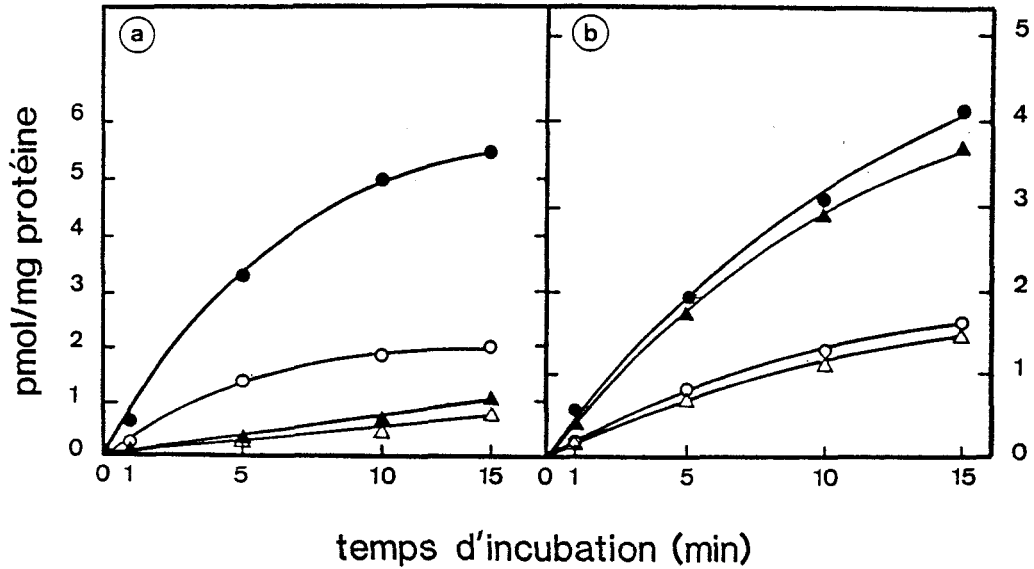


Fig. 20: Effet de la monensine sur le transport et le transfert du CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac dans les cellules CHO perméabilisées.

Les cellules CHO type sauvage (a) ou mutant (b) sont cultivées en monocouche, en présence (symboles pleins) ou en absence (symboles ouverts) de monensine 10  $\mu$ M pendant une heure. Les cellules sont alors perméabilisées par congélation/décongélation et incubées en présence de CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac 4,2  $\mu$ M; aux temps indiqués t= 1, 5, 10 et 15 minutes, la radioactivité totale associée aux cellules (●●, ○○) et la radioactivité acido-précipitable (▲▲, △△) sont mesurées.

La figure 20 montre qu'un tel traitement des cellules CHO type sauvage à la monensine augmente l'entrée du CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac dans les vésicules intracellulaires de ces cellules (2,75 fois après 15 minutes), ce qui conduit à une légère augmentation de la sialylation des accepteurs endogènes. L'effet global est la formation d'une réserve intracisternale de CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac, beaucoup plus importante. Donc, parallèlement à la dilatation du Golgi, la monensine induit une augmentation du transport du CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac et de son accumulation dans les vésicules.

D'autre part, l'utilisation de monensine sur des fractions purifiées en vésicules golgiennes de foie de Rat a montré que le transporteur du CMP-Neu5Ac, en lui-même, n'est pas affecté par la monensine. L'effet de la monensine n'est pas étudié sur le transporteur lui-même, mais sur la capacité d'accumulation des vésicules dilatées par la monensine.

Ceci nous permet de conclure que, d'une part, le processus de transport n'est pas inhibé par la monensine et, d'autre part, nous pouvons établir une corrélation entre ce gonflement golgien et la localisation du transporteur de CMP-Neu5Ac mis en évidence: ce glycosyl-nucléotide est transporté et accumulé dans les vésicules de l'appareil de Golgi des cellules CHO de type sauvage.

Par contre, aucune accumulation de CMP-Neu5Ac libre n'est détectée dans les vésicules intracellulaires des cellules CHO mutantes, ni dans les cellules traitées à la monensine, ni dans les cellules non traitées.

Toutefois, la dilatation des saccules golgiens induite par la monensine, entraîne une augmentation de l'entrée du CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac suivie d'un transfert immédiat du [<sup>14</sup>C]Neu5Ac sur les accepteurs endogènes. Ce dernier résultat confirme la plus grande utilisation du [<sup>14</sup>C]Neu5Ac due à la présence d'un plus grand nombre de sites sialylables disponibles sur les accepteurs endogènes des cellules CHO mutantes.

### III- CONCLUSION

Les recherches que nous avons effectuées avaient pour buts la mise en évidence et la caractérisation du transporteur de CMP-Neu5Ac.

Le premier objectif que nous nous étions fixé était la mise au point d'un modèle d'étude de ce phénomène, en limitant au maximum les altérations de l'organisation interne de la cellule qu'entraîne la

purification de fractions membranaires: concentration d'enzymes associés à ces fractions membranaires, perméabilité accrue, gradients électrochimiques perturbés, ou perte de facteurs de régulation.

Ce modèle des cellules CHO, cultivées en suspension dont la membrane plasmique a été perméabilisée par congélation-décongélation, nous a permis de rechercher l'existence du transporteur du CMP-Neu5Ac dans les deux types cellulaires mis à notre disposition et d'en caractériser le fonctionnement. Confirmant les hypothèses avancées par Hirschberg, nous avons montré dans les vésicules intracellulaires des cellules CHO sauvages, que le CMP-Neu5Ac entrait par un processus dépendant du temps, saturable et inhibé par des analogues de substrat .

Nous en avons précisé la localisation dans le Golgi par utilisation de la monensine, et le fonctionnement: il s'agit d'un antiport permettant au CMP-Neu5Ac de s'accumuler dans les vésicules intracellulaires en échange avec du CMP intraluminal. Nous avons montré que cet antiport CMP/CMP-Neu5Ac n'existait pas dans le Golgi des cellules CHO mutantes. Toutefois, le CMP-Neu5Ac pénètre dans ces vésicules intracellulaires, sans doute par un processus de diffusion passive, masqué d'ordinaire par l'activité de l'antiport. Cette diffusion passive d'une molécule chargée telle que le CMP-Neu5Ac est difficile à expliquer mais rend compte des 20% de sialylation des glycoconjugués trouvés *in vivo* dans les cellules CHO déficientes dans le transport du CMP-Neu5Ac.

Cette première étape réalisée, il était très attrayant de déterminer le mécanisme exact de fonctionnement de l'antiporteur CMP/CMP-Neu5Ac, sa spécificité en substrat, de rechercher des inhibiteurs spécifiques, qui nous permettraient de repérer ce transporteur parmi les autres constituants membranaires. Mais notre modèle de cellules perméabilisées présentait des limites pour de telles études. En particulier, il nous est impossible de différencier les vésicules du reticulum endoplasmique et les vésicules de l'appareil de Golgi. En revanche, le fractionnement subcellulaire des cellules CHO et la préparation de vésicules golgiennes purifiées nous ont permis de distinguer la contribution des diverses membranes impliquées, et d'étudier le transporteur du CMP-Neu5Ac sans interférences avec le métabolisme cellulaire.

## CHAPITRE II

### I- LES VESICULES GOLGIENNES PURIFIEES, UN "OUTIL" DANS L'ETUDE DU TRANSPORT DU CMP-Neu5Ac

Pour aller plus avant dans l'étude du transporteur du CMP-Neu5Ac, un contrôle précis de la composition des milieux externe et interne des vésicules intracellulaires était nécessaire. L'absence de métabolisme intracellulaire, ou de facteurs de régulation pouvant interagir avec le substrat transporté fait des vésicules golgiennes purifiées de cellules CHO un "outil" remarquable d'étude du transporteur de CMP-Neu5Ac.

#### A- Préparation d'une fraction enrichie en vésicules golgiennes.

La méthode utilisée pour préparer des vésicules golgiennes est décrite dans la section matériels et méthodes. L'obtention de vésicules golgiennes nécessite la rupture de la membrane plasmique, la fragmentation en vésicules et la séparation de ces vésicules du cytoplasme et des autres membranes (nucléaires, mitochondriales, du reticulum ...). Le type de fractions golgiennes obtenu va dépendre de la manière dont est réalisée l'homogénéisation: si elle est brutale, on obtient une fraction microsomale (mélange de vésicules lisses du Golgi et du reticulum, mais aussi des fragments de membrane plasmique). Réalisée avec ménagement, la fraction est enrichie en piles de saccules caractéristiques de l'appareil de Golgi *in situ*.

Du protocole que nous avons établi se dégagent plusieurs points:

\* L'appareil de Golgi est très sensible aux enzymes lytiques présents dans l'homogénat (et peut être dans les vésicules elles-mêmes). Pour amoindrir les effets de ces enzymes, il nous a fallu travailler rapidement et à 4°C.

\* L'appareil de Golgi est sensible aux variations osmotiques et aux homogénéisations excessives. L'homogénéisation doit être douce et la concentration en saccharose varier entre 0,25 M et 0,5 M.

\* Le contrôle de la pureté et de la topologie des vésicules golgiennes obtenues est basé sur des critères biochimiques (dosages enzymatiques) et sur des critères morphologiques (contrôle au microscope électronique).

## B- Caractérisation des vésicules golgiennes

### 1- Microscopie électronique

La pureté de la fraction golgienne obtenue peut être estimée en examinant la morphologie des vésicules obtenues au microscope électronique. Il n'est pourtant pas toujours aisé de connaître la provenance des diverses vésicules car toutes les membranes ont un aspect comparable. Les ultracoupes réalisées à partir de fractions enrichies en vésicules golgiennes montrent une grande homogénéité de vésicules à membranes lisses. On observe peu de morceaux de membranes, quelques empilements de saccules et des saccules typiques de l'appareil de Golgi. (voir figure 21)

*Fig. 21: Ultracoupe de la fraction golgienne. (grossissement 5800)*

## 2- Topologie des vésicules golgiennes obtenues

Nous avons voulu vérifier que, dans la fraction golgienne ainsi obtenue, les vésicules golgiennes avaient conservé la même orientation qu'elles avaient *in situ*. Pour ce faire, nous avons utilisé le fait que les sialyltransférases ont leur site actif situé dans la lumière des saccules golgiennes et réalisé la latence de la sialyltransférase avec un substrat macromoléculaire exogène, l'asialofétuine. Nous avons ainsi vérifié que les vésicules avaient une latence importante de l'ordre de 83%. Ces résultats indiquent que les vésicules golgiennes préparées à partir de cellules CHO sont essentiellement orientées dans le même sens qu'elles avaient *in situ* et que seule, une faible proportion des vésicules n'a pas conservé son intégrité structurale. La topologie des vésicules golgiennes utilisées a été vérifiée avant chaque expérimentation, voir figure 22.

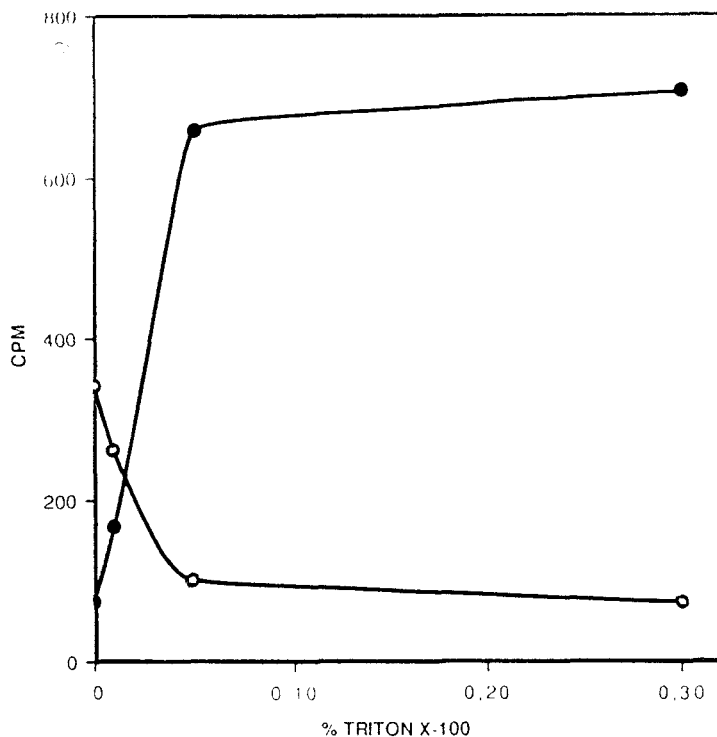


Fig. 22: Latence de la sialyltransférase.

Les vésicules golgiennes obtenues sont préincubées 1 min. à 20°C en présence de différentes concentrations en Triton X-100. Elles sont alors incubées en présence de CMP-[<sup>14</sup>C]NeuAc 5 μM, 4 min. à 37°C. Le transfert du [<sup>14</sup>C]Neu5Ac sur accepteur endogène (-○-○-) ou exogène (-●-●-), ici l'asialofétuine à 4 mg/ml, est mesuré comme décrit dans la section matériels et méthodes.



## II- LES VÉSICULES GOLGIENNES DES CELLULES CHO DANS L'ETUDE DU TRANSPORT DU CMP-Neu5Ac.

### A- Résultats

Le CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac est-il transporté et accumulé dans les vésicules golgiennes des cellules CHO?

C'est ce que nous avons vérifié en incubant des vésicules golgiennes préparées à partir de cellules CHO sauvages et de cellules CHO mutantes en présence de différentes concentrations en CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac. Après plusieurs étapes de lavage des vésicules golgiennes et filtration sur filtres Millipore (voir section matériels et méthodes), le transport du CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac dans les vésicules golgiennes et le transfert du [<sup>14</sup>C]Neu5Ac sur les accepteurs endogènes sont mesurés par comptage de la radioactivité associée au filtre, en scintillation liquide.

La figure 23 (a) représente le transport du CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac dans le Golgi des cellules CHO sauvages et des cellules mutantes. Comme nous l'avons précédemment constaté dans les cellules CHO mutantes perméabilisées, le flux entrant de CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac dans les vésicules golgiennes des cellules CHO mutantes varie linéairement en fonction de la concentration en CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac présente dans le milieu d'incubation, alors que le phénomène est saturable dans les vésicules golgiennes des cellules CHO sauvages. Le phénomène observé dans les vésicules golgiennes des cellules CHO mutantes ne représente que 5 à 10% du phénomène observé dans le Golgi des cellules CHO sauvages.

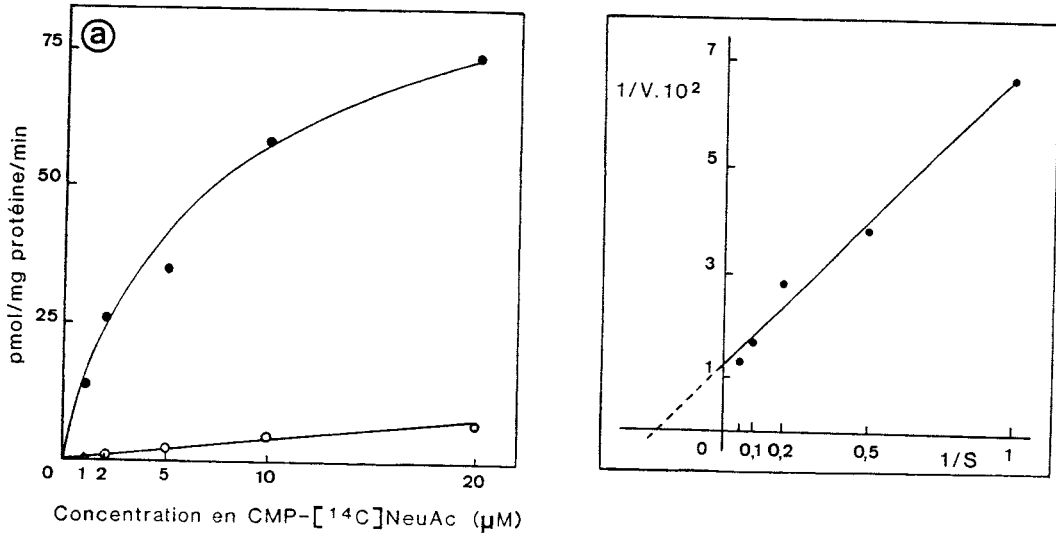


Fig. 23: Effet de la variation de la concentration en CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac sur son entrée dans les vésicules golgiennes.

Les vésicules golgiennes des cellules CHO sauvages ou mutantes (1,5 à 2mg/ml) sont incubées 4 minutes à 37°C avec des concentrations variables (1 à 20 μM) de CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac. Après chaque incubation, la radioactivité totale associée aux vésicules (le transport) est déterminée par filtration des vésicules golgiennes sur filtre Millipore 0,22 μm comme décrit dans la section matériels et méthodes. Les valeurs de la représentation en double inverse  $1/V = f(1/S)$  sont déterminées par régression linéaire ( $r^2 = 0,99$ ) et permettent de déterminer un Km apparent de 4,3 μM et une vitesse maximale de 79 pmol/mg protéines/min.

La représentation en double inverse, selon Lineweaver et Burk des résultats obtenus pour les vésicules golgiennes des cellules CHO sauvages, permet de déterminer un affinité apparente de 4,3 μM et une vitesse maximale de 79 pmol/mg protéines/min. Ces données sont à rapprocher de celles décrites par Deutscher et al. [193] qui annoncent

une affinité apparente de 1  $\mu$ M et une vitesse maximale de 70 pmol/mg protéines/10 min. dans des vésicules golgiennes de cellules CHO sauvages (0,4 mg) incubées 10 minutes à 30°C, ou encore de celles obtenues pour les cellules perméabilisées. Sans être égaux, ces résultats sont cependant comparables. Il faut, en effet, tenir compte du modèle cellulaire différent utilisé et surtout du fait qu'un mg de protéine d'une préparation purifiée de Golgi ne représente pas la même quantité de vésicules qu'un mg de protéines de cellules perméabilisées.

Remarquons encore que nous avons réduit au maximum les temps de préparation et d'incubation des vésicules golgiennes et évité les cycles congélation-décongélation répétées des vésicules qui conduisent aux dégradations décrites par Sommers et al. [194].

### B- Conclusion

Les résultats de cette étude menée sur des vésicules golgiennes purifiées de cellules CHO confirment les conclusions précédemment énoncées pour les cellules perméabilisées.

\* Il existe un transporteur spécifique du CMP-Neu5Ac dans les membranes golgiennes des cellules CHO sauvages.

\* Il existe également un mouvement transmembranaire de CMP-Neu5Ac dans les membranes golgiennes des cellules CHO mutantes qui ne relève pas de la mise en jeu d'un transporteur spécifique du CMP-Neu5Ac, mais qui représente cependant jusqu'à 10% du taux du transport observé dans les cellules sauvages. Ce mécanisme d'entrée passive du CMP-Neu5Ac vient suppléer à cette déficience primaire que présentent les cellules CHO mutantes pour le transport du CMP-Neu5Ac, assurant *in vivo* la sialylation de 20% des glycoprotéines.

### III- TRANSPORT DU CMP-Neu5Gc DANS LES VESICULES GOLGIENNES DES CELLULES CHO

Des vésicules golgiennes préparées à partir de cellules CHO sauvages et mutantes ont été également incubées en présence de différentes concentrations de CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Gc, un dérivé naturel synthétisé à partir du CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac et généreusement fourni par L. Shaw et R. Schauer.

Comme précédemment, plusieurs lavages des vésicules golgiennes sont réalisés sur filtres Millipore 0,22  $\mu\text{m}$ , et les filtres sont comptés en scintillation liquide. La figure 24 rend compte des résultats obtenus concernant le passage du CMP-[ $^{14}\text{C}$ ]Neu5Gc dans les vésicules golgiennes des cellules CHO sauvages et mutantes. Il s'agit d'un phénomène saturable présentant une affinité apparente de 5,07  $\mu\text{M}$  et une vitesse maximale de 10,51 pmol/mg protéines/min., dans le cas des vésicules golgiennes de cellules CHO sauvages, alors que le processus d'entrée du CMP-[ $^{14}\text{C}$ ]Neu5Gc dans les vésicules golgiennes de cellules CHO mutantes varie linéairement en fonction de concentrations en substrat dans le milieu d'incubation.

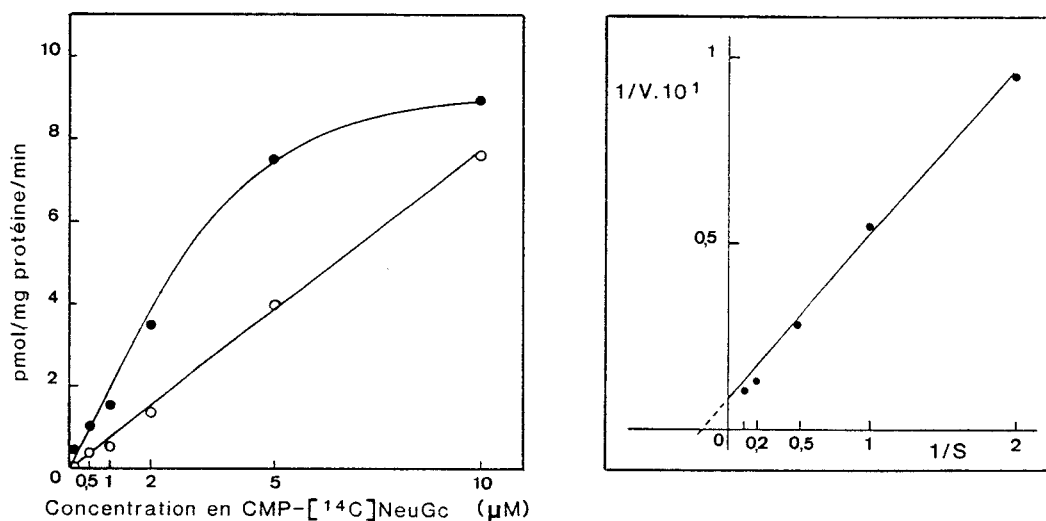


Fig. 24: Effet de la variation de la concentration en CMP-[ $^{14}\text{C}$ ]Neu5Gc sur son entrée dans les vésicules golgiennes.

Les vésicules golgiennes des cellules CHO sauvages et mutantes (1,5 à 2 mg/ml) sont incubées 3 minutes à 37°C avec des concentrations variables (0,5 à 10  $\mu\text{M}$ ) de CMP-[ $^{14}\text{C}$ ]Neu5Gc (100 mCi/mmol). Après incubation, la radioactivité totale associée aux vésicules (le transport) est déterminée par filtration sur filtre Millipore 0,22  $\mu\text{m}$  comme décrit dans la section matériels et méthodes. Les valeurs de la représentation en double inverse  $1/V = f(1/S)$  sont déterminées par régression linéaire ( $r^2=0,94$ ) et permettent de déterminer une affinité apparente de 5,07  $\mu\text{M}$  et une vitesse maximale de 10,51 pmol/mg protéines/min.

Il apparaît donc que le CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Gc entre dans les vésicules golgiennes des cellules CHO sauvages selon un processus saturable. Le CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Gc entre également dans les vésicules golgiennes des cellules CHO mutantes mais ne fait pas l'objet d'un transport actif.

Dès lors, il nous a paru très attrayant d'étudier plus en détail le mécanisme du passage du CMP-Neu5Gc du cytoplasme où il est synthétisé, aux sites de glycosylation. Ce passage se fait-il par l'intermédiaire d'un transporteur spécifique du CMP-Neu5Gc ou est-il commun à d'autres glycosyl-nucléotides?

Dans ce cas, quel en est le mécanisme de fonctionnement?

Pour ce faire, nous avons utilisé des vésicules golgiennes préparées à partir de foie de Souris.

### CHAPITRE III

#### TRANSPORT DU CMP- ACIDE N-GLYCOLOYLNEURAMINIQUE DANS LES VESICULES GOLGIENNES DE FOIE DE SOURIS

L'acide N-glycoloylneuraminique est un acide sialique que l'on rencontre dans tout le règne animal. Il dérive de l'acide N-acétylneuraminique par hydroxylation du groupement méthyl porté par la fonction amine de l'acide sialique. Très récemment, Shaw et Schauer [195] ont démontré l'existence d'une activité hydroxylasique présente dans le surnageant post-microsomal isolé de glandes sous-maxillaire de Porc, permettant l'hydroxylation du CMP-Neu5Ac en CMP-Neu5Gc.

Dans ce premier article, nous nous sommes posé la question de savoir si le CMP-Neu5Gc synthétisé dans le cytoplasme à partir du CMP-Neu5Ac faisait également l'objet d'un transport spécifique dans les vésicules golgiennes de foie de Souris. L'intérêt de l'utilisation de ces vésicules golgiennes réside dans le fait qu'il s'agit d'un matériel biologique rapidement disponible et en grande quantité. La préparation des vésicules golgiennes de foie de Souris est rapide et aisée. D'autre part, il a été montré très récemment que l'acide N-glycoloylneuraminique est l'acide sialique prépondérant dans les glycoconjugués sériques de Souris, puisqu'il représente 94% des acides sialiques (Reutter et al. [196]). L'acide N-acétylneuraminique ne représente que 4% des acides sialiques. Ce fait est assez exceptionnel, puisque dans les autres cas étudiés, Cheval, Ane, Porc et Rat, ce rapport est inversé dans les glycoconjugués sériques, et c'est l'acide N-acétylneuraminique qui est prépondérant.

En tenant compte de cette observation et des travaux effectués par L. Shaw et R. Schauer sur la localisation cytoplasmique de l'hydroxylase, nous nous sommes posés la question de l'existence d'un transporteur spécifique du CMP-Neu5Gc dans les vésicules golgiennes de

foie de Souris. Ces différents faits sont réunis et schématisés dans la figure 25

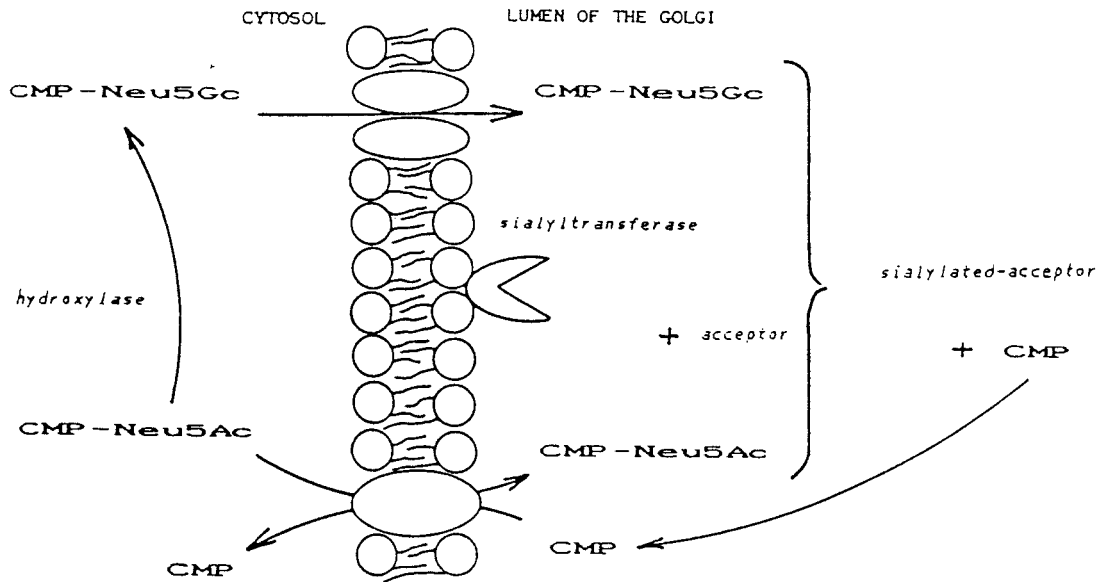


Fig. 25: Schématisation de localisation des différents intervenants dans la réaction de sialylation

## Transport of CMP-*N*-glycoloylneuraminic acid into mouse liver Golgi vesicles

Anne Lepers, Lee Shaw\*, René Cacan, Roland Schauer\*, Jean Montreuil and André Verbert

Laboratoire de Chimie Biologique et Unité Associée au CNRS no. 217, Université des Sciences et Techniques de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cédex, France and \*Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Biochemisches Institut der Medizinischen Fakultät Olshausenstrasse, Haus N11, D-2300 Kiel 1, FRG

Received 27 April 1989

CMP-Neu5Gc has been shown to be transported into mouse liver Golgi vesicles by a specific carrier the characteristics of which were investigated in detail. In the system employed, CMP-Neu5Gc enters the Golgi vesicles within 2 min; transport was saturable with high concentrations of the sugar-nucleotide and was dependent on temperature. A kinetic analysis gave an apparent  $K_m$  of 1.3  $\mu$ M and a maximal transport velocity of 335 pmol/mg protein per min. Almost identical values were obtained with CMP-Neu5Ac, under the same incubation conditions. Furthermore, the uptake of CMP-Neu5Gc was inhibited by CMP-Neu5Ac, a substrate analogue. Conversely, the uptake of CMP-Neu5Ac was inhibited by CMP-Neu5Gc to the same extent, leading to the conclusion that the transport of CMP-Neu5Ac and CMP-Neu5Gc is mediated by the same carrier molecule. This transport system for CMP-Neu5Gc involves both CMP and CMP-Neu5Gc since intravesicular CMP induced the entry of external CMP-Neu5Gc.

Transport; CMP-sialic acid; Golgi vesicle

### 1. INTRODUCTION

The sialic acids are a family of *N*- and *O*-substituted derivatives of neuraminic acid (5-amino-3,5-di-deoxy-D-glycero- $\beta$ -D-galacto-nonulosonic acid), whose two principal members are *N*-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) and *N*-glycoloylneuraminic acid (Neu5Gc) [1]. They occur most frequently as the terminal sugar residues on the glycan chains of many glycoconjugates. During the formation of glycoconjugate-bound Neu5Ac, the activated sugar nucleotide, CMP-Neu5Ac, which is present in the cytosol, has to gain access to

the lumen of the Golgi apparatus where it serves as the sialic acid donor for the sialyltransferases.

Several laboratories have demonstrated the uptake of CMP-Neu5Ac into mouse liver microsomes [2], rat liver Golgi vesicles [3], and plasma-membrane-permeabilized mouse thymocytes [4]. The saturation of this uptake by increasing concentrations of CMP-Neu5Ac, its inhibition by substrate analogues and dependence on temperature indicate that a specific carrier system is involved in the transport of CMP-Neu5Ac into the Golgi lumen. The recent finding that the biosynthesis of Neu5Gc results from the hydroxylation of CMP-Neu5Ac by a soluble, possibly cytosolic enzyme [5] prompts the suggestion that the CMP-Neu5Gc product might also enter the Golgi lumen by means of a similar carrier system.

In the present paper, we characterize the uptake of CMP-[ $^{14}$ C]Neu5Gc into Golgi vesicles isolated from mouse liver. The data provide evidence that these membranes contain a high-affinity transport system for CMP-Neu5Gc. A kinetic analysis and

*Correspondence address:* A. Verbert, Laboratoire de Chimie Biologique et Unité Associée au CNRS no. 217, Université des Sciences et Techniques de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cédex, France

*Abbreviations:* CMP-Neu5Ac, cytidine-5'-monophospho-*N*-acetyl- $\beta$ -D-neuraminic acid; CMP-Neu5Gc, cytidine-5'-monophospho-*N*-glycoloyl- $\beta$ -D-neuraminic acid; CMP, cytidine monophosphate





competition experiments are performed to examine whether CMP-Neu5Gc and CMP-Neu5Ac share the same carrier molecule. The effect of luminal CMP on the transport process is also studied.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Chemicals and reagents

All reagents were of analytical grade. CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac (9.69 GBq/mmol) was purchased from Amersham International (Bucks., England). CMP-Neu5Ac, CMP, bovine serum albumin and fetuin were of the highest purity available and were obtained from Sigma (St. Louis, MO).

### 2.2. Isolation of Golgi vesicles from mouse liver

Golgi vesicles, derived from the livers of 4 week-old Swiss mice, were isolated using a modification of the subcellular fractionation procedure originally described by Balch et al. [6]. The mice were killed with chloroform, the liver excised and placed in ice-cold STM (0.25 M sucrose; 10 mM Tris-HCl, pH 7.4; 1 mM MgCl<sub>2</sub>). All subsequent operations were carried out at 4°C. After passage through a tissue press, the finely divided liver was homogenized with 4 strokes in a 30 ml Potter homogenizer (B. Braun, Melsungen) at low speed (750 rpm) into 3 vols of STM buffer. The crude homogenate was adjusted to 1.4 M sucrose by the addition of ice-cold 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) containing 2.3 M sucrose and 1 mM EDTA. 3 ml of the latter buffer was loaded into a Beckman SW 27 tube and overlaid with 3 ml of 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) containing 1.6 M sucrose, and then with 10 ml of the 1.4 M sucrose-containing crude homogenate. This was subsequently overlaid with 10 ml of 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) containing 1.2 M sucrose and finally with 10 ml of 0.8 M sucrose in 10 mM Tris-HCl, pH 7.4. The gradients were centrifuged for 2.5 h at 25 000 rpm (90 000 × g) in a Beckman SW 27 rotor. The turbid band at the 0.8 M/1.2 M sucrose interface was harvested in a minimum volume by syringe puncture, diluted two-fold in 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, and centrifuged at 90 000 × g for 1 h in the SW 27 rotor. The resulting pellet of Golgi membranes could be used immediately, or more conveniently, frozen and stored at -80°C. The frozen membrane fractions should be thawed shortly before the assay by a short exposure to 37°C and maintained on ice prior to use.

The following marker enzymes were used to confirm the purity and the recovery of isolated Golgi-derived vesicles. They were enriched 143-fold in sialyltransferase specific activity (1.6% yield) [7], 0.96-fold in glucose-6-phosphatase specific activity (0.01% yield) [8], 5-fold in 5'-nucleotide specific activity (0.06% yield) [8], 15-fold in β-hexosaminidase specific activity (0.175% yield) [8].

### 2.3. Preparation of radioactive and non-radioactive CMP-Neu5Gc

Unless stated otherwise, all procedures were carried out at 4°C.

#### 2.3.1. Extraction of soluble protein from mouse liver

Livers from freshly killed Balb/c mice were homogenized in 5 vols (ml/g wt tissue) of ice-cold 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, us-

ing a Potter-Elvehjem homogeniser and centrifuged at 120 000 × g (Beckman 45Ti rotor; 39 000 rpm) for 1 h. The resulting supernatant was either used immediately or stored at -70°C until use.

#### 2.3.2. Enzymatic hydroxylation of CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac by CMP-Neu5Ac hydroxylase from mouse liver (EC 1.14.99.18)

37 kBq CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac (purchased from New England Nuclear, D-6072 Dreieich; spec. act. 10.1 GBq/mmol) was incubated for 3 h at 37°C with 20 ml of the mouse liver supernatant in the presence of 1 mM NADH and 0.5 mM FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O. The reaction was stopped by cooling on ice and protein was removed by ultrafiltration at 4°C (Sartorius membrane filter; 20 000 Da molecular mass limit). The clear, colourless eluate from ultrafiltration was diluted two-fold with water and applied to a 1.4 × 26 cm column of Dowex 1 × 8 (200-400 mesh; HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> counterion) equilibrated in 10 mM triethylamine hydrogencarbonate (pH 7.8). The column was washed with 2 vols of equilibration buffer and developed with an 800 ml linear gradient up to 1 M triethylamine hydrogencarbonate (pH 7.8). Fractions containing CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Gc (emerging between 0.3 M and 0.4 M buffer) were pooled and lyophilised. The residue was resuspended in 1.5 ml of 0.3 M triethylamine hydrogencarbonate (pH 7.8) and gel filtered on a 1.5 × 80 cm column of Sephadex G-10 (superfine) equilibrated in 5 mM Tris-HCl (pH 7.4), collecting 1 ml fractions. Fractions constituting the main peak of radioactivity were pooled, lyophilised and resuspended in 1 ml water.

The final product contained less than 1% CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac as revealed by radio-TLC of the intact and acid-hydrolysed product [5]. Furthermore, no free sialic acid was detected by HPLC analyses using the conditions described by Gross et al. [9] and radiochemical detection.

Non-radioactive CMP-Neu5Gc was synthesised from CTP and Neu5Gc using the CMP-sialate synthetase (EC 2.7.7.43) present in a soluble protein extract of frog liver [10] and purified by the same ion-exchange and gel-filtration procedures described above.

#### 2.4. Protein determination

Proteins from cells or Golgi vesicles, solubilized in the presence of SDS were estimated using a modification of the method of Lowry with bovine serum albumin as standard [11].

#### 2.5. Incubation of Golgi vesicles with CMP-[<sup>14</sup>C]sialic acid

Golgi vesicles, which were found to be sealed and of the same membrane topography as in vivo (see section 3) were incubated in 0.25 M sucrose, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM MnCl<sub>2</sub> and varying amounts of radio-labelled CMP-[<sup>14</sup>C]sialic acid, in a total volume of 100 μl. After incubation, the uptake of CMP-[<sup>14</sup>C]sialic acid by the Golgi vesicles and the transfer of [<sup>14</sup>C]sialic acid onto endogenous acceptors were determined by rapid filtration on millipore filters (GS type, 2.5 cm, pore size 0.22 μm), using a modified procedure originally described by Fleischer [12].

The uptake of CMP-[<sup>14</sup>C]sialic acid was determined by adding 1 ml of ice-cold stop buffer (0.25 M sucrose; 10 mM Tris-HCl, pH 7.4; 1 mM MgCl<sub>2</sub>) to one half of the incubation medium, followed by rapid filtration. The filter and retained vesicles were washed with 6 × 1 ml of the cold stop buffer, and

the radioactivity associated with the filter was then estimated by liquid scintillation counting.

The transfer of [ $^{14}\text{C}$ ]sialic acid was determined by precipitation of the glycosylated acceptors present in the second half of the incubation medium with 5% phosphotungstic acid in 2 N HCl, followed by filtration through Millipore filters and further washing with 5% (w/v) trichloroacetic acid. The radioactivity associated with the filter was then counted.

We have checked for non-specific adsorption of CMP-[ $^{14}\text{C}$ ]sialic acid by addition of a 100-fold excess of unlabelled CMP-sialic acid after incubation and prior to filtration on a Millipore filter. It was shown that there was no change in the amount of filter-associated CMP-[ $^{14}\text{C}$ ]sialic acid.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1. Latency of sialyltransferase towards CMP-[ $^{14}\text{C}$ ]Neu5Gc

To be of physiological significance, the assay of CMP-[ $^{14}\text{C}$ ]Neu5Gc uptake had to be performed only with Golgi vesicles shown to be sealed and of the same membrane topography as in vivo [13]. When sialyltransferases were assayed with increasing concentrations of Triton X-100 using labelled CMP-[ $^{14}\text{C}$ ]Neu5Gc and unlabelled asialofetuin as the macromolecular exogenous acceptor [5], an increased incorporation was observed (fig.1), indicating that 91% of the Golgi vesicles were well sealed and of the same topographical orientation as in vivo. Furthermore, this approach provides evidence that CMP-[ $^{14}\text{C}$ ]Neu5Gc has to be capable of crossing intracellular membranes in order to be used by the sialyltransferases present in the lumen of the Golgi vesicles.

#### 3.2. Time course of CMP-[ $^{14}\text{C}$ ]Neu5Gc penetration into mouse liver Golgi vesicles and of Neu5Gc transfer onto endogenous acceptors

Mouse liver Golgi vesicles were incubated with 1.5  $\mu\text{M}$  CMP-[ $^{14}\text{C}$ ]Neu5Gc. The rapid filtration technique resulted in virtually complete separation of the vesicles and incubation medium within seconds, in contrast to the alternative approach which involves a lengthy period of centrifugation [14]. Using this procedure, the rate of uptake of radiolabelled CMP-Neu5Gc by Golgi vesicles was shown to be linear and rapid for the first 4 min, after which it decreased (fig.2). We also checked for [ $^{14}\text{C}$ ]Neu5Gc transfer onto endogenous acceptors as a function of time (fig.2). Presumably, because of a high sialyltransferase activity and the low concentration of CMP-[ $^{14}\text{C}$ ]Neu5Gc used,

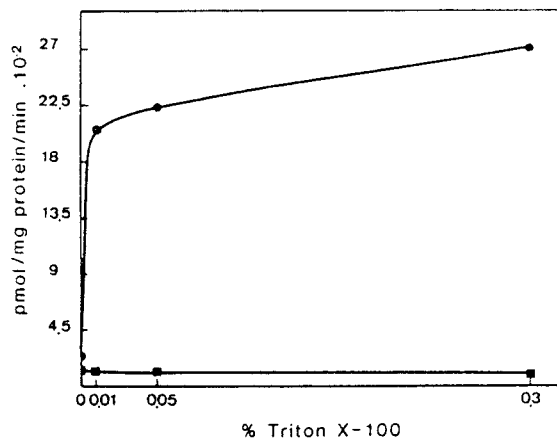


Fig.1. Latency of sialyltransferase with endogenous acceptors and asialofetuin as exogenous acceptor. Golgi vesicles were incubated at 37°C for 4 min with CMP-[ $^{14}\text{C}$ ]Neu5Gc (1  $\mu\text{M}$ , 63 000 dpm) in the presence or absence of asialofetuin (4 mg/ml) as exogenous acceptor, and various concentrations of Triton X-100 ranging from 0 to 0.3%. After incubation, the glycosylated acceptors were precipitated with phosphotungstic acid and washed by filtration with 5% trichloroacetic acid. The radioactivity associated with the filter was then counted. The incorporation onto asialofetuin (●—●) was obtained by the difference between two incubations one lacking exogenous acceptor (■—■).

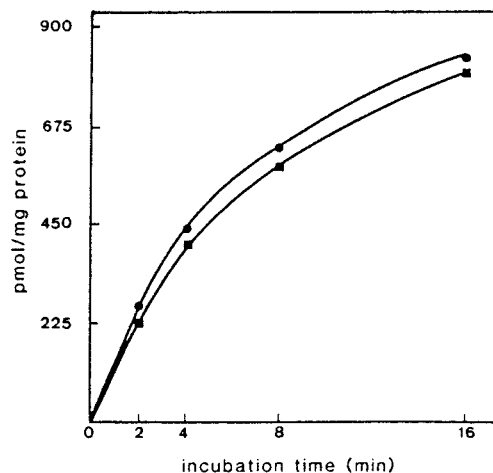


Fig.2. Time course of CMP-[ $^{14}\text{C}$ ]Neu5Gc penetration into mouse liver Golgi vesicles and Neu5Gc transfer onto endogenous acceptors. CMP-[ $^{14}\text{C}$ ]Neu5Gc (1.5  $\mu\text{M}$ , 94 000 dpm) was incubated with Golgi vesicles in STM buffer (pH 7.4) at 37°C for the times listed in the figures. (●—●) The total vesicle-associated radioactivity and the acid-precipitable radioactivity (■—■) (transport and transfer, respectively) were measured as described in section 2.

there was very little difference between total and acid-precipitable radioactivity.

The transport of CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Gc was also dependent on temperature: uptake at 4°C being 9% of that at 37°C (data not shown).

### 3.3. Concentration dependence of CMP-[<sup>14</sup>C]-Neu5Gc transport

The penetration rate of CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac was saturable with increasing concentrations of CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac (0.5–20 μM) in the medium (fig.3a). Initial uptake rates were measured with a 2 min incubation, and the resulting transfer of [<sup>14</sup>C]Neu5Ac onto endogenous acceptors studied. The points of the double reciprocal plot were fitted by linear regression analysis to a straight line ( $r = 0.998$ ) which gave an apparent  $K_m$  of 1.3 μM and a maximal velocity of 335 pmol/mg protein per min (fig.3a, inset). These values are of the same order of magnitude as those previously reported by Sommers and Hirschberg [14] for transport of CMP-Neu5Ac into rat liver Golgi.

Using exactly the same incubation conditions, we have shown (fig.3b) that the transport of CMP-Neu5Gc is saturable with high concentrations of CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Gc in the medium, giving rise to an apparent  $K_m$  of 1.25 μM and a maximal velocity of 325 pmol/mg protein per min (fig.3b, inset).

The results obtained above on the temperature dependence and substrate concentration dependence of CMP-Neu5Gc transport establish the existence of a carrier mechanism for CMP-Neu5Gc in mouse liver Golgi vesicles.

### 3.4. Specificity of CMP-Neu5Gc transport

To evaluate the specificity of this carrier process, radiolabelled CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Gc uptake by Golgi vesicles was assayed in the presence of various concentrations of unlabelled CMP-Neu5Ac up to 100-fold greater (500 μM) than that of radiolabelled CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Gc (5 μM). Uptake of CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Gc was inhibited by 50% at 8.5 μM CMP-Neu5Ac as shown in fig.4b. The results of similar competitive studies performed using radiolabelled CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac and unlabelled CMP-Neu5Gc under identical incubation conditions are shown in fig.4a. 50% inhibition was obtained at 5.6 μM CMP-Neu5Gc. This behaviour is consistent with the existence of a single carrier molecule present in the mouse liver Golgi vesicles mediating the uptake of both CMP-Neu5Ac and CMP-Neu5Gc substrates. The presence of a *N*-acetyl group in the sugar moiety does not constitute an important recognition feature as it can be replaced by a *N*-glycoloyl group without any change in the uptake rate of the CMP-sialic acid.

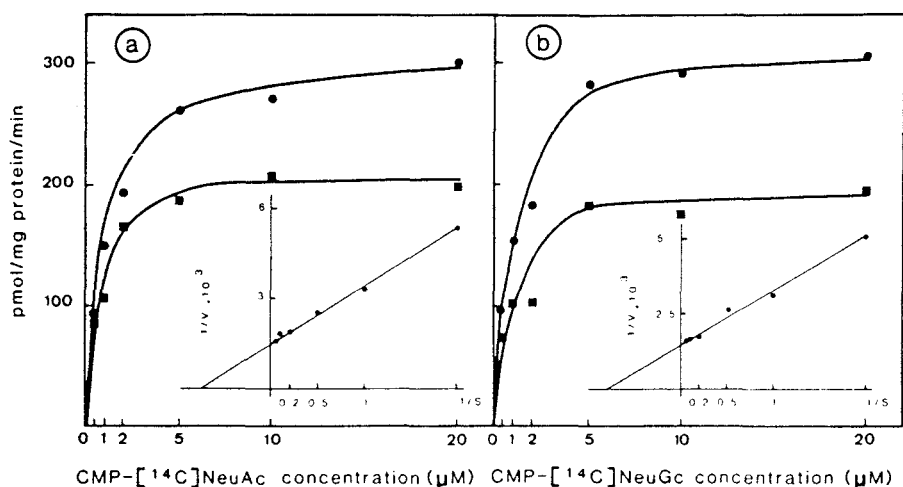


Fig.3. Concentration dependence of CMP-Neu5Gc transport. Golgi vesicles were incubated for 2 min with various concentrations of either CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac (a), or CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Gc (b). After incubation, the total vesicle-associated radioactivity (●—●, transport) and the acid-precipitable radioactivity (■—■, transfer) were measured as described in section 2. The insets show the Lineweaver-Burk plots.

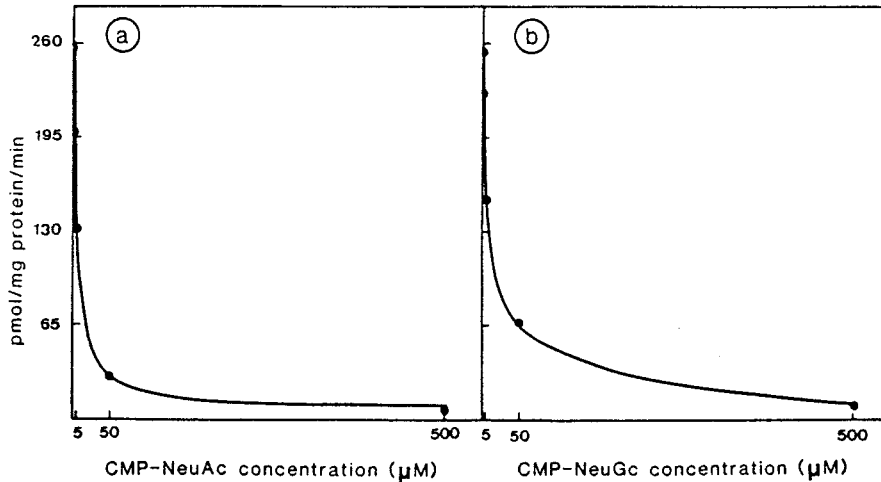


Fig.4. Mutual competition between CMP-Neu5Ac and CMP-Neu5Gc for their uptake by mouse liver Golgi vesicles. Golgi vesicles were incubated 4 min at 37°C with either CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Ac (5 μM, 277 500 dpm) and various concentrations of unlabelled CMP-Neu5Gc ranging from 0 to 500 μM (a), or with CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Gc (5 μM, 133 200 dpm) and various concentrations of CMP-Neu5Ac ranging from 0 to 500 μM (b). Total vesicle-associated radioactivity (transport) was measured as described previously in section 2.

3.5. Effect of intravesicular CMP

Finally, as was hypothesized by Capasso and Hirschberg [3], we have checked for the existence of an antiport mechanism involving the exchange of CMP with CMP-Neu5Gc. We set out to determine whether the uptake of CMP-Neu5Gc from

the cytoplasm was coupled with an exchange of CMP from the lumen by preloading Golgi vesicles with 100 μM CMP for 10 min. Previous experiments showed that Golgi vesicles were able to take up CMP (data not shown) as already described by Fleischer [12,15]. After removing extravesicular CMP by repeated centrifugation and washing, the CMP-preloaded vesicles were then incubated with 2 μM CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Gc and its uptake measured.

The results in fig.5 show that under these conditions, the total radioactivity associated with the vesicles, corresponding to CMP-Neu5Gc uptake, was enhanced with time in CMP-preloaded vesicles. This stimulating effect of increased luminal CMP concentrations suggests an exchange mechanism between intravesicular CMP and extravesicular CMP-Neu5Gc.

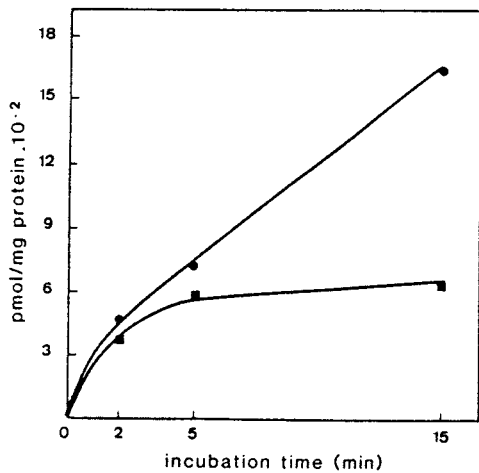


Fig.5. Effect of preloading Golgi vesicles with CMP on the uptake of CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Gc. Golgi vesicles were preincubated for 10 min at 37°C with 100 μM CMP (●—●) or without CMP (■—■). The extravesicular CMP was removed by centrifugation and further washing with the STM buffer and the Golgi vesicles were incubated for various times shown in the figure with 2 μM CMP-[<sup>14</sup>C]Neu5Gc at 37°C. The total vesicle-associated radioactivity was measured as described in section 2.

*Acknowledgements:* The financial support of CNRS and Fonds der Chemischen Industrie is gratefully acknowledged. We would also like to express our gratitude to the European Commission for funding part of this project through ERASMUS scheme.

REFERENCES

[1] Corfield, A. and Schauer, R. (1982) in: Sialic Acids (Schauer, R. ed.) Springer (Wien), Cell Biology Monogr. 10, 5-50.

- [2] Carey, D., Sommers, L. and Hirschberg, C. (1980) *Cell* 19, 597-605.
- [3] Capasso, J. and Hirschberg, C. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 7051-7055.
- [4] Cacan, R., Cechelli, R., Hoflack, B. and Verbert, A. (1984) *Biochem. J.* 224, 277-284.
- [5] Shaw, L. and Schauer, R. (1988) *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 369, 477-486.
- [6] Balch, W., Dunphy, W., Braell, W. and Rothman, J. (1984) *Cell* 39, 405-416.
- [7] Bauvois, B., Cacan, R., Fournet, B., Caen, J., Montreuil, J. and Verbert, A. (1982) *Eur. J. Biochem.* 121, 567-572.
- [8] Beaufay, H., Amar-Cortese, A., Feytmans, E., Thines-Sempoux, D., Wibo, M., Robbi, M. and Berthet, J. (1974) *J. Cell. Biol.* 61, 188-200.
- [9] Gross, H., Bünsch, A., Paulson, J. and Brossmer, R. (1987) *Eur. J. Biochem.* 168, 595-602.
- [10] Haverkamp, J., Beau, J.M. and Schauer, R. (1979) *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 360, 159-166.
- [11] Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. and Randall, R. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- [12] Fleischer, B. (1983) *J. Histochem. Cytochem.* 31, 1033-1040.
- [13] Perez, M. and Hirschberg, C. (1987) *Methods Enzymol.* 138, 709-715.
- [14] Sommers, L. and Hirschberg, C. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 10811-10817.
- [15] Brandam, E. and Fleischer, B. (1981) *J. Cell. Biol.* 91, 270-275.

Nous avons donc mis en évidence l'existence d'un transporteur du CMP-Neu5Gc dans les membranes des vésicules golgiennes de foie de Souris. Il s'agit, en effet, d'un processus d'entrée du CMP-Neu5Gc dépendant du temps, de la température et qui est saturable. En outre, des expériences de compétition, réalisées avec du CMP-Neu5Gc et du CMP-Neu5Ac, nous ont indiqué que ces deux substrats partageaient le même transporteur.

Finalement, nous avons obtenu quelques résultats préliminaires concernant le mécanisme d'entrée du CMP-Neu5Gc dans les vésicules golgiennes de foie de Souris: il s'agit d'un échange qui s'effectue entre une molécule de CMP intraluminal et le CMP-Neu5Gc cytoplasmique.

La figure 26 schématise les résultats des travaux présentés dans cet article.

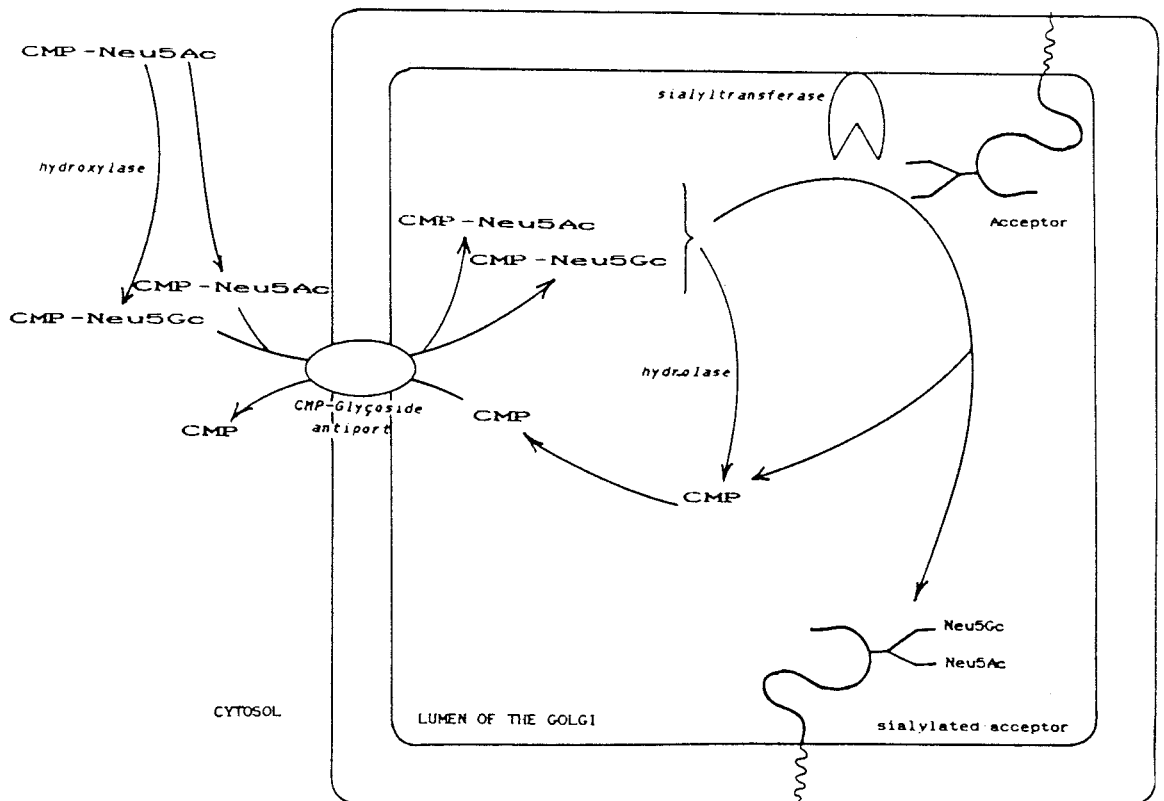


Fig. 26: Schématisation des différents intervenants du métabolisme des acides sialiques.

L'examen attentif de ce schéma amène un certain nombre de remarques et de questions, en particulier:

\* D'un point de vue métabolique, ce transporteur commun au CMP-Neu5Ac et au CMP-Neu5Gc représente-t-il une étape de la glycosylation pouvant être soumise à régulation? On peut, en effet, imaginer que des taux de sialylation différents dans des cellules d'origines diverses résultent d'une telle régulation du transport.

\* Quelle étape dans le métabolisme du CMP-Neu5Gc est déterminante du taux de Neu5Gc incorporé dans les glycoconjugués? Est-ce l'hydroxylase, le transporteur de CMP-acide sialique ou encore les activités sialyltransférasiques?

Des études préliminaires sur ces facteurs influençant la biosynthèse et l'incorporation de l'acide N-glycoloylneuraminique dans les glycoconjugués de foie de Souris ou de Rat indiquent que l'élément déterminant est l'activité de la CMP-Neu5Ac hydroxylase (Lepers et al. [197]).

## Conclusions Générales



Des études que nous venons de réaliser sur la régulation de la sialylation des glycoconjugués, en utilisant comme modèle les cellules CHO en culture, se dégagent un certain nombre d'enseignements. Notamment:

1- Nous avons mis au point une technique simple et rapide de perméabilisation des cellules fibroblastiques CHO par congélation-décongélation permettant une mesure rapide du transport des CMP-acides sialiques du compartiment cytoplasmique dans la lumière des vésicules intracellulaires.

2- En appliquant cette méthode de perméabilisation à la mesure du transport des CMP-acides sialiques, nous avons constaté une augmentation de ce transport et de l'accumulation des précurseurs, donneurs de sucres: la congélation/décongélation permet aux CMP-acides sialiques d'accéder aux compartiments intracellulaires tels que le Golgi.

3- Nous avons montré qu'il existait un phénomène de transport pour le CMP-Neu5Ac dans ces cellules CHO perméabilisées, en appliquant les critères de mise en évidence des transporteurs qui mettent en jeu des composants membranaires sensibles aux variations de la température, saturables en présence d'un excès de substrat et inhibés par des analogues de substrat, en l'occurrence des dérivés du CMP-Neu5Ac. Nous avons également pu établir un parallèle entre un compartiment sensible à la monensine: le Golgi et la localisation du transporteur du CMP-Neu5Ac.

Ce modèle de cellules perméabilisées nous a permis de préciser le mécanisme de l'entrée du CMP-Neu5Ac dans les vésicules intracellulaires. Cette entrée est couplée à la sortie d'une molécule de CMP. Ce phénomène correspond à un transport actif secondaire encore dénommé antiport; il est spécifique du CMP et du CMP-Neu5Ac. La "force motrice" de ce transport provient de la mise en place d'un gradient électrochimique de CMP. La composante électrique du gradient n'intervient pas, nous l'avons vérifié, en utilisant divers ionophores à cations, à protons et des agents découplants. Par contre, une différence de concentrations en CMP induit le passage du CMP-Neu5Ac.

5- Par contre, les cellules CHO mutantes perméabilisées ne répondent à aucun de ces critères de mise en évidence d'un constituant membranaire jouant le rôle de transporteur du CMP-Neu5Ac. Les mouvements transmembranaires qui existent pourtant ne peuvent s'expliquer que par une diffusion passive de ce substrat qui existerait dans les deux types cellulaires mais qui serait masquée dans les cellules CHO sauvages par le fonctionnement de l'antiport.

6- L'utilisation de vésicules golgiennes purifiées des cellules CHO nous a permis d'étudier le transporteur de CMP-Neu5Ac sans interférences avec le métabolisme cellulaire et de vérifier les résultats obtenus précédemment.

D'autre part, il a été observé que le CMP-Neu5Gc, un dérivé du CMP-Neu5Ac synthétisé dans le cytoplasme, était particulièrement abondant sur les glycoconjugués du foie de Souris. Nous avons donc préparé des vésicules golgiennes à partir de foie de Souris pour étudier le transport de ce dérivé dans la lumière du Golgi et nous avons montré que ces deux substrats partageaient le même transporteur.

Ces derniers résultats originaux suscitent un certain nombre de questions, en particulier:

Le Neu5Gc (96%) est trouvé en proportion plus importante que le Neu5Ac (4%) sur les glycoconjugués du foie de Souris. Les proportions sont inversées sur les glycoconjugués du foie de Rat (Neu5Gc 11%, Neu5Ac 88%).

Quelle activité enzymatique impliquée dans le métabolisme des CMP-acides sialiques détermine le taux de Neu5Gc ou de Neu5Ac sur les glycoconjugués?

Est-ce l'hydroxylase cytoplasmique caractérisée par Shaw et al. [198] et qui permet la synthèse du CMP-Neu5Gc à partir du CMP-Neu5Ac?

Est-ce le transporteur qui serait plus spécifique de l'un ou l'autre de ces donneurs de sucre?

Ou alors, les sialyltransférases sont-elles discriminantes pour le transfert des acides sialiques?

Nous avons montré que le système de transport des CMP-acides sialiques n'est pas discriminant dans le transport du CMP-Neu5Ac ou du CMP-Neu5Gc aussi bien dans les vésicules golgiennes de foie de Souris que de foie de Rat.

En outre, les activités sialyltransférasiques de ces tissus ne sont pas fondamentalement différentes envers le CMP-Neu5Ac ou le CMP-Neu5Gc. Ces derniers résultats corroborent d'ailleurs ceux de Higa et Paulson [199], qui utilisent des sialyltransférases purifiées.

Nos premiers résultats ont montré que l'activité hydroxylasique envers le CMP-Neu5Ac chez la Souris était 30 fois supérieure à celle trouvée chez le Rat. L'hydroxylase cytoplasmique apparait comme étant le facteur déterminant dans la proportion relative de ces deux acides sialiques

L'étape ultérieure dans l'étude du transport des CMP-acides sialiques sera la purification.

Elle devrait permettre de déterminer les caractéristiques structurales de cette protéine, son orientation dans la membrane golgienne ou encore ses homologues avec d'autres transporteurs ou glycosyltransférases.

La purification de ce transporteur permettrait également la production d'anticorps spécifiques qui serviraient de sondes pour répondre à de multiples questions biologiques:

La localisation du transporteur du CMP-Neu5Ac est -elle restreinte au *trans*-Golgi? ou est-il retrouvé dans d'autres compartiments subcellulaires?

ou biochimiques:

Y-aurait-il "cross-reaction" de l'anticorps entre le transporteur et les transférases correspondantes? Si oui, ces deux activités enzymatiques feraient-elles partie d'un même complexe protéique?

Déjà, la reconstitution de l'activité de transport du CMP-Neu5Ac à partir de fractions protéiques golgiennes dans des protéoliposomes constitue un nouveau modèle de choix pour préciser, entre autre, la stoechiométrie de l'échange entre le CMP-Neu5Ac et le CMP (Milla et Hirschberg [200]).

## Matériels et Méthodes

## I- LES MATERIELS BIOLOGIQUES

### A- Les cellules CHO

#### 1- Culture

Les cellules d'Ovaires de Hamster chinois (CHO) parentales, auxotrophes pour la proline (nommées Pro<sup>-5</sup>), et les cellules CHO déficientes dans le transport du CMP-Neu5Ac (nommées Lec2), sont cultivées en monocouche ou en suspension. Elles poussent dans le milieu ALPHA (Gibco) supplémenté en serum de veau foetal (10%).

#### 2- Perméabilisation des cellules

Les cellules CHO peuvent être utilisées 72 heures après leur repiquage. Après centrifugation à basse vitesse (500g, 10 minutes), elles sont congelées à -80°C. Une décongélation rapide conduit à la perméabilisation spécifique de la membrane plasmique.

#### 3- Numération, viabilité cellulaire

Les cellules CHO sont comptées grâce à la cellule de Malassez. La mesure de la perméabilisation est réalisée par le test au bleu Trypan. Les cellules sont remises en suspension dans le tampon décrit par Cox et Peters [201] contenant du Bleu Trypan à la concentration de 0,02% (poids/volume). L'utilisation du Bleu Trypan pour le comptage des cellules vivantes et intègres est basée sur le fait que celles-ci ne laissent pas pénétrer le colorant et demeurent "blanches". Le pourcentage de cellules colorées indiquent le pourcentage de cellules perméabilisées.

#### 4- Traitement à la monensine

Les cellules sont cultivées en monocouche dans des flacons de plastique de 175 cm<sup>2</sup>. Lorsque les cellules sont à confluence, le flacon est vidé de son milieu de culture (Alpha MEM) qui est remplacé par 14 ml de milieu neuf. Les cellules sont préincubées 2 heures en présence de monensine 10 µM. Une solution stock de monensine 10 mM est réalisée dans

l'éthanol. C'est pourquoi, des cellules non traitées par la monensine constituant un témoin sont incubées dans les mêmes conditions mais en présence d'éthanol 1<sup>o</sup>/100. Après cette incubation, le milieu est écarté, les cellules sont détachées puis perméabilisées.

## B- Préparation des vésicules golgiennes des cellules CHO

### 1- Homogénéisation des cellules

Les vésicules golgiennes des cellules CHO sont isolées selon une méthode modifiée de celle décrite par Balch et al. [202]. Les cellules CHO ( $2 \cdot 10^9$  cellules), cultivées en suspension sont centrifugées à basse vitesse (500g, 10 minutes). Elles sont remises en suspension dans 10 ml d'un milieu hypotonique (10 mM NaCl, 15 mM Mg acétate, 1 mM DTT, 10 mM Hepes pH 7,5), sous agitation magnétique, pendant 10 minutes, traitement qui les fait gonfler. Après centrifugation des cellules à 1500 t/min. pendant 10 minutes, le surnageant est éliminé, les cellules sont remises en suspension dans un ml du même milieu hypotonique. Elles sont alors homogénéisées manuellement dans un homogénéiseur de Potter par 20 allers-retours du piston. L'homogénat est ramené à isoosmolarité par addition de 200  $\mu$ l d'une solution hypertonique (700 mM NaCl, 40 mM Mg acétate, 1 mM DTT, 400 mM Hepes pH7,5). Toute ces étapes sont réalisées à 4°C.

### 2- Gradient discontinu de saccharose

L'homogénat obtenu est ajusté à une concentration de 1,4 M en saccharose par addition de saccharose 2,3 M dans du Tris-HCl 10 mM (pH 7,4) contenant de l'EDTA 1 mM. Le gradient de saccharose est coulé comme schématisé sur la figure 27. Chacune des solutions de saccharose est préparée dans du Tris-HCl 10 mM pH 7,4. Les gradients sont centrifugés 2 heures 30 à 25000 rpm (90000g) dans un rotor SW27 Beckman. La bande opalescente qui apparaît à l'interface 0,8 M saccharose/1,2 M saccharose est collectée, diluée deux fois dans une solution Tris-HCl 10 mM pH 7,4 et centrifugée à 90000g pendant une heure dans le rotor SW27. Le culot de vésicules golgiennes obtenu peut être utilisé de suite et dans ce cas est remis en suspension dans une solution tampon notée STM (Saccharose

0,25 M, Tris-HCl 10 mM pH 7,4, MgCl<sub>2</sub> 1 mM). Toutes ces opérations sont effectuées à 4 °C.

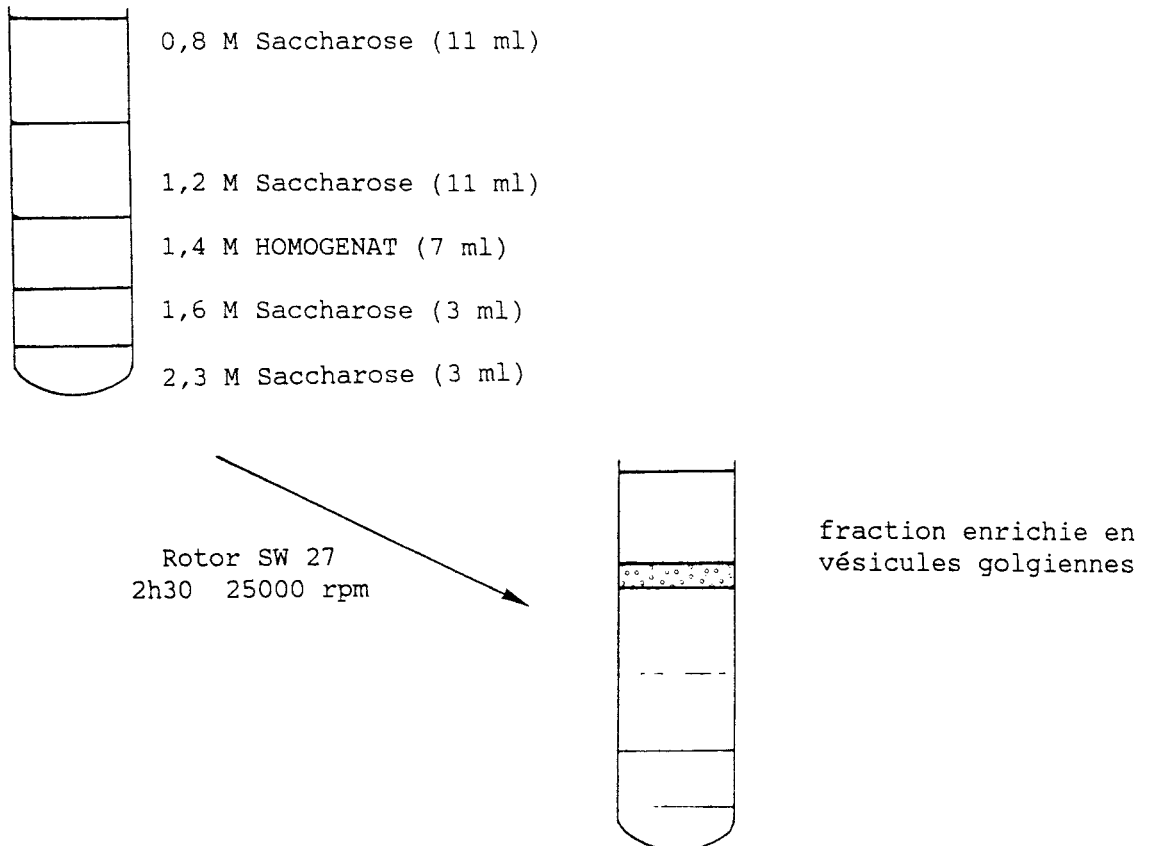


Fig. 27: Schématisation du gradient de saccharose utilisé pour la préparation de vésicules golgiennes.

### C- Préparation des vésicules golgiennes de foie de Souris

#### 1- Les animaux

Les animaux utilisés sont des souris Swiss de quatre semaines. Elles sont tuées par inhalation de chloroforme. Les foies sont rapidement prélevés et placés dans un tampon saccharose 0,25 M, Tris-HCl 10 mM à pH 7,4, MgCl<sub>2</sub> 1 mM (STM) maintenu à 4 °C.

#### 2- Homogénéisation

Après passage dans une presse à tissus, les foies broyés sont homogénéisés dans un homogénéiseur de Potter (B. Braun Melsungen) de 30 ml, à basse vitesse (750 rpm) par quatre allers-retours dans 3

volumes de tampon STM. L'homogénat ainsi obtenu est ajusté à 1,4 M en saccharose par addition d'une solution de saccharose 2,3 M préparée dans du Tris-HCl 10 mM pH 7,4.

### 3- Gradient discontinu en saccharose

Le reste des opérations est celui décrit pour les vésicules golgiennes des cellules CHO.

## II- CONTROLE DE LA PURETE ET DE L'INTEGRITE DES VESICULES GOLGIENNES PREPAREES

### A- Méthodes biochimiques: les enzymes marqueurs

Les enzymes dont les dosages sont décrits ci-dessous ont été utilisés comme enzymes marqueurs de fractions subcellulaires. Les résultats obtenus nous ont permis de suivre les enrichissements en une fraction donnée au cours du fractionnement et de la purification et d'estimer les contaminations éventuelles par d'autres fractions subcellulaires. Les activités enzymatiques de chaque fraction étudiée sont exprimées par rapport à l'activité enzymatique de l'homogénat.

#### 1- Marqueur du reticulum endoplasmique

Glucose-6-phosphatase (D-Glucose-6-phosphate phosphohydrolase, E.C. 3.1.3.9).

La glucose-6-phosphatase hydrolyse le glucose-6-phosphate en glucose et en phosphate . Le dosage du phosphate libéré permet de mesurer l'activité de l'enzyme. (Beaufay et al. [203]).

#### Solutions

- \* Molybdate d'ammonium à 2,5 % dans  $H_2SO_4$ , 5N
- \* Sulfite de sodium 20 % dans de l'eau.
- \* Hydroquinone (1 % dans de l'eau, à préparer extemporanément).
- \* Glucose-6-phosphate 50 mM.



### Dosage

La réaction est déclenchée par addition de 50 µl de glucose-6-phosphate dans 50 µl de tampon STM contenant la fraction à étudier. Après une incubation de 10 minutes, la réaction est stoppée par addition de 0,2 ml d'acide trichloracétique à 10 %. Les tubes sont centrifugés à 3000g, 5 minutes et du surnageant, 240 µl sont prélevés pour doser le phosphate libéré selon la méthode de Fiske et Subbarow [204]. A ces 240 µl sont ajoutés:

- \* 0,4 ml de réactif molybdique (agiter vigoureusement)
- \* 0,2 ml de sulfite de sodium
- \* 0,2 ml d'hydroquinone

Après 15 à 60 minutes, la coloration est lue au spectrophotomètre à 725 nm. Une gamme étalon contenant de 0,1 à 2,5 µM de phosphore est réalisée dans les mêmes conditions.

### 2- Marqueur de l'appareil de Golgi

#### Sialyltransférase

La sialyltransférase catalyse le transfert du [<sup>14</sup>C]NeuAc sur des accepteurs macromoléculaires exogènes, ici l'asialofétuine. (Bauvois et al. [205]).

#### Solutions

- \* CMP-[<sup>14</sup>C]NeuAc (262 mCi/mmol 50µCi/2 ml)
- \* MgCl<sub>2</sub> 100 mM
- \* asialofétuine 50 mg/ml
- \* Triton X-100 à 10%

#### Dosage

60 µl de la fraction à analyser sont préincubés 5 minutes à température ambiante avec 3 µl de Triton X-100. La réaction est déclenchée par addition de:

- \* 7,5 µl d'asialofétuine
- \* 3,8 µl  $MnCl_2$
- \* 2,5 µl CMP-[<sup>14</sup>C]NeuAc
- \* 1,7 µl STM

Après 15 minutes à 37°C, la réaction est arrêtée par précipitation à l'acide phosphotungstique 5% dans HCl, suivie d'une filtration sur filtre de verre (GF/C Glass Fiber Filter-Whatmann). Les filtres sont lavés plusieurs fois par de l'acide trichloracétique 5 % avant d'être comptés en scintillation liquide.

### 3- Marqueur de la membrane plasmique

5' nucléotidase basique (5' ribonucléotide phosphohydrolase E.C. 3.1.3.5)

L'enzyme catalyse la réaction:

Adénosine 5'-monophosphate  $\longrightarrow$  adénosine + ortophosphate

Le dosage du phosphate libéré permet de mesurer l'activité de l'enzyme (voir le principe du dosage du phosphate exposé auparavant)

#### Solutions

- \* AMP 50 mM
- \*  $MgCl_2$  100 mM
- \* Tris-HCl 500 mM, pH 8

#### Dosage

La réaction est déclenchée par addition de

- \* 50 µl AMP
- \* 10 µl  $MgCl_2$
- \* 10 µl Tris-HCl

à 30 µl de la fraction à analyser. Après une incubation de 30 minutes à 37 °C, la réaction est stoppée par addition de 0,2 ml d'acide trichloracétique à 10% et le phosphate libéré est dosé. Le protocole est identique à celui décrit pour la glucose-6-phosphatase.

#### 4- Marqueur des lysosomes

##### $\beta$ -hexosaminidase

Cette enzyme catalyse l'hydrolyse du paranitrophényl-glycoside . Le paranitrophénol et le glycoside sont libérés.

##### Solutions

- \* pNp-GlcNAC 3mM
- \* tampon acétate 0,2 M pH 4,5
- \* tampon bicarbonate-carbonate 1 M

##### Dosage

50  $\mu$ l de la fraction à analyser sont incubés 15 minutes à 37 °C avec 50  $\mu$ l d'une solution de pNp-GlcNAC 3 mM dans le tampon acétate 200 mM pH 4,5. La réaction est arrêtée par addition de 100  $\mu$ l d'éthanol, à température ambiante. Après centrifugation à 50000 rpm, 10 minutes, 100  $\mu$ l du surnageant sont prélevés. Ajouter 500  $\mu$ l de  $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 M. Une gamme étalon contenant de 5 à 50  $\mu$ g de pNp est réalisée dans les mêmes conditions.

#### B- Microscopie électronique\*

##### 1- Fixation

Le culot de Golgi de cellules CHO obtenu est fixé 3 heures à 4 °C avec 1 ml d'un mélange contenant:

- \* 9 volumes de tampon cacodylate 0,1 M, pH 7,4
- \* 1 volume de glutaraldéhyde 25 % (2,5 % final)

Une série de lavages rapides est réalisée à température ambiante dans le mélange:

- \* 3 volumes de saccharose (0,33 M)
- \* 1 volume de tampon cacodylate 0,1 M, pH 7,4

##### 2- Post-fixation

Le culot de Golgi est ensuite post-fixé pendant 2 heures par le tétroxyde d'osmium à 1 % dans le même tampon cacodylate 0,1 M, NaCl 0,154 M pH 7,4.

### 3- Déshydration éthylique

Cette déshydratation s'effectue par des lavages successifs, dans des solutions contenant des concentrations croissantes d'acétone:

- \* 2 fois 5 minutes, acétone 50 %
- \* 2 fois 8 minutes, acétone 70 %
- \* 2 fois 15 minutes, acétone 90 %
- \* 2 fois 30 minutes, acétone pure.

### 4- Imprégnation, inclusion, coupes et coloration

Après imprégnation pendant 2 heures dans une solution d'araldite dans l'acétone, les culots sont inclus dans l'araldite pure, coupés et contrastés par l'acétate d'uranyle en solution alcoolique et par des sels de plomb.

### 5- Observations

Les coupes sont examinées grâce à un microscope électronique Elmiskop I ou Jeol 120 CX

---

\* Les différents contrôles effectués en microscopie électronique ont été réalisés par le docteur Eliane Porchet-Henneré, et son équipe que nous remercions.

### III- MESURES DES ACTIVITES SIALYLTRANSFERASIQUES ET DU TRANSPORT DES GLYCOSYL-NUCLEOTIDES

#### A- Dans les cellules perméabilisées

##### 1- Conditions optimales d'incubation

Les conditions optimales d'incubation des cellules perméabilisées sont les suivantes:

- \* CMP-[<sup>14</sup>C]NeuAc (Amersham International) 262 mCi/mmol ie  
9,69 GBq/mmol
- \* MnCl<sub>2</sub> 5 mM
- \* accepteur exogène, si nécessaire, l'asialofétuine  
4 mg/ml

pour un volume d'incubation final de 100 µl, à 37°C.

##### 2- Mesure du transport

Après incubation avec le CMP-[<sup>14</sup>C]NeuAc radioactif, la radioactivité totale associée aux cellules (radioactivité retenue dans les cellules perméabilisées) est une mesure du transport du CMP-[<sup>14</sup>C]NeuAc à l'intérieur des vésicules intracellulaires. A la fin d'une incubation, la moitié du milieu réactionnel est diluée 100 fois dans du tampon de Cox et Peters. Le tube est centrifugé à 3000g pendant 30 secondes. L'opération est renouvelée 3 fois de suite. Le culot cellulaire est dissous dans 200 µl d'acide formique (100 °C, 10 minutes) et la radioactivité déterminée en scintillation liquide.

##### 3- Mesure du transfert

La radioactivité précipitable à l'acide trichloracétique est une mesure de l'activité de transfert sur les accepteurs endogènes, Cacan et al. [206]. Pour déterminer la radioactivité liée de façon covalente, les cellules sont traitées comme précédemment, mais après le dernier lavage, l'autre moitié du culot cellulaire restant est précipitée par 5 ml d'acide trichloracétique à 5 % (w/v) dans l'eau. Le précipité est lavé 3 fois par 10 ml du même acide, placé dans 200 µl d'acide formique

(100°C, 10 minutes) et la radioactivité est déterminée en scintillation liquide.

#### 4- Extraction séquentielle des intermédiaires lipidiques

Après incubation, la réaction est stoppée par addition de 300 µl de "mélange d'arrêt" (cacodylate de sodium 0,1 M, IgG 1 %, MgCl<sub>2</sub> 4 mM pH 7,4), 800 µl de méthanol et 1200 µl de chloroforme. Les intermédiaires lipidiques sont ensuite extraits par la méthode décrite par Hoflack et al. [207]. Les différentes étapes de la méthode sont décrites dans la figure 28: elle s'inspire de celle décrite par Oliver et Hemming [208]. Elle permet d'obtenir:

\* Une phase supérieure aqueuse,

renfermant les composés hydrophiles: les glycosyl-nucléotides marqués, leurs produits de dégradation et les produits de dégradation des intermédiaires lipidiques (les phospho-oligosaccharides et oligosaccharides libres relâchés dans le milieu). Le matériel radioactif détecté dans cette phase correspond aux molécules transportées et accumulées dans les vésicules intracellulaires. Le matériel radioactif non piégé dans les vésicules est éliminé lors des lavages successifs du culot cellulaire.

\* Une phase inférieure organique,

contenant des produits hydrophobes, mais solubles dans cette phase chloroforme/méthanol. Il s'agit essentiellement des intermédiaires lipidiques de type dolichols: Man-P-Dol, Glc-P-Dol, GlcNAc-PP-Dol, GlcNAc<sub>2</sub>-PP-Dol, ainsi que les sphingolipides et certains gangliosides. Après séchage sous courant d'air, la radioactivité est détectée par comptage en scintillation liquide.

\* Une phase chloroforme/méthanol/eau,

permettant l'extraction des dolichol-pyrophosphate-oligosaccharides et des gangliosides les plus hydrophiles. Cette phase est séchée sous courant d'air chaud et analysée en scintillation liquide.

\* Un résidu protéique,

renfermant les protéines nouvellement glycosylées. La détermination de la radioactivité est faite par solubilisation du culot protéique dans 200  $\mu$ l d'acide formique (100°C, 10 minutes et comptage en scintillation liquide). La radioactivité déterminée dans le culot protéique est une mesure de l'activité de transfert sur accepteurs endogènes.

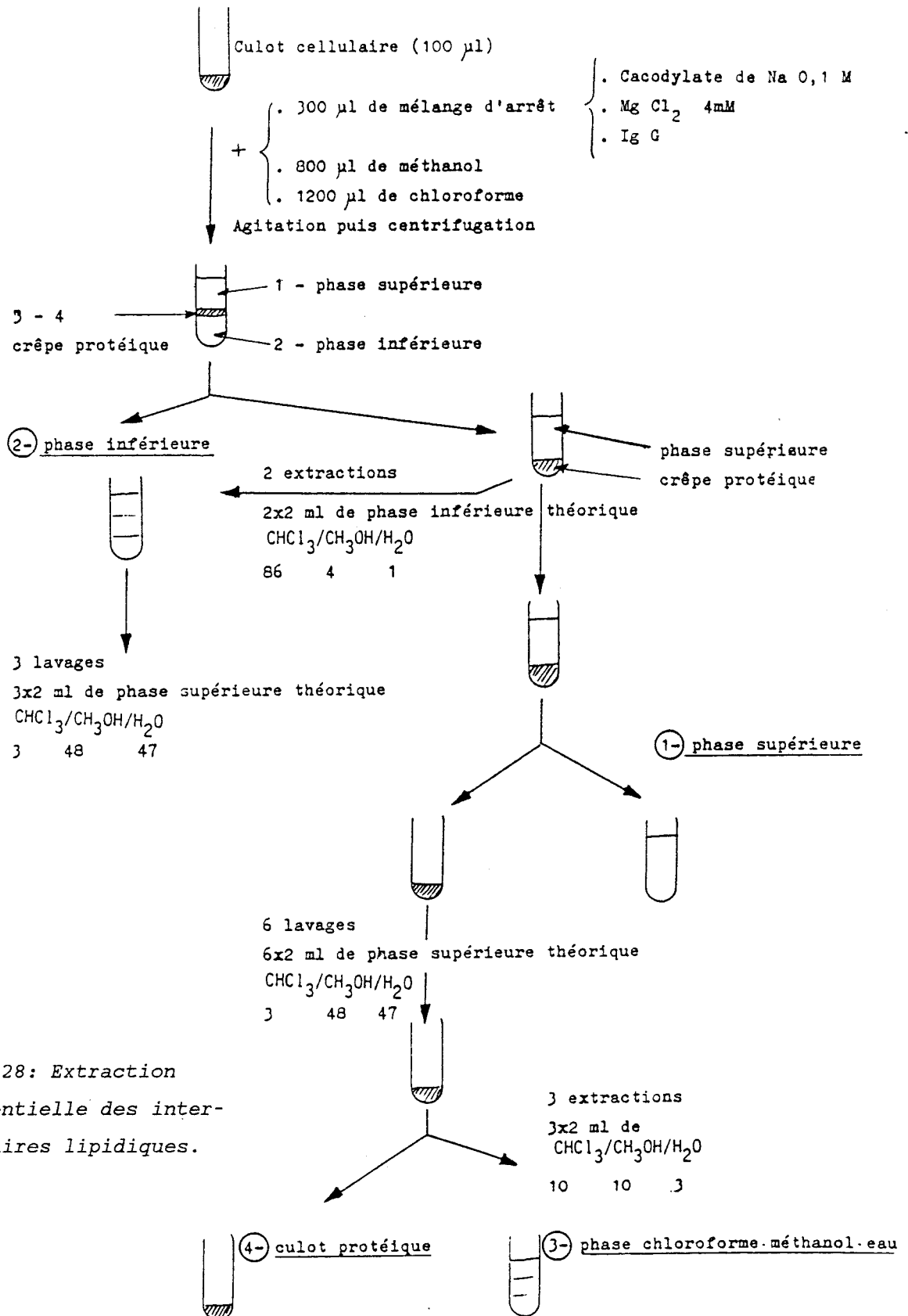


Fig. 28: Extraction séquentielle des intermédiaires lipidiques.

## B- Dans les vésicules golgiennes

### 1- Conditions optimales d'incubation

Au préalable, il est nécessaire de s'assurer que les vésicules golgiennes sont closes et dans la même orientation qu'*in vivo*. Ceci est réalisé par des expériences de latence envers les sialyltransférases et un accepteur macromoléculaire exogène non marqué: l'asialofétuine (4 mg/ml). L'utilisation de concentrations croissantes en Triton X-100 (de 0 à 0,3 %), permet de libérer l'activité sialyltransférase indiquant qu'environ 91 % des vésicules conservent la même orientation qu'*in vivo*. Les vésicules golgiennes sont incubées en présence de saccharose 0,25 M, Tris-HCl 10 mM (pH 7,4), KCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, MnCl<sub>2</sub> 5 mM et du CMP-[<sup>14</sup>C]NeuAc 262 mCi/mmol ie 9,69 GBq/mmol final pendant 2 minutes et à 37 °C.

### 2- Mesure du transport

Après incubation avec le CMP-[<sup>14</sup>C]NeuAc, la radioactivité totale associée aux vésicules golgiennes (radioactivité retenue dans les vésicules) est une mesure du transport du CMP-[<sup>14</sup>C]NeuAc à l'intérieur des vésicules golgiennes. A la fin de l'incubation, la moitié du milieu réactionnel est additionnée de 1 ml d'un "mélange d'arrêt" froid. Il s'agit d'une solution tampon contenant du saccharose 0,25 M, du MgCl<sub>2</sub> 1 mM, du Tris-HCl 1 mM (pH 7,4). L'ensemble est filtré rapidement sur rampe de filtration, sur filtre Millipore (la taille des pores n'excède pas 0,22 µm). Trois lavages par 1 ml de la solution tampon précédemment décrite sont suffisants pour éliminer toute trace de radioactivité extravésiculaire. La radioactivité associée au filtre est comptée en scintillation liquide.

### 3- Mesure du transfert

L'autre moitié du mélange réactionnel est précipitée par 1 ml d'acide phosphotungstique préparé à 5 % dans HCl 2N. L'ensemble est également filtré sur filtre Millipore (taille des pores 0,22 µm) et lavé 2 fois par 10 ml d'acide trichloracétique à 5 % (w/v) dans l'eau. La radioactivité associée au filtre est comptée en scintillation liquide.



C'est une mesure de l'activité de transfert sur les transporteurs endogènes.

Nous nous sommes assurée qu'il ne s'agissait pas d'une adsorption non spécifique du CMP-[<sup>14</sup>C]NeuAc par addition d'un excès de CMP-NeuAc non radioactif après incubation mais juste avant la filtration. Aucune variation dans la quantité de radioactivité associée au filtre n'a été détectée.

Annexe

**Les cellules perméabilisées comme moyen d'accès aux organites  
intracellulaires: une approche des réactions de glycosylation**

La perméabilisation sélective de la membrane plasmique des cellules animales permet d'introduire au sein de la cellule des substrats qui d'ordinaire, ne franchissent pas la barrière plasmique. Ceci élargit la gamme des précurseurs radioactifs utilisables dans les études métaboliques et évite les inconvénients de leur interconversion en d'autres substrats au sein de la cellule. En outre, ce modèle nous a permis d'étudier les phénomènes de transport membranaires des glycosyl-nucléotides *in situ* sans recourir à l'utilisation de fractions membranaires qui nécessitent la mise en oeuvre de manipulations trop longues pour un phénomène aussi rapide que le transport. Notre propos, dans cette annexe, est de passer en revue quelques-unes de ces méthodes physiques et chimiques qui ont été utilisées avec succès dans diverses études métaboliques et en particulier, celles que nous avons appliquées à l'étude de la glycosylation (Cecchelli et al. (1983) [209], Cacan et al. (1984) [210]).

**I- LES METHODES PHYSIQUES**

**A- Le grattage des cellules: le "scraping"**

Cette méthode de perméabilisation sélective de la membrane plasmique de cellules cultivées a permis l'étude directe des processus de transport intracellulaire des protéines du reticulum endoplasmique rugueux à l'appareil de Golgi (Featherstone [211], Orci et al. [212]). Les cellules animales cultivées en monocouche sont incubées dans un milieu hypotonique qui les fait gonfler (Beckers et al. [213]). Elles sont alors raclées sur toute la surface de la culture à l'aide d'un grattoir en caoutchouc ce qui conduit au déchirement sélectif de la membrane plasmique de plus de 95% des cellules. Ce procédé perturbe l'intégrité du cytosol mais laisse le noyau, le reticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi intacts. Il est donc possible de faire varier les conditions et la composition du cytoplasme en particulier, par

l'addition de produits chimiques et de produits radiomarqués.

### B- La congélation-décongélation

Nous avons développé une méthode très simple et très rapide de perméabilisation de cellules cultivées en suspension pour l'étude des phénomènes de glycosylation. La membrane plasmique de cellules d'Ovaire de Hamster chinois a été sélectivement perméabilisée par un simple cycle de congélation à  $-80^{\circ}\text{C}$  et de décongélation à  $37^{\circ}\text{C}$ . Cette méthode de perméabilisation avait déjà été décrite pour les bactéries et les levures mais pas encore pour les cellules animales en culture (Souzu [215], Komatzu et al. [215]). Sans doute, la perméabilisation de la membrane plasmique résulte-t-elle de la formation de cristaux de glace qui l'endommagent. Quoiqu'il en soit, les cellules CHO perméabilisées conservent un haut degré d'intégrité structurale et physiologique, ce qui permet une approche "in situ" des processus intracellulaires. Les concentrations en substrats exogènes radiomarqués ainsi que celles des ions indispensables peuvent être précisément contrôlées prouvant l'intégrité des membranes intracellulaires. D'autre part, les enzymes conservent leur environnement physiologique normal leur permettant un fonctionnement optimal. Cette méthode nous a permis de dispenser au travers de la membrane plasmique un (ou plusieurs) glycosyl-nucléotide radioactif qui peut être utilisé par les glycosyltransférases spécifiques dans un compartiment subcellulaire bien défini de la cellule.

## II- LES METHODES DE PERMEABILISATION REVERSIBLE

### A- Les chocs osmotiques

Des cellules en culture ont été perméabilisées par chocs osmotiques. Les cellules cultivées en monocouche sont placées dans un milieu hypertonique modifié du milieu de Eagle, ce qui les rend perméables en particulier aux nucléotides. Elles conservent leur morphologie cellulaire, 100% de leur DNA, 91% de leurs protéines (Castellot et al. [216]) et demeurent capables de synthétiser protéines et acides nucléiques. L'avantage majeur de cette méthode est qu'elle est réversible: en effet, les cellules retrouvent leur perméabilité

sélective lorsqu'elles sont placées dans un milieu complet préchauffé, et continuent à proliférer.

#### B- L'ATP

La forme tétrabasique de l'ATP ( $\text{ATP}^{4-}$ ) provoque la formation de lésions dans la membrane plasmique de cellules mastocytaires transformées (Rozengurt et al. [217], Rozengurt et Heppel [218], Heppel et al. [219], Weisman et al. [220], Sternberg et Heppel [221]). Ce phénomène résulterait de l'interaction de l'ATP extracellulaire avec des récepteurs membranaires conduisant à l'activation de canaux ioniques et à la formation de pores membranaires laissant passer de petites molécules d'ordinaire non perméantes. Lorsque l'ATP<sup>4-</sup> est converti en son sel avec du magnésium, les lésions membranaires se ressoudent en quelques secondes, restaurant ainsi l'imperméabilité de la membrane plasmique. De telles cellules continuent de pousser et de proliférer normalement après un cycle ou plus de perméabilisation.

#### III- LE VIRUS SENDAI

Le virus hémolytique Sendai provoque les mêmes changements dans la perméabilité plasmatique des cellules mastocytaires de Rat (Pasternak [222]). La membrane plasmique subit une dépolarisation suivie d'une perméabilité accrue aux cations monovalents puis aux dérivés phosphorylés et enfin, aux solutés de masse moléculaire supérieure à 800, tels que les protéines (Gomperts et al. [223]). En fait, le mécanisme par lequel les cellules qui ont subi ce traitement par le virus Sendai deviennent perméables n'est pas encore bien connu.

#### IV- LES BASES FAIBLES

Les bases faibles telles que la chloroquine, la méthylamine et le chlorure d'ammonium sont très souvent citées comme des agents lysosomotropiques. Ces amines sont prélevées dans les compartiments acides de la cellule et accumulées là sous leur forme protonée perturbant ainsi les processus intracellulaires tels que la distribution des enzymes lysosomiaux, ou l'endocytose de ligands ou encore l'entrée de certains virus (Helenius et al. [224], Dean et al. [225], Tietze et al. [226]).

Au laboratoire, nous avons utilisé du chlorure d'ammonium iso-osmotique (0,154 M) sur des préparations de splénocytes pour provoquer la lyse des érythrocytes. Nous avons constaté que cela conduisait également à une plus grande incorporation des sucres sur des accepteurs endogènes à partir de glycosyl-nucléotides radioactifs que dans des splénocytes non traités (Cacan et al. (1984) [227]). Cette perméabilisation cependant, n'est pas réversible puisqu'après plusieurs lavages, les cellules traitées au chlorure d'ammonium permettent toujours l'entrée et l'utilisation des glycosyl-nucléotides radiomarqués. L'observation en microscopie électronique de thymocytes traités ou non au chlorure d'ammonium suggère un mécanisme possible pour la perméabilisation de la membrane plasmique de ces cellules (Cecchelli et al. (1983) [228]). Les thymocytes possèdent un très gros noyau entouré d'une petite région cytoplasmique. Le chlorure d'ammonium s'accumule dans les compartiments acides de la cellule principalement les vésicules de sécrétion et les lysosomes mais également dans l'appareil de Golgi et le reticulum endoplasmique qui constituent un réseau membranaire de saccules (Novikoff et al. [229], Seglen et Reith [230]). Cette accumulation conduit, à la fois, au gonflement des vésicules intracellulaires et à la perforation de la membrane plasmique.

## V- LES GLYCOSIDES EXTRAITS DE PLANTES

### A- La digitonine

La digitonine a été très largement utilisée pour la perméabilisation des cellules adrénales chromaffines comme moyen d'accès au site d'action du couplage stimulus-sécrétion (Burgoyne et al. [231]). La digitonine se fixe spécifiquement au 3-11- $\alpha$ -hydroxystérol pour perméabiliser sélectivement les membranes cellulaires sur la base de leur contenu en cholestérol. La membrane plasmique des cellules chromaffines est rendue perméable aux protéines et aux petites molécules. Par contre, les membranes intracellulaires ne sont pas affectées et le processus de sécrétion sensible au calcium demeure intact. Nous avons mis à profit ces propriétés de la digitonine pour perméabiliser sélectivement la membrane plasmique de cellules fibroblastiques, les BHK (Baby Hamster Kidney) cultivées en flacon plastique (Cecchelli et al. (1986) [232]). Les cellules sont incubées

cinq minutes à 20 °C en présence de digitonine à 50 µg/ml. Après plusieurs lavages pour éliminer l'excès de digitonine, 75% à 80% des cellules sont perméabilisées comme on peut en juger après Test d'exclusion au Bleu Trypan utilisé à 0,02%. Le Bleu Trypan est une molécule de basse masse moléculaire qui, d'ordinaire n'entrent pas dans la cellule. Lorsqu'elle parvient dans le cytoplasme, elle colore le noyau et les protéines intracellulaires (dans le cas des cellules perméabilisées, par exemple). Ce modèle de cellules perméabilisées nous a permis une mesure rapide du phénomène de transport des glycosyl-nucléotides du compartiment cytoplasmique dans les lumières des vésicules intracellulaires. En outre, nous avons pu mettre en évidence la formation d'une réserve intracisternale de glycosyl-nucléotides pour les glycosyltransférases, sans dégradation des substrats.

#### B- La saponine

La saponine (utilisée à 0,1 mg/ml) interagit spécifiquement avec le cholestérol de la membrane plasmique pour former des pores de 100 nm à 1 µm, laissant pénétrer de petites molécules et des ions (Burgess et al. [233]). On constate d'autre part la sortie d'une protéine soluble cytoplasmique, la lactico-déshydrogénase (LDH) qui est un enzyme marqueur du cytoplasme. Utilisée à de plus fortes concentrations (0,5 mg/ml), elle peut conduire à la perméabilisation des membranes externes des mitochondries. Ce procédé a été appliqué en particulier à des hépatocytes de Cobaye constituant ainsi un système où les fonctions internes de l'hépatocyte demeurent intactes.

#### VI- LES ANTIBIOTIQUES POLYENIQUES

La filipine, l'étruscomycine, la nystatine, la pimarinine, l'amphotéricine B sont des antibiotiques polyéniques produits par différentes espèces de Streptomyces. Ces molécules ont en commun leur structure, leurs propriétés physiques et biologiques (Norman et al. (1976) [234]). Elles sont utilisées pour perméabiliser sélectivement la membrane plasmique des cellules (De Kruiff et al. [235]). Ainsi, la filipine rend la membrane plasmique perméable en formant des complexes multimoléculaires avec les stérols membranaires (Kinsky et al. [235]). La réaction est stoechiométrique et stéréochimique (Norman et al. (1972)

[237], Norman et al. (1972) [238]).

#### VII- LES DETERGENTS

L'efficacité des détergents non ioniques tels que le Triton X-100, le Nonidet P40, le Brij 58... à perméabiliser la membrane des cellules a été étudiée. L'utilisation de ces détergents à basses concentrations conduit à la perméabilisation de la membrane plasmique mais également des autres membranes intracellulaires. D'autres méthodes utilisant des détergents tels que la lysolécithine sont plus spécifiques de la membrane plasmique. Selon ce procédé, les cellules conservent leur morphologie générale et leurs organites intracellulaires intacts (Miller et al. [239]).

#### VII- L'ELECTROPORATION

La technique d'électroporation est de plus en plus répandue pour la perméabilisation des cellules (pour revue voir Potter [240]). L'attrait de cette méthode repose sur la grande simplicité de manipulation, la reproductibilité et sur une haute efficacité. Elle permet un haut degré de contrôle de la perméabilisation et évite l'utilisation d'agents chimiques souvent nocifs voire létaux pour les cellules. Jusqu'à présent largement employée pour le transfert de gènes (Stopper et al. [241], elle permet également d'introduire des protéines et autres métabolites dans la cellule (Jones et al. [242], Knight et Scrutton [243]). Les lésions générées par ces décharges à haut voltage sont suffisamment larges pour permettre l'entrée ou la sortie de petites molécules telles que l'ATP. En fait, la taille de ces pores varie selon le type cellulaire et la taille de la cellule. Un des avantages de la méthode est que ces cellules "électroperméabilisées" peuvent être maintenues en l'état à 0°C, ou au contraire, la barrière constituée par la membrane plasmique peut être rétablie par incubation à 37°C.

#### CONCLUSION

Les membranes biologiques jouent un rôle considérable dans le contrôle de l'activité des cellules qui, intactes, sont imperméables à



beaucoup de substrats exogènes. La perméabilisation sélective de la membrane plasmique permet d'avoir accès au contenu cytoplasmique de la cellule soit pour en extraire des métabolites ou des enzymes soit pour introduire des agents exogènes dans la cellule, des précurseurs radioactifs, des informations génétiques...

En particulier, nous avons utilisé ce moyen d'accès à l'intérieur de la cellule pour étudier certaines étapes de la glycosylation tout en conservant intacte l'organisation interne de la cellule.

En comparant les différentes façons de perméabiliser les membranes plasmiques des cellules, il apparaît qu'il n'existe pas une méthode unique de perméabilisation mais que la procédure à suivre dépend de la composition de la membrane plasmique, du type de la cellule et également de la réaction enzymatique à étudier.

## Bibliographie

	<u>N° références</u>	<u>Pages</u>
<b>A</b>		
Abeijon, C. and Hirschberg C. B. (1987)	133	42
J. Biol. Chem. 262, 4153-4159	148	47
Aminoff, D., Gathmann, W. D. and Baig, M. M. (1979)	69	23
J. Biol. Chem. 254, 8909-8913		
<b>B</b>		
Baenziger, J. U., Kornfeld, S. and Kochwa, S. (1974)	61	18
J. Biol. Chem. 249, 1889-1897		
Baenziger, J. U. and Kornfeld, S. (1974)	62	18
J. Biol. Chem. 249, 7260-7270		
Balch, W., Dunphy, W., Braell, W. and Rothman, J. (1984) Cell 39, 405-416	202	110
Bauvois, B., Cacan, R., Fournet, B., Caen, J., Montreuil, J. and Verbert, A. (1982)	67 205	22 113
Eur. J. Biochem. 121, 567-572		
Beaufay, H., Amar-Cortese, A., Feytmans, E., Thinès-Sempoux, D., Wibo, M., Robbi, M. and Berthet, J. (1974) J. Biol. Chem. 61, 188-200	203	112
Beckers, C. J., Keller, D. S. and Balch, W. E. (1987) Cell 50, 523-534	213	122
Beyer, T. A., Sadler, J. E., Rearick, J. I., Paulson, J. C. and Hill, R. L. (1981)	81	24
Adv. Enzymol. 52, 24-175		
Briles, E. B., Li, E. and Kornfeld, S. (1977)	172	52
J. Biol. Chem. 252, 1107-1116	175 180	53 67
Burgess, G. M., Mc Kinney, J. S., Fiabato, A., Leslie, B. A. and Putney, J. W. (1983)	233	126
J. Biol. Chem. 258, 15336-15345		
Burgoyne, R. D., Morgan, A. and O'Sullivan, A. J. (1988) Febs. Lett. 238, 151-155	231	125
<b>C</b>		
Cacan, R. (1979)	78	23
Thèse d'état, Université de Lille		

Cacan, R., Cecchelli, R., Hoflack, B. and Verbert, A. (1984) <i>Biochem. J.</i> 224, 277-284	161 164 210 227	48 49 122 125
Cacan, R., Hoflack, B. and Verbert, A. (1980) <i>Eur. J. Biochem.</i> 112, 81-86	206	117
Capasso, J. M. and Hirschberg, C. B. (1984) <i>Biochim. Biophys. Acta</i> 777, 133-139	120 121 125 128	37 37 38 39
Capasso, J. M. and Hirschberg, C. B. (1984) <i>J. Biol. Chem.</i> 259, 4263-4266	127 170	38 50
Capasso, J. M. and Hirschberg, C. B. (1984) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 81, 7051-7055	129 131 168	39 40 50
Capasso, J. M., Keenan, T., Abeijon, C. and Hirschberg, C. B. (1989) <i>J. Biol. Chem.</i> 264, 5233-5240	147	46
Carey, D. J. and Hirschberg, C. B. (1981) <i>J. Biol. Chem.</i> 256, 989-993	77 114 124 126	23 35 38 38
Carey, D., Sommers, L. W. and Hirschberg, C. B. (1980) <i>Cell</i> 19, 597-605	118 154 178	37 47 63
Carlson, D. M. (1968) <i>J. Biol. Chem.</i> 243, 616-626	43 50	13 15
Carlsson, H. E., Sundblad, G., Hammarstrom, S. and Lonngren, J. (1978) <i>Carbohydr. Res.</i> 64, 181-188	44	13
Castellot, J., Miller, Jr. and Pardee, A. (1978) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 75, 351-355	216	123
Cecchelli, R., Cacan, R., Hoflack, B. and Verbert, A. (1983) <i>Biochem. J.</i> 216, 681-686	160 209 228	48 122 125
Cecchelli, R., Cacan, R., Porchet-Henneré, E. and Verbert, A. (1986) <i>Biosci. Rep.</i> 6, 227-234	163 167	49 50
Cecchelli, R., Cacan, R. and Verbert, A. (1985) <i>Eur. J. Biochem.</i> 153, 111, 116	165	50
Cecchelli, R., Cacan, R. and Verbert, A. (1986) <i>FEBS Lett.</i> 208, 407-412	169 232	50 125

Chabaud, O., Bouchilloux, S., Ronin, C. and Ferrand, M. (1974) <i>Biochimie</i> 56, 119-130	65	22
Coates, S. W., Guiney, T. Sommers, L. W., Yeh, M. and Hirschberg, C. B. (1980) <i>J. Biol. Chem.</i> 255, 9225-9229	13	9
Corfield, A. P., Sander-Wewer, M., Veh, R. W., Wember, M. and Schauer, R. (1986) <i>Biol. Chem. Hoppe-Seyler</i> 367, 433-439	36	11
Corfield, A. P., Schauer, R. and Wember, M. (1979) <i>Biochem. J.</i> 177, 1-7	17	9
Corfield, A. P. and Schauer, R. (1982 b) in " <i>Sialic Acids: Chemistry, Metabolism and Function</i> " (Schauer, R., ed.) <i>Cell Biology Monographs</i> , Springer-Verlag, Wien, New York pp 195-261	6	8
pp 5-50	32	11
Coste, H. (1985) Thèse de Doctorat, Université Claude Bernard, Lyon I	145	45
Cox, J. and Peters, T. (1979) <i>J. Physiol. London</i> 289, 469-478	177 199 201	57 108 109
Creek, K. E., Weisman, D. C. and Morré, D. J. (1980) <i>Eur. J. Cell Biol.</i> 23, 157-165	11	9
<b>D</b>		
Dean, R. T., Jessup, W. and Roberts, C. R. (1984) <i>Biochem. J.</i> 217, 27-40	225	124
De Kruiff, B., Gerritsen, W. J., Oerleman, A., Demel, R. A. and Van Deenen, L. L. M. (1974) <i>Biochem. Biophys. Acta</i> 339, 30-43	235	126
Deutscher, S. L. and Hirschberg, C. B. (1986) <i>J. Biol. Chem.</i> 261, 96-100	156 175	47 53
Deutscher, S. L., Nuwahyhid, N., Stanley, P., Briles, E. I. B. and Hirschberg, C. B. (1984) <i>Cell</i> 39, 295-299	174 176 182 193	52 56 69 92
<b>E</b>		
Enzyme Nomenclature (1976) <i>Biochem. Biophys. Acta</i> 429, 1-45	27	10

## F

Featherstone, C. (1988) Trends Biochem. Sci. 13,284-286	211	122
Ferwerda, W., Blok, C. M. and Van Rinsum, J. (1983) Biochem. J. 216, 87-92	12	9
Ferwerda, W., Blok, C. M. and Van Rinsum, J. (1986) Glycoconjugate J. 3, 153-161	14	9
Finne, J. (1975) Biochim. Biophys. Acta 412, 317-325	54	16
Fiske, C. H. and Subbarow, Y. (1925) J. Biol. Chem. 66, 375-380	204	113
Fleisher, B., Fleisher, S. and Ozawa, H. (1969) J. Cell. Biol. 43, 59-79	74	23
Fleisher, B. (1981) J. Cell Biol. 89, 246-255	76 115 117	23 36 37
Fleischer, B. (1983) J. Histochem. Cytochem. 31, 1033-1040	139 184	44 76
Fox, O. F., Kishore, G. S., Courbelli, R. (1979) Cancer Letts. 7, 251-257	79	24

## G

Ganapathy, V., Ganapathy, M., Mahesh, V. and Leibach, F. (1988) J. Biol. Chem. 263, 4561-4568	112	35
Gomperts, B. D., Baldwin, J. M. and Micklem, K. J. (1983) Biochem. J. 210, 737-745	223	124
Gottschalk, A. and Bhargava, A. S. (1972) in " <i>Glycoproteins: their composition, structure and function</i> " (Gottschalk, A., ed.) Elsevier, Amsterdam, Vol. 5, Part B, pp 810-829	51	15
Gross, H. J. and Brossmer, R. (1987) Glycoconjugates J. 4, 145-156	22	10
Gross, H. J. and Brossmer, R. (1988) Eur. J. Biochem. 177, 583-589	23	10
Gross, H. J., Bünsch, A. and Brossmer, R. (1984) Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 365,994-995	20	9
Gross, H. J., Bünsch, A., Paulson, J. C. and Brossmer, R. (1987) Eur. J. Biochem. 168, 595-602	21	9

## H

Hale, D. E. and Williamson, J. R. (1984) J. Biol. Chem. 259, 8737-8742	130	40
Hauser, S. C., Ziurys, J. C. and Gollan, J. L. (1988) Biochem. Biophys. Acta 967, 149-157	135 150	42 47
Helenius, A., Hellman, I., Wall, D. and Hubbard, A. (1983) Trends Biochem. Sci. 8, 245-250	224	124
Heppel, L. A., Weizman, G. A. and Friedberg I. (1985) J. Membrane Biol. 86, 189-196	219	124
Hesford, F. J., Berger, E. G. and Van Halbeck, H. (1984) Glycoconjugates J. 1, 141-153	88	26
Higa, H. H. and Paulson, J. C. (1985) J. Biol. Chem. 260, 8838-8849	91 199	26 108
Higashi, H., Hirabayashi, Y., Fukiu, Y., Nakai, M., Matsumoto, M., Ueda, S. and Kato, S. (1985) Cancer Res.45, 3796-3802	106	29
Hoflack, B., Cacan, R. and Verbert, A. (1980) Eur. J. Biochem. 112, 81-86	185 207	81 118

## J

Jeanloz, R. W. and Codington J. F. (1976) in " <i>Biological roles of Sialic Acid</i> ", (Rosenbuerg, A. and Schengrund, C. L., eds.) Plenum Press, N. Y. and London	103	28
Jones, P. M., Salmon, M. W. and Howell, S. L. (1988) Biochem. J. 254, 335-344	242	127
Jouradian, G. W. and Roseman, S. (1962) J. Biol. Chem. 237, 2442-2446	24	10
Joziassse, D. H., Bergh, M. L. E., Ter Hart, G. J., Koppen, P. L., Hoogwinbel, E. J. M. and Van den Eijden, D. H. (1985) J. Biol. Chem. 260, 4941-4951	95	27

## K

Kammerling, J. P., Schauer, R., Shukla, A. K., Stoll, S., Van Halbeck, H. and Vliegenthart, J. F. G. (1987) Eur. J. Biochem. 162, 601-607	33	11
Kean, E. L. et Roseman, S. (1966) J. Biol. Chem. 241, 5643-5650	9	9

Kinsky, S. C., Luse, S. A., Zopf, D., Van Deenen, L. L. M. and Haxby, J. A. (1967) Biochem. Biophys. Acta 135, 844-861	235	126
Kitajima, K., Inoue, Y. and Inoue, S. (1986) J. Biol. Chem. 261, 5262-5269	49	15
Knight, D. E. and Scrutton, M. C. (1986) Biochem. J. 234, 335-344	243	127
Komatzu, Y., Sato, M. and Osumi, M. (1987) Journal of Fermentation Technology 65, 125-131	215	123
Kornfeld, R. and Kornfeld, S. (1980) in " <i>Biochemistry of glycoproteins and Proteoglycans</i> " (Lennarz, W. J., ed) Academic Press, N. Y., pp 1-34	40	12
Kornfeld, R. and Kornfeld, S. (1985) Ann. Rev. Biochem. 54, 631-664	41	12
Krönen, H. (1987) Biol. Chem. Hoppe-Seyler 369, 149-155	113	35
Kuhn, N. J. and White, A. (1975) Biochem. J. 148, 77-84	136	43
Kuhn, N. J. and White, A. (1976) Biochem. J. 154, 243-244	137	43
Kuhn, N. J. and White, A. (1977) Biochem. J. 168, 423-433	138	43
Kundig, F. D., Aminoff, D. and Roseman, S. (1971) J. Biol. Chem. 246, 2543-2550	83	25
<b>L</b>		
Lennarz, W. J. (1975) Science 188, 986-991	143	45
Ledger, P. and Tanger, M. (1984) Trends Biochem. Sci. 9, 313-314	186	83
Lepers, A., Shaw, L., Verbert, A. and Schauer, R. in " <i>proceedings of the 19<sup>th</sup> meeting of the European Biochemical Societies</i> ", Rome, Italy, July 2-7, 1989	197	105
<b>M</b>		
Mc Guire, E. J. (1976) in " <i>Biological Roles of Sialic Acids</i> " (Rosenberg, A., Schengrund, C. L.) Plenum Publishing Corporation, N. Y. p 123-138	4 7	8 8



Mengual, R., Leblanc, G. and Sudaka, P. (1985) J. Biol. Chem. 258, 15071-1078	111	34
Miagi, T. and Tsuiki, S. (1982) Eur. J. Biochem. 126, 253-261	86	26
Milla, M. E. and Hirschberg, C. B. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1786-1790	132 200	41 108
Miller, M. R., Castellot, J. J. and Pardee, A. B. (1978) Biochemistry 17, 1073-1080	239	127
Montreuil, J. (1975) Pure and Appl. Chem. 42, 431-477	37	12
Montreuil, J. (1982) in " <i>Comprehensive Biochemistry</i> " vol. 19 B- part II, (Neuberger, A., Van deenen, L. L. M., eds.), Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, Oxford, N. Y., pp 1-188	38 57 72	12 17 23
Montreuil (1984) Biol. Cell. 51, 115-132	58	17
Munro, J. R., Narashinhan, S., Wetmore, S., Riordan, J. R. and Schachter, H. (1975) Arch. Biochem. Biophys. 160, 269-277	75	23

## N

Nilsson, B., Nordén, N. E. and Svensson, S. (1979) J. Biol. Chem. 254, 4545-4553	63	18
Norman, A. W., Demel, R. A., De Kruiff, B., Geurt Van Kessel, W. S. M. and Van Deenen L. L. M. (1972) J. Biol. Chem. 247, 1918-1929	237	126
Norman, A. W., Demel, R. A., De Kruiff, B., Geurt Van Kessel, W. S. M. and Van Deenen, L. L. M. (1972) Biochem. Biophys. Acta 290, 1-14	238	126
Norman, A. W., Spiegelvogel, A. M. and Wong R. G. (1976) Adv. Lipid Res. 14, 127-170	234	126
Novikoff, A. B., Essner, E. and Quintana, N. (1964) Fec. Proc. 23, 1010-1022	229	125
Nuwayhid, N., Glaser, J. H., Johnson, J. C., Conrad, E. H., Hauser, S. C. and Hirschberg, C. B. (1986) J. Biol. Chem. 261, 12936-12941	134 149	42 47

## O

Oda, K., Misumi, Y., Ikehara, Y. (1983) Eur. J. Biochem. 135, 209-216	191	84
--	-----	----

Oliver, G. and Hemming, F. (1975) 208 118  
Biochem. J. 153, 191-199

Orci, L., Malhotra, V., Amherdt, M., Serafini, T.  
and Rothman, J. (1989) Cell 56, 357-368 212 122

## P

Pasternak, C. A. (1984) in : *Membranes processes.  
Molecular Biology and Medical Applications.*  
(Benga, G., Baum, H. and Kummerow, F. A., eds.),  
pp140-166, Springer-Verlag, N. Y. 222 124

Paulson, J. C. Beranek, W. E. and Hill, R. L. (1977) 87 26  
J. Biol. Chem. 252, 2356-2362

Paulson, J. C., Rearick, J. I. and Hill, R. L. (1977) 68 23  
J. Biol. Chem. 252, 2363-2371

Paulson, J. C., Weinstein, J., Ujita, E. L.,  
Riggs, K. J. and Lai, P-H. (1987) 82 24  
Biochem. Society Transactions 618-620

Perez, M and Hirschberg, C. B. (1985) 141 44  
J. Biol. Chem. 260, 4671-4678 152 47  
166 50

Perez, M. and Hirschberg, C. B. (1986) 142 45  
J. Biol. Chem. 261, 6822-6830 146 45  
158 47

Perez, M. and Hirschberg, C. B. (1986) 159 48  
Biochim. Biophys. Acta 864, 213-222 162 49

Perez, M. and Hirschberg, C. B. (1987) 116 36  
Methods in Enzymol. 138, 709-715

Persat, F., Azzar, G., Martel, M. B. and Got, R.  
(1984) Biochim. Biophys. Acta 769, 377-380 144 45  
157 47

Potter, H. (1988) Anal. Biochem. 174, 361-373 240 127

Powell, L. D. and Hart, G. W. (1986) 181 67  
Anal. Biochem. 157, 179-185

## R

Rana, S. S., Chandrasekaran, E. V. and Mendicino, J.  
(1987) J. Biol. Chem. 262, 3654-3659 53 16

Rearick, J. I., Sadler, J. E., Paulson, J. C.  
and Hill, R. L. (1979) J. Biol. Chem. 254, 4444-4451 70 23

Reutter, G., Köttgen, E., Bauer, C. and Gerock, W. (1982) in " <i>Sialic Acids: Chemistry, Metabolism and function</i> " (Schauer, R., ed.) Cell Biology Monographs Springer Verlag, Wien, N. Y.	101	28
Reutter, G. and Schauer, R. (1988) in " <i>proceedings of the Japanese-German Symposium on Sialic Acids</i> " (Schauer, R., Yamakawa, T.) p. 98-100	2	8
Reutter, G., Stoll, S., Kamerling, J. P., Vliegenhart, J. F. G. and Schauer, R. (1988) in " <i>proceedings of the Japanese-German Symposium on Sialic Acids</i> " (Schauer, R. and Yamakawa, T., eds.) in Berlin Kieler Verlag Wissenschaft.	196	96
Robbins, P. W. and Lipmann, F. (1958) J. Biol. Chem. 233, 681-691	123	38
Roseman, S. (1962) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48, 437-441	3 10	8 9
Roth, J., Lucocq, J. M., Berger, E. G., Paulson, J. C. and Watkins W. M. (1984) J. Cell Biol. 99, 229 a	98	27
Roth, J., Lucocq, J. M. and Charest, P. M. (1984) J. Histochem. Cytochem. 32, 1167-1176	97	27
Roth, J., Taatjes, D. J., Weinstein, J., Paulson, J. C., Greenwell, P. and Watkins, W. H. (1986) J. Biol. Chem. 261, 14307-14312	99	27
Roth, J., Taatjes, D. J., Lucocq, J. M., Weinstein, J. and Paulson, J. C. (1985) Cell 43, 287-295	96	27
Rozengurt, E. and Heppel, L. A. (1979) J. Biol. Chem. 254, 708-714	218	124
Rozengurt, E., Heppel, L. A. and Friedberg, I. (1977) J. Biol. Chem. 252, 4584-4590	217	124
<b>S</b>		
Sadler, J. E., Paulson, J. C. and Hill, R. L. (1979) J. Biol. chem. 254, 2112-2119	107	29
Sadler, J. E., Rearick, J. I. and Hill, R. L. (1979) J. Biol. Chem. 254, 5934-5941	92	26
Sadler, J. E., Rearick, J. I., Paulson, J. C. and Hill, R. L. (1979) J. Biol. Chem. 254, 4434-4443	89	26
Savage, A. V., Koppen, P. L., Schiphorst, W. E. C. M., Trippelwitz, L. A. W., Van Halbeck, H., Vliegenhart, J. F. G.	52	15

and Van den Eijden, D. H. (1986) Eur. J. Biochem. 160, 123-129		
Schachter, H. and Roseman, S. (1980) in " <i>The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans</i> (Lennarz, W. J., ed.), Plenum Press, N. Y. pp 85-150	80	24
Schauer, R. (1970) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, 783-791	26	10
Schauer, R. (1978) Methods Enzymol. 50 c, 374-386	28	10
Schauer, R. (1982) in " <i>Advances in Carbohydrates Chemistry and Biochemistry</i> " (Tipson, S. and Horton, D., eds.) Academic Press, N. Y. p 176 pp 131-234 p 215	5 35 102 105	8 11 28 28
Schauer, R. (1982) in " <i>Sialic Acids: Chemistry, Metabolism and Function</i> ", (Schauer, R., ed.) Cell Biology Monographs, Springer-Verlag Inc., N. Y.	73 84	23 25
Schauer, R. (1985) Trends Biochem. Sci. 10, 357-360	1 104	8 28
Schauer, R. and Buscher, H-P. (1974) Biochim. Biophys. Acta 338, 369-373	29	10
Schauer, R., Casals-Stenzel, J. Corfield, A. P. and Veh, R. W. (1988) Glycoconjugates J. 5, 257-270	34	11
Schauer, R., Fisher, C., Lee, H., Ruch, B. and Kelm, S. (1988) in " <i>Lectins and Glycoconjugates in Oncology</i> ", (Gabijs, H. J., Nagel, G. A., eds.) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 5-23	108 109	29 29
Schauer, R., Haverkamp, J. and Ehrlich, K. (1980) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 361, 641-648	18	9
Schauer, R. and Wember, M. (1973) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 1405-1414	94	27
Schauer, R., Wember, M. and Ferreira do Amaral, C (1972) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 883-886	30 93	10 27
Schechter, E. (1986) Biochimie 68, 357-365	110	30
Schoop, H. G., Schauer, R. and Faillard, H. (1969) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 350, 155-162	25	10
Schwarz, J. K., Capasso, J. M. and Hirschberg, C. B. (1984) J. Biol. Chem. 259, 3554-3559	122 151	38 47

Seglen, P. O. and Reith, A. (1977) Biochem. Biophys. Acta 496, 29-35	230	125
Shah, S. N., and Ragupathy, E. (1977) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 155, 516-523	66	22
Shaw, L. and Schauer, R. (1988) Biol. Chem. Hoppe-Seyler 369, 477-486	31 195 198	11 84 107
Slomiany, A. and Slomiany, B. L. (1978) J. Biol. Chem. 253, 7301-7306	47	15
Slomiany, B. L., Mutrtz, V. L. N. and Slomiany, A. J. Biol. Chem. 255, 9719-9723	48	15
Slomiany, B. L., Zdebska, E. and Slomiany, A. (1984) J. Biol. Chem. 157, 139-146	46	13
Sommers, L. W. and Hirschberg, C. (1982) J. Biol. Chem. 257, 10811-10817	119 153 155 179 183 194	37 47 47 63 74 93
Souzu, H. (1980) Biochem. Biophys. Acta 603, 13-26	214	123
Spik, G., Bayard, B., Strecker, G., Bouquelet, S., and Montreuil, J. (1975) FEBS Lett. 50, 296-301	60	18
Spik, G., Fournet, B. and Montreuil, J. (1979) C. R. Acad. Sci. Paris 288D, 1018-1023	59	17
Spiro, R. C. (1973) Adv. Prot. Chem. 27, 349-467	39	12
Spiro, R. C. and Bhoyroo, V. D. (1974) J. Biol. Chem. 249, 5704-5713	55	16
Stanley, P. (1980) ACS Symposium Series 128, Cell surface glycolipids (Sweeley, C. C., Eds.) 124,221	173	52
Stanley, P. (1987) Trends Genet. 3, 77-81	171	52
Sternberg, Z. and Heppel, L. (1987) Biochem. Biophys. Acta 148, 560-566	221	124
Stopper, H., Jones, H. and Zimmermann, U. (1987) Biochem. Biophys. Acta 900, 38-44	241	127
Strous, G. T. A. M. and Loddish, H. F. (1980) Cell 22, 709-717	189	84

**T**

Tartakoff, A. M. and Vassali, P. (1971) J. Exp. Med. 146, 1332-1345	187	83
Tartakoff, A. M. and Vassali, P. (1978) J. Cell Biol. 79, 694-707	188	84
Tietze, C., Schlesinger, P. and Stahl, P. 1980) Biochem. Biophys. Res. Comm. 93, 1-3	226	124
Torres, C. R. and Hart, G. W. (1984) J. Biol. Chem. 259, 3308-3317	42	12

**U**

Uchida, N., Smilovitz, H. and Tanger, M. L. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1868-1872	190	84
--	-----	----

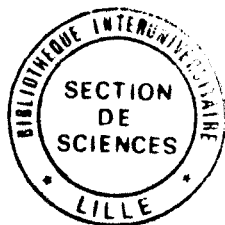
**V**

Van den Eijden, D. and Van Dijk, W. (1972) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 1817-1820	19	9
Van Kerkof, P., Willemsen, R., Slot, J., Geuze, H. (1985) Eur. J. Cell Biol. 36, 256-262	192	84
Vann, W. F., Silver, R. P., Abeijon, C., Chang, K., Aaronson, W., Sutton, A., Finn, C. W., Lindner, W. and Kotsatos, M. (1987) J. Biol. Chem. 262, 17556-17562	15	9

**W**

Warren, L., Blacklow, R. S. (1962) J. Biol. Chem. 237, 3527-3534	8	9
Weinstein, J., de Souza-e-Silva, U. and Paulson, J. C. (1982) J. Biol. Chem. 257, 13835-43844	85 90	26 26
Weinstein, J., de Souza-e-Silva, U. and Paulson, J. C. (1982) J. Biol. Chem. 257, 13845-13853	71	23
Weinstein, J., Iu, E. V., Mc Entee, K., Lai, P. M. and Paulson, J. C. (1987) J. Biol. Chem. 262, 17735-17743	100	27
Weisman, G. A., De, B. K., Friedberg, I., Pritchard, R. S. and Heppel, L. A. (1984) 119, 211-219	220	124

Wiegandt, H. (1985) in " <i>Glycolipids</i> <i>New Comprehensive Biochemistry</i> " (Neuberger, A. and Van deenen, L. I. M., eds) Elsevier, Amsterdam, N. Y., Oxford, vol. 10 pp 199-260	64	21
Wieland, F., Dompert, W., Benhard, G. and Sumpler, M. (1980) FEBS Lett. 120, 110-114	56	16
Wieruszkeski, J. M., Michalski, J. C., Montreuil, J., Strecker, G., Peter-Katalinic, J., Egge, H., Van Halbeck, H., Mutsaers, J. H. G. M. and Vliegthart, J. F. G. (1987) J. Biol. Chem. 262, 6650-6657	45	13
<b>Y</b>		
Yusuf, H. K. M., Pohlentz, G. and Sandhoff, K. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 7075-7079	140	44
<b>Z</b>		
Zapata, G., Vann, W. F., Aaronson, W., Lewis, M. S., Moos, M. (1989) J. Biol. Chem. 264, 14769-14774	16	9



PPN 036 11 653X

RESUME

La biosynthèse des glycoconjugués met en jeu un donneur de sucre, une structure acceptrice et des enzymes spécifiques (les glycosyltransférases). Dans la cellule eucaryote, elle est organisée au sein d'un système membranaire allant du reticulum endoplasmique rugueux aux vésicules golgiennes. Ces membranes intracellulaires séparent le milieu cytoplasmique contenant les glycosyl-nucléotides (les donneurs de sucre dans la réaction de glycosylation), de la lumière de ces organites où se trouvent les produits de la glycosylation. Cette ségrégation des molécules glycosylées pose immédiatement le problème du passage des précurseurs vers le lieu de glycosylation. Notre objectif a été d'élucider les mécanismes de transport des donneurs d'acide sialique aux sites de sialylation.

Nous avons mis au point une technique simple et rapide de perméabilisation des cellules fibroblastiques CHO (Chinese Hamster Ovary) par congélation-décongélation, rendant la membrane plasmique perméable au CMP-Neu5Ac sans affecter la perméabilité des vésicules intracellulaires. Ce modèle des cellules perméabilisées nous a permis de montrer qu'il existait un phénomène de transport pour le CMP-Neu5Ac en appliquant les critères de mise en évidence des transporteurs qui mettent en jeu des composants membranaires sensibles aux variations de la température, saturable en présence d'un excès de substrat et inhibés par des analogues de substrat. Nous en avons précisé le fonctionnement: ce phénomène correspond à un transport actif secondaire encore dénommé antiport, permettant un échange spécifique entre le CMP et le CMP-Neu5Ac.

L'utilisation de vésicules golgiennes purifiées de cellules CHO nous a permis d'étudier cet antiport sans interférence avec le métabolisme cellulaire. D'autre part, il a été observé que le CMP-Neu5Gc, un dérivé du CMP-Neu5Ac synthétisé dans le cytoplasme, était particulièrement abondant sur les glycoconjugués de foie de Souris. Nous avons donc caractérisé et précisé le mécanisme d'entrée de ce dérivé dans la lumière de vésicules golgiennes purifiées de foie de souris, et finalement nous avons montré que ces deux substrats partageaient le même transporteur.

