N° d'ordre 624 50376 1990 269



50376 1990 269

présentée à

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

pour obtenir le titre de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE

spécialité : BIOCHIMIE

par

JEAN-FRANCOIS HAEUW

CATABOLISME DES N-GLYCOSYL-PROTEINES ETUDE COMPAREE DE LA SPECIFICITE DES α -D-MANNOSIDASES CYTOSOLIQUES ET LYSOSOMIQUES DU FOIE DE RAT



Soutenue le 23 novembre 1990 devant la Commission d'examen: Président: Professeur Jean MONTREUIL Rapporteurs: Docteur Michèle AUBERY Docteur Bernard HOFLACK Professeur Geneviève SPIK Examinateurs: Professeur Jean-Pierre FARRIAUX Professeur Colin HUGUES Docteur Jean-Claude MICHALSKI Docteur Gérard STRECKER



Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois (Relations structure-fonction des constituants membranaires, Unité Mixte de Recherche du C.N.R.S. n° 111, Directeur: Professeur Jean MONTREUIL) sous la direction de Messieurs Gérard STRECKER, Directeur de Recherches au C.N.R.S. et Jean-Claude MICHALSKI, Chargé de Recherches à l'I.N.S.E.R.M..





Ce travail a fait l'objet de plusieurs communications et publications:

Communications par Affiche:

- Sequential degradation of oligomannosidic type N-glycans by endoplasmic reticulum, Golgi apparatus and lysosomal α -mannosidases. A H-NMR study. J.F. HAEUW, A. LEPERS, J.M. WIERUSZESKI, G. STRECKER, A. VERBERT, J. MONTREUIL and J.C. MICHALSKI.

Conférences Jacques Monod du Centre National de la Recherche Scientifique. Aussois. 29 mai-3 juin 1989.

- Etude comparée du catabolisme cytosolique et lysosomique des glycannes de type oligomannosidique. J.F. HAEUW, G. STRECKER, J.M. WIERUSZESKI, J. MONTREUIL et J.C. MICHALSKI.

XIII^{emes} Journées de la Chimie et Biochimie des Glucides. First Mediteranean Conference on Carbohydrates. Avignon. 20-23 mai 1990.

- Comparative study of the lysosomal and cytosolic catabolism of oligomannosidic-type glycans. J.F. HAEUW, G. STRECKER, J.M. WIERUSZESKI, J. MONTREUIL and J.C. MICHALSKI.

* Joint Meeting of the "Nederlandse Vereniging voor the Bestudering van Glycoconjugaten" and the "Studiengruppe für Biologische Chemie" to be held at "Deutsche Landjugend-Akademie Fredeburg e.V.". Bonn-Röttgen (R.F.A.). 5-6 octobre 1990.

* Conférences Jacques Monod du Centre National de la Recherche Scientifique. Aussois. 22-26 octobre 1990.

Communication orale:

Etude comparée du catabolisme cytosolique et lysosomique des glycannes de type oligomannosidique. J.F. HAEUW, G. STRECKER, J.M. WIERUSZESKI, J. MONTREUIL et J.C. MICHALSKI.

XVII^e Forum des Jeunes Chercheurs. Villeneuve d'Ascq. 3-6 juillet 1990.

Publications:

- In vitro hydrolysis of oligomannosyl oligosaccharides by the lysosomal α -D-mannosidases. J.C. MICHALSKI, J.F. HAEUW, J.M. WIERUSZESKI, J. MONTREUIL and G. STRECKER. European Journal of Biochemistry (1990) 189, 369-379.

- Etude comparée des catabolismes lysosomique et cytosolique des glycannes de type oligomannosidique. J.F. HAEUW, G. STRECKER, J.M. WIERUSZESKI, J. MONTREUIL et J.C. MICHALSKI. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences (1990) soumis pour

publication.

- Substrate specificity and role of cellular α -D-mannosidases. J.F. HAEUW, G. STRECKER, J.M. WIERUSZESKI, A. LEPERS, A. VERBERT, J. MONTREUIL and J.C. MICHALSKI. Glycobiology (1990), soumis pour publication.

orycobiology (1990); soumis pour publication.

- Substrate specificity of rat liver cytosolic α -D-mannosidase -Evidence for a degradative pathway for oligomannoside-type oligosaccharides distinct of that of lysosomes. J.F. HAEUW, G. STRECKER, J.M. WIERUSZESKI, J. MONTREUIL and J.C. MICHALSKI. European Journal of Biochemistry (1990), soumis pour publication.

ABREVIATIONS

- Asn : Asparagine
- Aspartamidase : Aspartyl-N-acétyl-ß-D-glucosaminidase
- dMM : 1-désoxymannojirimycine
- EDTA : Acide éthylène diamine tétra-acétique
- FAB-MS : "Fast Atom Bombardment-Mass Spectrometry"
- Fuc : L-fucose
- Gal : D-galactose
- GlcNAc : N-acétyl-D-glucosamine
- Hepes : Acide-2-hydroxy-éthylpipérazine-N'-2-éthane sulfonique
- HMG-CoA : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-Coenzyme A
- HPLC : "High Performance Liquid Chromatography"
- Man : D-mannose
- NeuAc : Acide-5-N-acétylneuraminique
- ppm : Partie par million
- RMN : Résonance magnétique nucléaire

SOMMAIRE

INTRODUCTION	11
GENERALITES	14
LYSOSOMES ET CATABOLISME DES GLYCOCONJUGUES	14
I- LES GLYCOCONJUGUES	14
A) LES GLYCOLIPIDES	14
B) LES N-GLYCOSYLPROTEINES	16
1° Classification	16
2° Les N-Glycosylprotéines	16
a) Glycannes de type oligomannosidique	17
b) Glycannes de type N-acétyllactosaminique	17
c) Glycannes de type hybride	19
II- LES LYSOSOMES	19
A) CARACTERISTIQUES GENERALES DES LYSOSOMES	20
1° La membrane lysosomique	20
2° Le pH intralysosomique	21
3° Les enzymes lysosomiques	23
B) BIOGENESE DES LYSOSOMES	25
l ^o Le transport des enzymes lysosomiques	27
2° Les protéines de la membrane lysosomique	31
C) <u>L'AUTOPHAGIE</u>	33
D) <u>L'HETEROPHAGIE</u>	35
1° La phagocytose	36
2° La pinocytose	3/
a) La pinocytose en phase fluide	3/
D) La pinocytose ausorptive	20
récepteur d'ASHWELL	39
2- Le récepteur spécifique du mannose et de la N-acétyl	
glucosamine	40
3- Le récepteur spécifique du fucose	40
3° Relations avec le cytosquelette cellulaire	41
III- LE CATABOLISME DES N-GLYCOSYLPROTEINES	42
A) LE CATABOLISME CYTOSOLIQUE	42
<i>1° Catabolisme de la protéine</i>	42
a) L'ubiquitine	43
b) La protéolyse	43
2º Catabolisme des chaînes glycanniques	45
B) LE CATABOLISME LYSOSOMIQUE	46
1° Protéolyse lysosomique	46
2° Catabolisme des chaines glycanniques	47
a) Historique	47
D) Hypotnese actuelle	48
c) Le catadolisme des giycannes de type N-acetyllactosa- minique	50
d) Le catabolisme des glycannes de type oligomannosidique	52

TU_ TDC ~_D_WANNAGTAACDC	E 0					
A) LES C-D-MANNOSIDASES DI DETICULUM ENDODIASMICUE DUCUEUX	52					
B) LES MANNOSTDASES DE L'APPAREIL DE GOLGI	55					
1° Les mannosidases IA et IB						
a) Propriétés physico-chimiques et structurales	55					
b) Spécificité	56					
2° La mannosidase II - GlcNAc dépendante	56					
a) Propriétés physico-chimiques et structurales	56					
b) Spécificité						
3° L'endomannosidase						
4° L'α-1,3- et α-1,6-mannosidase - GlcNAc indépendante						
5° Intervention dans les phénomènes de maturation des						
glycannes des N-glycosylprotéines	61					
C) LES α -D-MANNOSIDASES DU LYSOSOME	63					
1° Propriétés physico-chimiques	63					
2° Spécificité	65					
3° La mannosidose	65					
4° Etude chimique du matériel accumulé en cas de mannosidose	66					
D) LA MANNOSIDASE DU CYTOSOL	68					
1° Propriétés physico-chimiques	68					
2° Spécificité	70					
TRAVAUX DERSONNELS	71					
	/ -					
ETUDE DES α -mannosidases lysosomiques	71					
T- PTUNE OF LIVENDALYSE OF LIGLICAGECCUARINE Man CLONEC DAR LES						
The second of th	72					
a b immediande pipereitéere						
II- ETUDE DE L'ACTIVITE α -1,6-MANNOSIDASIQUE LYSOSOMIQUE	84					
II- ETUDE DE L'ACTIVITE α -1,6-MANNOSIDASIQUE LYSOSOMIQUE A) ETUDE CINETIQUE	84 84					
II- ETUDE DE L'ACTIVITE α-1,6-MANNOSIDASIQUE LYSOSOMIQUE A) ETUDE CINETIQUE 1° Cinétiques d'hydrolyse des glyco-asparagines GA1 et GA2	84 84 85					
 II- ETUDE DE L'ACTIVITE α-1,6-MANNOSIDASIQUE LYSOSOMIQUE A) ETUDE CINETIQUE 1^o Cinétiques d'hydrolyse des glyco-asparagines GA1 et GA2 2^o Cinétiques d'hydrolyse des glyco-asparagines GA3 et GA4 	84 84 85 87					
 II- ETUDE DE L'ACTIVITE α-1,6-MANNOSIDASIQUE LYSOSOMIQUE A) ETUDE CINETIQUE Cinétiques d'hydrolyse des glyco-asparagines GA1 et GA2 Cinétiques d'hydrolyse des glyco-asparagines GA3 et GA4 3° Cinétiques d'hydrolyse des oligosaccharides 	84 84 85 87 87					
 II- ETUDE DE L'ACTIVITE α-1,6-MANNOSIDASIQUE LYSOSOMIQUE A) ETUDE CINETIQUE Cinétiques d'hydrolyse des glyco-asparagines GA1 et GA2 Cinétiques d'hydrolyse des glyco-asparagines GA3 et GA4 3° Cinétiques d'hydrolyse des oligosaccharides B) ETUDE STRUCTURALE 	84 84 85 87 87 89					
 II- ETUDE DE L'ACTIVITE α-1,6-MANNOSIDASIQUE LYSOSOMIQUE A) ETUDE CINETIQUE Cinétiques d'hydrolyse des glyco-asparagines GA1 et GA2 Cinétiques d'hydrolyse des glyco-asparagines GA3 et GA4 Cinétiques d'hydrolyse des oligosaccharides B) ETUDE STRUCTURALE Analyse structurale du produit Man₂GlcNAc 	84 84 85 87 87 89 89					
 II- ETUDE DE L'ACTIVITE α-1,6-MANNOSIDASIQUE LYSOSOMIQUE A) ETUDE CINETIQUE Cinétiques d'hydrolyse des glyco-asparagines GA1 et GA2 Cinétiques d'hydrolyse des glyco-asparagines GA3 et GA4 Cinétiques d'hydrolyse des oligosaccharides B) ETUDE STRUCTURALE Analyse structurale du produit Man₂GlcNAc Analyse structurale du produit Man₂GlcNAc Analyse structurale du produit Man₂GlcNAc 	84 85 87 87 89 89					
 II- ETUDE DE L'ACTIVITE α-1,6-MANNOSIDASIQUE LYSOSOMIQUE A) ETUDE CINETIQUE Cinétiques d'hydrolyse des glyco-asparagines GA1 et GA2 Cinétiques d'hydrolyse des glyco-asparagines GA3 et GA4 Cinétiques d'hydrolyse des oligosaccharides B) ETUDE STRUCTURALE Analyse structurale du produit Man₂GlcNAc Analyse structurale du produit Man₂GlcNAc Analyse structurale du produit Man₂GlcNAc 	84 85 87 87 89 89					
 II- ETUDE DE L'ACTIVITE α-1,6-MANNOSIDASIQUE LYSOSOMIQUE A) ETUDE CINETIQUE Cinétiques d'hydrolyse des glyco-asparagines GA1 et GA2 Cinétiques d'hydrolyse des glyco-asparagines GA3 et GA4 Cinétiques d'hydrolyse des oligosaccharides B) ETUDE STRUCTURALE Analyse structurale du produit Man₂GlcNAc Analyse structurale du produit Man₂GlcNAc Analyse structurale du produit Man₂GlcNAc III- CONCLUSION 	84 85 87 87 89 90 90					
 II- ETUDE DE L'ACTIVITE α-1,6-MANNOSIDASIQUE LYSOSOMIQUE A) ETUDE CINETIQUE Cinétiques d'hydrolyse des glyco-asparagines GA1 et GA2 Cinétiques d'hydrolyse des glyco-asparagines GA3 et GA4 Cinétiques d'hydrolyse des oligosaccharides B) ETUDE STRUCTURALE Analyse structurale du produit Man_ClcNAc Analyse structurale du produit Man_2ClcNAc_Asn ETUDE DE L'α-D-MANNOSIDASE CYTOSOLIQUE 	84 84 85 87 89 90 90					
 II- ETUDE DE L'ACTIVITE α-1,6-MANNOSIDASIQUE LYSOSOMIQUE A) ETUDE CINETIQUE 1° Cinétiques d'hydrolyse des glyco-asparagines GA1 et GA2 2° Cinétiques d'hydrolyse des glyco-asparagines GA3 et GA4 3° Cinétiques d'hydrolyse des oligosaccharides B) ETUDE STRUCTURALE 1° Analyse structurale du produit Man₂GlcNAc 2° Analyse structurale du produit Man₂GlcNAc 2° Analyse structurale du produit Man₂GlcNAc ETUDE DE L'α-D-MANNOSIDASE CYTOSOLIQUE 	84 85 87 89 90 90					
 II- ETUDE DE L'ACTIVITE α-1,6-MANNOSIDASIQUE LYSOSOMIQUE A) ETUDE CINETIQUE Cinétiques d'hydrolyse des glyco-asparagines GA1 et GA2 Cinétiques d'hydrolyse des glyco-asparagines GA3 et GA4 Cinétiques d'hydrolyse des oligosaccharides B) ETUDE STRUCTURALE Analyse structurale du produit Man_GlcNAc Analyse structurale du produit Man_2GlcNAc_Asn III- CONCLUSION ETUDE DE L'α-D-MANNOSIDASE CYTOSOLIQUE ETUDE DES α-D-MANNOSIDASES DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE ET DE	84 85 87 89 90 90 92					
 II- ETUDE DE L'ACTIVITE α-1,6-MANNOSIDASIQUE LYSOSOMIQUE A) ETUDE CINETIQUE 1° Cinétiques d'hydrolyse des glyco-asparagines GA1 et GA2 2° Cinétiques d'hydrolyse des glyco-asparagines GA3 et GA4 3° Cinétiques d'hydrolyse des oligosaccharides B) ETUDE STRUCTURALE 1° Analyse structurale du produit Man₂GlcNAc 2° Analyse structurale du produit Man₂GlcNAc 2Asn III- CONCLUSION ETUDE DE L'α-D-MANNOSIDASE CYTOSOLIQUE ETUDE DES α-D-MANNOSIDASES DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE ET DE L'APPAREIL DE GOLGI 	84 85 87 89 90 90 92					
 II- ETUDE DE L'ACTIVITE α-1,6-MANNOSIDASIQUE LYSOSOMIQUE A) ETUDE CINETIQUE Cinétiques d'hydrolyse des glyco-asparagines GA1 et GA2 Cinétiques d'hydrolyse des glyco-asparagines GA3 et GA4 Cinétiques d'hydrolyse des oligosaccharides B) ETUDE STRUCTURALE Analyse structurale du produit Man_GlcNAc III- CONCLUSION ETUDE DE L'α-D-MANNOSIDASE CYTOSOLIQUE ETUDE DES α-D-MANNOSIDASES DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE ET DE L'APPAREIL DE GOLGI I- L'α-D-MANNOSIDASE DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE	84 85 87 89 90 90 92 127 128					
 II- ETUDE DE L'ACTIVITE α-1,6-MANNOSIDASIQUE LYSOSOMIQUE A) ETUDE CINETIQUE	84 85 87 89 90 90 92 127 128 128					
 II- ETUDE DE L'ACTIVITE α-1,6-MANNOSIDASIQUE LYSOSOMIQUE A) ETUDE CINETIQUE 1° Cinétiques d'hydrolyse des glyco-asparagines GAl et GA2 2° Cinétiques d'hydrolyse des glyco-asparagines GA3 et GA4 3° Cinétiques d'hydrolyse des oligosaccharides B) ETUDE STRUCTURALE 1° Analyse structurale du produit Man₂GlcNAc 2° Analyse structurale du produit Man₂GlcNAc ₂Asn III- CONCLUSION ETUDE DE L'α-D-MANNOSIDASE CYTOSOLIQUE ETUDE GOLGI I - L'α-D-MANNOSIDASE DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE ET DE L'APPAREIL DE GOLGI I - L'α-D-MANNOSIDASE DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE A) RESULTATS	84 85 87 89 90 90 92 127 128 128 128					
 II- ETUDE DE L'ACTIVITE α-1,6-MANNOSIDASIQUE LYSOSOMIQUE A) ETUDE CINETIQUE 1° Cinétiques d'hydrolyse des glyco-asparagines GA1 et GA2 2° Cinétiques d'hydrolyse des glyco-asparagines GA3 et GA4 3° Cinétiques d'hydrolyse des oligosaccharides B) ETUDE STRUCTURALE 	84 85 87 89 90 90 92 127 128 128 128					
 II- ETUDE DE L'ACTIVITE α-1,6-MANNOSIDASIQUE LYSOSOMIQUE A) ETUDE CINETIQUE	84 85 87 89 90 90 92 127 128 128 128 130 134					
 II- ETUDE DE L'ACTIVITE α-1,6-MANNOSIDASIQUE LYSOSOMIQUE A) ETUDE CINETIQUE 1° Cinétiques d'hydrolyse des glyco-asparagines GA1 et GA2 2° Cinétiques d'hydrolyse des glyco-asparagines GA3 et GA4 3° Cinétiques d'hydrolyse des oligosaccharides B) ETUDE STRUCTURALE 1° Analyse structurale du produit Man_2GlcNAc 2° Analyse structurale du produit Man_2GlcNAc 30 Conditions d'incubation et séparation des produits 2° Analyse des produits formés par RMN du proton à 400 MHz B) DISCUSSION ET CONCLUSION II- LES MANNOSIDASES I DE L'APPAREIL DE GOLGI 	84 85 87 89 90 90 92 127 128 128 128 130 134					
 II- ETUDE DE L'ACTIVITE α-1,6-MANNOSIDASIQUE LYSOSOMIQUE A) ETUDE CINETIQUE Cinétiques d'hydrolyse des glyco-asparagines GA1 et GA2 Cinétiques d'hydrolyse des glyco-asparagines GA3 et GA4 Cinétiques d'hydrolyse des oligosaccharides B) ETUDE STRUCTURALE Analyse structurale du produit Man_GlcNAc Analyse structurale du produit Man_2GlcNAc_Asn ETUDE DE L'α-D-MANNOSIDASE CYTOSOLIQUE ETUDE DES α-D-MANNOSIDASE DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE ET DE L'APPAREIL DE GOLGI L'α-D-MANNOSIDASE DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE RESULTATS Conditions d'incubation et séparation des produits 2° Analyse des produits formés par RMN du proton à 400 MHz DISCUSSION ET CONCLUSION II- LES MANNOSIDASES I DE L'APPAREIL DE GOLGI A) RESULTATS A) RESULTATS 	84 85 87 89 90 90 92 127 128 128 128 130 134 137					
 II- ETUDE DE L'ACTIVITE α-1,6-MANNOSIDASIQUE LYSOSOMIQUE A) ETUDE CINETIQUE Cinétiques d'hydrolyse des glyco-asparagines GA1 et GA2 Cinétiques d'hydrolyse des glyco-asparagines GA3 et GA4 Cinétiques d'hydrolyse des oligosaccharides B) ETUDE STRUCTURALE Analyse structurale du produit Man_GlcNAc ETUDE DE L'α-D-MANNOSIDASE CYTOSOLIQUE ETUDE DEs α-D-MANNOSIDASE DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE ET DE L'APPAREIL DE GOLGI L'α-D-MANNOSIDASE DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE A) RESULTATS Conditions d'incubation et séparation des produits Analyse des produits formés par RMN du proton à 400 MHz DISCUSSION ET CONCLUSION II- LES MANNOSIDASES I DE L'APPAREIL DE GOLGI ANALYSE DES PRODUITS FORMES PAR RMN DU PROTON A 400 MHz 	84 85 87 89 90 90 92 127 128 128 128 130 134 137 137					

III- ETUDE DE L'HYDROLYSE DE L'OLIGOSACCHARIDE Man_GlcNAc DANS	
L'APPAREIL DE GOLGI	149
A) INTRODUCTION	149
B) RESULTATS	149
C) DISCUSSION ET CONCLUSION	155
IV- CONCLUSION	157
CONCLUSION GENERALE	158
BIBLIOGRAPHIE	160
APPENDICE TECHNIQUE	
PREPARATION DES FRACTIONS CELLULAIRES DE FOIE DE RAT	I
T- PREPARATION DE LYSOSOMES	т
TT- PREPARATION DE CYTOSOL	ī
III- PREPARATION DE RETICULUM ENDOPLASMIQUE	- II
TV- PREPARATION DE L'APPAREIL DE GOLGI	III
V- DOSAGE DES ENZYMES MARQUEURS	III
PREPARATION DES SUBSTRATS	VI
ETUDES DES ACTIVITES α -D-MANNOSIDASIQUES	x
I- α-D-MANNOSIDASES LYSOSOMIQUES	х
II- a-D-MANNOSIDASE CYTOSOLIQUE	x
III- α-D-MANNOSIDASES DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE	XI
IV- a-D-MANNOSIDASES DE L'APPAREIL DE GOLGI	XI
SEPARATION ET ANALYSE DES PRODUITS D'HYDROLYSE	XII
I- SEPARATION DES PRODUITS D'HYDROLYSE	XII
II- ANALYSE DES PRODUITS D'HYDROLYSE	XII
A) ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE	XII
B) ANALYSE DES PRODUITS PAR RMN DU PROTON A 400 MHz	XIII
C) ANALYSE DES PRODUITS PAR SPECTROMETRIE DE MASSE	XIII
1° Méthylation	XIII
2° Spectrométrie de masse	XIV

BIBLIOGRAPHIE

....

xv

INTRODUCTION

Le catabolisme des glycoprotéines fait appel à l'action conjointe des protéases et des glycosidases lysosomiques. Ces derniers enzymes sont capables d'hydrolyser la plupart des enchaînements osidiques rencontrés dans les glycoconjugués. Peu de renseignements étaient cependant disponibles quant à la chronologie d'intervention des différentes glycosidases, à leur exacte spécificité vis-à-vis de substrats naturels et au taux d'hydrolyse de ces substrats.

Ces facteurs pris ensemble constituent autant d'étapes limitantes pour le catabolisme qu'il est primordial d'élucider. Pendant longtemps nos seules connaissances sur le déroulement des processus de dégradation des chaînes glycanniques sont venues de l'étude des "glycoprotéinoses". Ce groupe particulier de thésaurismose lysosomique constitue une véritable "expérience de la Nature". En effet, le déficit génétique en glycosidases caractérisant ces maladies se traduit par un blocage métabolique qui a pour conséquence une accumulation des composés glucidiques non dégradés dans les tissus et une excrétion urinaire massive d'oligosaccharides ou de glyco-asparagines trouvant leur origine dans les chaînes glycanniques des glycoprotéines de l'ensemble de l'organisme. L'examen attentif des structures oligosaccharidiques trouvées dans l'urine des malades donne une vue figée des réactions cataboliques en amont de l'enzyme déficient. Cette démarche a permis d'émettre l'hypothèse de l'existence d'endo-N-acétyl-ß-D-glucosaminidases cellulaires et a conduit à la découverte de ces enzymes dans le cytosol, d'une part, par le groupe de G.SPIK et dans le lysosome, d'autre part, par le groupe de G.STRECKER et J.C.MICHALSKI.

Le développement de méthodes physico-chimiques comme la résonance magnétique nucléaire (RMN) ou la spectrométrie de masse par bombardement

d'atomes accélérés (FAB-MS) a contribué à faire progresser nos connaissances sur le catabolisme normal des chaînes glycanniques. Ces méthodes sont, en effet, des outils de choix pour l'analyse des métabolites formés lors des réactions enzymatiques. Elles permettent, en particulier, de déterminer la nature des différents isomères susceptibles de se former au cours des réactions, ainsi que la cinétique et la chronologie de ces mêmes réactions. Ces techniques, appliquées dans notre Laboratoire à l'étude de la dégradation lysosomique des structures N-glycanniques de type N-acétyllactosaminique, ont ainsi montré, d'une part, que le catabolisme de ces composés était un phénomène ordonné et bidirectionnel et, d'autre part, que l'action des exoglycosidases s'exerçait à un rythme différent sur les diverses "antennes" des glycannes.

Afin de poursuivre ces études, nos travaux ont consisté à appliquer les méthodes préalablement mentionnées à l'étude chronologique de la dégradation des N-glycannes de type oligomannosidique. Ces composés sont essentiellement rencontrés dans la cellule au niveau des structures membranaires, ainsi que dans les glycoprotéines en voie de biosynthèse. Leur dégradation est réalisée par des α -mannosidases rencontrées dans pratiquement tous les compartiments cellulaires. Si les spécificités des α -mannosidases du reticulum endoplasmique ruqueux et de l'appareil de Golgi étaient en grande partie élucidées, la spécificité des enzymes lysosomiques et cytosoliques restait inconnue. L'étude de ces deux types d'enzymes permettait, en outre, d'aborder un problème d'actualité qui concerne l'importance respective des catabolismes lysosomique et cytosolique dans la dégradation des chaînes glycanniques, ainsi que le rôle et l'origine des enzymes cytosoliques. Dès 1979, R.PIERCE, dans le groupe de G.SPIK, avec la découverte de l'endo-N-acétyl-ß-Dglucosaminidase avait mis en avant le rôle possible joué par cet enzyme

cytosolique dans les phénomènes de catabolisme des glycoprotéines intracellulaires.

L'intérêt de l'étude des α -mannosidases est renforcé par l'existence d'une pathologie associée à ces enzymes : la mannosidose, maladie génétique dûe à une déficience en α -mannosidase lysosomique.

Nous ferons précéder l'exposé de nos travaux par une brève revue concernant les mécanismes d'intégration et de dégradation des glycoconjugués dans le lysosome, ainsi que par un catalogue des propriétés des α -mannosidases cellulaires décrites à ce jour.

GENERALITES

LYSOSOMES ET CATABOLISME DES GLYCOCONJUGUES

Le lysosome contient un équipement en hydrolases capable de dégrader tous les types de macromolécules comme, par exemple, les glycoconjugués et il est, à ce titre, l'organite cellulaire spécialisé dans le catabolisme et le recyclage des métabolites.

Grâce aux hydrolases "acides", enzymes dont les propriétés générales seront discutées ultérieurement, les lysosomes possèdent une fonction hétérophagique intéressant les substances extracellulaires, ainsi qu'une fonction autophagique portant sur les constituants endocellulaires.

Dans ce chapitre de généralités, nous décrirons les principales caractéristiques des glycoconjugués et, après une brève présentation des lysosomes, nous décrirons les voies du catabolisme des N-glycosylprotéines, connues au moment où nous avons entrepris nos travaux, et nous terminerons par une revue sur les α -mannosidases.

I) LES GLYCOCONJUGUES.

Le terme générique de glycoconjugués regroupe deux familles de composés biologiques: les glycolipides et les glycoprotéines.

Ces composés résultent de l'association covalentielle d'un glucide appelé glycanne avec un lipide ou une protéine.

A) LES GLYCOLIPIDES.

En fonction de la chaîne glycannique attachée à la partie lipidique, les glycosphingolipides peuvent être subdivisés en différents groupes

(*) Pour des revues générales, voir WIEGANDT, 1980; HAKOMORI, 1983.

dénommés trivialement: gala-, globo-, lacto-, muco- et ganglioglycosylcéramides.

Les glycolipides sont des composés essentiels de la cellule qui se retrouvent principalement au niveau de la membrane plasmique. Les gangliosides, glycolipides acides caractérisés par la présence d'acide sialique, sont des constituants majeurs du système nerveux central et ils sont surtout localisés au niveau des membranes neuronales et synaptiques. Dans les tissus extraneuronaux, les glycolipides jouent un d'interaction rôle dans les phénomènes et de différenciation cellulaires, ainsi que dans les phénomènes d'interaction avec des composés biologiquement actifs (hormones, toxines, virus). Il convient également de mentionner leur rôle immunologique primordial en tant qu'antigènes de groupes sanguins.

La variété et la gravité des troubles neurologiques et viscéraux observés chez les patients atteints de glycosphingolipidoses, maladies métaboliques caractérisées par la déficience totale ou partielle de l'activité de certaines glycosidases lysosomiques impliquées dans le catabolisme des glycolipides, prouvent que les glycolipides doivent nécessairement être dégradés et recyclés.

Les glycosphingolipides présentent ainsi un "turnover" relativement important et les gangliosides sont, de tous les glycolipides, ceux qui présentent le turnover le plus rapide. Toutefois, des différences notables sont observées selon le niveau de développement et la nature du tissu étudié. Les stades embryonnaires, néo- et post-nataux sont ainsi caractérisés par d'importantes modifications dans la nature des glycolipides membranaires, celles-ci étant directement corrélées à une augmentation de l'activité de certaines glycosyltransférases et glycosidases. B) LES N-GLYCOSYLPROTEINES.

1° Classification.

D'une manière générale, les glycoprotéines sont classées en fonction de la nature de la liaison glycanne-protéine (STRECKER et MONTREUIL, 1979). On distingue ainsi deux classes de glycoprotéines:

- Les O-glycosylprotéines chez lesquelles la liaison de type O-glycosidique s'effectue entre un monosaccharide et un résidu d'hydroxyaminoacide.

- Les N-glycosylprotéines où l'unique liaison de type N-glycosidique s'effectue entre la N-acétylglucosamine et l'asparagine.

Dans la suite de notre exposé, nous nous limiterons à l'étude de cette dernière classe de composés biologiques au catabolisme desquels nous nous sommes particulièrement intéressés.

2° Les N-glycosylprotéines.

4

Les glycannes liés N-glycosidiquement possèdent en commun une fraction invariable (*inv*), le noyau du trimannosyl-N-N'-diacétyl-chitobiose (MONTREUIL, 1975):

Man(
$$\alpha$$
1-6)
4'
Man(β 1-4)GlcNAc(β 1-4)GlcNAc(β 1-N)Asn
321
Man(α 1-3)

- 16 -

Cette fraction oligosaccharidique commune est substituée par des motifs oligosaccharidiques variables (var): les antennes (MONTREUIL, 1975) qui sont le support de la spécificité des glycannes des N-glycosylprotéines.

En fonction de la nature des chaînes oligosaccharidiques var, on distingue trois types fondamentaux de structures de glycannes liés N-glycosidiquement (Fig. 1, d'après MONTREUIL, 1975; 1980; 1982):

- le type oligomannosidique

- le type N-acétyllactosaminique

- le type oligomannosido-N-acétyllactosaminique ou hybride

a) Glycannes de type oligomannosidique.

Les structures de type oligomannosidique résultent de la substitution du noyau pentasaccharidique *inv* par des résidus de mannose en nombre variable. Ces résidus de mannose, au nombre maximum de 6 chez les Eucaryotes supérieurs, s'assemblent pour donner la structure limite (Man)_o(GlcNAc)₂ ou M-9.

b) Glycannes de type N-acétyllactosaminique.

Les glycannes de type N-acétyllactosaminique résultent de la substitution du noyau *inv* par un nombre variable de chaînons N-acétyllactosaminique Gal(ß1-4)GlcNAc. En fonction du nombre de ces chaînons, on obtiendra des structures dites mono-, bi-, tri-, tétraantennées. Une branche supplémentaire peut venir s'ajouter sur le résidu



Fig. 1: Les trois types fondamentaux de glycannes liés N-glycosidiquement aux protéines.

A: Glycanne de type oligomannosidique,

B: Glycanne de type N-acétyllactosaminique,

C: Glycanne de type hybride.

de mannose <u>4'</u> conduisant à des structures de type penta-antenné telles qu'elles ont été décrites dans l'ovomucoïde de Tourterelle (FRANCOIS-GERARD et al., 1980) et de Poule (PAZ PARENTE et al., 1982). Un résidu de N-acétylglucosamine dit intercalaire peut également venir substituer le résidu de mannose 3 (Fig. 1).

Les différents résidus de N-acétyllactosamine peuvent eux-mêmes être substitués par des résidus d'acide N-acétylneuraminique et/ou de fucose et par des groupements sulfuryls, conférant ainsi à ce type de glycannes liés N-glycosidiquement une importante hétérogénéité.

c) Glycannes de type hybride.

Le noyau *inv* est substitué par des résidus de mannose en nombre variable sur le résidu de mannose <u>4'</u> et par des chaînons N-acétyllactosaminique sur le résidu de mannose <u>4</u> (**TAI et al., 1977**). Dans la plupart des cas le résidu de N-acétylglucosamine intercalaire est également présent.

II) LES LYSOSOMES.

En 1955, **De DUVE** et al. donnent le nom de lysosomes à des particules cytoplasmiques dans lesquelles ils caractérisent des hydrolases dont la caractéristique principale est qu'elles possèdent un pH optimum acide.

Actuellement plus de cinquante hydrolases acides ont été caractérisées dans les lysosomes, organites à l'intérieur desquels elles se trouvent séquestrées grâce à une membrane destinée à assurer une compartimentation et ainsi éviter l'attaque du cytoplasme environnant.

A) CARACTERISTIQUES GENERALES DES LYSOSOMES.

Chez les animaux, on trouve des lysosomes dans toutes les cellules, à l'exception des globules rouges. Ils sont particulièrement nombreux dans les macrophages et les cellules hépatiques. L'aspect des lysosomes, du fait qu'ils sont impliqués dans la digestion de substances à l'intérieur de la cellule, dépend de leur état fonctionnel.

1° La membrane lysosomique.

Longtemps considérée comme une simple barrière destinée à assurer une ségrégation entre cytoplasme et milieu intralysosomique, la membrane lysosomique joue un rôle très important. Elle contribue en effet à assurer un équilibre entre l'entrée des substrats et la sortie des produits issus de leur dégradation.

La membrane lysosomique est imperméable aux macromolécules. La masse moléculaire représente le facteur déterminant de la perméabilité de la membrane lysosomique pour une molécule: les composés possédant une masse moléculaire supérieure à 200 ne peuvent pénétrer par diffusion simple à l'intérieur du lysosome (EHRENREICH et COHN, 1969; BADENOCH-JONES et BAUM, 1974)

De nombreuses fonctions du lysosome sont assurées par des protéines insérées dans sa membrane:

- ségrégation des enzymes,
- maintien du pH,
- transport des produits d'hydrolyse,
- reconnaissance ou fusion avec d'autres vésicules intracyto-

plasmiques, notamment avec des endosomes (STEINMAN et al., 1983),

- association avec les microtubules du cytosquelette cellulaire (MITHIEUX et ROUSSET, 1989).

Le transport des produits du catabolisme vers le cytoplasme est une fonction trés importante de la membrane lysosomique. Des systèmes membranaires responsables du transfert d'acides aminés, de monosaccharides, de nucléosides ou de vitamine ont ainsi été caractérisés chez divers types cellulaires (Tableau I).

Chez l'Homme, les déficiences de trois de ces transporteurs sont associées à des maladies dites de surcharge lysosomique. Il s'agit des déficiences en transporteurs:

- de cystine (cystinose),
- d'acide N-acétylneuraminique (maladie de Salla),
- de vitamine B₁₂.

2° Le pH intralysosomique.

Constatant que la plupart des enzymes lysosomiques possédait un pH optimum acide et sont inactifs à des pH voisins de la neutralité, **COFFEY** et DE DUVE ont émis dès 1968 l'hypothèse d'un pH intralysosomique relativement bas par rapport à celui du cytoplasme.

La première mesure *in situ* a été réalisée après endocytose par des macrophages d'un composé fluorescent, l'isothiocyanate de fluoresceïne, couplé à un polymère de Dextran (OHKUMA et POOLE, 1978). Le spectre d'excitation et l'intensité de fluorescence du Dextran marqué dépendent du pH du milieu dans lequel il se trouve. Tableau I: Les transporteurs de la membrane lysosomique.

Molécule t	ransportée	Type cellulaire	Références
Acides aminés	Cystine		GAHL et al., 1982
	Cationiques	Fibroblastes humains	PISONI et al., 1985
	Tyrosine et neutres	Fibroblastes humains	BERNAR et al., 1986
	Petits neutres	Fibroblastes humains	PISONI et al., 1987
	Anioniques	Fibroblastes humains	COLLARINI et al., 1988
	Monoiodotyrosine	Cellules de thyroïde	TIETZE et al., 1989
		de Rat	
Monosaccharides	Glucose/mannose		
	Acide sialique	Fibroblastes humains	RENLUND et al., 1986
	N-acétylhexosamines	Hépatocytes de Rat	JONAS et al., 1989
Nucléoside	Adénosine		PISONI et THOENE, 1989
Vitamine	B 12		ROSENBLATT et al., 1985

- 22 -

Récemment, ANDERSON et al. (1984) ont développé une méthode immunocytochimique qui permet de visualiser les compartiments "acides" et de mesurer leur pH in situ par microscopie électronique.

Sur la base des multiples mesures réalisées, on peut affirmer que le lysosome est l'organite le plus "acide" de la cellule: selon le type cellulaire étudié et la méthode utilisée, le pH intralysosomique varie, en effet, entre 4,5 et 5,5.

L'acidité du milieu intralysosomique est maintenue par une pompe à protons ATP-dépendante (OHKUMA et al., 1982). Bien qu'elle n'ait pas encore été isolée, cette pompe semble identique aux ATPases décrites dans les endosomes et les vésicules mantelées ("coated pits") (MELLMAN et al., 1986).

Cette pompe serait électrogénique: le transfert des protons ne serait pas directement couplé à un transfert d'ions, mais la différence de potentiel membranaire engendrée pourrait être régulée par l'entrée d'anions (Cl⁻) et/ou la sortie de cations (K⁺ ou Na⁺) (HARIKUMAR et REEVES, 1983).

3° Les enzymes lysosomiques.

Les nombreuses hydrolases acides décrites à ce jour sont des glycoprotéines dont les glycannes jouent un rôle fondamental dans les processus de reconnaissance et de ségrégation cellulaires de ces enzymes, ainsi qu'un rôle de protection de la chaîne peptidique contre l'hydrolyse protéasique.

Ces enzymes possèdent des masses moléculaires relativement élevées et sont généralement constituées de plusieurs sous-unités. Les N-acétyl-B-D-hexosaminidases de placenta et rein humains sont, par exemple, formées de deux sous-unités différentes α et B: la forme A serait un hétéropolymère et la forme B un homopolymère de sous-unités ß (GEIGER et ARNON, 1976; SRIVASTAVA et al., 1976).

Trois formes de ß-galactosidase peuvent être isolées du foie humain: les formes A_1 et A_2 sont respectivement des monomère et dimère de masses moléculaires 70 et 150 kDa et la forme A_3 résulterait de l'association de plusieurs monomères (CHEETHAM et DANCE, 1976).

Plusieurs enzymes peuvent s'associer et former un complexe multienzymatique. Un tel complexe associant trois enzymes, respectivement les neuraminidase, ß-galactosidase et carboxypeptidase, a été isolé du placenta humain (VERHEIJEN et al., 1985). Un modèle structural de ce complexe a récemment été proposé par POTIER et al. (1990): celui-ci serait constitué d'un noyau hexamérique, comportant les activités neuraminidasique et ß-galactosidasique, et de cinq monomères de carboxypeptidase périphériques.

Les enzymes lysosomiques présentent un maximum d'activité dans une zone de pH comprise entre 4,0 et 5,5. Le pH optimum des enzymes lysosomiques varie en fait en fonction du tampon utilisé, de la force ionique du milieu, de la température, de la présence d'effecteurs et de la nature du substrat.

Ces enzymes sont stables en milieu acide et cette stabilité serait dûe à la présence des nombreuses chaînes glycanniques mais dépendrait aussi de la température. La stabilité à la température représente d'ailleurs un critère permettant de distinguer certaines formes enzymatiques. Le terme "iso-enzyme" désigne des formes enzymatiques ayant les mêmes propriétés catalytiques et différant par certaines propriétés physico-chimiques comme:

- le pH optimum,
- la stabilité à la dénaturation (chaleur, agents chimiques),
- le point isoélectrique,
- la mobilité électrophorétique,
- le comportement vis-à-vis des effecteurs.

Ces différents facteurs ainsi que les différences de masse moléculaire et de composition chimique ont donc permis la caractérisation et l'isolement de nombreuses formes isoenzymatiques.

B) BIOGENESE DES LYSOSOMES.

Dans les cellules à activité macrophagique (granulocytes, monocytes ou macrophages), les lysosomes se forment selon la voie classique de synthèse et d'empaquetage des protéines à partir de l'appareil de Golgi (PALADE, 1975).

Pour de nombreux autres types cellulaires le processus est plus complexe. Les protéines lysosomiques suivent le chemin emprunté par toutes les protéines néo-synthétisées à partir du site de début de synthèse, le reticulum endoplasmique rugueux, et ne sont dirigées vers leur destination finale qu'au niveau d'une région tubulaire à membrane lisse associée à l'appareil de Golgi (Fig. 2). Cette région a pu être mise en évidence et caractérisée à la suite d'expériences de cytochimie (NOVIKOFF et NOVIKOFF, 1977; PINO et al., 1981). Le terme GERL, acronyme anglo-saxon pour <u>Go</u>lgi-associated smooth <u>Endoplasmic Reticulum</u> that forms Lysosomes, a été proposé dès 1976 par NOVIKOFF pour décrire ce



Fig. 2: Transport cellulaire des enzymes lysosomiques et biogenèse des lysosomes (d'après DAHMS et al., 1989).

- ○, Enzymes lysosomiques.
- •, Protéines sécrétées.
- -C, Récepteurs du Man-6-P.

compartiment cellulaire. Afin de traduire la stricte localisation trans-golgienne de ce compartiment, **GRIFFITHS et SIMONS** ont introduit en **1986** le terme TGN, autre acronyme pour Trans-Golgi Network.

Les protéines membranaires et les enzymes ne possèdent toutefois pas le même mode d'intégration, et le processus de biogenèse du lysosome mature et fonctionnel se subdivise donc en deux parties.

1° Le transport des enzymes lysosomiques.

Les enzymes néo-synthétisés acquièrent un signal de reconnaissance qui va permettre leur ségrégation.

Les mécanismes moléculaires impliqués dans le transport intracellulaire des hydrolases vers les lysosomes ont été compris grâce à l'étude de maladies dites de surcharge lysosomique.

L'étude de la mucolipidose de type II ou "I-cell disease", permit de mettre en évidence un signal de reconnaissance commun à toutes les hydrolases acides. Dans cette maladie les enzymes normalement synthétisés sont sécrétés au lieu d'être dirigés vers les lysosomes. L'expérience critique consista à montrer que ces hydrolases sécrétées ne n'étaient pas reconnues par des fibroblastes normaux alors que des enzymes sécrétés par des fibroblastes normaux alors que des par des fibroblastes de patients atteints de I-cell disease (HICKMAN et NEUFELD, 1972). La mucolipidose de type II était donc dûe à une mutation affectant un enzyme synthétisant un signal de reconnaissance porté par les enzymes destinés aux lysosomes.

L'identification du groupement fonctionnel fut réalisée à la suite d'études d'inhibition de la recapture d'enzymes exogènes par des fibroblastes. **KAPLAN et al.** (1977) constatèrent, en effet, que la pinocytose était fortement et spécifiquement inhibée par le mannose-6-phosphate et émirent l'hypothèse selon laquelle ce signal de reconnaissance était porté par les glycannes des enzymes.

Des études structurales ont, par la suite, permis de déterminer les sites potentiels de phosphorylation des chaînes glycanniques des hydrolases acides. Cinq sites de phosphorylation ont ainsi été proposés au niveau des glycannes de type oligomannosidique contre un seul pour ceux de type hybride (HASILIK et al., 1980; VARKI et KORNFELD, 1980, 1983).

L'acquisition du signal Man-6-P est donc la modification critique pour les enzymes lysosomiques car elle assurera leur destination finale. La synthèse du signal Man-6-P s'effectue en deux étapes dans l'appareil de Golgi. La première étape fait intervenir un enzyme l'UDP-N-acétylglucosamine: N-acétylparticulier, glycoprotéine glucosamine-1-phosphotransférase, et consiste en un transfert d'un résidu de N-acétylglucosamine-1-phosphate à partir de l'UDP-N-acétylglucosamine sur l'hydroxyle en position 6 d'un résidu de mannose (REITMAN et KORNFELD, 1981; WAHEED et al., 1982). La seconde étape consiste en un démasquage des résidus phosphate. Elle est catalysée par une N-acétylqlucosamine 1-phosphodiester- α -N- acétylqlucosaminidase qui hydrolyse le résidu de N-acétylglucosamine et fait ainsi apparaître le résidu Man-6-P (VARKI et KORNFELD, 1981; WAHEED et al., 1981).

Les hydrolases acides "équipées" du signal de reconnaissance vont être transportées de leur lieu de synthèse vers les lysosomes par l'intermédiaire de récepteurs du Man-6-P. Deux récepteurs, différant notamment par leurs propriétés structurales et de liaison, ont été caractérisés dans de nombreux tissus et lignées cellulaires:

- <u>Un récepteur cation-indépendant</u>: **SAHAGIAN** *et al.*(1981) isolent notamment ce récepteur à partir de foie de Boeuf par chromatographie sur colonne de B-galactosidase immobilisée et montrent qu'il s'agit d'une glycoprotéine membranaire possédant une masse moléculaire de 270 kDa (Fig. 3) et que l'association du récepteur et du ligand est indépendante de la présence de cations et dépend principalement du pH, l'association étant optimale dans une zone de pH variant entre 6,0 et 7,0.

- <u>Un récepteur cation-dépendant</u> a été mis en évidence et purifié par **HOFLACK et KORNFELD** (1985a et b) à partir de foie de Boeuf et de macrophages de Souris déficients en récepteur cation-indépendant. Celui-ci se distingue du récepteur précédemment décrit par le fait qu'il est cation-dépendant, essentiellement Mn^{2+} -dépendant. Il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire de 46 kDa de masse moléculaire (Fig. 3).

Les hydrolases acides se lient aux récepteurs dans l'appareil de Golgi et "traversent" ainsi l'ensemble des saccules golgiennes (Fig. 2). Au niveau du TGN, la ségrégation s'opère par concentration de ces complexes récepteur-ligand au niveau de régions particulières tapissées de clathrine. Ces régions bourgeonnent et forment des vésicules mantelées (Fig. 2).

Ces "navettes" gagnent le compartiment pré-lysosomique ou "late endosome" (Fig. 2) dont l'acidification du milieu intravésiculaire réalisé par le jeu d'une pompe à protons provoque la rupture de la liaison récepteur-ligand, celle-ci n'étant stable qu'à des pH supérieurs à 6,0 (**SAHAGIAN** *et al.*, **1981**). Tout comme l'association du récepteur



Fig. 3: Représentation schématique des récepteurs du mannose-6-phosphate

- (•---, site de glycosylation).
- A: récepteur cation-indépendant
- B: récepteur cation-dépendant

avec son ligand était responsable de l'expédition d'une vésicule mantelée, la dissociation du complexe provoque le retour du récepteur vers l'appareil de Golgi (BROWN et al., 1986; VON FIGURA et HASILIK, 1986).

Les lysosomes se forment par vésicularisation à partir de ce compartiment pré-lysosomique (GRIFFITHS et al., 1988).

Les hydrolases ainsi livrées au lysosome subissent enfin une protéolyse ménagée, maturation finale de ces protéines qui permet de former des espèces moléculaires complètement actives (HASILIK et NEUFELD, 1980).

Toutefois, certains enzymes peuvent intégrer les lysosomes par endocytose. Le phénomène de sécrétion-recapture décrit par **NEUFELD et CANTZ (1971)** et **HICKMAN et NEUFELD (1972)** représente une seconde voie d'intégration des hydrolases acides dans les lysosomes.

Des enzymes présents dans le milieu extracellulaire se lient à des récepteurs de la membrane plasmique. Les complexes récepteur-ligand sont internalisés et les vésicules mantelées ainsi formées fusionnent avec des endosomes périmembranaires ou "early endosomes" (Fig. 2). Une acidification du milieu intravésiculaire de ces organites provoque, comme décrit précédemment, la dissociation des complexes récepteurligand et le recyclage des récepteurs. Les enzymes gagnent le compartiment pré-lysosomique, ou "late endosome", puis les lysosomes par l'intermédiaire de vésicules.

2° Les protéines de la membrane lysosomique.

Parmi cette classe de protéines, ont été isolées, à partir des lysosomes de différentes espèces animales, des glycoprotéines de masse

moléculaire 100 à 120 kDa dont les séquences primaires en acides aminés, déterminées après clonage, montrent de fortes homologies. Bien que leur rôle demeure inconnu, les études structurales réalisées montrent qu'elles forment une famille de protéines hautement conservées dérivant d'un gène ancestral commun.

Elles sont constituées d'une chaîne polypeptidique de 20 à 60 kDa de masse moléculaire qui s'organise en cinq domaines, sont fortement glycosylées et possèdent un point isoélectrique très bas (inférieur à 4) dû aux nombreux acides sialiques portés par les glycannes.

Les fortes homologies de séquence des domaines C-terminaux cytoplasmique et transmembranaire de ces protéines suggèrent que ceux-ci représentent un signal nécessaire à leur insertion dans la membrane lysosomique (**HIMENO** *et al.*, 1989; **NOGUCHI** *et al.*, 1989).

Ces protéines, bien qu'elles soient glycosylées, gagnent le lysosome par un mécanisme indépendant du récepteur du mannose-6phosphate. Certains enzymes s'expriment en effet normalement dans les lysosomes de patients atteints de I-cell disease, patients chez lesquels les enzymes ne sont pas adressés aux lysosomes par suite d'une déficience en N-acétylglucosamine-1-phosphotransférase (HASILIK et al., 1981): la phosphatase acide (WAHEED et al., 1988) et l' α -glucosidase (TSUJI et al., 1988) sont intégrées dans la membrane et finalement libérées après action de protéases cytosoliques et lysosomiques (GOTTSCHALK et al., 1989).

Des expériences d'immuno-marquage suggèrent l'existence de deux voies d'intégration de ces protéines dans les lysosomes:

- Des protéines comme les lgp 120, LIMP III et LAMP I, ont été localisées au niveau de l'appareil de Golgi, des endosomes et des lysosomes (**LEWIS** *et al.*, **1985; BARRIOCANAL** *et al.*, **1986**). Elles seraient intégrées en même temps que les enzymes. - D'autres, LEP 100 et Endolyn 78, ont été localisées au niveau des mêmes compartiments cellulaires mais aussi de la membrane plasmique (5%). Ceci suggère un mouvement bidirectionnel de ces protéines entre les membranes lysosomique et plasmique (CROZE et al., 1989).

C) L'AUTOPHAGIE.

Mis en évidence par **ERICSSON** en **1969**, ce processus permet aux macromolécules ou aux organites cellulaires "usagés" de gagner l'intérieur du lysosome afin d'y être dégradés.

On distingue classiquement plusieurs types d'autophagie (Fig. 4):

- <u>La macro-autophagie</u> est le processus par lequel une portion du reticulum endoplasmique lisse (**ERICSSON**, 1969) ou de l'appareil de Golgi (NOVIKOFF et al., 1971) enveloppe une partie du cytoplasme.

Selon la nature du matériel internalisé, on distingue deux types de vacuoles autophagiques ou autophagosomes:

- * les vacuoles autophagiques de type I: dans ce cas, des organites intracellulaires (mitochondries, reticulum endoplasmique) sont englobés.
- * les vacuoles autophagiques de type II: dans ce cas, la zone du cytoplasme circonscrite contient des macromolécules (glycogène, ribosomes, protéines).

La vacuole ainsi formée fusionne avec un lysosome préexistant et devient un **autophagolysosome** à l'intérieur duquel sont déversées les hydrolases acides du lysosome.



Fig. 4: Les phénomènes d'autophagie et d'hétérophagie (d'après SAKAI et al., 1989).

hétérophagosome	LP: lysosome primaire
hétérophagolysosome	AP: autophagosome
nématolysosome	APL: autophagolysosome
corps résiduel	MA: micro-autophagolysosome
	hétérophagosome hétérophagolysosome nématolysosome corps résiduel

- <u>La microautophagie</u> est un processus par lequel le lysosome lui-même englobe une petite portion du cytosol (**GLAUMAN** et al., 1981).

- <u>La crinophagie</u> est le mécanisme par lequel des vésicules de sécrétion, contenant des protéines néo-synthétisées, fusionnent avec des lysosomes (SMITH et FARQUHAR, 1966).

Ces différents phénomènes sont sous la dépendance de divers facteurs comme:

- la concentration en acides aminés (MORTIMORE et SCHWORER, 1977),
- les hormones: l'insuline inhibe l'autophagie, le glucagon ayant l'effet inverse (HOPGOOD et al., 1980),
- l'ATP: source d'énergie indispensable à la ségrégation des composés dans le cytoplasme (**PLOMP et al., 1987**),
- le cytosquelette: les microtubules, nécessaires à la fusion entre vacuoles autophagiques et lysosomes (MARZELLA et al., 1982) et des filaments intermédiaires qui, en s'associant avec certaines protéines, permettraient de séquestrer ces dernières dans le cytoplasme avant leur dégradation (DOHERTY et al., 1987).

D) L'HETEROPHAGIE.

L'hétérophagie est le processus par lequel des particules et molécules exo-cellulaires sont digérées à l'intérieur de la cellule. Cette fonction assurée par les lysosomes dépend donc du processus d'endocytose, mécanisme permettant l'internalisation de ces substances extracellulaires. On distingue classiquement deux types d'endocytose:

- La phagocytose qui permet l'internalisation de grosses particules de taille supérieure ou égale à 0,1 μ m comme des bactéries et des macromolécules;

- <u>La pinocytose</u> qui permet à la cellule d'internaliser des petites molécules solubles et selon le mode d'internalisation, via un récepteur ou non, on distingue:

. la pinocytose adsorptive,

. la pinocytose en phase fluide.

1° La phagocytose.

Les deux phases permettant d'aboutir à la formation d'un phagosome, reconnaissance et internalisation de la particule, représentent en fait la succession des évènements suivants (STOSSEL, 1976):

a- Reconnaissance de la particule par le phagocyte,

b- Emission d'un message signal de l'internalisation,

c- Association particule-surface cellulaire,

d- Emission de pseudopodes,

e- Fusion des pseudopodes et formation d'une vésicule.

De nombreux facteurs semblent avoir une influence sur le phénomène de phagocytose, notamment sur la nature de l'interaction particulecellule. Ce sont:

- les propriétés de la surface des particules et des cellules: nature chimique, hydrophobicité, charge...

- la présence d'ions divalents, de Ca²⁺ notamment,
- l'association de la particule à des protéines sériques (immunoglobulines, complément) qui vont favoriser la reconnaissance par le phagocyte: c'est le concept de l'opsonisation.

2° La pinocytose.

a- La pinocytose en phase fluide.

Dans ce cas, la membrane plasmique englobe une fraction du liquide extracellulaire contenant des molécules en solution. La vésicule formée est un **macropinosome**.

Ce phénomène ne peut être dissocié de celui d'exocytose, phénomène antagoniste permettant, entre autres, le recyclage des constituants membranaires et le reflux du liquide internalisé. **BESTERMAN** *et al.* (1981) montrent qu'environ un quart du volume internalisé par pinocytose est rapidement exocyté par les macrophages.

Malgré la concomitance des deux processus, STEINMAN et al. (1976) montrent que des macrophages peuvent internaliser jusque 25% de leur volume et 185% de leur surface cellulaire par heure.

Outre le rôle d'assurer un certain "turnover" des lipides et protéines membranaires, la pinocytose en phase fluide couplée à la dégradation intralysosomique assure à la cellule un approvisionnement en métabolites. Dans les cas de carence, la pinocytose de protéines exogènes serait une source d'acides aminés pour la synthèse de protéines.

Enfin, SWANSON et al. (1987b) montrent que la pinocytose stimule la progression des lysosomes le long des microtubules du cytosquelette vers

la périphérie de la cellule, phénomène inhibé par le nocodazole (drogue causant la dissociation du cytosquelette cellulaire).

b- La pinocytose adsorptive.

Commun à tous les types cellulaires, à l'exception des érythrocytes, ce phénomène permet l'internalisation de certaines molécules circulantes par l'intermédiaire de récepteurs membranaires et possède plusieurs finalités (STAHL et SCHWARTZ, 1986).

L'association récepteur-ligand provoque le déplacement du complexe vers une région spécialisée de la membrane, le puits recouvert ou "coated pit" (ANDERSON et al., 1977), tapissée sur sa face interne d'un réseau de plusieurs protéines dont la protéine majeure est la clathrine (PEARSE, 1976). Ces structures spécialisées mesurent environ 1400 A de diamètre et ne représentent généralement que l à 2% de la surface cellulaire.

Ensuite, les parois du puits se referment pour former une vésicule recouverte (coated vesicle) qui, par dépolymérisation et perte de la clathrine, donne un endosome.

Une acidification de la vacuole opérée par l'intermédiaire d'une pompe à protons ATP-dépendante induit la dissociation du complexe récepteur-ligand, évènement qui provoque lui-même le recyclage du récepteur vers la membrane plasmique. Enfin, la vacuole ainsi formée, contenant les composés internalisés, fusionne avec un lysosome.

Les glycoprotéines circulantes peuvent ainsi être captées et endocytées afin d'être dégradées au sein du lysosome. Plusieurs récepteurs membranaires de type lectinique ont ainsi été caractérisés chez les Mammifères.

1- <u>Le récepteur hépatique des asialoglycoprotéines ou récepteur</u> <u>d'ASHWELL.</u>

Le concept du mécanisme de régulation physiologique du catabolisme des glycoprotéines sériques est né de l'observation, faite par le groupe d'ASHWELL, selon laquelle l'injection d'une préparation d'asialocéruléoplasmine à des lapins se traduisait par une disparition rapide de l'asialoglycoprotéine de la circulation, alors que la glycoprotéine native présentait quant à elle une demi-vie de plusieurs jours (MORELL et al., 1968).

La désialylation est ainsi une marque de vieillissement des glycoprotéines sériques, celle-ci entraînant le démasquage d'un signal de reconnaissance spécifique, en l'occurence le résidu de galactose. Après injection chez le Rat, toutes les glycoprotéines désialylées, à l'exception de l'asialotransferrine, sont rapidement captées et retrouvées dans le foie. C'est le cas, en particulier, de la fétuine, de la céruléoplasmine, de l'orosomucoïde et de deux hormones gonadotropes: l'hormone folliculostimulante (FSH) et la gonadotrophine chorionique (HCG) (MORELL et al., 1971; NEUFELD et ASHWELL, 1980). Une étude statistique de VAN DEN HAMER et al. (1970) montre que l'exposition de deux résidus de galactose de la glycoprotéine suffit à sa capture.

Ce récepteur a été purifié du foie de Lapin (HUDGIN et al., 1974), de Rat (TANABE et al., 1979) et humain (BAENZIGER et MAYNARD, 1980). La disposition transmembranaire du récepteur hépatique de Rat, proposée par HARFORD et ASHWELL (1981), fut confirmée par CHIACCHIA et DRICKAMER en 1984. Le récepteur du foie de Lapin est une glycoprotéine constituée de deux sous-unités différentes, possédant un poids moléculaire apparent de 250 kDa.

2- <u>Le récepteur spécifique du mannose et de la N-acétyl-</u> glucosamine.

Initialement décrit dans le foie (SCHLESINGER et al., 1978), ce système de reconnaissance est aussi mis en évidence dans les macrophages (STAHL et al., 1978; KUSIAK et al., 1980) et les monocytes (ROCHE et al., 1985), mais aussi au niveau de la rate et des os (ACHORD et al., 1977).

La reconnaissance de deux motifs monosaccharidiques différents par le même système fut confirmée par l'isolement d'une première protéine de liaison du mannose à partir du foie de Rat (KAWASAKI et al., 1978). MAYNARD et BAENZIGER (1982) ont, par la suite, montré que ce récepteur était d'origine hépatocytaire et qu'il différait du récepteur des cellules réticulo-endothéliales.

3- Le récepteur spécifique du fucose.

L'existence d'un récepteur hépatocytaire de résidus de fucose est suggérée, dès 1978, par **PRIEELS** *et al.*. Ces auteurs montrent que la lactotransferrine humaine disparaît rapidement du sérum, après injection chez la Souris, pour se retrouver au niveau du foie. Une reprise hépatique analogue a été décrite pour la ß-glucocérébrosidase (**FURBISH** *et al.*, 1980).

Ce récepteur, spécifique des glycoprotéines présentant un résidu de fucose lié en α -1,3 sur un résidu de N-acétylglucosamine, interviendrait en complément des deux autres systèmes hépatocytaires dans la "clearance" des glycoprotéines circulantes. LEHRMAN et HILL (1986) purifient, à partir du foie de Rat, une lectine, composée de deux sous-unités de poids moléculaires 88 et 77 kDa, possédant une forte affinité pour les ligands fucosylés. HALTIWANGER et al. (1986) ont montré que cette lectine n'était présente que dans les cellules de KUPPFER.

3° Relations avec le cytosquelette cellulaire.

Les éléments du cytosquelette cellulaire jouent un rôle important dans les phénomènes d'autophagie et d'hétérophagie: les fusions entre lysosomes et endosomes, et lysosomes et vacuoles autophagiques sont en effet inhibées par des drogues déstabilisatrices des microtubules (nocodazole, colchicine) ou des filaments d'actine (cytochalasine) (MARZELLA et al., 1982; MATTEONI et KREIS, 1987).

Préalablement à la fusion qui ne s'effectue pas au hasard à l'intérieur de la cellule, les deux vésicules convergent l'une vers l'autre. Cette translocation s'opère le long des microtubules du cytosquelette par l'intermédiaire de micro-mouvements saltatoires des vacuoles (MATTEONI et KREIS, 1987).

Pour d'autres types cellulaires, les macrophages notamment, les lysosomes forment un réseau tubulaire périnucléaire par association aux microtubules (SWANSON et al., 1987a). La pinocytose en phase fluide stimulerait un certain allongement de ces organites vers la périphérie de la cellule et les nématolysosomes ainsi formés fusionneraient avec les pinosomes (Fig. 3) (SWANSON et al., 1987b).

La communication entre les lysosomes est un autre phénomène dépendant du cytosquelette. Les différentes populations de lysosomes peuvent en effet, échanger leurs contenus (**FERRIS** et al., 1987) et leurs protéines membranaires (**DENG** et al., 1988). La signification physiologique de ce phénomène reste toutefois à élucider.

III) LE CATABOLISME DES N-GLYCOSYLPROTEINES

Le lysosome est le siège principal du catabolisme des nombreux composés biologiques cellulaires et extracellulaires. A ce jour, une cinquantaine d'hydrolases acides ont, en effet, été décrites (BARRETT et HEATH, 1977).

Les glycosidases lysosomiques jouent un rôle essentiel dans le catabolisme des glycoconjugués et l'intérêt de leur étude est renforcé, notamment d'un point de vue clinique, par l'existence de nombreuses pathologies humaines associées à des déficiences en ces enzymes.

Toutefois, la dégradation des protéines endo- et exocellulaires s'exerce à deux niveaux à l'intérieur de la cellule: le cytosol et le lysosome.

A) LE CATABOLISME CYTOSOLIQUE.

Le catabolisme cytosolique s'adresse, en principe, uniquement aux protéines solubles du cytoplasme.

1° Catabolisme de la protéine.

Dans le cytosol, un polypeptide de faible masse moléculaire, l'ubiquitine (9 kDa, 76 acides aminés), régule la dégradation des protéines endocellulaires.

a) <u>L'ubiquitine.</u>

Rencontrée uniquement dans les cellules eucaryotes, cette protéine résulte de l'expression de deux types de gènes: des polygènes codant pour des poly-ubiquitines (WIBORG et al., 1985), et des gènes codant pour des monomères possédant une extension de 52 ou 76-80 acides aminés, appelée peptide CEP (Carboxyl Extension Peptide) (LUND et al., 1985).

Les monomères d'ubiquitine sont libérés sous l'action d'une protéase et cette maturation des produits de l'expression génique est un phénomène rapide et co-traductionnel (JONNALAGADDA et al., 1989; MONIA et al., 1989).

L'ubiquitine est une protéine globulaire possédant une queue hydrophobe constituée par les 4 amino-acides de l'extrémité C-terminale, Leu-Arg-Gly-Gly (VIJAY-KUMAR et al., 1985).

b) La protéolyse.

L'ubiquitine est conjuguée à la protéine par l'intermédiaire d'une liaison isopeptidique entre le résidu de glycine situé en position C-terminale de l'ubiquitine et la fonction ε -NH₂ d'un résidu de lysine de la protéine cible. Cette conjugaison ATP-dépendante est en fait le résultat d'une série de réactions mettant en jeu un complexe ubiquitine-protéine ligase constitué de trois enzymes E_1 , E_2 et E_3 (HERSHKO et al., 1983) (Fig. 5):

- E_1 est un activateur

- E₂ et E₃ sont des transporteurs

Plusieurs molécules d'ubiquitine sont ainsi liées à la protéine cible et la poly-ubiquitination déclenche une dégradation très rapide de celle-ci. HOUGH et al. (1986; 1987) ont caractérisé et purifié, à partir



Fig. 5: Les différentes étapes permettant la conjugaison des protéines à l'ubiquitine et leur dégradation par un système peptidasique (d'après CIECHANOVER et SCHWARTZ, 1989)

de réticulocytes, deux complexes protéasiques ATP-dépendants et possédant des constantes de sédimentation de 26 et 20 S.

La demi-vie des protéines cytosoliques semble être fonction de l'acide aminé en position N-terminale (HERSHKO et al., 1984; BACHMAIR et al., 1986; FERBER et CIECHANOVER, 1987).

L'ubiquitination des protéines ne semble pourtant pas être un phénomène suffisant pour déclencher la protéolyse puisque des complexes protéine-ubiquitine ont été mis en évidence dans le noyau et la membrane plasmique. Outre son intervention lors de la protéolyse des protéines cytosoliques, l'ubiquitine possède, en effet, d'autres rôles physiologiques (voir les revues générales de **JENTSCH et al., 1990; MONIA et al., 1990**). Elle intervient notamment dans:

- le maintien de la structure de la chromatine,

- la régulation de l'expression de certains gènes,
- le contrôle du cycle cellulaire,
- la biogenèse des ribosomes,
- la réponse à certains stress.

2º Catabolisme des chaînes glycanniques.

Quelques activités glycosidasiques cytosoliques ou "solubles" ont été caractérisées, mais leur intervention dans la dégradation des chaînes glycanniques des N-glycosylprotéines reste à démontrer.

Des activités endo-N-acétyl-ß-D-glucosaminidasiques ont ainsi été mises en évidence dans différents tissus chez l'Homme et le Rat (**PIERCE** *et al.*, 1979, 1980; OVERDIJK *et al.*, 1981; LISMAN *et al.*, 1985; SONG *et al.*, 1987). Elles clivent les glycopeptides et glyco-asparagines en hydrolysant la liaison entre les résidus de N-acétylglucosamine du N-N'diacétylchitobiose. L'enzyme du foie de Rat possède une spécificité

réduite aux glycannes de type oligomannosidique (activité "manno"endoglucosaminidasique) et N-acétyllactosaminique à condition que ces désialylés derniers soient partiellement (activité "galacto"endoglucosaminidasique) (PIERCE et al., 1979; 1980; LISMAN et al., 1985). Ces enzymes pourraient donc assurer la première étape du catabolisme des glycannes des N-glycosylprotéines cytosoliques, mais aussi assurer un contrôle de la biosynthèse des N-glycosylprotéines al., 1980) et des glycosylpyrophospho- dolichols (PIERCE et (APPOURCHAUX, 1987).

Deux activités exoglycosidasiques ont été décrites et les enzymes purifiés, notamment du cytosol de foie de Rat: une α -neuraminidase (MIYAGI et TSUIKI, 1975) et une α -mannosidase (SHOUP et TOUSTER, 1976). La neuraminidase est active vis-à-vis d'un certain nombre de glycoprotéines, glycopeptides et oligosaccharides sialylés. La mannosidase est, par contre, spécifique des oligosaccharides, son activité étant très faible lorsque des glycoprotéines et glycopeptides sont utilisés comme substrats.

Ces enzymes cytosoliques ne peuvent en aucun cas réaliser une dégradation complète des glycannes des N-glycosylprotéines. Les glycopeptides et oligosaccharides libérés doivent vraisemblablement intégrer le lysosome afin d'être totalement dégradés. Toutefois le processus par lequel ceux-ci sont conduits au sein du lysosome reste à déterminer.

B) LE CATABOLISME LYSOSOMIQUE.

1° Protéolyse lysosomique.

La protéine est très rapidement dégradée par de nombreuses endo- et

exopeptidases (pour une revue générale, voir BARRETT et HEATH, 1977).

2º Catabolisme des chaînes glycanniques.

a) <u>Historique.</u>

Le fait que les exoglycosidases agissent préférentiellement sur les oligosaccharides plutôt que sur les glycopeptides ou les glycoprotéines natives suggérait que le catabolisme des N-glycosylprotéines était un phénomène ordonné au cours duquel la dégradation de la chaîne glycannique succédait à la dégradation de la chaîne protéique.

La compréhension des différentes étapes du catabolisme des chaînes glycanniques a principalement été consécutive à l'étude du matériel excrété dans l'urine de patients souffrant de glycoprotéinoses (MICHALSKI, 1984). Ces maladies métaboliques sont caractérisées par un déficit total ou partiel de l'activité des glycosidases acides, enzymes responsables du catabolisme des chaînes glycanniques des N-glycosylprotéines. L'absence d'activité est généralement dûe à une modification transcriptionnelle de l'enzyme ou d'un de ses cofacteurs.

Le blocage métabolique se traduit dans un premier temps par une accumulation lysosomique de polymères incomplètement dégradés. Ces composés, lorsqu'ils sont solubles, s'accumulent ensuite dans l'urine et les tissus des patients (STRECKER et MONTREUIL, 1979).

Toutes les glycosidases impliquées dans le catabolisme des glycannes liés N-glycosidiquement aux protéines, sauf l'endo-N-acétyl-ß-D-glucosaminidase, sont à l'origine d'une pathologie humaine connue.

L'examen comparatif de la structure primaire de près d'une centaine d'oligosaccharides isolés d'urine de patients atteints de glycoprotéinoses révélait un point commun: tous ne possédaient qu'un seul résidu de N-acétylglucosamine en position terminale réductrice, sauf dans le cas de la fucosidose où sont essentiellement formées des glyco-asparagines. Ces observations ont conduit à une première hypothèse selon laquelle le catabolisme des N-glycosylprotéines débuterait par l'action d'une endo-N-acétyl-ß-D-glucosaminidase qui, en clivant le résidu di-N-acétylchitobiose, libérait le glycanne amputé d'un résidu de N-acétylglucosamine (MONTREUIL, 1975; 1981; STRECKER et MONTREUIL, 1979).

De telles activités endoglucosaminidasiques vis-à-vis de glycopeptides de type oligomannosidique et N-acétyllactosaminique furent décrites chez l'Homme et l'animal (PIERCE et al., 1979; OVERDIJK et al., 1981). Néanmoins, la localisation exclusivement cytosolique de ces endoglucosaminidases (PIERCE et al., 1980) était difficilement conciliable avec un rôle éventuel dans le processus catabolique des glycannes censé se dérouler majoritairement au sein des lysosomes. En outre, ces enzymes étaient inactifs vis-à-vis de glycannes persialylés (PIERCE et al., 1980), ne permettait pas d'expliquer l'origine ce qui des sialo-oligosaccharides excrétés dans les urines de patients atteints de sialidose (MICHALSKI et al., 1984).

b) Hypothèse actuelle.

L'étude *in vitro* de l'action des enzymes lysosomiques sur des composés purifiés, glycopeptides et oligosaccharides surtout, a permis de démontrer que la dégradation lysosomique des chaînes glycanniques des N-glycosylprotéines était un phénomène ordonné et bidirectionnel (**BAUSSANT** et al., 1986; KURANDA et ARONSON, 1986; BRASSART et al., 1987). Trois enzymes jouent un rôle clef dans ce processus: l' α -L-fucosidase, l'aspartyl-N-acétyl-ß-D-glucosaminidase et l'endo-Nacétyl-ß-D-glucosaminidase.

<u>L' α -L-fucosidase</u> (fucoside fucohydrolase, EC 3.2.1.51) a été caractérisée et purifiée dans les lysosomes de foie de Rat par **OPHEIM et TOUSTER** (1977). L'enzyme, dont le pH optimum est de 5,8, est actif sur les glyco-asparagines et les oligosaccharides fucosylés. Il hydrolyse les résidus de fucose liés en α -1,3 et en α -1,6.

<u>L'aspartyl-N-acétyl-B-D-glucosaminidase</u> (L-aspartamido-B-N-acétylglucosamine hydrolase, EC 3.5.1.26) est un enzyme lysosomique qui hydrolyse la liaison entre l'asparagine et la N-acétylglucosamine lorsque la fonction α -NH₂ de l'asparagine est libre. L'enzyme est, en effet, inactif dans les cas suivants:

- substitution de cette fonction par un acide aminé ou par un groupement alkylé.
- substitution du résidu de N-acétylglucosamine du point d'attache, N-acétylglucosamine <u>1</u>, par un résidu de fucose lié en α -1,6.

L'aspartamidase intervient donc après les protéases et la fucosidase. Pourtant, cet enzyme "domine" le catabolisme car son action devance la dégradation récurrente des oligosaccharides par les exoglycosidases (STRECKER et al., 1988).

<u>L'endo-N-acétyl-ß-D-glucosaminidase acide</u> (EC 3.2.1.96) a été caractérisée dans les lysosomes de foie de Rat (**BAUSSANT et al., 1986**; **KURANDA et ARONSON, 1986**) et purifiée à partir de rein humain (**DEGASPERI** et al., 1989b). L'enzyme hydrolyse le résidu de di-N-acétylchitobiose selon le schéma suivant:

R-GlcNAc(B1-4)GlcNAc ----- R-GlcNAc + GlcNAc

Tout comme l'aspartamidase, l'enzyme est actif sur les oligosaccharides sialylés du type N-acétyllactosaminique. Elle se distingue aussi de l'enzyme cytosolique par son incapacité à cliver les glyco-asparagines et glycopeptides et par son pH optimum qui est de 3,5.

Quelques espèces animales, comme le Mouton, le Porc et le Boeuf sont dépourvues de cette activité endoglucosaminidasique (**SONG et al.**, 1987). Aussi, chez ces espèces, en cas de dysfonctionnement du catabolisme des N-glycosylprotéines, l'unique action de l'aspartamidase permet d'expliquer l'excrétion d'oligosaccharides possédant le résidu de N-N'-diacétylchitobiose en position terminale réductrice (WARNER et O'BRIEN, 1981; ABRAHAM et al., 1983).

c) Le catabolisme des glycannes de type N-acétyllactosaminique.

BAUSSANT et al. (1986), KURANDA et ARONSON (1986) et BRASSART et al. (1987) ont établi les bases d'un catabolisme bidirectionnel.

Les premières étapes de la dégradation débutent à l'extrémité terminale réductrice et font immédiatement suite à la dégradation protéasique de la chaîne peptidique. Elles font donc intervenir l'action en série des trois enzymes précédemment décrits, respectivement l' α -L-fucosidase, l'aspartamidase et l'endo-N-acétylglucosaminidase (Fig. 6). La dégradation de l'oligosaccharide ainsi libéré est achevée par action récurrente d'exoglycosidases: neuraminidase, ß-galactosidase, ß-hexosaminidase et α - et β -mannosidases (Fig. 6). NeuAc($\alpha 2-6$)Gal($\beta 1-4$)GlcNAc($\beta 1-2$)Man($\alpha 1-3$) $Fuc(\alpha 1-6)$ α -NEURAMINIDASE PROTEASES $Gal(B1-4)GlcNAc(B1-2)Man(\alpha 1-6)$ Man(B1-4)GlcNAc(B1-4)GlcNAc(B1-N)Asn 1 $Fuc(\alpha 1-6)$ $Gal(B1-4)GlcNAc(B1-2)Man(\alpha 1-3)$ α -FUCOSIDASE **B-GALACTOSIDASE** $GlcNAc(B1-2)Man(\alpha 1-6)$ Man(B1-4)GlcNAc(B1-4)GlcNAc(B1-N)Asn $GlcNAc(B1-2)Man(\alpha 1-3)$ ASPARTYL N-ACETYLGLUCOSAMINIDASE ENDO N-ACETYL-B-GLUCOSAMINIDASE $GlcNAc(\beta 1-2)Man(\alpha 1-6)$ Man(B1-4)GlcNAc $GlcNAc(\beta 1-2)Man(\alpha 1-3)$ **B-HEXOSAMINIDASE** MANNOSIDASES

MONOSACCHARIDES

Fig. 6: Schéma du catabolisme lysosomique des glycannes de type N-acétyllactosaminique (BAUSSANT et al., 1986; BRASSART et al., 1987). Des travaux plus récents (**STRECKER** et al., 1988) ont permis de montrer une action concomitante des endoglycosidases et des exoglycosidases, notamment des sialidase et β -galactosidase, ainsi qu'une dégradation préférentielle de l'antenne liée en α -1,3 sur le résidu de mannose <u>3</u>, celle-ci étant en effet moins mobile dans l'espace donc plus accessible aux exoglycosidases.

d) Le catabolisme des glycannes de type oligomannosidique.

Les exoglycosidases mises en jeu lors de la dégradation intralysosomique des glycannes de type oligomannosidique seront principalement les α -D-mannosidases. Les différentes propriétés de ces enzymes feront l'objet du chapitre suivant.

IV- LES α -D-MANNOSIDASES.

Différents types d' α -D-mannosidases (EC 3.2.1.24) ont été décrits dans de nombreux tissus animaux et lignées cellulaires. Ces enzymes, caractérisés et différenciés sur la base de leurs propriétés physico-chimiques et enzymatiques respectives, diffèrent principalement par leur localisation cellulaire et par leur intervention dans le métabolisme des chaînes glycanniques des N-glycosylprotéines.

Les α -mannosidases du reticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi participent aux processus de maturation des chaînes glycanniques des N-glycosylprotéines, tandis que les α -mannosidases du cytosol et du lysosome sont impliquées dans le catabolisme de ces mêmes glycannes.

A) LES *α*-D-MANNOSIDASES DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE RUGUEUX.

Deux formes enzymatiques ont été identifiées dans le reticulum endoplasmique du foie de Rat: une forme membranaire, solubilisée par le désoxycholate (**BISCHOFF et KORNFELD**, 1983), et une forme soluble (**BISCHOFF et KORNFELD**, 1986). Elles possèdent des propriétés identiques et peuvent être distinguées des autres mannosidases cellulaires notamment par le fait qu'elles ne soient pas retenues par chromatographie sur colonne de concanavaline A-Sepharose. La forme soluble pourrait d'ailleurs provenir de la forme membranaire par protéolyse.

Ces deux enzymes sont stabilisés par les ions Co²⁺, ne sont pas inhibés par la swainsonine ou la désoxymannojirimycine (dMM), possèdent un pH optimum de 6,5 ainsi qu'une forte affinité pour les substrats synthétiques.

In vitro, ces mannosidases hydrolysent des résidus de mannose liés en α -1,2 de différents glycannes de type oligomannosidique avec une préférence pour l'oligosaccharide Man₉GlcNAc₂. La forme soluble est toutefois capable d'hydrolyser les deux résidus externes liés du composé GlcMan₉GlcNAc₂.

BISCHOFF et al. (1986) ont mis en évidence, par la suite, une activité α -mannosidasique sensible à la dMM dans des cellules CHO en culture. L'activité précédemment décrite, résistante à la dMM, catalyse l'une des premières étapes de la maturation des glycannes de l'ensemble des glycoprotéines cellulaires: elle hydrolyse spécifiquement un résidu de mannose lié en α -1,2 de la structure Man₉GlcNAc₂ avant le passage de ces protéines dans l'appareil de Golgi (Fig. 7). L'enzyme sensible à la dMM serait par contre responsable, uniquement pour les protéines du





reticulum, de la formation de glycannes possédant 7 ou 6 résidus de mannose.

RIZZOLO et KORNFELD (1988) ont décrit une mannosidase sensible à la dMM et capable d'hydrolyser un résidu de mannose des composés GlcMan₉GlcNAc₂ et Man₉GlcNAc₂. Ces auteurs proposent que des mannosidases possédant des spécificités différentes soient réparties dans différents "compartiments interconnectés" du reticulum.

Enfin des α -1,2-mannosidases ont été purifiées de microsomes de foie de Boeuf (SCHWEDEN et al., 1986) et de Lapin (FORSEE et al., 1989). Elles sont toutes deux activées par les ions Ca²⁺ et possèdent un pH optimal de 6,0. L'enzyme du foie de Lapin est retenu par chromatographie sur Con A-Sepharose. L'enzyme de Boeuf est inhibé par la dMM (K_I = 7 μ M) et hydrolyse trois résidus de mannose du composé Man₉GlcNAc₂ et un seul des composés Glc₃Man₉GlcNAc₂ ou GlcMan₉GlcNAc₂.

B) LES α -MANNOSIDASES DE L'APPAREIL DE GOLGI.

L'appareil de Golgi contient plusieurs activités α -mannosidasiques différentes: trois iso-glycosidases séparables par chromatographie sur colonne de phosphate de cellulose, les formes IA, IB et II (**TULSIANI** et al., 1982b), une endomannosidase (**LUBAS et SPIRO**, 1987) et une α -1,3- et α -1,6-mannosidase (**MONIS et al.**, 1987).

1° Les mannosidases IA et IB.

a) Propriétés physico-chimiques et structurales.

Elles présentent un maximum d'activité à pH 6,0 et diffèrent principalement par leur comportement chromatographique sur colonne de phosphate de cellulose et par leur thermosensibilité, la forme IB étant thermolabile (TULSIANI et al., 1982b). L'étude immunologique de ces deux iso-enzymes suggère qu'ils proviennent d'un précurseur commun et/ou contiennent des sous-unités identiques (TULSIANI et TOUSTER, 1988).

Elles sont spécifiquement inhibées par la dMM (inhibition non compétitive) (**BISCHOFF et KORNFELD**, 1984) et sont concentrées dans les citernes *cis* de l'appareil de Golgi (**DUNPHY et al.**, 1981).

La mannosidase IA du foie de Rat possède une masse moléculaire de 230 kDa et serait un tétramère constitué de sous-unités identiques de 57 kDa (**TULSIANI et TOUSTER, 1988**).

b) Spécificité.

Elles ne possèdent aucune affinité pour un substrat synthétique comme le paranitrophényl- α -D-mannoside et hydrolysent uniquement les liaisons α -1,2 des résidus de mannose rencontrées dans les glycannes de type oligomannosidique (TULSIANI et al., 1982b). Elles produisent, par deux voies différentes, le même composé Man₅GlcNAc₂ (Fig. 8, d'après TABAS et KORNFELD, 1979; TULSIANI et TOUSTER, 1988). Certains facteurs, et notamment la conformation de la protéine, pourraient moduler leur intervention au cours de la maturation des glycannes des N-glycosylprotéines, comme cela a été suggéré par CHAPMAN et KORNFELD (1979).

2º La mannosidase II - GlcNAc dépendante.

a) Propriétés physico-chimiques et structurales.

Elle est la première activité mise en évidence dans l'appareil de Golgi de foie de Rat (DEWALD et TOUSTER, 1973). Il s'agit d'une



Fig. 8: Séquences d'hydrolyse des résidus de mannose réalisées par les α -D-mannosidases de l'appareil de Golgi IA (voie A, d'après TULSIANI et TOUSTER, 1988) et IB (voie B, d'après TABAS et KORNFELD, 1979) glycoprotéine membranaire possédant une masse moléculaire de 124 kDa (MOREMEN et TOUSTER, 1986) et un pH optimum de 5,5 (TULSIANI et al., 1977).

Elle est activée par les ions Co²⁺ et Zn²⁺ (**TULSIANI** et al., 1982b) et inhibée par la swainsonine (**TULSIANI** et al., 1982a; **TULSIANI** et **TOUSTER**, 1983).

Une étude immunocytochimique révèle qu'elle est répartie dans les différents éléments de l'appareil de Golgi (NOVIKOFF et al., 1983).

b) Spécificité.

Cet enzyme possède une spécificité limitée au substrat GlcNAcMan₅GlcNAc₂(TULSIANI et al., 1982b). Elle hydrolyse spécifiquement les deux résidus externes liés en α -1,3 et α -1,6 (Fig. 9). HARPAZ et SCHACHTER (1980) et SHAO et al. (1989) ont d'ailleurs démontré que la première étape consistait en l'hydrolyse du résidu lié en α -1,6.

3° L'endomannosidase.

Elle a été mise évidence dans le foie de Rat par LUBAS et SPIRO (1987). Son pH optimum est de 7,0.

Cette α -1,2-mannosidase convertit les substrats de type $(Glc)_n Man_9 GlcNAc_2$ en un unique composé $Man_8 GlcNAc_2$ (Fig. 10) (LUBAS et SPIRO, 1988) et décrit ainsi une voie alternative de celle réalisée par les glucosidases I et II.

4° L' α -1,3- et α -1,6-mannosidase - GlcNAc indépendante.

Décrit dans un premier temps dans des cellules déficientes en

- 58 -



Fig. 9: Schéma de la réaction catalysée par la mannosidase II de l'appareil de Golgi au cours de la maturation des glycannes des N-glycosylprotéines.



Fig. 10: Schéma de la réaction catalysée par l'endo- α -D-mannosidase de l'appareil de Golgi (d'après LUBAS et SPIRO, 1988).

activité N-acétylglucosaminyltransférase I (MONIS et al., 1987), cet enzyme a été purifié ensuite à partir de microsomes de foie de Rat (BONAY et HUGHES, 1989). Cette mannosidase a été localisée dans les citernes cis de l'appareil de Golgi. Elle est constituée de deux sous-unités de 105 kDa et est inhibée par l'EDTA et les ions Zn²⁺.

Cet enzyme convertit le composé $Man_5GlcNAc_2$ en un unique produit $Man_3GlcNAc_2$ par hydrolyse des résidus de mannose <u>A</u> et <u>B</u> respectivement liés en α -1,3 et α -1,6. Le rôle de cette mannosidase demeure toutefois inconnu.

5° Intervention dans les phénomènes de maturation des glycannes des N-glycosylprotéines.

Les protéines sont glycosylées dans le lumen du reticulum endoplasmique par transfert sur un résidu asparagine de la chaîne peptidique naissante de l'oligosaccharide précurseur Glc₃Man₉GlcNAc₂ préalablement assemblé sur un intermédiaire polyprénolique (Fig. 11). La synthèse de ce mégaloglycanne-diphosphodolichol s'effectue en deux temps:

- Sur la face cytoplasmique du reticulum endoplasmique rugueux, élaboration du composé Man₅GlcNAc₂-P-P-Dol;

- Dans le lumen du reticulum, addition d'autres résidus de mannose et de résidus de glucose et formation du composé Glc₃Man₉GlcNAc₂-P-P-Dol.

La maturation des glycannes s'effectue dans le reticulum et l'appareil de Golgi. Dans le reticulum, les glucosidases I, puis II vont éliminer les trois résidus de glucose. La dernière étape co-traductionnelle voit intervenir $\alpha - 1, 2$ -mannosidase, une vraisemblablement résistante à la dMM, et consiste en l'hydrolyse du



Fig. 11: Le cycle des Dolichols.

Dol, Dolichol; GlcNAc, N-acétylglucosamine; Man, mannose; Glc, glucose.

résidu de mannose \underline{D}_2 . La protéine est ensuite transférée dans les citernes *cis* de l'appareil de Golgi où la mannosidase I hydrolyse les derniers résidus de mannose liés en α -1,2 (Fig. 12, voie I).

Si la protéine gagne l'appareil de Golgi juste après transfert de l'oligosaccharide précurseur, une voie alternative permet d'aboutir à un glycanne identique après action d'une endomannosidase et de la mannosidase I (Fig. 12, voie II).

La mannosidase II n'intervient qu'après transfert d'un résidu de N-acétylglucosamine par l'intermédiaire de la N-acétylglucosaminyltranférase I. Les glycannes de type N-acétyllactosaminique sont ensuite élaborés par addition d'autres résidus monosaccharidiques. Si cette mannosidase II n'intervient pas, le glycanne sera de type hybride.

C) LES α -D-MANNOSIDASES DU LYSOSOME.

1° Propriétés physico-chimiques.

Deux formes A et B peuvent être séparées par chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose à partir de différents tissus humains et bovins, notamment le foie et le rein (CAROLL et al., 1972; PHILLIPS et al., 1974b). Ces deux iso-enzymes possèdent un pH optimum identique variant entre 4,0 et 4,5, sont activés par les ions Zn^{2+} , inhibés par les ions Co^{2+} , l'EDTA et la swainsonine et sont relativement thermostables (PHILLIPS et al., 1974a et b; DORLING et al., 1980).

Chez l'homme, les deux formes sont déficientes en cas de mannosidose (CAROLL et al., 1972) et sont donc génétiquement liées: la mutation affecterait le gène de l'enzyme porté par le chromosome 19 (CHAMPION et SHOWS, 1977). Une activité résiduelle, représentant jusque 10% de l'activité normale, peut toutefois être détectée dans les fibroblastes



Fig. 12: Représentation schématique des différentes étapes de la maturation des glycannes des N-glycosylprotéines.

1, oligosaccharyltransférase; 2, α -glucosidase I; 3, α -glucosidase II; 4, α -mannosidase du reticulum; 5, α -mannosidase I; 6, endo- α mannosidase; 7, α -mannosidase I; 8, N-acétylglucosaminyltransférase I; 9, α -mannosidase II; 10, fucosyltransférase et N-acétylglucosaminyltransférase II; 11, galactosyltransférase; 12, sialyltransférase. \blacksquare , N-acétylglucosamine; \bigcirc , mannose; \blacktriangle , glucose; \diamondsuit , fucose; \blacklozenge , galactose;

♦, acide sialique.

et certains tissus de patients atteints de mannosidose (HULTBERG et MASSON, 1975; BEAUDET et NICHOLS, 1976; MERSMANN et BUDDECKE, 1977). L'enzyme est activé par les ions Zn^{2+} et Co^{2+} .

Ces deux iso-glycosidases diffèrent par leur point iso-électrique et leur masse moléculaire, mais sont identiques sur le plan immunochimique (GRABOWSKI et al., 1980; CHENG et al., 1986).

La forme A du foie humain serait constituée de deux sous-unités de masses moléculaires 62 et 26 kDa reliées entre elles par des ponts disulfure, tandis que la forme B comporterait trois sous-unités de 62, 58 et 26 kDa (CHENG et al., 1982; 1986).

2° Spécificité.

Les deux isoenzymes de foie humain et bovin ne semblent pas posséder de spécificité enzymatique liée à la nature de la liaison: elles sont, en effet, capables de libérer les résidus de mannose liés en α -1,2, α -1,3 et α -1,6 à partir de différents oligosaccharides isolés d'urine de patients atteints de mannosidose (HULTBERG et al., 1975). L'enzyme du foie de Rat est plus actif sur des oligosaccharides et glycopeptides que sur des glycoprotéines natives (OPHEIM et TOUSTER, 1978).

En 1987, TULSIANI et TOUSTER ont montré que l'enzyme de rein humain possédait une plus grande activité envers les oligosaccharides linéaires. DEGASPERI et al. (1989a) ont obtenu des résultats similaires avec des enzymes isolés de tissus bovins et félins.

3° La mannosidose.

C'est en 1967 que OCKERMAN décrivit à propos d'une observation une nouvelle maladie de surcharge lysosomique. Cette dernière résulte d'une

- 65 -

déficience en α -D-mannosidase lysosomique (**CAROLL** et al., 1972), d'où la désignation de "mannosidose" qui lui est attribuée. Le déficit se caractérise chez le malade par une accumulation de composés riches en mannose au niveau du foie et du cerveau (**OCKERMAN**, 1969), ainsi que par une excrétion urinaire accrue de ces composés (**NORDEN** et al., 1973).

Des mannosidoses ont également été décrites chez le Rat (**BURDITT** *et al.*, 1980) et le Boeuf. Chez ce dernier, on distingue la mannosidose génétiquement induite (*JOLLY*, 1971) de la mannosidose acquise par consommation de plantes comme l'Astragale (*Swainsona canescens*) (**DORLING** *et al.*, 1978; *JAMES et al.*, 1981) qui renferme un alcaloïde, la swainsonine ou 1,2,8-indolizidinetriol, reconnu comme inhibiteur puissant des mannosidases lysosomiques.

4° Etude chimique du matériel accumulé en cas de mannosidose.

Dix sept oligosaccharides ont été isolés d'urines de patients atteints de mannosidose (NORDEN et al., 1973 et 1974; STRECKER et al., 1976; YAMASHITA et al., 1980; MATSUURA et al., 1981). Ces oligosaccharides ne possèdent qu'un résidu de N-acétylglucosamine en position terminale réductrice et de 2 à 9 résidus de mannose (Tableau II).

Un certain nombre d'observations relatives à la spécificité des mannosidases lysosomiques peuvent être déduites de l'étude des structures accumulées lors de la mannosidose. Ainsi, chez l'Homme, l'oligosaccharide majeur devrait être le tétrasaccharide в, correspondant au noyau inv des glycannes des N-glycosylprotéines. En fait, cet oligosaccharide est pratiquement inexistant et plus des 2/3 en oligosaccharides excrétés poids des sont représentés par le trisaccharide A et des structures en dérivant. Ceci peut s'expliquer de

Saccharide	Structure	Saccharide	Structure
Trisaccharide		Octasaccharide	********
A	Man αl-3Man βl-4 GlcNAc		Man g1-2Man:01-6
Tétra saccharie	de	F1	Man al-6
в,	Man α1-2Man α1-3Man β1-4 GlcNAc	-	Man α 1-3 Man β 1-4 GlcNAc
-	Man $\alpha 1 - 6$		Man $\alpha 1 - 2$ Man $\alpha 1 - 3$
B ₂	Man B1-4 GlcNAc		
2	/ Man α 1-3		Man α 1-6
Pentasaccharic	de		Man α 1-6
c,	Man α 1-2Man α 1-2Man α 1-3Man β 1-4 GlcNAc	F	Man α l-2Man α l-3 Man β l-4 GlcNAc
L	Man α 1–3Man α 1–6	2	Man α 1-2Man α 1-3
C,	Man & 1-4 GlcNAc		
2	Man a 1-3		Man α 1-6
Hexasaccharid	e		$Man \propto 1-6$
	Man α 1-6	F	Man α 1-3 Man β 1-4 GlcNAc
D,	$Man \alpha 1-6$	د	Man α 1-2Man α 1-2Man α 1-3
1	Man a 1-3 Man B 1-4 G1cNAc	Nonasaccharide	
n		C	$\int_{-\infty}^{\infty} \frac{1}{\sqrt{2}} \frac{1}{\sqrt{2}$
⁰ 2		⁰ 1	
			Man 1-2Man 1-3
			α α $1-2\alpha$ α $1-3$
Hentasacchari	de		
	$\operatorname{Man}_{\alpha} 1 - 2\operatorname{Man}_{\alpha} 1 - 6$		Man a 1-6
Е.	Man a 1-6		 Man α 1~6
I	Man a 1-3 Man & 1-4 GlcNAc	G	Mang 1-2Mang 1-3 Mang 1-4 GlcNAc
	Man α 1-3	2	Mang 1-2Mang 1-2Mang 1-3
	$Man \alpha 1-6$		$Man_{\alpha} 1-2Man_{\alpha} 1-6$
E	Mana 1-6		Man a 1~6
2	Mana 1-2Mana 1-3 Mana 1-4 GlcNAc	G	Mang 1-3 Manß 1-4 GleNAc
	Man α 1-3	3	Manα 1-2Manα 1-2Manα 1-3
		Décasaccharide	
E	Man al-6	_	Man ^a 1-2Man ^a 1-6
-3	$Man\alpha 1-6$,Manα 1−6
•	Mang 1-3 Mang 1-4 GlcNAc	Н,	$\frac{1}{Man^{\alpha} l - 2Man^{\alpha} l - 3} \qquad Man^{\beta} l - 4 GlcNAc$
	Mang 1-2Map gl-3	L	Man^{α} 1-2Man^{\alpha} 1-2Man^{\alpha} 1-3

...

Tableau II: Structure des différents oligosaccharides excrétés dans l'urine de patients atteints de mannosidose (d'après **MATSUURA et al., 1981**).

deux manières: par l'action d'une endomannosidase spécifique de la liaison α -1,6 des résidus de mannose ou par l'existence d'une activité α -1,6-mannosidasique résiduelle en cas de mannosidose.

Des études portant sur la mannosidose induite apportent de plus amples informations sur la spécificité des mannosidases. La swainsonine étant aussi un inhibiteur de la mannosidase II de l'appareil de Golgi, son effet *in vivo* se manifeste par un arrêt de la maturation des chaînes glycanniques des N-glycosylprotéines. L'oligosaccharide majeur accumulé devient alors un composé comportant cinq résidus de mannose (Tableau III). De même, une culture de fibroblastes de patients atteints de mannosidose réalisée en présence de swainsonine provoque une diminution de l'accumulation de l'oligosaccharide Man₂GlcNAc et une augmentation de l'oligosaccharide Man₃GlcNAc. Cette observation serait donc une preuve supplémentaire de l'existence d'une α -1,6-mannosidase non affectée en cas de mannosidose, celle-ci étant toutefois inhibée par la swainsonine.

D) LA MANNOSIDASE DU CYTOSOL.

1º Propriétés physico-chimiques.

Les activités α -D-mannosidasiques lysosomiques et cytosoliques peuvent être séparées par chromatographie sur colonne de DEAE cellulose (CAROLL et al., 1972) ou de Con A-Sepharose (PHILLIPS et al., 1976).

Les mannosidases cytosoliques présentent généralement un pH optimum neutre variant entre 6,0 et 7,0. **SNAITH** (**1977**) met en évidence dans différents tissus du Rat trois iso-enzymes neutres différant par leur pH optimal et leur dépendance vis-à-vis de certains effecteurs.

Les enzymes du foie humain et de Rat sont inhibés par l'EDTA, stabilisés et activés par les ions Co²⁺ (**PHILLIPS et al., 1974a; SHOUP**

- 68 -

Tableau III: Oligosaccharides excrétés dans les urines du Rat et de la Chèvre et accumulés dans les fibroblastes humains en cas de mannosidose induite (d'après ABRAHAM et al., 1983; DORLING et al., 1983; GOUSSAULT et al., 1986).



et TOUSTER, 1976). MATHUR et BALASUBRAMANIAN (1984) ont d'ailleurs purifié la forme neutre du cerveau de singe par chromatographie sur colonne de Co $^{2+}$ immobilisé.

2° Spécificité.

L'enzyme du foie de Rat possède un Km vis-à-vis du paranitrophényl- α -D-mannoside beaucoup plus faible que ceux observés pour les formes du lysosome et de l'appareil de Golgi (SHOUP et TOUSTER, 1976). Les liaisons α -1,2, α -1,3 et α -1,6 des résidus de mannose sont hydrolysées par les enzymes du foie humain, bovin et de Rat (HULTBERG et al., 1975; OPHEIM et TOUSTER, 1978).

TULSIANI et TOUSTER (1987) et DEGASPERI et al. (1989a) ont montré que les mannosidases cytosoliques possèdent une activité privilégiée vis-à-vis des composés de type oligomannosidique ramifiés. Ces auteurs suggèrent que le catabolisme des glycannes des N-glycosylprotéines de type oligomannosidique débute dans le cytosol et que les produits linéaires formés sont ensuite transférés dans le lysosome pour la poursuite de la dégradation.

Enfin, les mannosidases cytosoliques pourraient aussi être engagées dans la dégradation de certains intermédiaires polyprénoliques (CACAN et al., 1989).

TRAVAUX PERSONNELS

ETUDE DES α -MANNOSIDASES LYSOSOMIQUES

Les travaux entrepris au Laboratoire depuis de nombreuses années ont permis d'élucider le catabolisme lysosomique des glycannes de type N-acétyllactosaminique, et notamment de déterminer les étapes initiatrices et limitantes de cette dégradation (BAUSSANT et al., 1986; BRASSART et al., 1987; STRECKER et al., 1988).

Dans le but de poursuivre ces études, les méthodes physico-chimiques comme la résonance magnétique nucléaire ou la spectrométrie de masse ont été appliquées à l'étude des séquences de dégradation intralysosomique glycannes oligomannosidique. Ces composés sont des de type essentiellement rencontrés au niveau des glycoprotéines circulantes et dans les membranes des cellules, mais elles constituent aussi des intermédiaires de synthèse des glycannes des N-glycosylprotéines. Dans . le lysosome, la dégradation de ces composés est réalisée par les α -D-mannosidases.

Si la spécificité des mannosidases du reticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi était en partie élucidée, les renseignements concernant la spécificité des enzymes lysosomiques restaient assez fragmentaires.
I) ETUDE DE L'HYDROLYSE DE L'OLIGOSACCHARIDE Man₉Glenae PAR LES α -D-MANNOSIDASES LYSOSOMIQUES.

Deux α -mannosidases acides, les formes A et B, peuvent être séparées par chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose à partir de différents tissus de mammifères. Chez l'Homme et les bovins, ces deux isoenzymes représentent des formes moléculaires voisines possédant des caractéristiques biochimiques et immunologiques similaires, et différant essentiellement par leur composition en sous-unités et leur charge (CHENG et al., 1982; 1986; GRABOWSKI et al., 1980). OPHEIM et TOUSTER (1978) n'isolent toutefois qu'une forme enzymatique du foie de Rat.

L'activité de ces mannosidases acides est augmentée par les ions $2n^{2+}$ et inhibée en présence d'ions Co²⁺ (PHILLIPS et al., 1974a et b).

Ces enzymes sont capables d'hydrolyser les résidus de mannose liés en α -1,2, α -1,3 et α -1,6 de différents oligosaccharides de type oligomannosidique (HULTBERG et al., 1975; OPHEIM et TOUSTER, 1978).

Les quelques études antérieures concernant la spécificité de ces enzymes permettaient de supposer que la dégradation de l'oligosaccharide Man_oGlcNAc fournirait de nombreux intermédiaires.

Dans l'étude que nous avons réalisée, seuls ont été utilisés comme substrats des oligosaccharides ne possédant qu'un résidu de N-acétylglucosamine en position terminale réductrice puisque **BAUSSANT** et al. (1986) et **BRASSART** et al. (1987) avaient précédemment démontré que la dégradation des glycannes des N-glycosylprotéines débutait par l'action de deux enzymes agissant au niveau de l'extrémité terminale réductrice, l'aspartyl-N-acétyl-B-D-glucosaminidase et l'endo-N-acétyl-B-D-glucosaminidase.

Les résultats de cette étude sont rapportés dans l'article qui suit cette brève introduction.

In vitro hydrolysis of oligomannosyl oligosaccharides by the lysosomal α -D-mannosidases

Jean-Claude MICHALSKI, Jean-François HAEUW, Jean-Michel WIERUSZESKI, Jean MONTREUIL and Gérard STRECKER

Laboratoire de Chimie Biologique et Unité Mixte de Recherche du Centre National de la Recherche Scientifique no 111, Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois, France

(Received July 17/November 22, 1989) - EJB 890885

In vitro incubation of the oligomannosyl oligosaccharides Man₉GlcNAc and Man₅GlcNAc with isolated disrupted lysosomes yields different oligosaccharide isomers resulting from mannosidase hydrolysis. These isomers were isolated by HPLC and characterized by ¹H-NMR spectroscopy. The first steps of the degradation involve an (α 1-2)mannosidase activity and lead to the formation of one Man₈GlcNAc, one Man₇GlcNAc, two Man₆GlcNAc and two Man₅GlcNAc isomers. These reactions do not require Zn²⁺ as activator.

On the other hand, the following steps, which lead to the formation of Man₃GlcNAc and Man₂GlcNAc, are Zn^{2+} -dependent. This process is characterized by the preferential action of an (α 1-3)mannosidase activity, and the formation of Man(α 1-6)Man(α 1-6)Man(β 1-4)GlcNAc and Man(α 1-6)Man(β 1-4)GlcNAc. Therefore, the digestion of Man₉GlcNAc inside the lysosome appears to follow a very specific pathway, since only nine intermediate compounds can be identified instead of the 38 possible isomers.

Our results are consistent both with the existence of several specific enzymes for $\alpha 1-2$, $\alpha 1-3$ and $\alpha 1-6$ linkages, and with the presence of a unique enzyme whose specificity would be dependent either on Zn^{2+} or on the spatial conformation of the glycan. Nevertheless, previous work on the structural analysis of oligosaccharides excreted in the urine of patients suffering from mannosidosis, demonstrates the absence of the core $\alpha 1-6$ -linked mannosyl residue in the major storage product derived from oligomannosyl oligosaccharides. This observation indicates the presence of a specific ($\alpha 1-6$)mannosidase form, unaffected in mannosidosis.

Oligomannosidic glycans occur in numerous mammalian glycoproteins, as well as in the common glycosidic precursors involved in glycoprotein biosynthesis (for reviews see [1, 1 a]). In these glycans, mannose residues are linked via three different types of linkage i.e. $\alpha 1$ -2, $\alpha 1$ -3 and $\alpha 1$ -6. Multiple forms of x-D-mannosidases capable of hydrolysing these different types of glycosidic bonds have been shown to be widely distributed in mammalian cells [2]. Seven distinct forms of α -Dmannosidase with different pH optima and subcellular locations have been characterized. Neutral x-D-mannosidases are involved in processing reactions occuring during biosynthesis assembly of asparagine-linked oligosaccharides [3]; they include the endoplasmic reticular enzyme [4], Golgi mannosidases I_A , I_B and II [5, 6] and the cis-Golgi α 1-3- and α 1-6-specific mannosidases [7]. The second class of enzymes is responsible for the catabolism of the oligomannosidic glycans and includes the cytosolic and acidic lysosomal mannosidases [8, 9]. While the substrate specificity of the enzymes involved in maturation of N-glycosidically linked glycans has been well documented, little information remains available concerning the specificity of the lysosomal enzyme towards natural substrates [10, 11]. Using oligosaccharides Man₉GlcNAc and

Correspondence to J. C. Michalski, Laboratoire de Chimie Biologique, U. M. no. 111 CNRS, Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

Abbreviations. Man, α -D-mannopyranose; GlcNAc, 2-deoxy-2acetamido-D-glucopyranose; Man₀GlcNAc, Man(α 1-2)Man(α 1-3)-[Man(α 1-2)Man(α 1-6)]Man(α 1-6)[Man(α 1-2)]Man(α 1-2)Man(α 1-3)-Man(β 1-4)GlcNAc; Man₅GlcNAc, Man(α 1-3) [Man(α 1-6)]Man(α 1-6)[Man(α 1-3)]Man(β 1-4)GlcNAc.

Enzymes. x-D-mannosidase (EC 3.2.1.24); acid phosphatase (EC 3.1.3.2); *N*-acetyl-β-D-hexosaminidase (EC 3.2.1.30); glucose-6-phosphatase (EC 3.1.3.9); sialyltransferase (EC 2.4.99.1).

Man₅GlcNAc as substrates, in this study we report the kinetics and sequence of hydrolysis of the different mannose residues by the lysosomal α -D-mannosidases. This study has been performed by HPLC separation and ¹H-NMR structural determination of oligosaccharides released after different hydrolysis times.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Bio-Gel P2 (200-400 mesh). Dowex 50×2 (200-400 mesh; H⁺ form) and Dowex 1×2 (200-400 mesh; CH₃COO⁻ form) were from Bio-Rad Laboratories (Touzard et Matignon, Vitry-sur-Seine, France), 1-deoxymanno-jirimycin and swainsonine were purchased from Boehringer (Mannheim, FRG.). All other chemicals were of the highest purity commercially available.

Substrates

The oligosaccharide Man₉GlcNAc was isolated from urine samples taken from a patient with mannosidosis as previously described [12]. Man₅GlcNAc₂Asn was prepared by pronase digestion of hen ovalbumin followed by ion-exchange chromatography according to [13]. Man₅GlcNAc was obtained by hydrolysis of Man₅GlcNAc₂Asn with the immobilized endo-*N*-acetyl- β -D-glucosaminidase from a Basidiomycete [14].

Subcellular fractionation of rat liver

Lysosomal preparation was carried out by a modification of the procedure described by Jonas [15]. Wistar female rats (200 - 300 g) were starved overnight and beheaded. All subsequent steps were carried out at 4 °C. Livers were quickly removed, transferred to ice-cold buffer (0.25 M sucrose, 20 mM Hepes adjusted to pH 7.4) and homogenised in the same sucrose solution by three strokes of a motor-driven loosefitting Potter-Elvehjem homogeniser at low speed (750 rpm). The liver homogenate was adjusted to 4 ml buffer/g liver. An enriched lysosomal pellet was obtained, according to De Duve et al. [16], by centrifugation of the post-nuclear fraction at 10000 rpm for 15 min (Beckman SW 27-1 rotor). This pellet was suspended in 5.5 ml sucrose solution, and mixed with 4.5 ml Percoll, 0.25 M sucrose, 20 mM Hepes, pH 7.4. This mixture was centrifuged for 90 min at 6000 rpm (Beckman SW 40Ti rotor). The dense lysosomal band near the bottom of the gradient was diluted 10-fold in sucrose buffer and collected by centrifugation to remove Percoll. The resulting pellet was resuspended in 1 ml 200 mM acetate buffer pH 5.0 containing 0.5% Triton X-100, homogenised by 20 strokes of a Dounce homogeniser and gently stirred for 2 h at 4°C.

Protein assay

Protein was estimated by the method of Lowry et al. [17] with bovine serum albumin as standard.

Enzyme assays

Acid phosphatase and N-acetyl- β -D-hexosaminidase were selected as marker enzymes for lysosomes. Glucose-6-phosphatase and sialyltransferase were taken as marker enzymes respectively for the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. Lysosomal marker enzymes were assayed according to Barrett [18] with *p*-nitrophenylphosphate and *p*-nitrophenyl- β -D-N-acetylglucosaminoside as substrates. Glucose-6-phosphatase was assayed according to Beaufay et al. [19] but modified by the addition of 12 mM sodium tartrate to inhibit nonspecific acid phosphatase activity [20], and sialyltransferase according to Bauvois et al. [21]. Lysosomal α -D-mannosidase activity was routinely assayed using p-nitrophenyl-q-pmannopyranoside as a substrate according to Barrett [18]. When oligosaccharides Man₉GlcNAc and Man₅GlcNAc were used as substrates, the incubation mixture was as follows: 5 mg substrate dissolved in 100 µl 200 mM acetate buffer pH 5.0, 200 µl lysosomal homogenate (2 mg protein). Incubation was carried out at 37 °C. In experiments using Man₅GlcNAc as a substrate Zn(CH₃COOH)₂ was added to a final concentration of 2.5 mM. For kinetic studies, 200-µl aliquots of lysosomal extract were added every 4 h.

Inactivation of mannosidase activity at 37°C

1 ml lysosomal extract was incubated at 37 °C and pH 5.0 before assay at the same pH for α -mannosidase activity according to Barrett [18] with *p*-nitrophenyl- α -D-mannopyranoside.

HPLC analysis

Enzyme incubations were stopped by adding 1 vol. absolute ethanol. After centrifugation, the supernatant was desalted on coupled columns (15 ml) of Dowex $50 \times 2 (200 - 400 \text{ mesh}, \text{H}^+ \text{ form})$ and Dowex $1 \times 2 (200 - 400 \text{ mesh}, \text{CH}_3\text{COO}^- \text{ form})$. Carbohydrate-containing material was further purified by gel chromatography on a Bio-Gel P2 (200 - 400 mesh) column (1 × 50 cm), eluted with water.

HPLC separation of oligomannosidic oligosaccharides was performed on primary amine bonded silica, 5 µm Supelcosyl LC-NH₂ column $(0.4 \times 25 \text{ cm}, \text{ Supelco Inc.})$ Bellefonte, Pennsylvania). 1 mg oligosaccharide dissolved in 50 µl water was injected on the column. The column was equilibrated with the initial solvent (acetonitrile/water, 70:30). After the injection, isocratic conditions (acetonitrile/water, 70:30) were maintained for 15 min, followed by a linear gradient to acetonitrile/water (50:50) for 60 min. The flow-rate was 1 ml/min. The oligosaccharides were detected at 206 nm. Samples of purified Man₉GlcNAc (1 mg) were incubated at 37°C with the crude lysosomal homogenate for various incubation times and at different pH values. The products of hydrolysis were analyzed by HPLC, which allows the separation of the different oligomannosidic oligosaccharides according to the number of mannose residues. The different isomers were identified by comparison of their migration times with standard oligosaccharides purified from the urine of patients with mannosidosis. Integration of each peak area allowed the measurement of the rate of formation and disappearance of each isomer, after different incubation times or at different pH values.

¹H-NMR analysis

¹H-NMR analysis of oligosaccharides in ²H₂O (99.45%, *Commissariat à l'Energie Atomique, Saclay, France*) was carried out on a Bruker AM-400 WB spectrometer operating in the Fourier-transform mode at a probe temperature of 300 K. Chemical shifts δ are given relative to sodium 2,2-dimethyl-2silapentane sulphonate (indirectly to acetone in ²H₂O, δ = 2.225 ppm). NMR spectra were interpreted by comparison with NMR data from the literature [22] with an accuracy of 0.002 ppm. For ¹H-NMR studies, 5 mg Man₉GlcNAc or 5 mg Man₅GlcNAc were digested with the lysosomal homogenate for 48 h and after stopping the reaction, the different isomers were further purified by HPLC as previously mentioned.

RESULTS

Subcellular fractionation of rat liver

Rat liver was fractionated according to Jonas [15] using Percoll density centrifugation gradients to obtain a lysosomal fraction free of endoplasmic reticulum and Golgi membranes. This objective was very important since these two subcellular compartments are known to contain α -mannosidase activities. As shown in Table 1, the lysosomal fraction contained 5% acid phosphatase and 5.5% *N*-acetyl- β -D-hexoaminidase activities with, respectively, eightfold and tenfold enrichments over the initial homogenate. These two enzymes are markers for the lysosomes. In contrast, the Golgi marker, sialyltransferase, was not detectable in the lysosomal fraction, and the endoplasmic reticulum marker, glucose-6-phosphatase, was only 1.2% of the initial activity.

To ensure the absence of contamination activities by processing mannosidases under the experimental procedure used in this study, hydrolysis of Man₉GlcNAc and Man₅GlcNAc was performed as in Materials and Methods, in the presence of specific mannosidase inhibitors such as 1-deoxymannojirimycin (100 μ M) and swainsonine (20 μ M). *In vitro* effects of these two inhibitors on rat liver mannosidases are well characterized. 1-Deoxymannojirimycin, which specifically inhibits Golgi mannosidase I [23], has no effect on the hydrolysis of the substrates. In the same conditions swainsonine, a plant alkaloid which is a potent inhibitor of Golgi α -mannosidase II [24] and lysosomal α -mannosidase [25], completely abolished the hydrolysis of both substrates.

These results favour the sole involvement of lysosomal mannosidase in the degradative pathway under study.



Fig. 1. Effect of incubation at 37 $^{\circ}$ C and pH 5.0 on the α -mannosidase activity in the lysosomal fraction. Results are expressed as a percentage of the activity in the unincubated lysosomal fraction

Table 1. Enzymatic characterization of the lysosomal fraction

Inactivation of mannosidase activity at 37°C

Fig. 1 shows the effect on enzyme activity of incubation for various periods of time at 37 °C and pH 5.0. After 6 h, the activity had fallen to 60% of the control, and longer periods of incubation (up to 8 h) caused a 70-80% loss of activity. Moreover, addition of Zn^{2+} could not restore the activity. For kinetic studies, the incubation mixtures were supplied every 4 h with additional aliquots of lysosomal extract.

Hydrolysis of Man₉GlcNAc by lysosomal extract

Fig. 2A shows the HPLC separation of the different oligomannosidic oligosaccharides resulting from a 48 h hydrolvsis of Man_oGlcNAc with the lysosomal extract. Hydrolvsis of Man₉GlcNAc was shown to be optimal at pH 5.0. Fig. 3A shows that Man₉GlcNAc is rapidly converted to Man₈GlcNAc, while Man₇GlcNAc and Man₆GlcNAc appear more slowly. The hydrolysis curves indicate that approximately 55% Man₈GlcNAc, 31% Man₇GlcNAc, 10% Man₆GlcNAc and 1% Man₅GlcNAc were produced after 48 h. No traces of Man₄GlcNAc or lower isomers were formed even after prolonged incubation. It should be noted that hydrolysis of Man₉GlcNAc to Man₅GlcNAc does not require Zn²⁺. Since Man₅GlcNAc was not further processed under the incubation conditions used for Man₉GlcNAc, optimal parameters for Man₅GlcNAc hydrolysis were determined by supplying the buffer with ions. It appeared that degradation of Man₅GlcNAc required Zn²⁺ ions and was optimal at pH

Activity in the homogenate was taken as 100%. Yield is expressed as a percentage of the total activity of the homogenate recovered in the lysosomal enriched fraction. Purification is given by the relative specific activity; specific activity in the lysosomal enriched fraction/specific activity in the starting homogenate. n.d., not detectable

Fraction	Acid phosphatase		N-acetyl-β-D- hexosaminidase		Glucose-6-phosphatase		Sialyltransferase	
	purification	yield	purification	yield	purification	yield	purification	yield
	-fold	%	-fold	%	-fold	%	-fold	%
Homogenate Lysosomal enriched	1 8	100 5	1 10	100 5.5	1 1.1	100	1 n.d.	100 n.d.



Fig. 2. HPLC elution profile of oligosaccharides formed after a 48 h incubation time of (A) $Man_9GlcNAc$ and (B) $Man_9GlcNAc$ with rat liver lysosomal homogenate on a Supelcosyl LC-NH₂ column



Fig. 3. Time course of hydrolysis, by rat liver lysosomal homogenate, of (A) $Man_9GlcNAc$ without Zn^{2+} , and (B) $Man_5GlcNAc$ with Zn^{2+} . Approximately 1 mg of each oligosaccharide was incubated at 37 °C with the rat liver lysosomal extract for various time periods. Oligosaccharides released were separated by HPLC and quantified by peak integration as described under Materials and Methods. (A) Man_9 GlcNAc (\blacksquare); Man_8 GlcNAc (\blacktriangle); Man_7 GlcNAc (\bigcirc); Man_6 GlcNAc (\square); Man_5 GlcNAc (\blacktriangle); (B) Man_5 GlcNAc (\blacksquare); Man_4 GlcNAc (\bigstar); Man_3 GlcNAc (\bigcirc); Man_2 GlcNAc (\square)

5.0. Figs 2B and 3B indicate that under these hydrolysis conditions $Man_5GlcNAc$ is converted to $Man_4GlcNAc$, Man_3GlcNA and $Man_2GlcNAc$.

¹H-NMR analysis

Each fraction separated by HPLC was further analyzed by ¹H-NMR spectroscocpy.

NMR analysis of oligomannosyl oligosaccharide resulting from the lysosomal digestion of Man₂GlcNAc in absence of Zn^{2+}

 $Man_8GlcNAc$. The compound Man₈GlcNAc was found to be a unique oligosaccharide, lacking the Man-D₃ residue (for nomenclature, see Fig. 4), instead of the expected mixture of the three possible Man₈GlcNAc isomers. It is clear that the ¹H-NMR spectrum does not contain the C1H resonance of Man-D₃. In addition, the Man-B C1H signal is shifted upfield from $\delta = 4.142$ ppm in Man₉GlcNAc, to $\delta = 4.905$ ppm. The other C1H resonances are identical to those observed in the spectrum of Man₉GlcNAc (Table 2).

 $Man_7GlcNAc$. The second Man residue to be removed is another (α 1-2)-linked mannose unit Man- \underline{D}_1 , as demonstrated by the examination of the NMR spectrum of Man₇GlcNAc (Fig. 4C), in which the Man- \underline{C} C1H resonance is upfield shifted at $\delta = 5.055$ ppm, and the Man- \underline{D}_1 C1H signal absent from the anomeric proton region.

 $Man_6GlcNAc$. The conversion of Man₇GlcNAc to Man₆GlcNAc is made in two different ways, since the Man₆GlcNAc fraction contains two isomers, lacking respectively the Man- \underline{C} and the Man- \underline{D}_2 residues (Fig. 5B). It may be deduced from the observation of the doubling of C1H signals from Man- $\underline{4}$ and Man- \underline{A} , that this occurs both in the terminal position and when these residues are (α 1-2)-substituted. The integration of these signals allows the determination of a ratio of 2:3 for Man₆GlcNAc (I) relative to Man₆GlcNAc (II).

 $Man_5GlcNAc$. The Man₅GlcNAc fraction also contained two isomers, in the ratio of 1:1, as deduced from the NMR spectrum (Fig. 5C) which shows the doubling of the signals related to the Man-<u>A</u> and Man-<u>4'</u> residues. The isomer Man₅GlcNAc (II) can only proceed from Man₆GlcNAc (II), while Man₅GlcNAc (I) may possess two origins, as indicated in Fig. 7. Starting from Man₉GlcNAc as a substrate, no traces of Man₄GlcNAc isomers were detectable. To examine the next steps, we used Man₅GlcNAc (I), substrate obtained by successive digestions of hen ovalbumin with pronase and endo-N-acetyl- β -D-glucosaminidase.

NMR analysis of oligomannosyl oligosaccharides resulting from lysosomal digestion of $Man_5GlcNAc$ (1) in the presence of Zn^{2+}

The lysosomal digestion of Man₅GlcNAc (I), performed according to the experimental conditions used for Man₉Glc-NAc, remained unsuccessful. By examining the influence of pH and the action of cations, hydrolysis was finally found to be optimal at pH 5.0, and in the presence of 2.5 mM Zn^{2+} . Applying these experimental conditions, the Man₅GlcNAc (I) substrate was found to be hydrolysed into Man₄GlcNAc, Man₃GlcNAc and Man₂GlcNAc (Fig. 2B).

 $Man_4GlcNAc$. The Man_4GlcNAc component originates from Man_5GlcNAc (I) by removing exclusively the (α 1-3)linked Man-4 residue. Indeed, the NMR spectrum (Fig. 6A) does not exhibit the Man-4 C1H resonance, and shows an upfield shift of the Man-3 C2H resonance, observed at $\delta =$ 4.088 ppm(α) and 4.076 ppm(β) (Table 3). The presence of the Man-A and Man-B C1H signals at $\delta =$ 5.060 ppm and $\delta =$ 4.911 ppm confirms the proposed structure for Man_4GlcNAc.

Man₃GlcNAc. The Man₃GlcNAc oligosaccharides occur as a mixture of two isomers, as shown by the presence of two signals related to the C1H resonance of GlcNAc (Fig. 6B).

The major component Man₃GlcNAc (I) possesses the Man- $\underline{4'}$ and \underline{B} residues, while the minor one, Man₃GlcNAc (II) contains the Man- $\underline{4'}$ and Man- \underline{A} units. The ratio Man₃GlcNAc (I)/Man₃GlcNAc (II) was established to be 6:1, by integration of the GlcNAc C1H signals.

 $Man_2GlcNAc$. The Man_2GlcNAc oligosaccharide was easily identified as Man(α 1-6)Man(β 1-4)GlcNAc, since the only α -linked mannose residue present in the molecule is the Man-<u>4</u>' residue (Fig. 6C).

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

The major goal of the present study was to investigate the specificity of lysosomal α -D-mannosidases from rat liver toward natural substrates. The ¹H-NMR analysis of products result-



Fig. 4. ¹H NMR of (A) Man₉GlcNAc (substrate) and of the mixture of (B) Man₈GlcNAc and (C) Man₉GlcNAc resulting from enzymatic digestion

ing from enzymatic hydrolysis represents a powerful approach which allows the determination of the different chronological steps involved in the catabolism of complex molecules such as glycans [26, 27]. It should be mentioned that, since our experiments have been realized *in vitro*, extrapolation of our results to an *in vivo* situation can only be speculative.

Oligomannosidic oligosaccharides are sequentially hydrolysed by the x-D-mannosidases according to an ordered path-



Fig. 5. ¹H NMR of $Man_6GlcNAc$ and $Man_5GlcNAc$; (A) purified $Man_5GlcNAc$ from hen ovalbumin; (B) and (C) $Man_6GlcNAc$ and $Man_5GlcNAc$ formed after enzymatic hydrolysis of $Man_6GlcNAc$

way represented in Fig. 7. It appeared that during the first step of hydrolysis only one mannose residue (Man- D_3) was removed, producing a pure Man₈GlcNAc oligosaccharide instead of the three expected isomers. Following Man- D_3 , Man-

 \underline{D}_1 was hydrolysed stepwise giving again a pure Man₇GlcNAc isomer. Hydrolysis of Man₇GlcNAc results in the removal either of the α 1-2-linked Man- \underline{D}_2 (60%) or Man- \underline{C} (40%), leading to two Man₆GlcNAc isomers, which are further



Fig. 6. ¹H NMR of (A) $Man_4GlcNAc$. (B) $Man_3GlcNAc$ and (C) $Man_2GlcNAc$ resulting from enzymatic hydrolysis of $Man_5GlcNAc$ in presence of Zn^{2+}



٠,

Fig. 7. Proposed scheme for the lysosomal catabolism of oligomannosidic oligosaccharides in rat liver

376

Proton	Mannose residue position	Chemical shift in								
		Man ₉ GlcNAc	Man ₈ GlcNAc	Man ₇ GlcNac	Man ₆ GlcNAc		MansGlcNAc			
		$M - M$ $D_3 B$ $M - M 4$ $D_2 A$ $M - M - M 3 2$ $D_1 C 4$	M - M - M - GN $M - M - M - M$	M - M - M - GN	M - M M - GN	$M \rightarrow M \rightarrow M - GN$ $M - M \rightarrow GN$	$M \longrightarrow M - GN$	$M = M \frac{M}{M} M = GN$		
		ppm	,		(11)	(1)	(1)	(11)		
CUL	2	5 221	5 170	5 220	6.220	5 245	5 247	5 227		
CIH	20	5.251	J.228 4 71 4	J.220	5.230	5.245	5.247	3.237		
	$\frac{2\beta}{2}$	4.714	4.714	4./14	4.708	n.d.	n.d.	n.d.		
	30	4.776	4.775	4.776	4.783	4.//4	4.787	4.787		
	3 <i>B</i>	4.772	4.771	4.773	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
	$4\alpha, \beta$	5.337	5.334	5.343	5.094	5.348	5.101	5.101		
	4'α	4.872	4.872	4.872	4.872	4.872	4.872	4.910		
	β	4.869	4.870							
	Aα	5.398	5.399	5.398	5.395	5.080	5.080	5.370		
	β	5.407	5.407	5.405	5.404	5.108	5.106	5.379		
	Βα, β	5.142	4.905	4.905	4.904	4.904	4.906			
	Cα, β	5.308	5.305	5.055		5.053				
	D1x,β	5.048	5.046				-			
	D2x	5.058	5.055	5.055	5.053			5.059		
	β	5.063	5.060	5.060	5.060			5.063		
	D3α.β	5.040			-		-			
C2H	37	4 239	4 236	4 239	4 257	4 257	4 262	4 262		
(211	ß	4 229	4 226	4 228	4 246	4 246	4.202	4 249		
	$A \gamma R$	4 103*	4 106	4 130	4 070	4.120	4.076	4 076		
	$A' \sim$	4.158	4 156	4.156	4.070	4.157	4.144	4.070		
		4.155	4 152	4 1 5 2	4.157	4.157	4.144	4.144		
	ρ	4.133	4.152	4.132	4.155	4.133	4.140	4.140		
	AI	4.069	4.087	4.087	4.090	4.049	4.048	4.11		
	p	1.0.	1.0.	4.102	n.u. 2 095	n.d. 2.095	4.001			
	$\beta \alpha, \beta$	4.023	3.984	3.983	3.985	3.985	3.987			
	$C\alpha, p$	4.109	4.100	4.070	—	4.070	-			
	$D1\alpha, \beta$	4.066-	4.065	-			_	4.02		
	$D2\alpha,\beta$	4.009	4.009	4.070	4.070	adden		4.07		
	D32,β	4.073~		-		***	-			
NAc	2 x	2.050	2.050	2.050	2.050	2.050	2.044	2.053		
	β	2.046	2.046	2.046	2.050	2.050	2.044	2.050		

Table 2.¹ H Chemical shifts of structural-reporter groups of constituent monosaccharides for purified Man₃GlcNAc and respective oligosaccharides resulting from its hydrolysis with rat liver lysosomes M, mannose; GN, N-acetylglucosamine; n.d., not detectable

* Values determined by homonuclear correlation spectroscopy.
 * Values deduced by comparison with Man₈GlcNAc and Man₇GlcNAc spectra.

Table 3. ¹ H chemical shifts of structural-reporter groups of constituent monosaccharides for purified Man ₅ GlcNAc and respective oligosaccharides
resulting from its hydrolysis with rat liver lysosomes
M, mannose; GN, N-acetylglucosamine; n.d., not determined

Proton Mannose Chemical shift in residue! position. Man₅GlcNAc Man₄GlcNAc Man₃GlcNAc Man₂GlcNAc M M١ M В -GNM - GNM - GNМ M - GNM -GN3 2 A м (1)(II) ppm C1H 5.247 5.254 5.211 5.259 5.214 2α β 4.710 4.72 n.d. 4.672 4 779 3α 4.787 4.780 4.779 4.777 ß 4.774 4.772 4.772 4.769 5.101 4α.β 4΄χ 4.872 4.871 4.898 4.892 4.916 β 4.907 4.909 n.d. 4.916 5.080 5 076 Aα 5.060 _ 5.106 5.107 ß 5.090 4.913 Βα,β 4.906 4.911 4.12 3α C2H 4.262 4 088 4 092 4 089 β 4.249 4.076 4.084 n.d. 4.075 4.076 $4\alpha.\beta$ 3.975 4΄α 4.144 4.138 3.975 3.968 3.984 ß 4.140 4.141 3.984 3.972 4.08 4.048 Aα 4.045 -----4.061 ---β 4.066 n.d. **Β**α,β 3.984 3.987 3.992 ____ 2.045 2.061 2α 2 044 NAc 2.044 2.060β 2.044 2.044 2.057 2.045 2.057

processed to $Man_5GlcNAc$ either by hydrolysis of the residual $\alpha 1$ -2-linked Man_2D_2 or by hydrolysis of the $\alpha 1$ -6-linked Man-<u>B</u>.

It may be assumed that the order of hydrolysis is either dependent on substrate conformation or on enzyme specificity. Nevertheless, it should be noted that catabolism of Man₉GlcNAc to Man₅GlcNAc is catalysed mainly by an (a1-2)mannosidase activity. As previously mentioned this activity does not require any divalent ions and is optimal at pH 5.0. In these experimental conditions, Man₅GlcNAc (I) represents a limiting structure which is not processed further either by $(\alpha 1-3)$ or $(\alpha 1-6)$ mannosidases. We established that further hydrolysis of Man₅GlcNAc (1) was obtained only after adding Zn²⁺ to the incubation medium. In these experimental conditions as shown in Fig. 7, Man₅GlcNAc is preferentially hydrolysed by the $(\alpha 1-3)$ mannosidase leading to the formation of the linear tetrasaccharide $Man(\alpha 1-6)Man(\alpha 1-6)Man(\beta 1-6)Man($ 4)GlcNAc, which is further hydrolysed by an $(\alpha 1-6)$ mannosidase to produce the trisaccharide Man(α 1-6)Man(β 1-4)GlcNAc, and the disaccharide Man(β 1-4)GlcNAc.

This study does not lead to definite conclusions about the occurrence of different α -D-mannosidase isoenzymes in rat liver lysosomes, specific for each type of glycosidic linkage. Nevertheless, it appears clear that hydrolysis of α 1-3 and α 1-6 linkages is Zn²⁺ dependent. As suggested by Tulsiani et al. [28] Zn²⁺ may be involved in the relative stability of one isoenzyme form.

Moreover, it should be noted that the hydrolysis product represented by the trisaccharide $Man(\alpha 1-6)Man(\beta 1-$

4)GlcNAc is different from the trisaccharide Man(a1-3)Man(β 1-4)GlcNAc which accumulates in urine of patients with mannosidosis [12]. This observation may be related to the occurrence of residual (α 1-6)mannosidase activity in these patients. In addition, it is in favour of a specific (a1-6)mannosidase activity. The lysosomal catabolic pathway completely differs from the ordered processing pathway previously described for Golgi-associated α -D-mannosidase [3]. Recently, Tulsiani and Touster [11] reported that the lysosomal x-D-mannosidases of rat kidney preferentially cleave linear polymers and have little activity towards branched structures, which are substrates for cytosolic α -Dmannosidases. Nevertheless, our results demonstrate that the lysosomal enzymes of rat liver are able to catabolyse completely the branched Man₉GlcNAc structure. However, the relative importance of both catabolic pathways, lysosomal and cytosolic, as well as the relationship between these two subcellular compartments remains to be investigated.

From a structural point of view, the digestion of Man₉GlcNAc with lysosomal α -D-mannosidases produces a number of oligomannosidic oligosaccharide isomers that have never previously been characterized in native glycoproteins.

Some ¹H-NMR parameters of Man₉GlcNAc have been revised with regard to the data previously reported [22, 29]. The C2H resonances of the Man- $\underline{4'}$, Man- \underline{A} and Man- \underline{C} were established using ¹H-homonuclear correlation spectroscopy (Table 2).

This analysis indicated that C2H resonances of Man-4 and Man-A must be interchanged. The C1H resonance of Man-

 D_1d , Man- D_2 and Man- D_3 were confirmed by comparing the NMR spectra of Man₉GlcNAc, Man₈GlcNAc and Man₇GlcNAc. The latter two are devoid respectively of Man- D_3 and Man- D_1 and consequently their exact C1H resonances could be extracted from the spectra and were found to be identical to previous data [22, 29]. Therefore, if we assume that the C2H resonances of these Man residues are not altered by a discrete change in chemical structure, the new values deduced for Man C2H resonances should be 4.060 ppm (Man- D_1), 4.069 ppm (Man- D_2) and 4.073 ppm (Man- D_3). These parameters could not be accurately determined by homonuclear decoupling because of their overlap, and were previously only tentatively assigned [22, 29].

This research was supported in part by the Centre National de la Recherche Scientifique (Unité Mixte no 111: Relations structurefonction des constituants membranaires; Director: Professor Jean Montreuil), by the Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois, by the Ministère de l'Education, by the Fondation pour la Recherche Médicale. The authors are grateful to the Conseil Régional du Nord-Pas de Calais, Centre National de la Recherche Scientifique, Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur. Ministère de l'Education Nationale, Association pour la Recherche sur le Cancer for their contribution to the acquisition of the 400-MHz NMR spectrometer. We are indebted to Mrs Cathrine Alonso, a Centre National de la Recherche Scientifique technician for her skilful technical assistance. We are grateful to Professor André Verbert and René Cacan for helpful discussions during this study.

REFERENCES

- 1. Montreuil, J. (1980) Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 37. 157-223.
- Montreuil, J. (1982) in Comprehensive biochemistry (Neuberger, A. & van Deenen, L. L. M., eds) pp. 1-188. Elsevier, Amsterdam.
- 2. Winchester, B. G. (1984) Biochem. Soc. Trans. 12, 522-524.
- Kornfeld, R. & Kornfeld, S. (1985) Annu. Rev. Biochem. 54, 631 664.
- 4. Bischoff, J. & Kornfeld, R. (1983) J. Biol. Chem. 258, 7907-7910.
- Tulsiani, D. R. P., Hubbard, S. C., Robbins, P. W. & Touster, O. (1982) J. Biol. Chem. 257, 3660-3668.
- 6. Tabas, I. & Kornfeld, S. (1978) J. Biol. Chem. 253, 7779-7786.
- 7. Monis, E., Bonay, P. & Hughes, R. C. (1987) Eur. J. Biochem. 168, 287-294.

- 8. Shoup, V. A. & Touster, O. (1976) J. Biol. Chem. 251, 3845-3852.
- Carroll, M., Dance, N., Masson, P. K., Robinson, D. & Winchester, B. G. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 49, 579-583.
- 10. Hultberg B., Lundblad A, Masson, P. K. & Öckerman, P. A. (1975) Biochim. Biophys. Acta 410, 156-163.
- 11. Tulsiani, D. R. P. & Touster, O. (1987) J. Biol. Chem. 262, 6506-6514.
- Strecker, G., Fournet, B., Bouquelet, S., Montreuil, J., Dhondt, J. L. & Farriaux, J. P. (1976) *Biochimie (Paris)* 58, 579-586.
- 13. Montgomery, R. & Yu, Y. (1963) J. Biol. Chem. 238, 3547-3554.
- 14. Bouquelet, S., Strecker, G., Montreuil, J. & Spik, G. (1980) *Biochimie (Paris)* 62, 43-49.
- 15. Jonas, A. J. (1986) Biochem. J. 236, 671-677.
- 16. de Duve, C., Pressman, B. C., Gianeto, R., Wattiaux, R. & Appelmans, F. (1955) *Biochem. J. 60*, 604-617.
- 17. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- Barrett, A. J. (1972) in Lysosomes, a laboratory handbook (Dingle, J. T., ed.) pp. 110-135, North-Holland Publishing Co., Amsterdam.
- Beaufay, H., Amar-Cortesec, A., Feytmans, E., Thines-Sempoux, D., Wibo, M., Robbi, M. & Berthet, J. (1974) J. Cell Biol. 61, 188-200.
- 20. Brightwell, R. & Tappel, A. L. (1968) Arch. Biochem. Biophys. 124, 333-343.
- Bauvois, B., Cacan, R., Fournet, B., Caen, J., Montreuil, J. & Verbert, A. (1982) Eur. J. Biochem. 121, 567-572.
- Vliegenthart, J. F. G., Dorland, C. & van Halbeek, H. (1983) Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 41, 343-374.
- 23. Bischoff, J. & Kornfeld, R. (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 125, 324-331.
- Tulsiani, D. R. P., Harris, T. M. & Touster, O. (1982) J. Biol. Chem. 257, 7936-7939.
- Dorling, P. R., Huxtable, C. R. & Colegate, S. M. (1980) Biochem. J. 191, 649-651.
- Baussant, T., Strecker, G., Wieruszeski, J. M., Montreuil, J. & Michalski, J. C. (1986) *Eur. J. Biochem. 159*, 381-385.
- Brassart D., Baussant, T., Wieruszeski, J. M., Strecker, G., Montreuil, J. & Michalski, J. C. (1987) *Eur. J. Biochem.* 169, 131-136.
- Tulsiani, D. R. P., Coleman, V. D. & Touster, O. (1988) Arch. Biochem. Biophys. 267, 60-69.
- van Halbeek, H., Dorland, L., Veldink, G. A., Vliegenthart, J. F. G., Strecker, G., Michalski, J. C., Montreuil, J. & Hull, W. E. (1980) FEBS Lett. 121, 71-77.

L'aspartylglucosaminurie et la fucosidose, maladies de surcharge lysosomique dûes à la déficience génétique en aspartamidase et α -L-fucosidase, se caractérisent, par opposition aux autres glycoprotéinoses, par une excrétion urinaire massive de glycoasparagines avec notamment excrétion de mannosyl-glyco-asparagine de structure suivante:

$$\operatorname{Man}(\alpha 1-6) [\operatorname{Fuc}(\alpha 1-6)]_{0-1} \\ \\ \operatorname{Man}(\beta 1-4) \operatorname{GlcNAc}(\beta 1-4) \operatorname{GlcNAc}(\beta 1-N) \operatorname{Asn}$$

Il est à noter que l'isomère correspondant à la liaison α -1,3 est systématiquement absent.

L'accumulation de ce composé conduit à supposer que l' α -1,6mannosidase est aspartamidase-dépendante, c'est-à-dire que son activité est facilitée par l'action préalable de l'aspartamidase, succédant elle-même à celle de l' α -L-fucosidase.

Afin de vérifier cette hypothèse, la dégradation de différents oligosaccharides et glyco-asparagines a été suivie d'une manière qualitative par chromatographie sur couche mince, puis la structure de certains produits d'hydrolyse a été déterminée par spectrométrie de masse.

A) ETUDE CINETIQUE.

Les différents substrats utilisés ont été les suivants: GA1: $Man(\alpha 1-3) [Man(\alpha 1-6)]Man(\beta 1-4)GlcNAc(\beta 1-4)GlcNAc(\beta 1-N)Asn,$ GA2: $Man(\alpha 1-6)Man(\beta 1-4)GlcNAc(\beta 1-4)GlcNAc(\beta 1-N)Asn,$ GA3: $Man(\alpha 1-3) [Man(\alpha 1-6)]Man(\beta 1-4)GlcNAc(\beta 1-4)GlcNAc(\beta 1-N)Asn-Ac,$ GA4: $Man(\alpha 1-6)Man(\beta 1-4)GlcNAc(\beta 1-4)GlcNAc(\beta 1-N)Asn-Ac$,

OL1: $Man(\alpha 1-3) [Man(\alpha 1-6)] Man(\beta 1-4) GlcNAc$,

OL2: $Man(\alpha 1-3)Man(\beta 1-4)GlcNAc$,

OL4: $Man(\alpha 1-6)Man(\beta 1-4)GlcNAc$.

Les incubations ont été réalisées à 37°C et pH 5 (tampon acétate de sodium 200 mM) en présence de triton X-100 0,5% et d'acétate de zinc 2,5 mM, et les cinétiques d'hydrolyse ont été suivies par chromatographie sur couche mince.

1º Cinétiques d'hydrolyse des glyco-asparagines GA1 et GA2.

Les glyco-asparagines GA1 et GA2 subissent essentiellement l'action des endoglycosidases aspartyl-N-acétyl-ß-D-glucosaminidase et endo-Nacétyl-ß-D-glucosaminidase, conduisant à la formation des produits suivants:

- Man₃GlcNAc₂ et Man₃GlcNAc dans le cas du composé GA1 (Fig. 13A),

- Man₂GlcNAc₂ et Man₂GlcNAc dans le cas du composé GA2 (Fig. 13B).

L'activité des α -mannosidases apparaît, en effet, très inférieure à celle des endoglycosidases. On constate toutefois la formation de produits résultant de l'action de ces enzymes:

- Man₂GlcNAc₂Asn, Man₂GlcNAc₂ et Man₂GlcNAc dans le cas de GA1 (Fig. 13A),
- uniquement ManGlcNAc après 24 h d'hydrolyse du composé GA2 (Fig. 13B)





A: Hydrolyse de GA1. Ligne 1: témoin M₃GN; lignes 2, 3, 4 et 5: temps 1, 2, 4 et 8 h d'incubation; ligne 6: témoin M₂GN.

B: Hydrolyse de GA2. Ligne 1: témoin M₂GN; lignés 2, 3, 4, 5 et 6: temps 1, 2, 4, 8 et 24 h d'incubation.

C: Hydrolyse de GA3. Ligne 1: témoin M₃GN; lignes 2, 3, 4 et 5: temps 1, 2, 4 et 8 h d'incubation; ligne 6: témoin M₂GN.

D: Hydrolyse de GA4. Ligne 1: témoin M₂GN; lignes 2, 3, 4, 5 et 6: temps 1, 2, 4, 8 et 24 h d'incubation.

2° Cinétiques d'hydrolyse des glyco-asparagines GA3 et GA4.

La fonction NH_2 libre du résidu asparagine des composés GA1 et GA2 a été acétylée dans le but d'inhiber l'action de l'aspartyl-N-acétyl-ß-D-glucosaminidase et, par conséquent, l'action de l'endo-N-acétyl-ß-Dglucosaminidase.

Les substrats acétylés GA3 et GA4 ainsi obtenus ont été incubés dans les mêmes conditions que précédemment. Les différentes aliquotes prélevées ont été lyophilisées et les produits ont été digérés par l'endo-N-acétyl-B-D-glucosaminidase d'un Basidiomycète avant d'être analysés par chromatographie sur couche mince.

Ainsi, seule l'hydrolyse d'un résidu de mannose permet d'expliquer la formation de l'unique produit mis en évidence après la digestion de la glyco-asparagine GA3 (Fig. 13C).

La glyco-asparagine GA4, quant à elle, n'est pas du tout hydrolysée par l'activité α -1,6-mannosidasique (Fig. 13D).

3° Cinétiques d'hydrolyse des oligosaccharides.

Le tétrasaccharide OL1, $Man(\alpha 1-3)[Man(\alpha 1-6)]Man(\beta 1-4)GlcNAc$, est principalement dégradé en un composé $Man_2GlcNAc$ (Fig. 14A). Le composé inférieur ManGlcNAc apparaît pour des temps d'incubation supérieurs à 8 heures.

Les vitesses d'hydrolyse des trisaccharides OL2 et OL3 sont nettement différentes, bien que la dégradation de ces deux substrats fournisse un produit identique, Man(B1-4)GlcNAc. L'oligosaccharide OL3



Fig. 14 : Cinétiques d'hydrolyse des oligosaccharides OL1, OL2 et OL3.
A: Hydrolyse de OL1. Ligne 1: témoin M₃GN; lignes 2, 3, 4 et 5: temps 1, 2, 4 et 8 h d'incubation; ligne 6: témoin M₂GN.

B: Hydrolyse de OL2. Ligne 1: témoin M₂GN; lignés 2, 3, 4, 5 et 6: temps 1, 2, 4, 8 et 24 h d'incubation.

C: Hydrolyse de OL3. Ligne 1: témoin M₂GN; lignes 2, 3, 4, 5 et 6: temps 1, 2, 4, 8 et 24 h d'incubation.

est en effet dégradé beaucoup moins rapidement que le composé OL2, le produit ManGlcNAc n'est dans ce cas détecté qu'à partir de 24 h d'incubation (Fig. 14C et D).

B) ETUDE STRUCTURALE.

Les études cinétiques réalisées permettaient de constater:

- dans le cas des oligosaccharides, la dégradation préférentielle du résidu de mannose 4 lié en α -1,3,
- dans le cas des glyco-asparagines GA3 et GA4, la résistance à l'hydrolyse du résidu de mannose <u>4'</u> lié en α -1,6.

Dans le but de vérifier ces observations, la structure des produits Man₂GlcNAc et Man₂GlcNAc₂Asn, provenant de l'hydrolyse des composés OL1 et GA3, a été déterminée par spectrométrie de masse après méthylation. Les analyses ont été effectuées à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse et les spectres ont été interprétés par comparaison avec des témoins.

1° Analyse structurale du produit Man_GlcNAc.

Le composé Man₂GlcNAc, provenant de l'hydrolyse (incubation de 24 h) de l'oligosaccharide OL1, a été purifié par chromatographie HPLC sur colonne de type NH₂, puis méthylé et méthanolysé.

L'interprétation des spectres de masse des méthylglycosides permet d'identifier la présence de 2,3,4-tri-O-méthyl mannose et de 2,4,6-tri-O-méthyl mannose, et les rapports molaires, établis sur la base de l'analyse par chromatographie en phase gazeuse, indique que ces deux tri-O-méthyl mannosides sont présents dans le rapport 2/1. La dégradation de l'oligosaccharide OL1 produit donc deux trisaccharides différents: $Man(\alpha 1-3)Man(\beta 1-4)GlcNAc$ et $Man(\alpha 1-6)Man(\beta 1-4)GlcNAc$. On constate toutefois une hydrolyse préférentielle du résidu de mannose lié en α -1,3.

2° Analyse structurale du produit Man, GlcNAc, Asn.

Ce composé provient de l'hydrolyse de la glyco-asparagine GA3. Cette fois, l'interprétation des spectres de masse des méthylglycosides permet d'identifier uniquement le 2,3,4-tri-O-méthyl mannose.

L'absence de 2,4,6-tri-O-méthyl mannose confirme donc que l'unique produit d'hydrolyse de la glyco-asparagine GA3 possède la structure suivante : $Man(\alpha 1-6)Man(\beta 1-4)GlcNAc(\beta 1-4)GlcNAc(\beta 1-N)Asn$.

III) CONCLUSION

La dégradation lysosomique de l'oligosaccharide Man_9 GlcNAc est donc réalisée en deux étapes: la première conduit à l'oligosaccharide Man_5 GlcNAc par hydrolyse préférentielle des résidus de mannose liés en α -1,2 et la seconde, Zn^{2+} -dépendante, du Man_5 GlcNAc au Man(B1-4)GlcNAc après hydrolyse des résidus liés en α -1,3 puis α -1,6.

Une extrapolation de ces résultats et des nombreux autres concernant le catabolisme des N-glycosylprotéines permet de conclure que le catabolisme lysosomique des glycannes de type oligomannosidique est réalisé en quelques étapes successives et distinctes:

- 1 Intervention de deux endoglycosidases: l'aspartyl-N-acétyl-ß-Dglucosaminidase, puis l'endo-N-acétyl-ß-D-glucosaminidase,
- 2 Action d'α-1,2-mannosidases ne nécessitant la présence d'aucun effecteur,

3 - Action d' α -1,3-/ α -1,6-mannosidases Zn²⁺-dépendantes,

4 - Hydrolyse du disaccharide Man(B1-4)GlcNAc par la B-mannosidase.

Bien que la voie mise en évidence soit ordonnée, les résultats ne permettent pas de conclure à l'existence

- de différents iso-enzymes spécifiques de chacun des résidus de mannose à libérer ou d'un type de liaison,

ou - d'une seule mannosidase dont la spécificité dépendrait de la présence d'ions Zn²⁺ et de la structure tridimensionnelle du substrat.

La dégradation de l'oligosaccharide Man_5 GlcNAc montre une hydrolyse préférentielle des liaisons α -1,3. Une étude approfondie des activités α -1,3- et α -1,6-mannosidasiques permet de confirmer cette observation. En outre, l'activité α -1,6-mannosidasique est dépendante de l'activité aspartyl-N-acétyl- β -D-glucosaminidasique. Ce résultat permet ainsi d'expliquer l'accumulation, dans les cas d'aspartylglucosaminurie et de fucosidose, de la structure dimannosylée :

Man(B1-4)GlcNAc(B1-4)GlcNAc(B1-N)Asn

ETUDE DE L' α -MANNOSIDASE CYTOSOLIQUE

L'activité α -D-mannosidasique cytosolique est initialement mise en évidence dans le foie de Rat par MARSH et GOURLAY en 1971.

Cet enzyme peut être séparé des isoenzymes lysosomiques par chromatographie sur DEAE-cellulose (CAROLL et al., 1972) ou sur Con A-Sepharose (PHILLIPS et al., 1976). Chez l'Homme, son activité est normale en cas de mannosidose. L'enzyme isolé du foie humain est thermolabile (PHILLIPS et al., 1974a; GRABOWSKI et al., 1980). Contrairement aux enzymes lysosomiques, l'activité de la mannosidase du cytosol est augmentée par les ions Co^{2+} .

Deux autres glycosidases ont été mises en évidence dans le cytosol de différents tissus animaux: il s'agit des endo-N-acétyl-B-D-glucosaminidase et α -neuraminidase. Bien que ces enzymes aient été parfaitement caractérisés, leur rôle biologique demeure relativement obscur. Ces enzymes sont-ils impliqués dans le catabolisme des glycannes des N-glycosylprotéines, ou font-ils partie d'un "système" cellulaire régulateur de la biosynthèse de ces mêmes glycannes?

Dans ce contexte, nous nous sommes proposés de déterminer la spécificité de substrat de l' α -D-mannosidase du cytosol de foie de Rat.

Les résultats obtenus, rapportés dans un article soumis pour publication à *European Journal of Biochemistry*, permettent de différencier l' α -D-mannosidase du cytosol des enzymes du lysosome, et apportent quelques renseignements quant à son rôle dans le métabolisme des glycannes liés N-glycosidiquement aux protéines.

SUBSTRATE SPECIFICITY OF RAT LIVER CYTOSOLIC α -D-MANNOSIDASE Evidence for a degradative pathway for oligomannose type oligosaccharides distinct of that of lysosomes

Jean-Francois HAEUW, Gérard STRECKER, Jean-Michel WIERUSZESKI, Jean MONTREUIL and Jean-Claude MICHALSKI

Laboratoire de Chimie Biologique et Unité Mixte de Recherche du Centre National de la Recherche Scientifique n° 111, Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois, France

Correspondence to J.C. MICHALSKI, Laboratoire de Chimie Biologique et U.M.R. du C.N.R.S. nº 111, Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

Abbreviations. Man, α -D-mannopyranose; GlcNAc, 2-deoxy-2-acetamido-Dglucopyranose; dMM, 1-deoxymannojirimycin; Man₉GlcNAc, Man(α 1-2) Man(α 1-3)[Man(α 1-2)Man(α 1-6)]Man(α 1-6)[Man(α 1-2)Man(α 1-2)Man(α 1-3)] Man(β 1-4)GlcNAc; Man₇GlcNAc, Man(α 1-3)[Man(α 1-2)Man(α 1-6)]Man(α 1-6) [Man(α 1-2)Man(α 1-3)]Man(β 1-4)GlcNAc; Man₅GlcNAc, Man(α 1-3)[Man(α 1-6)] Man(α 1-6)Man(α 1-3)]Man(β 1-4)GlcNAc; Man₄GlcNAc, Man(α 1-2)Man(α 1-2)Man(α 1-2)Man(α 1-2)Man(α 1-2)Man(α 1-3)[Man(α 1-4)GlcNAc; Man₄GlcNAc, Man(α 1-2)Man(α 1-2)Man(α 1-2)Man(α 1-3)[Man(α 1-4)GlcNAc; Man₄GlcNAc, Man(α 1-2)Man(α 1-2)Man(α 1-2)Man(α 1-3)[Man(α 1-4)GlcNAc; Man₄GlcNAc, Man(α 1-2)Man(α 1-2)Man(α 1-2)Man(α 1-3)[Man(α 1-4)GlcNAc

Enzyme. α -D-mannosidase (EC 3.2.1.24)

specificity of rat liver cytosolic neutral The substrate α -D-mannosidase was investigated by *in vitro* incubation of oligomannosyl oligosaccharides Man_oGlcNAc, Man_oGlcNAc, Man_oGlcNAc and Man_oGlcNAc with a crude cytosolic fraction. The different oligosaccharides isomers resulting from mannosidase hydrolysis were separated by HPLC and analyzed by ¹H-NMR spectroscopy after HPLC separation. The enzyme is able to hydrolyse all types of mannose linkages found in oligomannose type glycans, respectively α -1,2, α -1,3 and α -1,6. Nevertheless the enzyme is much greater active on branched Man_oGlcNAc or Man_cGlcNAc oligosaccharides and rather inactive towards the linear Man,GlcNAc oligosaccharide. Structural analysis of the reaction products of $Man_{s}GlcNAc$ and $Man_{a}GlcNAc$ by the soluble mannosidase gives respectively Man_GlcNAc and Man_GlcNAc oligosaccharides. This Man_GlcNAc is a limit linear isomer, $Man(\alpha 1-2)Man(\alpha 1-2)Man(\alpha 1-3)[Man(\alpha 1-6)]Man(\beta 1-4)GlcNAc$, which represents the "construction" Man_s oligosaccharide chain of the dolichol pathway formed in the cytosolic compartment during the biosynthesis of N-glycoprotein glycans. The soluble mannosidase shows a highly specific action different from that previously described for the lysosomal α -mannosidases (Michalski et al., 1990, Eur. J. Biochem. 189, 369-379). The enzyme is activated by Co²⁺, insensitive to dMM but deeply inhibited by swainsonine in the presence of Co^{2^+} ions.

Multiple forms of α -D-mannosidase able to hydrolyze all types of mannosidic linkages found in oligomannosidic glycans are widely distributed in mammalian tissues [1]. These enzymes are classicaly divided in two groups: the first one includes neutral mannosidases involved in the processing reactions occuring during biosynthetic assembly of asparagine-linked oligosaccharides, respectively endoplasmic reticular [2,3] and Golgi enzymes [4,5,6]; the second class of enzymes is responsible for the catabolism of oligomannosidic glycans and includes the cytosolic and lysosomal α -mannosidases [7,8,9]. In a previous report [10] we demonstrate that the degradation of oligomannose type oligosaccharides follows a very specific pathway inside the lysosomes. Studies on the specificity of the neutral cytosolic α -D-mannosidase [11,12] have also suggest a role for this enzyme in glycoprotein catabolism. For this reasons we decided to precisely investigate the substrate specificity of the neutral α -D-mannosidase towards natural oligosaccharides using ¹H-NMR spectroscopy for structure determination of the isomers formed during the enzymatic hydrolysis. A comparison is made with the previously described lysosomal pathway, and the results reported herein confirm a role different but parallel from the lysosomal one for the cytosolic enzyme in the catabolism of N-glycosylproteins in the rat.

Reagents

Bio-Gel P2 (200-400 mesh), Dowex 50x2 (200-400 mesh; H^{+} form) and Dowex 1x2 (200-400 mesh; CH_3COO^{-} form) were from Bio-Rad Laboratories (Touzard et Matignon, Vitry-sur-Seine, France). Swainsonine and 1-deoxymannojirimycin were from Boehringer (Mannheim, FRG.). All other chemicals were of the highest purity commercially available.

Substrates

The oligosaccharide Man₉GlcNAc was isolated from urine samples taken from patients suffering from mannosidosis as previously described [13]. The oligosaccharides Man₇GlcNAc and Man₅GlcNAc were obtained by hydrolysis of the glycoasparagines Man₇GlcNAc₂Asn and Man₅GlcNAc₂Asn, prepared from hen egg ovalbumin [14], with the endo-N-acetyl-B-D-glucosaminidase from a Basidiomycete [15]. The oligosaccharide Man₄GlcNAc was purified by reverse phase HPLC from the Man₄GlcNAc oligosaccharides mixture isolated from urine of patients with mannosidosis.

Preparation of rat liver lysosomal and cytosolic fractions

Lysosomal preparation was carried out as previously described [10] by a modification of the procedure described by Jonas [16]. The cytosolic extract was prepared as follow: rats (Wistar, 200-300 g) were starved overnight and beheaded. All subsequent steps were carried out at 4°C. Livers were homogenised in an ice-cold 250 mM sucrose solution buffered to pH 7.4 (20 mM Hepes) with a Potter-Elvehjem homogeniser (750 rpm; three strokes). The homogenate, adjusted to 5 ml buffer/g liver, was centrifuged for 60 min at 105000 g (Beckman SW 27 rotor). The supernatant was adjusted to 100% ammonium sulfate saturation and gently stirred for 60 min at 4°C. The precipitate was suspended in a 20 mM Tris-HCl pH 7.4 buffer and dialysed for 24 h at 4°C against the same buffer. The protein solution was concentrated by ultrafiltration (Millipore XM-50 filter), resuspended in a 50 mM sodium cacodylate pH 6.2 buffer and reconcentrated using the same system.

Enzyme assays

Lysosomal and cytosolic α -D-mannosidase activities were routinely assayed using p-nitrophenyl- α -D-mannopyranoside as a substrate, respectively in 200 mM sodium acetate buffer at pH 5.0 and 50 mM sodium cacodylate buffer at pH 6.2.

Inactivation of cytosolic α -D-mannosidase activity at 37°C

1 ml of cytosolic extract was incubated at 37°C and pH 6.2 in the presence or absence of 1 mM CoCl_2 for various periods of time before assay for 20 min at the same pH and temperature for α -mannosidase activity with p-nitrophenyl- α -D-mannoside. The reaction mixture contained buffer (50 µl), 6 mM p-nitrophenyl- α -D-mannoside (50 µl) and cytosolic extract (50 µl). The reaction was stopped by the addition of 1 volume of ethanol at -20°C. After centrifugation (3000 rpm; 15 min) 200 µl of the supernatant were added to 400 µl of 1 M Na₂CO₃, and the absorbance at 400 nm was measured to determine the amount of p-nitrophenol released.

Effect of CoCl, on the cytosolic α -D-mannosidase activity

The effect of Co^{2^+} on the α -mannosidase activity was investigated by preincubating the cytosolic fraction for 15 min at 37°C with varying concentrations of CoCl_2 before incubation with p-nitrophenyl- α -D-mannoside as mentioned above.

Effect of 1-deoxymannojirimycin and swainsonine on the cytosolic α -D-mannosidase activity

Cytosolic extracts were preincubated at 37° C with varying concentrations of inhibitor, 1-deoxymannojirimycin or swainsonine, in the presence or absence of 1 mM CoCl₂. After 15 min, residual α -mannosidase activity was tested as previously mentioned.

Incubations and separation of the products

For comparative kinetic studies, approximately 1 mg of each oligosaccharide Man_QGlcNAc, Man_gGlcNAc or Man_AGlcNAc was incubated at 37°C with rat liver lysosomal and cytosolic extracts for various periods of time. The lysosomal α -D-mannosidase activities were studied using the following conditions: 100 μ l of lysosomal homogenate were added to 1 mg of substrate dissolved in 100 μ l of 200 mM sodium acetate pH 5.0 buffer. Same quantity of homogenate was added after 4 h because of enzyme denaturation [10]. When Man₅GlcNAc was used as a substrate, Zn(CH₃COOH)₂ was added to a final concentration of 2.5 mM [10]. To study the cytosolic α -D-mannosidase, 100 μ l of the cytosolic fraction were added to 1 mg of the substrate dissolved in 100 μ l of 50 mM sodium cacodylate pH 6.2 buffer containing 2 mM CoCl. The products of hydrolysis were analysed as previously described [10]. HPLC analysis were performed on primary bonded silica, 5 μ m Supelcosyl LC-NH₂ column (0.4x25 cm, Supelco Inc., Bellefonte, Pennsylvania). For H-NMR studies of the products resulting from the action of the cytosolic α -D-mannosidase, 5 mg of the different substrates were digested in the conditions mentioned above. MangGlcNAc and MangGlcNAc oligosaccharides were incubated for 2 h whereas Man_gGlcNAc was incubated only for 1 h before stopping the reaction and purifying the different isomers by HPLC.



¹H-NMR analysis

¹H-NMR analysis of the oligosaccharides in ²H₂O (99.95%, Commissariat à l'Energie Atomique, Saclay, France) were carried on a Bruker AM-400 WB spectrometer operating in the Fourier-transform mode at a probe temperature of 300 K. Chemical shifts (δ) are given relative to acetone in ²H₂O (δ = 2.225 ppm). NMR spectra were interpreted by comparison with NMR data from the literature [17] with an accuracy of 0.002 ppm.

RESULTS

Effects of Co^{2+} on the rat liver cytosolic α -D-mannosidase activity

 Co^{2^+} had a remarkable activating effect on the rat liver cytosolic α -D-mannosidase. Concentrations of 0.5 to 2 mM caused indeed a 5.5 to 6-fold increase in the α -mannosidase activity (Fig. 1). Although the detected activities are higher than in the absence of Co^{2^+} , much higher concentrations of this ion caused a lesser effect. Furthermore Co^{2^+} appears to be most effective in stabilizing the cytosolic α -mannosidase activity. Fig. 2 shows the effect of various periods of incubation on the enzyme activity in the absence and presence of 1 mM CoCl₂. In the absence of Co^{2^+} the enzyme is very stable up to 6 h but longer periods of incubation have a dramatic effect, a 90% loss of activity being observed after 24 h. Co^{2^+} produces a significant stabilization in the activity, the loss of activity being only 25% after 24 h.

Effect of 1-deoxymannojirimycin and swainsonine on the rat liver cytosolic α -D-mannosidase.

1-deoxymannojirimycin, potent inhibitor of Golgi mannosidase I [18], displays no effect on the cytosolic α -mannosidase activity even in the presence of Co²⁺ (Fig. 3). In the absence of Co²⁺, the cytosolic



Fig. 1. Effect of Co^{2+} on the α -D-mannosidase activity in the cytosolic fraction. Activity in the absence of Co^{2+} was taken as 1.



Fig. 2. Effect of incubation at 37°C on the α-D-mannosidase activity in the cytosolic fraction in the absence (●) and presence (■) of Co²⁺ (1 mM). Results are expressed as a percentage of the activity in the unincubated cytosolic fraction.



Fig. 3. Effect of dMM and swainsonine on the α -D-mannosidase activity in the cytosolic fraction in the presence and absence of Co²⁺. Cytosolic fractions (50 µl) were first preincubated (15 min at 37°C) with varying concentrations of dMM and swainsonine before addition of substrate and incubation at 37°C for 20 min. Results are expressed as a percentage of the activity in the absence of inhibitor. dMM in the absence $_{2}^{(-)}(0)$ and presence (\odot) of Co²⁺ (1 mM), swainsonine in the absence of Co²⁺ (\square), swainsonine in the presence of Co²⁺ (\square), swainsonine in the presence of Co²⁺ (\square), swainsonine in the presence of Co²⁺ (\square).

102

activity is also relatively insensitive to swainsonine, alkaloid inhibitor of lysosomal and Golgi II α -mannosidases [19,20]. Approximately 10% inhibition of activity is observed at concentrations ranging from 1 to 10 μ M (Fig. 3). With increasing concentrations, the alkaloid causes a higher inhibition. However 70% of the enzyme activity is recovered at a concentration of 200 μ M. The cytosolic α -mannosidase is more sensitive to swainsonine in the presence of 1 mM co²⁺, with about 50% inhibition occuring at 5 to 10 μ M and further inhibition (up to 80%) occuring at much higher concentrations when Co²⁺ is added during the preincubation and incubation with the substrate (Fig. 3). However the enzyme appears less sensitive to swainsonine when Co²⁺ is only added during incubation with substrate: about 40% inhibition is observed at concentrations of 5 to 10 μ M, and 60% for higher concentrations (Fig. 3).

Specificities of rat liver lysosomal and cytosolic α -D-mannosidases for natural substrates

Three different oligosaccharides, $Man_9GlcNAc$, $Man_5GlcNAc$ and $Man_4GlcNAc$ were incubated with rat liver lysosomal and cytosolic extracts for various periods of time. Fig. 4A shows that $Man_9GlcNAc$ is rapidly converted by lysosomal α -mannosidase to $Man_8GlcNAc$ while $Man_7GlcNAc$ and $Man_6GlcNAc$ appear more slowly, less than 5% after 8 h incubation time. After prolonged incubation the substrate completely disappeared, but no traces of $Man_4GlcNAc$ or lower isomers are produced. This $Man_9GlcNAc$ hydrolysis is catalysed mainly by α -1,2-mannosidase activities which do not require any effector, whereas Zn^{2+} ions are necessary to the cleavage of α -1,3- and α -1,6-linkages [10]. By supplying the medium with Zn^{2+} ions, at a final concentration of 2.5 mM, the compound $Man_5GlcNAc$ is degraded into lower isomers. However the



Fig. 4. Time course of hydrolysis of Man₉GlcNAc oligosaccharide by rat liver (A) lysosomal α -D-mannosidase, and (B) cytosolic α -D-mannosidase with Co²⁺ (1 mM). Approximately 1 mg of Man₉GlcNAc oligosaccharide was incubated at 37°C with rat liver lysosomal and cytosolic extracts for various periods of time. Released oligosaccharides were separated by HPLC and quantified by peak integration.

Man₅GlcNAc hydrolysis is very slow, and the Fig. 5A indicates after 8 h of incubation the formation of Man₄GlcNAc, lower isomers appearing only after longer times of incubation [10]. The rate of hydrolysis of these two branched oligosaccharides by the rat liver cytosolic α -D-mannosidase is higher in comparison with the lysosomal degradation. Man₉GlcNAc and Man₅GlcNAc are indeed rapidly converted respectively into Man₅GlcNAc (Fig. 4B) and Man₃GlcNAc (Fig. 5B). These two compounds are not further hydrolysed, even after prolonged time of incubation, and will then accumulate in the incubation medium. The time course of hydrolysis of the linear Man₄GlcNAc oligosaccharide brings up another evidence for the difference in the substrate specificities of the rat liver lysosomal and cytosolic α -D-mannosidases. This oligosaccharide is a good substrate for the lysosomal α -D-mannosidase (Fig. 6A) whereas the cytosolic enzyme is poorly active towards this compound (Fig. 6B). Similar results have been demonstrated by Tulsiani and Touster [11].

¹H-NMR analysis

Each fraction separated by HPLC was analysed by 400 MHz ¹H-NMR spectroscopy.

NMR analysis of oligomannosyl oligosaccharides resulting from the cytosolic digestion of Man_oGlcNAc.

The C1H and C2H resonances of the different oligosaccharides are assembled in the table 1.

 $Man_8GlcNAc$. The compound $Man_8GlcNAc$ is an unique oligosaccharide, proceeding from $Man_9GlcNAc$ by cleavage of the $(\alpha 1-2)$ -linked $Man-\underline{D}_3$ residue. The anomeric proton region of the $Man_8GlcNAc$ ¹H-NMR spectrum



Fig. 5. Time course of hydrolysis of Man_GlcNAc oligosaccharide by rat liver (A) lysosomal α -D-mannosidase with Zn²⁺ (2.5 mM), and (B) cytosolic α -D-mannosidase with Co²⁺ (1 mM). Approximately 1 mg of Man_GlcNAc oligosaccharide was incubated at 37°C with rat liver lysosomal and cytosolic extracts for various periods of time. Released oligosaccharides were separated by HPLC and quantified by peak integration.

 $\operatorname{Man}_{\mathsf{G}}\operatorname{GlcNAc}(\blacksquare); \operatorname{Man}_{\mathsf{A}}\operatorname{GlcNAc}(\diamondsuit); \operatorname{Man}_{\mathsf{G}}\operatorname{GlcNAc}(\diamondsuit)$

Man₄GlcNAc



Fig. 6. Time course of hydrolysis of Man₄GlcNAc oligosaccharide by rat liver (A) lysosomal α -D-mannosidase, and (B) cytosolic α -D-mannosidase with Co⁻⁻ (1 mM). Approximately 1 mg of Man₄GlcNAc oligosaccharide was incubated at 37 °C with rat liver lysosomal and cytosolic extracts for various periods of time. Released oligosaccharides were separated by HPLC and quantified by peak integration. Man₄GlcNAc (\diamondsuit); Man₃GlcNAc (\blacklozenge); Man₂GlcNAc (\bigstar)
shows indeed the absence of the ClH resonance of the Man- \underline{D}_3 (δ = 5.040 ppm) and the presence of the ClH resonance of a Man<u>B</u> non substituted at δ = 4.905 (Fig. 7A).

 $Man_7 GlcNAc$. The $(\alpha 1-6)$ -linked Man-<u>B</u> residue is the second unit to be removed, as it can be deduced from the observation of the Man₇GlcNAc oligosaccharide ¹H-NMR spectrum (Fig. 7B). The Man-<u>4'</u> ClH resonance is upfield shifted at $\delta = 4.896$ ppm (α) and $\delta = 4.894$ ppm (B), and the ClH signal of the Man-<u>B</u> is absent from the anomeric proton region.

 $Man_6GlcNAc$. The $Man_6GlcNAc$ oligosaccharide proceeds from $Man_7GlcNAc$ by the cleavage of another $(\alpha l-2)$ -linked mannose residue, $Man-\underline{D}_2$. The ClH resonance of this unit is effectively absent from the anomeric proton region of the $Man_6GlcNAc$ NMR spectrum (Fig. 8A), and this absence causes the upfield shift of the $Man-\underline{A}$ ClH signals, from $\delta = 5.403$ ppm (α) and $\delta = 5.410$ ppm (β) in the $Man_7GlcNAc$ ¹H-NMR spectrum (Fig. 7B), to $\delta = 5.098$ ppm (α) and $\delta = 5.124$ ppm (β) in the $Man_6GlcNAc$ NMR spectrum (Fig. 8A).

 $Man_5GlcNAc$. The accumulated $Man_5GlcNAc$ compound is a pseudo-linear oligosaccharide lacking the $(\alpha l-3)$ -linked $Man-\underline{A}$ residue as it can be deduced from the examination of the $Man_5GlcNAc$ NMR spectrum (Fig. 8B), in which the $Man-\underline{A}$ ClH resonance is absent and the $Man-\underline{4'}$ ClH signal is upfield shifted to $\delta = 4.916$ ppm.

NMR analysis of oligomannosyl oligosaccharides resulting from the cytosolic digestion of Man₅GlcNAc

Starting from Man_5^{GlcNAc} as a substrate, the rat liver cytosolic α -D-mannosidase produces only Man_4^{GlcNAc} and Man_3^{GlcNAc} oligosaccharides, whose C1H and C2H resonances are presented in the Table 2.





liver cytosolic α -D-mannosidase.





liver α -D-mannosidase.

Table 1. ¹H chemical shifts of structural reporter groups of constituent monosaccharides for oligosaccharides resulting from the hydrolysis of $Man_{g}GlcNAc$ by the rat liver cytosolic α -D-mannosidase M, mannose; GN, N-acetylglucosamine; n.d., not determined

Proton Residue Chemical shift in

		Man ₈ GlcNAc	Man ₇ GlcNAc	Man ₆ GlcNAc	Man ₅ GlcNAc
		M-M M-M-M-GN	M-M-M-GN M-M-M	M M-GN M-M-M	M M-GN
		ppm			
C1H	2α 2β 3α 3β $4\alpha,\beta$ $4'\alpha$ $4'\beta$ $A\alpha$ $A\beta$ B C D_{1} $D_{2}\beta$	5.228 4.714 4.775 4.771 5.334 4.872 4.870 5.399 5.407 4.905 5.305 5.046 5.055 5.060	5.231 n.d. 4.776 4.769 5.338 4.896 4.894 5.403 5.403 5.410 - 5.305 5.046 5.056 5.060	5.249 n.d. 4.777 4.768 5.343 4.899 4.895 5.098 5.124 - 5.301 5.044 -	5.212 4.722 4.778 4.769 5.342 4.916 n.d. - - 5.300 5.044 -
С2Н	3α 3β 4α,β 4'α 4'β Αα Αβ Β C D D D D D 2	4.236 4.226 4.106 4.156 4.152 4.087 n.d. 3.984 4.106 4.065 4.069	4.233 4.226 4.103 4.146 n.d. 4.08 n.d. - 4.103 4.065 4.069	4.237 4.228 4.105 4.134 4.130 4.05 4.065 - 4.105 4.065 -	4.241 4.232 4.083 3.977 3.972 - - 4.104 4.064 -

 $Man_4GlcNAc$. The $Man_4GlcNAc$ intermediate proceeds from $Man_5GlcNAC$ by cleavage of the $(\alpha l-6)$ -linked $Man-\underline{B}$ residue. The $Man-\underline{4'}$ ClH resonance appears consequently upfield shifted at $\delta = 4.895$ ppm (Fig. 9A). The proposed structure is confirmed by the presence of $Man-\underline{A}$ and $Man-\underline{4}$ ClH signals, respectively at $\delta = 5.096$ ppm (\underline{A}, α) , $\delta = 5.122$ ppm (\underline{A}, β) and δ = 5.107 ppm (4).

 $Man_3GlcNAc$. The Man_3GlcNAc ¹H-NMR spectrum (Fig. 9B) shows the presence of the C1H and C2H signals of only two α -linked residues, Man-4 and Man-4'. Thus the Man_3GlcNAc oligosaccharide was clearly identified as Man(α 1-6)[Man(α 1-3)]Man(β 1-4)GlcNAc.

NMR analysis of the Man_4 GlcNAc oligosaccharide resulting from the hydrolysis of Man_7 GlcNAc by the rat liver cytosolic α -D-mannosidase

A time course hydrolysis study reveals that the $Man_7GlcNAc$ oligosaccharide, lacking $Man-\underline{D}_1$ and \underline{D}_2 , is rapidly hydrolysed by the rat liver α -D-mannosidase into lower isomers (data not shown). A long time incubation, up to 4 h, leads to the accumulation of a $Man_4GlcNAc$ oligosaccharide which is not further degraded. 5 mg of $Man_7GlcNAc$ were incubated with the rat liver cytosolic extract, and the $Man_4GlcNAc$ product was analysed by ¹H-NMR spectroscopy. Thus three mannose residues are successively hydrolysed, respectively the $Man-\underline{D}_3$, <u>B</u> and <u>A</u>, as shown by the absence of their ClH and C2H resonances from the $Man_4GlcNAc$ NMR spectrum (Fig. 10). The presence of the $Man-\underline{4}$, $\underline{4'}$ and <u>C</u> ClH signals at δ = 5.351 ppm, δ = 4.917 ppm and δ = 5.050 ppm (Fig. 10, Table 2) confirms the proposed structure for The $Man_4GlcNAc$ oligosaccharide.

- 112 -











by the rat liver cytosolic α -D-mannosidase.

Table 2. ¹H Chemical shifts of structural reporter groups of constituent monosaccharides for the oligosaccharides $Man_4GlcNAc$ and $Man_3GlcNAc$ resulting from hydrolysis of $Man_5GlcNAc$ and for the oligosacchride $Man_4GlcNAc$ resulting from hydrolysis of $Man_5GlcNAc$ by the rat liver cytosolic α -D-mannosidase

M, mannose; GN, N-acetylglucosamine; n.d., not determined

Proton Residue Chemical shift in

		Man ₄ GlcNAc	Man GlcNAc	Man ₄ GlcNAc
		M M M-GN M	M M-GN M	M M-GN M-M
		ppm		
С1Н	2α	5.252	5.213	5.212
	2ß	4.712	4.723	4.720
	3α	4.788	4.789	4.780
	Зß	4.782	4.782	4.772
	4α,Β	5.107	5.106	5.351
	4'α	4.895	4.916	4.917
	4'ß	n.d.	n.d.	n.d.
	Αα	5.096	-	-
	АВ	5.122	-	-
	С	-	-	5.050
С2Н	3α	4.261	4.262	4.244
	3B	4.247	4.254	4.235
	4	4.074	4.070	4.105
	4'α	4.131	3.974	3.972
	4'B	4.135	3.978	3.977
	Αα	4.050	-	-
	Aß	4.070	-	-
	Ċ	-	-	4.068

DISCUSSION AND CONCLUSION

The present work confirms previous studies concerning the effect of Co^{2+} on the cytosolic α -D-mannosidase [8,21,22], the rat liver activity being strongly enhanced and stabilized by this divalent cation. As previously described [18] 1-deoxymannojirimycin, which specifically inhibits the Golgi α -mannosidase I [18,23], displays no effect on the rat liver cytosolic α -mannosidase activity. On the contrary the plant alkaloid swainsonine, potent inhibitor of the Golgi II [20] and lysosomal [19] α -mannosidases, can inhibit the cytosolic enzyme. However the effect of this inhibitor is quite different when incubations are realized in the presence or absence of Co^{2+} . In the absence of Co^{2+} , the enzyme is indeed relatively insensitive to swainsonine whereas in the presence of Co²⁺ the inhibitory effect appears comparable to that observed for the lysosomal α -mannosidases, with 50% inhibition occuring at a concentration of 5 μ M. A similar effect of swainsonine was previously reported for the rat kidney cytosolic α -mannosidase [11]. These results strongly suggest that the cytosolic α -mannosidase may be a metalloenzyme. Cobalt-ion chelate affinity chromatography has moreover been used to purify the neutral enzyme from monkey brain [24,25]. Thus the high levels of enzyme activation and inhibition by swainsonine in the presence of Co²⁺ could result from a conformational change induced by the binding of this ion.

It is well established that the degradation of oligomannose type glycans occurs predominantly in the lysosome, but recent papers suggest a possible involvment of cytosolic α -D-mannosidase in glycoprotein catabolism [11,12]. The substrate specificity of the rat liver α -D-mannosidase has been investigated with different oligosaccharides as substrates. This enzyme displays low activity towards linear substrates

and cleaves preferentially the branched polymers, such as Man_QGlcNAc or Man,GlcNAc, whereas the lysosomal enzymes prefer linear structures. The $Man_{o}GlcNAc$ and $Man_{c}GlcNAc$ oligosaccharides are sequentially hydrolysed by the α -D-mannosidase according to the ordered pathways depicted in the Fig. 11. The Man_oGlcNAc substrate is relatively rapidly converted into a $\operatorname{Man}_{\varsigma}\operatorname{GlcNAc}$ oligosaccharide. Each step produces a single isomer, and $Man-\underline{D}_3$, \underline{B} , \underline{D}_2 and \underline{A} residues are successively released to yield an unique hexasaccharide (Fig. 11) which is not further processed. The hydrolysis of Man₅GlcNAc substrate leads by a two steps pathway to a unique Man_GlcNAc by cleavage of the Man-B and A residues (Fig. 11). These patterns are quite different from those previously described for the reticular [26] and Golgi [5,23] α -1,2-mannosidases, and also from that we have recently characterized for the lysosomal α -mannosidases [10]. Lysosomal enzymes can indeed completely degrade the Man_aGlcNAc oligosaccharide by a specific pattern which occurs in two stages: the first one leads from Man_oGlcNAc to Man_cGlcNAc by preferential cleavage of the four α -1,2-linked mannose residues, and the second one, which is $2n^{2+}$ -dependent, leads to Man(B1-4)GlcNAc by hydrolysis of the α -1,3- and α -1,6-linked residues [10]. On the contrary, the cytosolic enzyme hydrolyzes Man_oGlcNAc by a pathway quite different to give an unique hexasaccharide which has, curiously, the same structure as one of the polyprenolic intermediates synthesized on the cytosolic face of the endoplasmic reticulum during the assembly of the common precursor of N-glycosylproteins glycans [27]. The restriction of the cytosolic α -mannosidase activity towards this oligosaccharide may be attributed to the spatial conformation of this compound, which makes the $Man-D_1$ resistant to hydrolysis. This hypothesis was tested using Man, GlcNAc oligosaccharide lacking $Man-\underline{D}_1$. The degradation of this compound produces a single $Man_{4}GlcNAc$, and thus we conclude that the $Man-D_{1}$, C, 4



Α

В





Fig. 11. Proposed schemes for the degradation of (A) $Man_9GlcNAc$ and (B) Man_5GlcNAc by the cytosolic α -D-mannosidases.

and 4' are totally resistant to hydrolysis. This resistance could also correspond to a protective effect against an early degradation of the polyprenolic intermediates, which must be furtherly be used inside the lumen of the endoplasmic reticulum for complete assembly of the precursor of N-glycoproteins glycans [27]. At last the fact that lysosomal α -mannosidases prefer linear substrates while cytosolic enzymes preferentially cleave branched compounds [11] support another hypothesis according to which a possible complementarity exists between cytosolic lysosomal compartments for and the catabolism of N-glycosylprotein glycans. The catabolism of some oligomannose-type glycans could start in the cytosol by hydrolysis of branched oligosaccharides formed by the action of the previously described cytosolic endo-N-acetyl-B-D-glucosaminidase [28,29], the resulting linear oligosaccharides being transferred into the lysosomes for further hydrolysis. However, the nature of glycoproteins undergoing the cytosolic catabolism remains to be elucidated.

This research was supported in part by the Centre National de la Recherche Scientifique (Unite Mixte de Recherche nº 111: Relations structure-fonction des constituants membranaires; Directeur, Professor Jean Montreuil), by the Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois, by the Ministère de l'Education Nationale and the Ministère de la Recherche et de la Technologie. The authors are grateful to the Conseil Régional du Nord-Pas de Calais, the Centre de la National de la Recherche Scientifique, the Ministère de la Recherche et de la Technologie, the Ministère de l'Education Nationale and the Association pour la Recherche sur le Cancer for their contribution to the acquisition of the 400 MHz spectrometer.

- 1. Winchester, B.G. (1984) Biochem. Soc. Trans. 12, 522-524.
- 2. Bischoff, J. & Kornfeld, R. (1983) J. Biol. Chem. 258, 7907-7910.
- 3. Schweden, J., Legler, G. & Bause, E. (1986) Eur. J. Biochem. 157, 563-570.
- 4. Tulsiani, D.R.P., Hubbard, S.C., Robbins, P.W. & Touster, O. (1982) J. Biol. Chem. 257, 3660-3668.
- 5. Tabas, I. & Kornfeld, S. (1979) J. Biol. Chem. 254, 11655-11663.
- Monis, E., Bonay, P. & Hughes, R.C. (1987) Eur. J. Biochem. 168, 287-294.
- Caroll, M., Dance, N., Masson, P.K., Robinson, D. & Winchester, B.G. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 49, 579-583.
- 8. Shoup, V.A. & Touster, O. (1976) J. Biol. Chem. 251, 3845-3852.
- 9. Opheim, D.J. & Touster, O. (1978) J. Biol. Chem. 253, 1017-1023.
- 10. Michalski, J.C., Haeuw, J.F., Wieruszeski, J.M., Montreuil, J. & Strecker, G. (1990) Eur. J. Biochem. 189, 369-379.
- 11. Tulsiani, D.R.P. & Touster, O. (1987) J. Biol. Chem. 262, 6506-6514.

- 12. Degasperi, R., Al Daher, S., Hall, N., Winchester, B. & Warren, C.D. (1989) Biochem. Soc. Trans. 17, 1036-1037.
- 13. Strecker, G., Fournet, B., Bouquelet, S., Montreuil, J., Dhondt, J.L. & Farriaux, J.P. (1976) Biochimie (Paris) 58, 579-586.
- 14. Montgomery, R. & Yu, Y. (1963) J. Biol. Chem. 238, 3547-3554.
- 15. Bouquelet, S., Strecker, G., Montreuil, J. & Spik, G. (1980) Biochimie (Paris) 62, 43-49.
- 16. Jonas, A.J. (1986) Biochem. J. 236, 671-677.
- 17. Vliegenthart, J.F.G., Dorland, C. & Van Halbeek, H. (1983) Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 41, 343-374.
- 18. Bischoff, J. & Kornfeld, S. (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 125, 324-331.
- 19. Dorling, P.R., Huxtable, C.R. & Colegate, S.M. (1980) Biochem. J. 191, 649-651.
- 20. Tulsiani, D.R.P., Harris, T.M. & Touster, O. (1982) J. Biol. Chem. 257, 7936-7939.
- 21. Phillips, N.C., Robinson, D., Winchester, B.G. & Jolly, R.D. (1974) Biochem. J. 137, 363-371.

- 22. Phillips, N.C., Robinson, D. & Winchester, B.G. (1974) Clin. Chim. Acta 55, 11-19.
- 23. Tulsiani, D.R.P. & Touster, O. (1988) J. Biol. Chem. 263, 5408-5417.
- 24. Mathur, R. & Balasubramanian, A.S. (1984) Biochem. J. 222, 261-264.
- 25. Mathur, R., Panneerselvam, K. & Balasubramanian, A.S. (1988) Biochem. J. 253, 677-685.
- 26. Bischoff, J., Liscum, L. & Kornfeld, R. (1986) J. Biol. Chem. 261, 4766-4774.
- 27. Snider, M.D. & Rogers, O.C. (1984) Cell 36, 753-761.
- 28. Pierce, R.J., Spik, G. and Montreuil, J. (1979) Biochem. J. 180, 673-676.
- 29. Pierce, R.J., Spik, G. and Montreuil, J. (1980) Biochem. J. 185, 261-264.

CONCLUSION

Les α -D-mannosidases cytosoliques et lysosomiques du foie de Rat possèdent des spécificités différentes vis-à-vis de substrats naturels. Les mannosidases du lysosome sont plus actives vis-à-vis de substrats linéaires, tandis que les mannosidases du cytosol hydrolysent préférentiellement les substrats de type branché. Une telle observation avait d'ailleurs déjà été réalisée par **TULSIANI et TOUSTER** (1987) pour les enzymes du rein de Rat. Si les α -D-mannosidases du lysosome sont capables de complètement dégrader tous les types d'oligosaccharides, l' α -D-mannosidase du cytosol n'effectue par contre qu'une hydrolyse partielle des composés de type branché comme les oligosaccharides Man_oGlcNAc, Man₇GlcNAc ou Man₅GlcNAc.

Ces résultats ainsi que plusieurs autres, et notamment l'activation de l'activité par le cobalt et le fait qu'elle ne soit pas retenue par chromatographie sur Con A-Sepharose (Fig. 15), permettent ainsi de distinguer la mannosidase du cytosol des autres mannosidases cellulaires.

Ces observations sont à la base des hypothèses suivantes:

- Les résultats suggèrent l'existence d'une synergie entre les compartiments cytosolique et lysosomique: la dégradation de certains oligosaccharides de type branché, libérés par l'action de l'endo-Nacétyl-B-D-glucosaminidase cytosolique (**PIERCE et al., 1979; 1980**), débuterait dans le cytosol, et les produits linéaires formés seraient ensuite conduits vers les lysosomes pour la poursuite de l'hydrolyse par l'intermédiaire d'un transporteur dont la présence reste toutefois à démontrer.



Fig. 15 : Chromatographie sur colonne de concanavaline A-Sepharose de l' α -D-mannosidase cytosolique du foie de Rat.

- Le fait que l' α -D-mannosidase cytosolique soit incapable de dégrader les composés de type linéaire est en faveur d'un système protecteur des intermédiaires polyprénoliques élaborés sur la face cytoplasmique du reticulum endoplasmique rugueux, ces intermédiaires étant ensuite utilisés dans le lumen du reticulum pour la biosynthèse des glycannes des N-glycosylprotéines.

ETUDE DES α -D-MANNOSIDASES DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE RUGUEUX ET DE L'APPAREIL DE GOLGI

Contrairement aux α -D-mannosidases cytosoliques et lysosomiques pour lesquelles peu de renseignements étaient disponibles quant à leur exacte spécificité de substrat, le rôle des α -mannosidases du reticulum endoplasmique rugueux et de l'appareil de Golgi dans les processus de maturation des glycannes des N-glycosylprotéines est depuis longtemps établi.

La mise au point d'une méthode qui associe la chromatographie HPLC et la résonance magnétique nucléaire a permis d'établir la spécificité des α -D-mannosidases du lysosome et du cytosol de foie de Rat et, bien que la spécificité des enzymes du reticulum endoplasmique rugueux et de l'appareil de Golgi soit connue, nous nous sommes proposé de vérifier les résultats concernant certains de ces enzymes en appliquant cette méthodologie. L'établissement de différentes séquences d'hydrolyse permet ainsi une comparaison des différentes activités α -D-mannosidasiques cellulaires.

I- <u>L'α-D-MANNOSIDASE DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE R</u>UGUEUX.

La mannosidase du reticulum endoplasmique rugueux est une α -1,2-mannosidase. Cet enzyme intervient, dans le processus de maturation des glycannes liés N-glycosidiquement aux protéines, aprés hydrolyse des résidus de glucose par les glucosidases I et II.

En vue de préciser la spécificité de cet enzyme, l'oligosaccharide Man₉GlcNAc a été incubé avec la fraction de reticulum endoplasmique rugueux isolé du foie de Rat.

A) RESULTATS.

1° Conditions d'incubation et séparation des produits.

Cette étude a été réalisée à pH 6,0 en présence de Triton X-100 et de deux inhibiteurs d'activités α -D-mannosidasiques: la dMM, inhibiteur de la mannosidase I de l'appareil de Golgi (**BISCHOFF et KORNFELD, 1984**; **TULSIANI et TOUSTER, 1988**), et la swainsonine, inhibiteur des α -mannosidases lysosomiques (**DORLING et al., 1980**). Ces inhibiteurs ont été utilisés à des concentrations, respectivement de 50 et 20 μ M, provoquant des inhibitions de 90% des activités mentionnées.

Après 36 heures d'incubation à 37°C, 50% du substrat sont hydrolysés et on observe la formation de trois composés: $Man_8GlcNAc$ (86%), $Man_7GlcNAc$ (11%) et $Man_6GlcNAc$ (3%). Ces différents produits ont été séparés par HPLC sur colonne de type NH_2 (Fig. 16) puis analysés par RMN du proton à 400 MHz.



Fig. 16: Analyse HPLC des oligosaccharides formés après 36 heures d'hydrolyse du composé Man₉GlcNAc par la mannosidase du reticulum endoplasmique rugueux.

2° Analyse des produits formés par RMN du proton à 400 MHz.

a) Identification des oligosaccharides MangGlcNAc.

Le composé Man₈GlcNAc II est aisément identifié par la présence, dans la zone des protons anomériques, des signaux caractéristiques d'un résidu de mannose <u>A</u> non substitué à δ = 5,073 ppm (α) et δ = 5,102 ppm (B) (Fig. 17 et Tableau IV) . De même, la présence de l'isomère Man₈GlcNAc III est attestée par l'observation du glissement chimique à δ = 4,905 ppm (Fig. 17 et Tableau IV) caractéristique du proton H-1 d'un résidu de mannose <u>B</u> en position terminale non réductrice. Enfin l'isomère Man₈GlcNAc I ne peut être identifié avec certitude, le glissement chimique du proton H-1 d'un résidu de mannose <u>C</u> terminal, à δ = 5,055 ppm, étant identique à celui du résidu <u>D</u>₂ α (Fig. 17 et Tableau IV).

L'analyse de nombreux spectres de RMN d'oligosaccharides de type oligomannosidique permet d'attribuer deux glissements chimiques différents au proton H-1 du résidu de N-acétylglucosamine 2, lorsque ce résidu se trouve en configuration α , selon la présence ou l'absence du résidu de mannose \underline{D}_2 : δ = 5,230 ppm si le résidu \underline{D}_2 est présent contre δ = 5,250 ppm si ce dernier résidu est absent (**MICHALSKI et al., 1990**). Les signaux à δ = 5,228 et 5,248 ppm (Fig. 17) confirment ainsi le mélange d'isomères. L'intégration de ces deux signaux permet de conclure que l'isomère Man_gGlcNAc II représente environ 80% du mélange.

b) Identification des oligosaccharides Man₇GlcNAc.

La fraction Man₇GlcNAc est également un mélange. Le signal à δ = 5,247 ppm relatif au proton H-1 d'un résidu de N-acétylglucosamine 2α prouve l'absence du résidu de mannose <u>D</u>₂ des oligosaccharides Man₇GlcNAc





Tableau IV: Glissements chimiques des protons H-1 et 2 des résidus de mannose et H-1 du résidu de N-acétylglucosamine des oligosaccharides Man₈GlcNAc résultant de l'hydrolyse de l'oligosaccharide Man₉GlcNAc par la mannosidase du reticulum endoplasmique rugueux. M, mannose; GN, N-acétylglucosamine; n.d., non déterminé.

Proton	Résidu	Glissement chimique (δ) en ppm			
		Man _g GlcNAc I	Man _g GlcNAc II	Man _g GlcNAc III	
		M-M	M-M	M	
		M-M M-M	M M-GN M-M-M	M-M M-GN M-M-M	
	2	E 339	5 248	5.228	
H-1	20	5,220 5 d	4 706	n.d.	
	2~ 0	n.d.	4,700 n d	n.d.	
	20,12	n.u. 5 3 <i>1</i> 2	5.342	5.342	
	41 // 1	1 870	4-870	4.870	
	4 1~	5,40	5.073	5,40	
	AG AR	5,40	5,102	5,40	
	R	5,143	5,148	4,905	
	C	5,055	5,306	5,306	
	D D	-	5,042	5,042	
	$\mathbf{D}^{1}\alpha$	5.055	_	5,055	
	$D^2 \hat{B}$	5,060	_	5,060	
	D ₂ ² D ₃	5,042	5,042	_	
и	3~	4 245	4.238	4.245	
n-2	38	4,245	4.231	4,238	
	4	4,130	4,106	4,106	
	- 4'α	4,151	4.151	4,151	
	4'B	4.145	4,145	4,145	
	Αα	4,090	4,049	4,090	
	Aß	4,102	4,106	4,102	
	B	4,027	4,027	3,988	
	C	4,074	4,072	4,072	
	D.	-	4,064	4,064	
		4,069	-	4,069	
	D ₃ ²	4,072	4,072	-	

Tableau V: Glissements chimiques des protons H-1 et 2 des résidus de mannose et H-1 du résidu de N-acétylglucosamine des oligosaccharides Man₇GlcNAc résultant de l'hydrolyse de l'oligosaccharide Man₉GlcNAc par la mannosidase du reticulum endoplasmique rugueux.

M, mannose; GN, N-acétylglucosamine, n.d., non déterminé.

Proton Résidu		Glissement chimique (δ) en ppm			
		Man ₇ GlcNAc	I	Man ₇ GlcNAc II	
		M		M-M M	
	- 	M M-GN M-M-M		M M-GN M-M	
H-1	2α	5,247		5,247	
	2ß	n.d.		n.d.	
	3	n.d.		n.d.	
	4	5,342		5,342	
	4'	4,872		4,872	
	Αα	5,078		5,106	
	Aß	5,078		5,106	
	В	4,910		5,148	
	С	5,306		5,054	
		5,042		-	
	D_3	-		5,042	
H-2	3α	4,247		4,247	
	3ß	4,240		4,240	
	4	4,130		4,130	
	4'α 4'β	4,146		4,146	
	Аα Аβ	4,05		4,05	
	В	3,986		4,023	
	С	4,10		4,070	
	D,	4,070		-	
	D ₃	-		4,070	

formés et lève l'ambiguité dûe au signal à δ = 5,408 ppm, celui-ci étant ainsi attribué à du matériel non oligosaccharidique (Fig. 17) et non à un résidu de mannose <u>A</u> substitué. Le dédoublement des signaux relatifs aux protons H-1 des résidus de mannose <u>B</u>, à δ = 4,910 et 5,148 ppm, et <u>C</u>, à δ = 5,306 et 5,044 ppm, confirme les structures proposées des deux isomères en mélange (Fig. 17, Tableau V).

B) DISCUSSION ET CONCLUSION.

Les structures déterminées permettent de préciser la séquence d'hydrolyse schématisée sur la figure 18. La première étape consiste en l'hydrolyse préférentielle (80%) du résidu de mannose \underline{D}_2 lié en α -1,2 (Fig. 18). On constate pourtant la formation de deux autres isomères Man_gGlcNAc. Les étapes suivantes conduisent par hydrolyse d'autres résidus de mannose liés en α -1,2, les résidus \underline{D}_3 et \underline{D}_1 , à des composés "inférieurs" Man₇GlcNAc et Man₆GlcNAC (Fig. 18). Toutefois la fraction Man₆GlcNAc ayant été isolée en quantité trop faible, les structures proposées sur la figure relèvent de l'hypothèse selon laquelle seuls des résidus de mannose liés en α -1,2 peuvent être hydrolysés par la mannosidase du reticulum endoplasmique (**BISCHOFF et KORNFELD, 1983**).

Ce résultat est en accord avec les études précédentes de **BISCHOFF** et **KORNFELD** (1983) qui ont en effet montré que la mannosidase du reticulum endoplasmique rugueux du foie de Rat était capable de libérer des résidus de mannose de différents oligosaccharides de type oligomannosidique contenant de 6 à 9 résidus de mannose. La HMG-CoA réductase et l' α_1 -glycoprotéine acide, protéines respectivement isolées du reticulum de cellules CHO et d'hépatocytes de Rat, contiennent en effet majoritairement le glycanne Man₈GlcNAc₂ sans résidu de mannose <u>D</u>₂ (**BISCHOFF** et al., 1986; SILVANOVICH et JAMIESON, 1989). Toutefois, la



Fig. 18 : Représentation schématique des différentes étapes d'hydrolyse de l'oligosaccharide Man₉GlcNAc par la mannosidase du reticulum endoplasmique rugueux.

HMG-CoA réductase, glycoprotéine résidente du reticulum, contient aussi des glycannes comportant 7 et 6 résidus de mannose (**LISCUM et al., 1983**; **BISCHOFF et al., 1986**), et les deux oligosaccharides Man₇GlcNAc isolés de cette protéine, après digestion par la pronase et l'endo-N-acétyl-ß-D-glucosaminidase H (**BISCHOFF et al., 1986**), possèdent des structures identiques à celles décrites dans notre étude.

BISCHOFF et al. (1986) attribuent la formation de ces glycannes à deux activités α -1,2-mannosidasiques différentes présentes au niveau du reticulum endoplasmique. La première activité, décrite par **BISCHOFF** et KORNFELD en 1983, interviendrait dans les processus co-traductionnels de maturation glycannique de toutes les N-glycosylprotéines, qu'elles soient endocellulaires ou destinées à être secrétées. Après action des glucosidases I et II, celle-ci hydrolyse spécifiquement le résidu de mannose \underline{D}_2 . Une seconde activité, sensible à la dMM, serait par contre responsable de la poursuite de la maturation des glycannes des protéines résidant dans le reticulum endoplasmique, et donc de la formation des glycannes de type Man₂- et Man₆GlcNAc₂.

Nos résultats ne permettent pas de distinguer ces deux activités. Toutefois, l'incubation ayant été réalisée en présence de dMM, l'accumulation de l'oligosaccharide Man₈GlcNAc II peut être corrélée à une inhibition de cette seconde activité.

II- LES MANNOSIDASES I DE L'APPAREIL DE GOLGI.

Deux activités α -1,2-mannosidasiques, possédant des spécificités de substrat différentes, ont été caractérisées dans l'appareil de Golgi:

- Une endomannosidase: cet enzyme possède une spécificité restreinte aux oligosaccharides de type oligomannosidique glucosylés, et libère, en une seule étape, des chaînons (Glc)_nMan à partir d'oligosaccharides du type (Glc)_nMan₉GlcNAc₂ (LUBAS et SPIRO, 1987; 1988).

- Les mannosidases I: deux formes, IA et IB, peuvent être séparées par chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose. Ces iso-enzymes hydrolysent les résidus de mannose liés en α -1,2 de différents oligosaccharides de type oligomannosidique (**TULSIANI et al., 1982b**).

A) RESULTATS.

Une cinétique d'hydrolyse de l'oligosaccharide $Man_9GlcNAc$ par l' α -mannosidase I de l'appareil de Golgi de foie de Rat a été suivie par analyse chromatographique sur couche mince (Fig. 19). Le substrat a été incubé à pH 6,0 et 37°C avec la fraction golgienne de foie de Rat en présence de Triton X-100. La mannosidase I convertit cet oligosaccharide en des produits comportant de 5 à 8 résidus de mannose (Fig. 19). Après 2 heures d'incubation, on observe la formation des oligosaccharides $Man_8GlcNAc$ (22%), $Man_7GlcNAc$ (35%), $Man_6GlcNAc$ (30%) et $Man_5GlcNAc$ (13%). Après 6 heures d'incubation l'oligosaccharide $Man_5GlcNAc$ devient le produit majeur, et des incubations plus longues voient ce produit s'accumuler dans le milieu réactionnel.



Fig. 19 : Suivi par chromatographie sur couche mince de la cinétique d'hydrolyse de l'oligosaccharide Man_gGlcNAc par la mannosidase I de l'appareil de Golgi. 2 migrations ascendantes dans le solvant n-butanol- acide acétique- eau (2:1:1,5 v/v).

Ligne 1: témoin Man₉GlcNAc. Lignes 2 à 6: temps d'incubation 1/2, 1, 2, 4 et 6 heures. Ligne 7: mélange témoin d'oligosaccharides de type oligomannosidique, Man₂GlcNAc à Man₉GlcNAc, isolés d'urine de patients atteints de mannosidose. Dans le but de déterminer la structure des différents intermédiaires formés, 5 mg de l'oligosaccharide Man₉GlcNAc ont été incubés pendant 2 h et les produits formés ont été purifiés par chromatographie HPLC sur colonne de type NH₂ et analysés par RMN du proton à 400 MHz.

B) ANALYSE DES PRODUITS FORMES PAR RMN DU PROTON A 400 MHz.

1° Identification des oligosaccharides MangGlcNAc.

Les glissements chimiques $\delta = 5,079$, 5,102 et 4,905 ppm (Fig. 20 et Tableau VI), caractéristiques de protons H-1 de résidus de mannose <u>A</u> et <u>B</u> terminaux, attestent de la présence des oligosaccharides Man₈GlcNAc II et III. L'oligosaccharide Man₈GlcNAc I est principalement détecté par la présence du signal à $\delta = 5,057$ ppm. Ce signal, confondant les signaux relatifs aux protons anomériques de résidus <u>D</u>₂ α et <u>C</u> terminaux, possède en effet une intensité supérieure à celui du proton H-1 du résidu <u>D</u>₂ β (Fig. 20).

L'intégration des signaux à δ = 5,228 et 5,246 ppm, relatifs au résidu de N-acétylglucosamine 2α , permet de conclure que le mélange d'oligosaccharides contient 50% du composé Man_gGlcNAc II.

2° Identification des oligosaccharides Man₇GlcNAc.

On observe de nouveau le dédoublement des signaux du résidu de N-acétylglucosamine 2α (Fig. 20) et, par conséquent, la complexité des oligosaccharides Man₇GlcNAc produits. L'absence de signaux caractéristiques de résidus de mannose <u>4</u> terminal ou <u>4'</u> monosubstitué prouve que chacun des isomères contient les résidus <u>A</u>, <u>B</u> et <u>C</u>.



Fig. 20 : Spectres de RMN des oligosaccharides Man₈GlcNAc (A) et Man₇GlcNAc (B) formés après hydrolyse de l'oligosaccharide Man₉GlcNAc par la mannosidase I de l'appareil de Golgi.

Tableau VI : Glissements chimiques (δ) des protons H-1 et 2 des résidus de mannose et H-1 du résidu de N-acétylglucosamine des oligosaccharides Man₈GlcNAc résultant de l'hydrolyse de l'oligosaccharide Man₉GlcNAc par la mannosidase I de l'appareil de Golgi.

M, mannose; GN, N-acétylglucosamine; n.d., non déterminé.

Proton Résidu Glissement chimique (δ) en ppm				
		Man ₈ GlcNAc I	Man ₈ GlcNAc II	Man ₈ GlcNAc III
		M-M	M-M	M
		M-M M-GN	M M-GN M-M-M	M-M M-GN M-M-M
H-1	2α	5,228	5,246	5,228
	2ß	4,713	4,706	4,713
	3α	4,788	4,776	4,766
	Зß	4,783	4,771	4,771
	4	5,34	5,34	5,34
	4'α	4,871	4,871	4,871
	4'ß	n.d.	n.d.	n.d.
	Αα	5,394	5,079	5,399
	Аß	5,403	5,102	5,406
	в	5,143	5,139	4,905
	с	5,057	5,303	5,303
	D,	_	5,044	5,044
	$D_{\alpha}^{1}\alpha$	5,057	_	5,057
	D ² B	5,062	-	5,062
	D ₃ ²⁻²	5,038	5,038	_
н-2	3α	4,263	4,238	4,238
	3ß	4,255	4,228	4,228
	4	4,130	4,130	4,130
	4'α	4,15	4,15	4,15
	4'B	n.d.	n.d.	n.d.
	Αα	4,088	4,048	4,088
	Aß	4,102	n.d.	4,102
	в	4,020	4,020	3,986
	с	4,069	4,10	4,10
	D.	- · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	4,069	4,069
		4,069	-	4,069
	⁻ 2 D	4,069	4,069	-
	3	•	·	

Tableau VII : Glissements chimiques des protons H-1 et 2 des résidus de mannose et H-1 du résidu de N-acétylglucosamine des oligosaccharides Man_GlcNAc résultant de l'hydrolyse de l'oligosaccharide Man_GlcNAc par la mannosidase I de l'appareil de Golgi. M, mannose; GN, N-acétylglucosamine; n.d., non déterminé.

Proton Résidu Glissement chimique (δ) en ppm				
		Man ₇ GlcNAc I	Man _J GlcNAc II	Man ₇ GlcNAc III
		M	M	м-м
		M M-GN	M-M M-GN	M-GN
		м-м-м	м-м	M-M
н-1	2α	5,246	5,228	5,246
	2ß	4,706	4,713	4,706
	3α	4,776	4,776	4,776
	3ß	4,772	4,772	4,772
	4	5,350	5,343	5,343
	4'α	4,872	4,872	4,872
	4'B	n.d.	n.d.	n.d.
	Αα	5,081	5,399	5,081
	Aß	5,104	5,405	5,104
	В	4,909	4,909	5,144
	С	5,301	5,055	5,055
	D,	5,041	-	-
	D_α	-	5,055	-
	ວ້β	-	5,060	-
	D_3^2	-	-	5,041
H-2	3α	4.238	4,238	4,238
	3ß	4,228	4,228	4,228
	4	4,130	4,130	4,130
	4'α	4,156	4,156	4,156
	4'B	4,151	4,151	4,151
	Αα	4,049	4,088	4,049
	Aß	n.d.	n.d.	n.d.
	В	3,981	3,981	4,020
	С	4,106	4,071	4,071
	D,	4,071	-	-
		-	4,071	-
	D_2^2	-	-	4,071
	D_3^2	-	~	4,071

Les trois oligosaccharides $Man_7GlcNAc$ I, II et III sont ainsi caractérisés par la présence de signaux relatifs aux protons H-1 de résidus de mannose <u>C</u> (δ = 5,301 ppm), <u>A</u> (δ = 5,399 (α) et 5,405 (β) ppm) et <u>B</u> (δ = 5,144 ppm) substitués respectivement par les résidus de mannose <u>D</u>₁, <u>D</u>₂ et <u>D</u>₃ (Fig. 20 et Tableau VII).

Après intégration des signaux relatifs aux protons H-1 du résidu de N-acétylglucosamine 2α , on constate que 60% du mélange sont représentés par l'isomère Man₇GlcNAc II. L'intensité relative du signal confondant les protons anomériques des résidus de mannose $\underline{D}_2 \alpha$ et <u>C</u> terminaux (Fig. 20) confirme cette conclusion.

3° Identification des oligosaccharides Man₆GlcNAc.

La présence du signal à δ = 5,094 ppm, caractéristique d'un résidu de mannose <u>4</u> non substitué, atteste la présence des oligosaccharides Man₆GlcNAc II et III (Fig. 21 et Tableau VIII). La présence de ces deux isomères se voit confirmée par les signaux relatifs aux protons anomériques de résidus <u>A</u> substitué, δ = 5,395 (α) et 5,403 (β) ppm (isomère II), et B substitué à δ = 5,142 ppm (isomère III).

L'absence de signal à δ = 4,890 ppm caractéristique d'un résidu de mannose <u>4'</u> mono-substitué et la présence du signal à δ = 5,349 ppm relatif d'un résidu <u>4</u> substitué par le résidu <u>C</u> (δ = 5,052 ppm) permettent d'identifier l'isomère Man₆GlcNAc I (Fig. 21 et Tableau VIII).

La comparaison des intensités des signaux relatifs au proton H-1 du résidu de N-acétylglucosamine 2α (δ = 5,245 et 5,228 ppm) (Fig. 21) permet de conclure que le mélange des oligosaccharides Man₆GlcNAc contient 50% de l'isomère II.


Fig. 21 : Spectres de RMN des oligosaccharides Man₆GlcNAc (A) et Man₅GlcNAC (B) résultant de l'hydrolyse de l'oligosaccharide Man₉GlcNAc par la mannosidase I de l'appareil de Golgi.

Tableau VIII : Glissements chimiques (δ) des protons H-1 et 2 des résidus de mannose et H-1 du résidu de N-acétylglucosamine des oligosaccharides Man₆GlcNAc et Man₅GlcNAc résultant de l'hydrolyse de l'oligosaccharide Man₉GlcNAc par la mannosidase I de l'appareil de Golgi.

M, mannose; GN, N-acétylglucosamine; n.d., non déterminé.

Proton Résidu Glissement chimique (δ) en ppm

Man₆GlcNAc I Man₆GlcNAc II Man₆GlcNAc III Man₅GlcNAc

		M	M	M-M	M
		M M-GN	M-M M-GN	M M-GN	M M-GN
		м-м	M	M	M
H-1	2α	5,245	5,228	5,245	5,245
	2ß	4,706	4,713	4,706	4,709
	3α	4,786	4,778	4,786	4,788
	Зß	4,782	4,773	4,782	4,782
	4	5,349	5,094	5,094	5,102
	4'α	4,872	4,872	4,872	4,872
	4'B	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	Αα	5,081	5,395	5,081	5,080
	Aß	5,107	5,403	5,107	5,106
	в	4,903	4,910	5,142	4,909
	С	5,052	-	-	-
	D,	_	-	-	-
	$D_{\alpha}^{1}\alpha$	-	5,052	-	-
	D ² B	-	5,060	-	-
	D_3^2	-	_	5,038	
H-2	3α	4,258	4.237	4,258	4.262
	38	4.237	4.230	4.237	4,250
	4	4,115	4,069	4,069	4.077
	4'α	4,155	4,155	4.155	4.145
	4'ß	4,152	4,152	4,152	4,141
	Αα	4,049	4,089	4,049	4.049
	Aß	n.d.	n.d.	n.d.	4,065
	B	3,990	3,990		3,988
	c	4.069	-	_	
	D		-	_	_
	\overline{D}^{-1}	-	4.069	_	-
		-	-	4,069	-

5° Identification des oligosaccharides Man₅GlcNAc.

L'unique oligosaccharide Man_5^{GlcNAc} est identifié grâce à l'observation des glissements chimiques δ = 5,080, 5,106, 4,909 et 5,102 ppm respectivement caractéristiques des protons H-1 de résidus de mannose <u>A</u> (α et β), <u>B</u> et <u>4</u> en position terminale non réductrice (Fig. 21 et Tableau VIII).

La présence d'un signal, relativement intense, à δ = 4,894 ppm (noté <u>4'</u> * sur la figure 21), suggère l'existence d'un second isomère Man₅GlcNAc: ce signal possède en effet un glissement chimique caractéristique d'un proton anomérique d'un résidu de mannose <u>4'</u> mono-substitué. Toutefois, la structure de ce second isomère ne peut être déterminée par l'observation du spectre.

C) DISCUSSION ET CONCLUSION.

Les différentes étapes d'hydrolyse de l'oligosaccharide $Man_9GlcNAc$ par les mannosidases IA et IB de l'appareil de Golgi consistent en l'hydrolyse des résidus de mannose \underline{D}_3 , \underline{D}_2 , \underline{D}_1 et \underline{C} liés en α -1,2 dans un ordre relativement aléatoire (Fig. 22). Les structures des nombreux isomères formés sont identiques à celles des produits obtenus lors d'études précédentes réalisées en utilisant des enzymes purifiés (Fig. 8 d'après TABAS et KORNFELD, 1979; TULSIANI et TOUSTER, 1988).

La première étape consiste, comme au niveau du reticulum endoplasmique, en l'hydrolyse préférentielle du résidu de mannose \underline{D}_2 . Toutefois ce résidu \underline{D}_2 semble assez résistant à l'hydrolyse s'il n'est pas éliminé dès la première étape. On constate, en effet, que les mélanges d'oligosaccharides Man_7^- et $Man_6GlcNAc$ contiennent respectivement 60 et 50% d'isomères comportant le résidu de mannose \underline{D}_2 .



Fig. 22 : Représentation schématique des différentes étapes d'hydrolyse de l'oligosaccharide Man₉GlcNAc par les mannosidases I de l'appareil de Golgi.

Le produit final d'hydrolyse est un oligosaccharide comportant 5 résidus de mannose. Bien que les substrats naturels des mannosidases I soient des glycoprotéines, celles-ci sont capables d'hydrolyser les résidus de mannose liés en α -1,2 de nombreux oligosaccharides de type oligomannosidique et de libérer un oligosaccharide comportant 5 résidus de mannose (Fig. 22), substrat de la N-acétylglucosaminyltransférase I puis de la mannosidase II.

III- ETUDE DE L'HYDROLYSE DE L'OLIGOSACCHARIDE Man₅Glenae Dans L'APPAREIL DE GOLGI DU FOIE DE RAT.

A) INTRODUCTION.

Deux α -1,3-/ α -1,6-mannosidases différentes ont ,à ce jour, été caractérisées dans l'appareil de Golgi du foie de Rat:

- la mannosidase II possède une spécificité restreinte au composé $\operatorname{GlcNAc(Man)}_5\operatorname{GlcNAc}_2$. Elle hydrolyse les résidus de mannose <u>A</u> et <u>B</u> en position terminale réductrice et liés en α -1,3 et α -1,6 (**TULSIANI** et al., 1982b).

- l'autre enzyme est capable de convertir l'oligosaccharide $Man_5GlcNAc$ en un produit unique $Man_3GlcNAc$ après hydrolyse des résidus <u>A</u> et B (**BONAY et HUGHES, 1989**).

Si le rôle de la mannosidase II au cours de la maturation des glycannes des N-glycosylprotéines est clairement établi, la signification biologique d'autres activités α -1,3-/ α -1,6-mannosidasiques golgiennes reste à déterminer.

En vue de déterminer avec précision les résidus de mannose susceptibles d'être hydrolysés dans l'appareil de Golgi par ce second type d'enzyme, l'oligosaccharide Man₅GlcNAc, produit final de l'action des mannosidases I, a été incubé avec la fraction golgienne préparée à partir du foie de Rat.

B) RESULTATS.

L'incubation est réalisée à pH 6,0 en présence de Triton X-100. On constate, après 24 heures d'incubation, la formation de produits comportant 4 et 3 résidus de mannose (Fig. 23). Ces produits ont été



Fig. 23 : Analyse HPLC des oligosaccharides formés après 24 heures d'hydrolyse de l'oligosaccharide $Man_5GlcNAc$ par une activité α -1,3-/ α -1,6-mannosidasique de l'appareil de Golgi.

séparés par chromatographie sur colonne de type NH_2 puis analysés par RMN du proton à 400 MHz.

1° Identification des oligosaccharides Man₄GlcNAc.

L'oligosaccharide Man₄GlcNAc I est détecté par la présence du glissement chimique δ = 4,871 ppm caractéristique du proton anomérique d'un résidu de mannose <u>4'</u> substitué par les résidus <u>A</u> et <u>B</u> (Fig. 24 et Tableau IX). Par contre, le signal à δ = 4,894 ppm permet de supposer la présence d'oligosaccharides possédant un résidu de mannose <u>4'</u> mono-substitué. En effet, les signaux à δ = 5,098, 5,120 et 5,104 ppm, respectivement relatifs de résidus de mannose <u>A</u> et <u>4</u>, confirment la présence de l'isomère Man₄GlcNAc III, tandis que les signaux à δ = 4,911 et 5,093 ppm relatifs des résidus <u>B</u> et <u>4</u> attestent de la présence de l'isomère Man₄GlcNAC II (Fig. 24 et Tableau IX).

Le mélange d'oligosaccharides se voit de plus confirmé par les glissements chimiques caractéristiques du proton anomérique du résidu de N-acétylglucosamine 2a.

2° Identification des oligosaccharides Man₃GlcNAc.

Il s'agit aussi d'un mélange de trois isomères. Les signaux à δ = 5,100 et 4,916 ppm caractéristiques de protons anomériques de résidus de mannose <u>4</u> et <u>4'</u> en position terminale réductrice attestent de la présence de l'isomère Man₃GlcNAc III (Fig. 24 et Tableau X). Les isomères Man₃GlcNAc I et II sont respectivement caractérisés par les glissements chimiques relatifs aux protons H-1 de résidus de mannose <u>A</u>, δ = 5,075 (α) et 5,106 (β) ppm, et <u>B</u>, δ = 4,916 ppm, en position terminale réductrice (Fig. 24 et Tableau X).



Fig. 24 : Spectres de RMN des oligosaccharides Man_4^{GlcNAc} (A) et Man_3^{GlcNAC} (B) résultant de l'hydrolyse de l'oligosaccharide Man_5^{GlcNAc} par une activité α -1,3-/ α -1,6-mannosidasique de l'appareil de Golgi.

Tableau IX : Glissements chimiques des protons H-1 et 2 des résidus de mannose et H-1 du résidu de N-acétylglucosamine des oligosaccharides Man₄GlcNAc résultant de l'hydrolyse de l'oligosaccharide Man₅GlcNAc par une activité α -1,3-/ α -1,6-mannosidasique de l'appareil de Golgi. M, mannose; GN, N-acétylglucosamine; n.d., non déterminé.

Proton	Résidu	Glissement chimique (δ) en ppm			
		Man ₄ GlcNAc I	Man ₄ GlcNAc II	Man ₄ GlcNAc III	
		M M M-GN	M M-GN M	M M-GN	
H-1	20	5.256	5.209	5.251	
	28	4,710	4.710	4.710	
	3α	4,781	4,789	4,789	
	3ß	n.d.	4,781	4,781	
	4	<u> </u>	5,093	5,104	
	4'	4,871	4,894	4,894	
	Αα	5,058	-	5,098	
	Aß	5,088	-	5,120	
	В	4,911	4,911	-	
н-2	3α	4.089	4,262	4,262	
	3ß	4,076	4,247	4,247	
	4	_	4,072	4,072	
	4'α	4,134	4,134	4,134	
	4'B	4,142	4,142	4,142	
	Αα	4,044	-	4,049	
	Aß	4,069		4,069	
	В	3,988	3,988	-	

- 153 -

Tableau X : Glissements chimiques (δ) des protons H-1 et 2 des résidus de mannose et H-1 du résidu de N-acétylglucosamine des oligosaccharides Man₃GlcNAc résultant de l'hydrolyse de l'oligosaccharide Man₅GlcNAc par une activité α -1,3-/ α -1,6-mannosidasique de l'appareil de Golgi. M, mannose; GN, N-acétylglucosamine; n.d., non déterminé.

Proton	Résidu	Glissement chimique (δ) en ppm			
		Man ₃ GlcNAc I	Man ₃ GlcNAc II	Man ₃ GlcNAc III	
		M M M-GN	M M-GN	M M-GN	
H-1	2α 2β 3α 3β 4 4'α 4'β Αα Αβ	5,211 4,711 4,789 4,779 - 4,898 4,910 -	5,260 4,711 4,789 4,779 - 4,892 n.d. 5,075 5,106	5,211 4,711 4,789 4,779 5,100 4,916 n.d. -	
H-2	Β 3α 3β 4 4'α 4'β Αα Αβ Β	4,916 4,09 n.d. - 3,97 n.d. -		- 4,266 4,258 4,068 3,97 n.d. - -	

C) DISCUSSION ET CONCLUSION.

L'analyse de la zone des protons anomériques du spectre de l'oligosaccharide Man_5^{GlcNAc} formé par les α -1,2-mannosidases I après hydrolyse de l'oligosaccharide Man_9^{GlcNAc} (Fig. 21) permettait la mise en évidence du proton H-1 d'un résidu de mannose <u>4'</u> mono-substitué (δ = 4,894 ppm) et suggérait par conséquent une possible hydrolyse de résidus de mannose liés en α -1,3 et/ou α -1,6 par l'intermédiaire d'une activité α -mannosidasique différente de la mannosidase II.

Nos résultats permettent de décrire la séquence d'hydrolyse de l'oligosaccharide $Man_5GlcNAc$ schématisée sur la figure 25. Cette séquence apparaît tout à fait aléatoire et produit différents isomères comportant respectivement 4 et 3 résidus de mannose et le trisaccharide $Man(\alpha 1-6)Man(\beta 1-4)GlcNAc$.

Deux activités différentes sont capables d'hydrolyser cet oligosaccharide Man₅GlcNAc et les différents produits caractérisés lors de cette étude peuvent donc résulter de l'action de ces deux enzymes.

BONAY et HUGHES (1989) ont en effet purifié à partir du foie de Rat un enzyme capable d'hydrolyser le composé $Man_5GlcNAc$. Toutefois cet enzyme hydrolyse spécifiquement les résidus de mannose <u>A</u> et <u>B</u>, et libère le tétrasaccharide $Man(\alpha 1-3)[Man(\alpha 1-6)]Man(\beta 1-4)GlcNAc$.

De plus, **TULSIANI** et al. (1982b) ont montré que la mannosidase IA purifiée du foie de Rat, bien qu'étant spécifique des résidus de mannose liés en α -1,2, pouvait convertir cet oligosaccharide Man₅GlcNAc en des produits Man₄GlcNAc et Man₃GlcNAc, sans toutefois déterminer leur structure.

La signification biologique de telles activités α -mannosidasiques reste pourtant à élucider. L'enzyme caractérisée par **BONAY et HUGHES** (1989) pourrait réaliser une voie alternative de biosynthèse des glycannes de type N-acétyllactosaminique ne nécessitant pas





l'intervention de la mannosidase II telle qu'elle a été décrite par KORNFELD et al. (1979) dans une souche mutante de cellules de lymphome de Souris. NARASIMHAN et al. (1977) ont, en effet, montré que le composé Man(α l-3)[Man(α l-6)]Man(β l-4)GlcNAc pouvait être, au même titre que l'oligosaccharide Man₅GlcNAc, substrat de la N-acétylglucosaminyltransférase I. Enfin, l'oligosaccharide Man(α l-3)[Man(α l-6)]Man(β l-4)-GlcNAc(β l-4)GlcNAc a été isolé du mélange des glycannes de l'ovomucoïde de Caille (HASE et al., 1982) et de Poule (PAZ-PARENTE et al., 1983), et il représente ainsi un exemple de structure échappant au schéma classique de maturation des glycannes des N-glycosylprotéines au cours de leur biosynthèse.

IV- CONCLUSION.

Cette étude a permis de vérifier et confirmer les résultats spécificité précédemment acquis concernant la de certaines α-mannosidases impliquées dans la biosynthèse des glycannes des N-glycosylprotéines. La méthodologie employée, basée principalement sur l'analyse par résonance magnétique nucléaire des produits résultant de l'hydrolyse enzymatique, permet en effet de préciser la structure des divers intermédiaires formés et de dégager la chronologie d'action des différents enzymes.

Les séquences déterminées pour les α -mannosidases du reticulum et de l'appareil de Golgi diffèrent non seulement entre elles, mais aussi de celles décrites pour les enzymes du lysosome et du cytosol. Ces enzymes produisent en effet de nombreux intermédiaires d'hydrolyse dont la formation peut, dans notre cas, toutefois être attribuée à l'intervention de plusieurs formes isoenzymatiques en mélange.

CONCLUSION GENERALE

Les travaux préalablement entrepris au Laboratoire sur le catabolisme lysosomique des N-glycosylprotéines de type N-acétyllactosaminique avaient permis de démontrer que la dégradation des glycannes par les hydrolases acides obéissait à une séquence tout à fait ordonnée, faisant intervenir les différents enzymes dans un ordre chronologiquement déterminé. Notre étude sur la dégradation des glycannes de type oligomannosidique confirme ces travaux en démontrant que la dégradation de ce dernier type de structures par les α -mannosidases lysosomiques obéit également à une séquence tout à fait ordonnée. Toutefois, ces résultats ne permettent pas de déterminer si le catabolisme des N-glycannes de type oligomannosidique est gouverné par la conformation du substrat ou par la spécificité de différentes formes isoenzymatiques. Dans ce contexte, une étude conformationnelle par RMN des substrats formés à chaque étape de la dégradation devrait permettre de confirmer cette hypothèse. Néanmoins, il est à noter que les étapes finales de dégradation faisant intervenir les α -1,3- et α -1,6mannosidases notamment requièrent la présence de zinc. A ce titre, l'hypothèse avancée concernant l'existence d'un iso-enzyme spécifique de liaisons α -1,6 du mannose ne pourra être vérifiée que par l'isolement des deux formes A et B des α -mannosidases acides du lysosome, ainsi que par l'étude de la spécificité de l'activité résiduelle en cas de mannosidose. D'ores et déjà, nous avons établi que l'hydrolyse des liaisons α -1,6, contrairement aux liaisons α -1,3, ne peut s'effectuer sur des glyco-asparagines ou sur des glycopeptides.

Les résultats obtenus concernant l'enzyme cytosolique confirment l'existence d'un catabolisme cytosolique des N-glycosylprotéines, préalablement suggéré par la découverte de l'endo-N-acétyl-ß-D-

glucosaminidase par le groupe de G.SPIK. L'étroite spécificité de cet enzyme permet, en outre, de mettre en avant plusieurs hypothèses. La première serait l'existence d'une complémentarité d'action entre enzymes cytosoliques et lysosomiques, le catabolisme débutant dans le premier de ces compartiments et s'achevant dans le second. Cette hypothèse ne pourra être vérifiée que par la recherche de récepteurs spécifiques à la surface de la membrane lysosomique permettant d'intégrer dans cet organite les métabolites résultant de l'hydrolyse cytosolique, à savoir: partiellement dégradées, glycopeptides glycoprotéines ou oligosaccharides. La seconde hypothèse est à relier à la structure de l'isomère Man_gGlcNAc formé lors de l'hydrolyse cytosolique, ce dernier constitue en effet l'intermédiaire de "construction" élaboré sur les dolichols sur la face cytosolique du RER lors des processus de N-glycannes. La spécificité restreinte des biosynthèse des α -mannosidases cytosoliques s'expliquerait alors en terme de protection de la cellule vis-à-vis de substrats métaboliquement essentiels. Il serait, en ce sens, crucial de déterminer l'activité de ces enzymes vis-à-vis des intermédiaires lipidiques mannosylés.

Ces différentes questions trouveront certainement un élément de réponse en déterminant la nature des substrats susceptibles de subir le catabolisme cytosolique, la nature exacte de l'équipement enzymatique du cytosol et l'origine biosynthétique de ces enzymes. BIBLIOGRAPHIE

.

ABRAHAM, D.J., BLAKEMORE, W.F., JOLLY, R.D., SIDEBOTHAM, R. et WINCHESTER, B.G. (1983) Biochem. J. 215, 573-579. p. 50, 69. ACHORD, D.T., BROFT, F., GONZALES-NORIEGA, A., SLY, W.S. et STAHL, P. (1977) Pediat. Res. 11, 816-822. p. 40. ANDERSON, R.G.W., BROWN, M.S. et GOLDSTEIN, J.L. (1977) Cell 10, 351-364. p. 38. ANDERSON, R.G.W., FALCK, J.R., GOLDSTEIN, J.L. et BROWN, M.S. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. <u>81</u>, 4838-4842. p. 23. APPOURCHAUX, P. (1987) Thèse de Doctorat, Lille. p. 46. BACHMAIR, A., FINLEY, D. et VARSHAVSKY, A. (1986) Science 234, 179-186. p. 45. BAENZIGER, J.U. et MAYNARD, Y. (1980) J. Biol. Chem. 255, 4607-4613. p. 39. BADENOCH-JONES, P. et BAUM, H. (1974) Biochem. J. 142, 1-6. p. 20. BARRETT, A.J. et HEATH, M.F. (1977) In Lysosomes: a laboratory handbook, Dingle J.T., ed, North-Holland Publishing Co., Amsterdam, pp. 19-145. p. 42, 47. BARRIOCANAL, J.G., BONIFACINO, J.S., YANN, L. et SANDOVAL, I.V. (1986) J. Biol. Chem. 261, 16755-16763. p. 32. BAUSSANT, T., STRECKER, G., WIERUSZESKI, J.M., MONTREUIL, J. et MICHALSKI, J.C. (1986) Eur. J. Biochem. 159, 381-385. p. 48, 49, 50, 51, 71, 71, 72. BEAUDET, A.L. et NICHOLS, B.L. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. 68, 292-298. p. 65. BERNAR, J., TIETZE, F., KOHN, L.D., BERNARDINI, I., HARPER, G.S., GROLLMAN, E.F. et GAHL, W.A. (1986) J. Biol. Chem. <u>261</u>, 17107-17112. p. 22. BESTERMAN, J.M., AIRHART, J.A., WOODWORTH, R.C. et COW, R.B. (1981) J. Cell Biol. 91, 716-727. p. 37. BISCHOFF, J., LISCUM, L. et KORNFELD, R. (1986) J. Biol. Chem. 261, 4766-4774. p. 53, 134, 136.

BISCHOFF, J. et KORNFELD, R. (1983) J. Biol. Chem. 258, 7907-7910. p. 53, 134, 136. BISCHOFF, J. et KORNFELD, R. (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. <u>125</u>, 324-331. p. 56, 128. BISCHOFF, J, et KORNFELD, R. (1986) J. Biol. Chem. 261, 4758-4765. p. 53. BONAY, P. et HUGHES, R.C. (1989) In the Proceedings of the Xth international symposium on glycoconjugates, p. 316. p. 61, 149, 155. BRASSART, D., BAUSSANT, T., WIERUSZESKI, J.M., STRECKER, G., MONTREUIL, J. et MICHALSKI, J.C. (1987) Eur. J. Biochem. 169, 131-136. p. 48, 50, 51, 71, 72. BROWN, W.J., GOODHOUSE, J. et FARQUHAR, M.G. (1986) J. Cell Biol. 103, 1235-1247. p. 31. BURDITT, L.J., CHOTAI, K., HIRANI, S., NUGENT, P.G., WINCHESTER, B.G. et BLAKEMORE, W.F. (1980) Biochem. J. <u>189</u>, 467-473. p. 66. CACAN, R., LEPERS, A., BELARD, M et VERBERT, A. (1989) Eur. J. Biochem. 185, 173-179. p. 70. CAROLL, M., DANCE, N., MASSON, P.K., ROBINSON, D. et WINCHESTER, B.G. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 49, 579-583. p. 63, 66, 68, 92. CHAMPION, M.J. et SHOWS, T.B. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 2968-2972. p. 63. CHAPMAN, A. et KORNFELD, R. (1979) J. Biol. Chem. 254, 824-828. p. 56. CHEETHAM, P.S.J. et DANCE, N.E. (1976) Biochem. J. 157, 189-195. p. 24. CHENG, S., MALCOLM, S., PEMBLE, S. et WINCHESTER, B.G. (1982) Biochem. Soc. Trans. 10, 403-404. p. 65, 72. CHENG, S., MALCOLM, S., PEMBLE, S. et WINCHESTER, B.G. (1986) Biochem. J. 233, 65-72. p. 65, 72. CHIACCHIA, K.B. et DRICKAMER, K. (1984) J. Biol. Chem. 259, 15440-15446. p. 39.

CIECHANOVER, A. et SCHWARTZ, A.L. (1989) Trends Biochem. Sci. 14, 483-488. p. 44. COFFEY, J.W. et DE DUVE, C. (1968) J. Biol. Chem. 243, 3255-3263. p. 21. COLLARINI, E.J., PISONI, R.L. et CHRISTENSEN, H.N. (1988) FASEB J. 2, A322 p. 22. CROZE, E., IVANOV, I.E., KREIBICH, G., ADESNIK, M., SABATINI, D.D. et ROSENFELD, M.G. (1989) J. Cell Biol. 108, 1597-1613. p. 33. DAHMS, N.M., LOBEL, P. et KORNFELD, S. (1989) J. Biol. Chem. 264, 12115-12118. p. 26. DE DUVE, C., PRESSMAN, B.C., GIANETTO, R., WATTIAUX, R. et APPELMANS, F. (1955) Biochem. J. 60, 604-617. p. 19. DEGASPERI, R., AL DAHER, S., HALL, N., WINCHESTER, B. et WARREN, C.D. (1989a) Biochem. Soc. Trans. 17, 1036-1037. p. 65, 70. DEGASPERI, R., LI, Y.T. et LI, S.C. (1989b) J. Biol. Chem. 264, 9329-9334. p. 49. DENG, Y. et STORRIE, B. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 3860-3864. p. 42. DEWALD, B. et TOUSTER, O. (1973) J. Biol. Chem. 218, 7223-7233. p. 56. DOHERTY, F.J., WASSEL, J.A. et MAYER, R.J. (1987) Biochem. J. 241, 793-800. p. 35. DORLING, P.R., HUXTABLE, C.R., CENCI DI BELLO, I. et WINCHESTER, B.G. (1983) Biochem. Soc. Trans. <u>11</u>, 717-718. p. 69. DORLING, P.R., HUXTABLE, C.R. et COLEGATE, S.M. (1980) Biochem. J. 191, 649-651. p. 63, 128. DORLING, P.R., HUXTABLE, C.R. et VOGEL, P. (1978) Neuropathol. Appl. Neurobiol. 4, 285-295. p. 66. DUNPHY, W.G., FRIES, E., URBANI, L.J. et ROTHMAN, J.E. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 7453-7457. p. 56.

- 162 -

EHRENREICH, B.A. et COHN, Z.A. (1969) J. Exp. Med. 129, 227-243. p. 20. ERICSSON, J.L.E. (1969) Exp. Cell Res. 56, 393-405. p. 33. FERBER, S. et CIECHANOVER, A. (1987) Nature 326, 808-811. p. 45. FERRIS, A.L., BROWN, J.C., PARK, R.D. et STORRIE, B. (1987) J. Cell Biol. 105, 2703-2712. p. 42. FORSEE, W.T., PALMER, C.F. et SCHUTZBACH, J.S. (1989) J. Biol. Chem. 264, 3869-3876. p. 55. FRANCOIS-GERARD, C., BROCTEUR, J., ANDRE, A., GERDAY, C., PIERCE, R.J., CRETEL, A. et SPIK, G. (1980) Blood Transf. Immunohaemat. 23, 579-587. p. 19. FURBISH, F.S., KRETT, N.L., BARRANGER, J.A. et BRADY, R. (1980) Biochem. Biophys. Res. Commun. 95, 1768-1774. p. 40. GAHL, W.A., TIETZE, F., BASHAN, N., STEINHERZ, R. et SCHULMAN, J.D. (1982) J. Biol. Chem. 257, 9570-9575. p. 22. GEIGER, B. et ARNON, R. (1976) Biochemistry 15, 3484-3493. p. 24. GLAUMANN, H., ERICSSON, J.L.E. et MARZELLA, L. (1981) Int. Rev. Cytol. 73, 149-182. p. 35. GOTTSCHALK, S., WAHEED, A., SCHMIDT, B., LAIDLER, P. et VON FIGURA, K. (1989) EMBO J. 8, 3215-3219. p. 32. GOUSSAULT, Y., WARREN, C.D., BUGGE, B. et JEANLOZ, R.W. (1986) Glycoconj. J. 3, 239-245. p. 69. **GRABOWSKI, G.A., IKONNE, J.U. et DESNICK, R.J. (1980)** Enzyme <u>25</u>, 13-25. p. 65, 72, 92. GRIFFITHS, G., HOFLACK, B., SIMONS, K., MELLMAN, I. et KORNFELD, S. (1988) Cell 52, 329-341. p. 31.

GRIFFITHS, G. et SIMONS, K. (1986) Science <u>234</u>, 438-443. p. 27.

HAKOMORI, S.I. (1983) In Handbook of Lipid Research, Sphingolipid Biochemistry, Kanfer, J.N. and Hakomori, S.I., eds, Plenum Press, New York and London, pp. 1-165. p. 14.

HALTIWANGER, R.S., LEHRMAN, M.A., ECKARDT, A.E. et HILL, R.L. (1986) J. Biol. Chem. 261, 7433-7439. p. 41. HARFORD, J. et ASHWELL, G. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 1557-1561. p. 39. HARIKUMAR, P. et REEVES, J.P. (1983) J. Biol. Chem. 258, 10403-10410. p. 23. HARPAZ, N. et SCHACHTER, H. (1980) J. Biol. Chem. 255, 4894-4902. p. 58. HASE, S., OKAWA, K. et IKENAKA, T. (1982) J. Biochem. <u>91</u>, 735-737. p. 157. HASILIK, A., KLEIN, U., WAHEED, A., STRECKER, G. et VON FIGURA, K. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77, 7074-7080. p. 28. HASILIK, A. et NEUFELD, E.F. (1980) J. Biol. Chem. 255, 4937-4945. p. 31. HASILIK, A, WAHEED, A. et VON FIGURA, K. (1981) Biochem. Biophys. Res. Commun. 98, 761-767. p. 32. HERSHKO, A., HELLER, H., ELIAS, S. et CIECHANOVER, A. (1983) J. Biol. Chem. 258, 8206-8214. p. 43. HERSHKO, A., HELLER, H., EYTAN, E., KAKLIJ, G. et ROSE, I.A. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. <u>81</u>, 7021-7025. p. 45. HICKMAN, S. et NEUFELD, E.F. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 49, 992-997. p. 27, 31. HIMENO, M., FUJITA, H., NOGUCHI, Y., KONO, A. et KATO, K. (1989) Biochem. Biophys. Res. Commun. 162, 1044-1053. p. 32. HOFLACK, B. et KORNFELD, S. (1985a) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 4428-4432. p. 29. HOFLACK, B. et KORNFELD, S. (1985b) J. Biol. Chem. 260, 12008-12014. p. 29. HOPGOOD, M.F., CLARK, M.G. et BALLARD, F.J. (1980) Biochem. J. 186, 71-79. p. 35. HOUGH, R., PRATT, G. et RECHSTEINER, M. (1986) J. Biol. Chem. 261, 2400-2408. p. 43.

HOUGH, R., PRATT, G. et RECHSTEINER, M. (1987) J. Biol. Chem. <u>262</u> 8308-8313. p. 43. HUDGIN, R.L., PRICER, W.E., ASHWELL, G., STOCKERT, R.J. et MORELL, A.G. (1974) J. Biol. Chem. <u>245</u>, 5536-5543. p. 39.

HULTBERG, B., LUNDBLAD, A., MASSON, P.K. et OCKERMAN, P.A. (1975) Biochim. Biophys. Acta <u>410</u>, 156-163. p. 65, 70, 72.

HULTBERG, B. et MASSON, P.K. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. <u>67</u>, 1473-1479. p. 65.

JAMES, L.F., MARTLEY, W.J. et VAN KAMPEN, K.R. (1981) J. Am. Vel. Med. Ass. <u>178</u>, 146-150. p. 66.

JENTSCH, S., SEUFERT, W., SOMMER, T. et REINS, H.A. (1990) Trends Biochem. Sci. <u>15</u>, 195-198. p. 45.

JOLLY, R.D. (1971) J. Pathol. <u>103</u>, 113-121. p. 66.

JONAS, A.J., SPELLER, R.J., CONRAD, P.B. et DUBINSKY, W.P. (1989) J. Biol. Chem. <u>264</u>, 4953-4956. p. 22.

JONNALAGADDA, S., BUTT, T.R., MONIA, B.P., MIRABELLI, C.K., GOTLIB, L., ECKER, D.J. et CROOKE, S.T. (1989) J. Biol. Chem. <u>264</u>, 10637-10642. p. 43.

KAPLAN, A., ACHORD, D.T. et SLY, W.S. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. <u>74</u>, 2026-2030. p. 27.

KAWASAKI, T., ETOH, R. et YAMASHITA, I. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. <u>81</u>, 1018-1024. p. 40.

KORNFELD, S., GREGORY, W. et CHAPMAN, A. (1979) J. Biol. Chem. <u>254</u>, 11649-11654. p. 157.

KURANDA, M.J. et ARONSON, N.N. (1986) J. Biol. Chem. <u>261</u>, 5803-5809. p. 48, 49, 50.

KUSIAK, J.W., QUIRK, J.M. et BRADY, R.O. (1980) Biochem. Biophys. Res. Commun. <u>94</u>, 199-204. p. 40.

LEHRMAN, M.A. et HILL, R.L. (1986) J. Biol. Chem. <u>261</u>, 7419-7425. p. 41. LEWIS, V., GREEN, S.A., MARSH, H., VIHKO, P., HELENIUS, A. et MELLMAN, I. (1985) J. Cell Biol. <u>100</u>, 1839-1847. p. 32. LISCUM, L., CUMMINGS, R.D., ANDERSON, R.G.W., DEMARTINO, G.N., GOLDSTEIN, J.L. et BROWN, M.S. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. <u>80</u>, 7165-7169. p. 136.

LISMAN, J.J.W., VAN DER WAL, C.J. et OVERDIJK, B. (1985) Biochem. J. 229, 379-385. p. 45, 46.

LUBAS, W.A. et SPIRO, R.G. (1987) J. Biol. Chem. <u>262</u>, 3775-3781. p. 55, 58, 137.

LUBAS, W.A. et SPIRO, R.G. (1988) J. Biol. Chem. <u>263</u>, 3990-3998. p. 58, 60, 137.

LUND, P.K., MOATS-STAATS, B.M., SIMMONS, J.G., HOYT, E., D'ERCOLE, A.J., MARTIN, F. et VAN WYK, J.J. (1985) J. Biol. Chem. <u>260</u>,7609-7613. p. 43.

MARSH, C.A. et GOURLAY, G.C. (1971) Biochem. Biophys. Acta <u>235</u>, 142-148. p. 92.

MARZELLA, L., AHLBERG, J. et GLAUMANN, H. (1982) J. Cell Biol. <u>93</u>, 144-154. p. 35, 41.

MATHUR, R. et BALASUBRAMANIAN, A.S. (1984) Biochem. J. <u>222</u>, 261-264. p. 70.

MATSUURA, F., NUNEZ, H.A., GRABOWSKI, G.A. et SWEELAY, C.C. (1981) Arch. Biochem. Biophys. <u>207</u>, 337-352. p. 66, 67.

MATTEONI, R. et KREIS, T.E. (1987) J. Cell Biol. <u>105</u>, 1253-1265. p. 41.

MAYNARD, Y. et BAENZIGER, J.U. (1982) J. Biol. Chem. <u>257</u>, 3788-3794. p. 40.

MELLMAN, I., FUCHS, R. et HELENIUS, A. (1986) Ann. Rev. Biochem. <u>55</u>, 663-700. p. 23.

MERSMANN, G. et BUDDECKE, E. (1977) FEBS Lett. <u>73</u>, 123-126. p. 65.

MICHALSKI, J.C. (1984) Thèse de Doctorat d'Etat, Lille. p. 47, 48.

MICHALSKI, J.C., HAEUW, J.F., WIERUSZESKI, J.M., MONTREUIL, J. et STRECKER, G. (1990) Eur. J. Biochem. <u>189</u>, 369-379. p. 130.

MITHIEUX, G. et ROUSSET, B. (1989) J. Biol. Chem. 264, 4664-4668. p. 21. MIYAGI, T. et TSUIKI, S. (1985) J. Biol. Chem. 260, 6710-6716. p. 46. MONIA, B.P., ECKER, D.J. et CROOKE, S.T. (1990) Bio/technology 8, 209-215. p. 45. MONIA, B.P., ECKER, D.J., JONNALAGADDA, S., MARSH, J., GOTLIB, L., BUTT, T.R. et CROOKE, S.T. (1989) J. Biol. Chem. 264, 4093-4103. p. 43. MONIS, E., BONAY, P. et HUGHES, R.C. (1987) Eur. J. Biochem. 168, 287-294. p. 55, 61. MONTREUIL, J. (1975) Pure Appl. Chem. 42, 431-477. p. 16, 17, 48. MONTREUIL, J. (1980) Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 37, 157-223. p. 17. MONTREUIL, J. (1981) C. R. Soc. Chim. Biol. 175, 694-708. p. 48. MONTREUIL, J. (1982) In Comprehensive Biochemistry, Neuberger, A. and van Deenen, L.L.M., eds, Elsevier, Amsterdam, pp. 1-188. p. 17. MORELL, A.G., GREGORIADIS, G., SCHEINBERG, J.H., HICKMAN, J. et ASHWELL, G. (1971) J. Biol. Chem. 246, 1461-1467. p. 39. MORELL, A.G., IRVINE, R.A., STERNLIEB, I.H. et ASHWELL, G. (1968) J. Biol. Chem. 243, 155-159. p. 39. MOREMEN, K.W. et TOUSTER, O. (1986) J. Biol. Chem. 261, 10945-10951. p. 58. MORTIMORE, G.E. et SCHWORER, C.M. (1977) Nature 270, 174-176. p. 35. NARASIMHAN, S., STANLEY, D. et SCHACHTER, H. (1977) J. Biol. Chem. 252, 3926-3933. p. 157. NEUFELD, E.F. et ASHWELL, G. (1980) In The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans, Lennarz, W.J., ed., Plenum Press, New York, pp. 241-266. p. 39. NEUFELD, E.F. et CANTZ, M.J. (1971) Ann. N. Y. Acad. Sci. 179, 580-587.

p. 31.

- 167 -

NOGUCHI, Y., HIMENO, M., SAZAKI, H., TANAKA, Y., KONO, A., SAZAKI, Y. et KATO, K. (1989) Biochem. Biophys. Res. Commun. 164, 1113-1120. p. 32. N.E., LUNDBLAD, A., SVENSSON, S. et AUTIO, S. (1974) NORDEN, Biochemistry 13, 871-874. p. 66. NORDEN, N.E., LUNDBLAD, A., SVENSSON, S., OCKERMAN, P.A. et AUTIO, S. (1973) J. Biol. Chem. 248, 6210-6215. p. 66. NOVIKOFF, A.B. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 2781-2787. p. 25. NOVIKOFF, A.B. et NOVIKOFF, P.M. (1977) Histochem. J. 7, 525-551. p. 25. NOVIKOFF, P.M., NOVIKOFF, A.B., OINTANA, N. et HAUEV, J.J. (1971) J. Cell Biol. 50, 859-886. p. 33. NOVIKOFF, P.M., TULSIANI, D.R.P., TOUSTER, O., YAM, A. et NOVIKOFF, A.B. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80, 4364-4368. p. 58. OCKERMAN, P.A. (1967) Lancet 2, 239-241. p. 65. OCKERMAN, P.A. (1969) J. Pediatr. 75, 360-365. p. 66. OHKUMA, S., MORIYAMA, Y. et TAKANO, T.C. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. <u>79</u>, 2758-2762. p. 23. OHKUMA, S. et POOLE, B. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 3327-3331. p. 21. OPHEIM, D.J. et TOUSTER, O. (1977) J. Biol. Chem. 252 739-743. p. 49. OPHEIM, D.J. et TOUSTER, O. (1978) J. Biol. Chem. 253, 1017-1023. p. 65, 70, 72. OVERDIJK, B., VAN DER KROEF, M.J., LISMAN, J.J.W., PIERCE, R.J., MONTREUIL, J. et SPIK, G. (1981) FEBS Lett. 128, 364-366. p. 45, 48. PALADE, G.E. (1975) Science 189, 347-358. p. 25. PAZ-PARENTE, J., STRECKER, G., LEROY, Y., MONTREUIL, J., FOURNET, B., VAN HALBEEK, H., DORLAND, L. et VLIEGENTHART, J.F.G. (1983) FEBS Lett. <u>152</u>, 145-152. p. 157.

PAZ PARENTE, J., WIERUSZESKI, J.M., STRECKER, G., MONTREUIL, J. et FOURNET, B. (1982) J. Biol. Chem. <u>257</u>, 13173-13176. p. 19. PEARSE, B.M.F. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 2434-2438. p. 38. PHILLIPS, N.C., ROBINSON, D. et WINCHESTER, B.G. (1974a) Clin. Chim. Acta 55, 11-19. p. 63, 68, 72, 92. PHILLIPS, N.C., ROBINSON, D. et WINCHESTER, B.G. (1976) Biochem. J. 153, 579-583. p. 68, 92. PHILLIPS, N.C., ROBINSON, D., WINCHESTER, B.G. et JOLLY, R.D. (1974b) Biochem. J. 137, 363-371. p. 63, 72. PIERCE, R.J., SPIK, G. et MONTREUIL, J. (1979) Biochem. J. 180, 673-676. p. 45, 46, 48, 124. PIERCE, R.J., SPIK, G. et MONTREUIL, J. (1980) Biochem. J. 185, 261-264. p. 45, 46, 48, 124. PINO, R.M., PINO, L.C. et BANKSTON, P.W. (1981) J. Histochem. Cytochem. 29, 1061-1070. p. 25. PISONI, R.L., FLICKINGER, K.S., THOENE, J.G. et CHRISTENSEN, H.N. (1987) J. Biol. Chem. 262, 6010-6017. p. 22. PISONI, R.L. et THOENE, J.G. (1989) J. Biol. Chem. 264, 4850-4856. p. 22. PISONI, R.L., THOENE, J.G. et CHRISTENSEN, H.N. (1985) J. Biol. Chem. 260, 4791-4798. p. 22. PLOMP, P.J.A.M., WOLVETANG, E.J., GORDON, A.K., MEIJER, A.J., GORDON, P.B. et SEGLEN, P.O. (1987) Eur. J. Cell Biol. 164, 197-203. p. 35. POTIER, M., MICHAUD, L., TRANCHEMONTAGNE, J. et THAUVETTE, L. (1990) Biochem. J. 267, 197-202. p. 24. PRIEELS, J.P., PIZZO, S.V., GLASGOW, L.R., PAULSON, J.C. et HILL, R.L. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. <u>75</u>, 2215-2219. p. 40. REITMAN, M.L. et KORNFELD, S. (1981) J. Biol. Chem. 256, 4275-4281. p. 28. RENLUND, M., TIETZE, F. et GAHL, W.A. (1986) Science 232, 759-762.

p. 22.

RIZZOLO, L.J. et KORNFELD, R. (1988) J. Biol. Chem. 263, 9520-9525. p. 55. ROCHE, A.C., MIDOUX, P., BOUCHARD, D. et MONSIGNY, M. (1985) FEBS Lett. <u>193</u>, 63-68. p. 40. ROSENBLATT, D.S., HOSACK, A., MATIASZUK, N.V., COOPER, B.A. et LAFRAMBOISE, R. (1985) Science 228, 1319-1321. p. 22. SAHAGIAN, G.G., DISTLER, J. et JOURDIAN, G.W. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 4289-4293. p. 29. SAKAI, M., ARAKI, N. et OGAWA, K. (1989) J. Elect. Micros. Tech. 12, 101-131. p. 34. SCHLESINGER, P.H., DOEBBER, T.W., MANDELL, B.F., WHITE, R., DESCHRYVER, C., RODMAN, J.S., MILLER, M.J. et STAHL, P.D. (1978) Biochem. J. 176, 103-109. p. 40. SCHWEDEN, J., LEGLER, G. et BAUSE, E. (1986) Eur. J. Biochem. 157, 563-570. p. 55. SHAO, M.C., KRUDY, G., ROSEVEAR, P.R. et WOLD, F. (1989) Biochemistry 28, 4077-4083. p. 58. SHOUP, V.A. et TOUSTER, O. (1976) J. Biol. Chem. 251, 3845-3852. p. 46, 68, 70. SILVANOVICH, A. et JAMIESON, J.C. (1989) Biochem. Cell Biol. 67, 1-7. p. 134. SMITH, R.E. et FARQUHAR, M.G. (1966) J. Cell Biol. 31, 319-347. p. 35. SNAITH, S.M. (1977) Biochem. J. 163, 557-564. p. 68. SONG, Z., LI, Y.T. et LI, S.C. (1987) Biochem. J. 248, 145-149. p. 45, 50. SRIVASTAVA, S.K., WIKTOROWICZ, J.E. et AWASHTI, Y.C. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 2833-2837. p. 24. STAHL, P.D., RODMAN, J.S., MILLER, M.J. et SCHLESINGER, P.H. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 1399-1403. p. 40.

.

STAHL, P. et SCHWARTZ, A.L. (1986) J. Clin. Invest. 77, 657-662. p. 38. STEINMAN, R.M., BRODIE, S.E. et COHN, Z.A. (1976) J. Cell Biol. 68, 665-687. p. 37. STEINMAN, R.M., MELLMAN, I.S., MULLER, W.A. et COHN, Z.A. (1983) J. Cell Biol. 96, 1-27. p. 21. STOSSEL, T.P. (1976) J. Reticuloendothel. Soc. 19, 237-245. p. 36. STRECKER, G., FOURNET, B., BOUQUELET, S., MONTREUIL, J., DHONDT, J.L. et FARRIAUX, J.P. (1976) Biochimie 58, 579-586. p. 66. STRECKER, G., MICHALSKI, J.C. et MONTREUIL, J. (1988) Biochimie 70, 1505-1510. p. 49, 52, 71. STRECKER, G. et MONTREUIL, J. (1979) Biochimie 61, 1199-1246. p. 16, 47, 48. SWANSON, J., BURKE, E. et SILVERSTEIN, S.C. (1987a) J. Cell Biol. 104, 1217-1222. p. 41. SWANSON, J., BUSHNELL, A. et SILVERSTEIN, S.C. (1987b) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 1921-1925. p. 37, 41. TABAS, I. et KORNFELD, S. (1979) J. Biol. Chem. 254, 11655-11663. p. 56, 57, 146. TAI, T., YAMASHITA, K., ITO, S. et KOBATA, A. (1977) J. Biol. Chem. 252, 6687-6694. p. 19. TANABE, T., PRICER, W.E. et ASHWELL, G. (1979) J. Biol. Chem. 254, 1038-1043. p. 39. TIETZE, F., KOHN, L.D., KOHN, A.D., BERNARDINI, I., ANDERSON, H.C., ADAMSON, M.D., HARPER, G.S. et GAHL, W.A. (1989) J. Biol. Chem. 264, 4762-4765. p. 22. TSUJI, A., OMURA, K. et SUZUKI, Y. (1988) J. Biochem. <u>104</u>, 276-278. p. 32. TULSIANI, D.R.P., HARRIS, T.M. et TOUSTER, O. (1982a) J. Biol. Chem. 257, 7936-7939. p. 58.

TULSIANI, D.R.P., HUBBARD, S.C., ROBBINS, P.W. et TOUSTER, O. (1982b) J. Biol. Chem. 257, 3660-3668. p. 55, 56, 58, 137, 149, 155. TULSIANI, D.R.P., OPHEIM, D.J. et TOUSTER, O. (1977) J. Biol. Chem. 252,3227-3233. p. 58. TULSIANI, D.R.P. et TOUSTER, O. (1983) J. Biol. Chem. 258, 7578-7585. p. 58. TULSIANI, D.R.P. et TOUSTER, O. (1987) J. Biol. Chem. 262, 6506-6517. p. 65, 70, 124. TULSIANI, D.R.P. et TOUSTER, O. (1988) J. Biol. Chem. 263, 5408-5417. p. 56, 57, 128, 146. VAN DEN HAMER, C.J.A., MORELL, A.G., SCHEINBERG, I.H. et ASHWELL, G. (1970) J. Biol. Chem. 245, 4397-4402. p. 39. VARKI, A. et KORNFELD, S. (1980) J. Biol. Chem. 255, 8398-8401. p. 28. VARKI, A. et KORNFELD, S. (1981) J. Biol. Chem. 256, 9937-9943. p. 28. VARKI, A. et KORNFELD, S. (1983) J. Biol. Chem. 258, 2808-2818. p. 28. VERHEIJEN, F.W., PALMERI, S., HOOGEVEN, A.T. et GALJAARD, H. (1985) Eur. J. Biochem. 149, 315-321. p. 24. VIJAY-KUMAR, S., BUGG, C.E., WILKINSON, K. et COOK, W.J. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 3582-3585. p. 43. VON FIGURA, K. et HASILIK, A. (1986) Ann. Rev. Biochem. 55, 167-193. p. 31. WAHEED, A., GOTTSCHALK, S., HILLE, A., KRENTLER, C., POHLMANN, R., BRAULKE, T., HAUSER, H., GEUZE, H. et VON FIGURA, K. (1988) EMBO J. 7, 2351-2358. p. 32. WAHEED, A., HASILIK, A. et VON FIGURA, K. (1981) J. Biol. Chem. 256, 5717-5721. p. 28. WAHEED, A., HASILIK, A. et VON FIGURA, K. (1982) J. Biol. Chem. 257, 12322-12331. p. 28. WARNER, T.G. et O'BRIEN, J.S. (1981) J. Biol. Chem. 257, 224-232. p. 50.

WIBORG, O., PEDERSEN, M.S., WIND, A., BERGLUND, L.E., MARCKER, K.A. et VUUST, J. (1985) EMBO J. 4, 755-759. p. 43.

WIEGANDT, H. (1980) In Structure and Function of Gangliosides, Svennerholm, L., Mandel, P., Dreyfus, H. and Urban, P.E., eds, Plenum Press, New York, pp. 3-10. p. 14.

YAMASHITA, K., TACHIBANA, Y., MIHARA, K., OKADA, S., YABUUCHI, H. et KOBATA, A. (1980) J. Biol. Chem. <u>255</u>, 5126-5133. p. 66.

APPENDICE TECHNIQUE

PREPARATION DES FRACTIONS CELLULAIRES DE FOIE DE RAT

Des Rats femelles (WISTAR, 6-8 semaines) sont mis à jeûn une nuit avant d'être sacrifiés par décapitation, et les foies sont rapidement prélevés. Les différentes étapes du fractionnement cellulaire sont réalisées à +4°C.

I) PREPARATION DE LYSOSOMES.

Les foies sont broyés au moyen de l'appareil de FISCHER puis homogénéisés dans une solution de saccharose 250 mM tamponnée à pH 7,4 (20 mM Hepes), à raison de 4 ml/g, à l'aide d'un appareil de POTTER (750 tours/mn, 3 allers-retours). Le culot obtenu par centrifugation à 10.000 g (rotor BECKMAN SW 27) de la fraction post-nucléaire (**De DUVE** et al., 1955) est suspendu dans le tampon précédent contenant 45% de Percoll (v/v). Le mélange est centrifugé pendant 90 mn à 40.000 g (rotor BECKMAN SW 40) (JONAS, 1986), et la fraction de 1 ml collectée à la base des tubes est lavée avec une solution isotonique de chlorure de sodium à 0,9%.

II) PREPARATION DE CYTOSOL.

L'homogénat, préparé de la même manière que précédemment, est centrifugé pendant 1 h à 105.000 g (rotor BECKMAN SW 27). Le surnageant est saturé en sulfate d'ammonium et agité pendant 1 h. Le précipité formé est suspendu dans un tampon de pH 7,4 (Tris-HCl 20 mM) et dialysé pendant 24 h contre ce même tampon. La solution de protéines est concentrée par ultrafiltration (filtre Millipore XM-50), remise en suspension en un tampon de pH 6,2 (cacodylate de sodium 50 mM) et concentrée de nouveau avec le même système d'ultrafiltration.

III) PREPARATION DE RETICULUM ENDOPLASMIQUE.

Le protocole suivi est celui de DEBEIRE et al. (1977). Après broyage, les foies de Rat sont homogénéisés dans une solution de saccharose 250 mM tamponnée à pH 7,4 (Tris-HCl 10 mM, MgCl, 0,5 mM) à l'aide d'un appareil de POTTER (1200 tours/mn, 6 allers-retours). Le surnageant post-mitochondrial est placé sur 10 ml d'une solution de saccharose 1 M, et l'ensemble est centrifugé pendant 1 h à 105.000 g (rotor BECKMAN SW 27). Le culot de microsomes est suspendu dans une solution de saccharose 1,6 M. Les fractions submicrosomales sont séparées par centrifugation sur un gradient discontinu de saccharose. 7 ml de la fraction microsomale sont déposés sur 7 ml d'une solution de saccharose 1,8 M. Après addition de 14 et 7 ml de solutions de saccharose respectivement 1,4 et 1 M, l'ensemble est centrifugé pendant 3 h à 105.000 g (rotor BECKMAN SW 27). Le reticulum endoplasmique ruqueux se situe à l'interface des solutions 1,8 et 1,6 M, tandis qu' à l'interface des solutions 1,6 et 1,4 M se trouve le reticulum endoplasmique lisse. Ces deux fractions, récupérées avec précaution, sont diluées par addition de 1 volume de tampon Tris-HCl 10 mM pH 7,4 et centrifugées pendant 1 h à 100.000 g (rotor BECKMAN SW 27).

IV) PREPARATION DE L'APPAREIL DE GOLGI.

Le protocole suivi est une modification de celui décrit précédemment par **BALCH** et al. (1984). L'homogénéisation des tissus broyés est réalisée dans une solution de saccharose 250 mM tamponnée à pH 7,4 (Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 0,5 mM) à l'aide d'un appareil de POTTER (750 tours/mn, 4 allers-retours). L'homogénat est mélangé à 1 volume d'une solution de saccharose 2,3 M. L'appareil de Golgi est préparé par centrifugation en gradient discontinu de saccharose. Dans un tube sont ainsi déposés successivement différents volumes de solution de saccharose:

- 3 ml de saccharose 2,3 M,
- 3 ml de saccharose 1,6 M,
- 10 ml de l'homogénat,
- 10 ml de saccharose 1,2 M,
- 10 ml de saccharose 0,8 M

Après une centrifugation pendant 2,5 h à 100.000 g (rotor BECKMAN SW 27), la fraction golgienne est récupérée à l'interface des solutions de saccharose 0,8 et 1,2 M. Celle-ci est diluée par addition de 1 volume de tampon Tris-HCl 10 mM pH 7,4 et centrifugée pendant 1 h à 100.000 g (rotor BECKMAN SW 27).

V) DOSAGES DES ENZYMES MARQUEURS.

Afin d'estimer le degré de pureté de chacune des fractions cellulaires, différents enzymes marqueurs ont été dosés.

La phosphatase acide (EC 3.1.3.2) et la N-acétyl-B-D-glucosaminidase

(EC 3.2.1.30), marqueurs enzymatiques du lysosome, sont dosées en utilisant le paranitrophénylphosphate et le paranitrophényl-ß-D-N-acétylglucosaminoside (BARRETT, 1972).

La glucose-6-phosphatase (EC 3.1.3.9), marqueur du reticulum endoplasmique, est dosée selon la méthode décrite par **BEAUFAY** *et al.* (1974), l'activité de la phosphatase acide étant inhibée par addition au milieu d'incubation de tartrate de sodium 12 mM (BRIGHTWELL et TAPPEL, 1968).

Enfin l'activité de la sialyltransférase (EC 2.4.99.1), enzyme marqueur de l'appareil de Golgi, est dosée en utilisant l'asialotransferrine comme accepteur endogène (**BAUVOIS** et al., 1981).

Les enrichissements et rendements de purification dans les fractions de lysosomes, reticulum endoplasmique rugueux et appareil de Golgi sont présentés dans le tableau.
Tableau: Caractérisation enzymatique des fractions cellulaires du foie de Rat.

Le rendement (R) représente le pourcentage de l'activité enzymatique dosée dans la fraction par rapport à celle dosée dans l'homogénat de départ (100%). Le taux de purification (P) est exprimé par le rapport des activités spécifiques: activité spécifique de la fraction / activité spécifique de l'homogénat de départ. n.d., non détectable.

Fraction	ß-hexosaminidase		Phosphatase acide		Glucose-6- phosphatase		Sialyl transférase	
	P	R	P	R	P	R	P	R
Homogénat de départ	1	100	1	100	1	100	1	100
Lysosome	10	5,5	8	5	1,1	1,2	n.d.	n.d.
Reticulum	1	1,5	-	-	9,2	12,5	0,7	1
Appareil de Golgi	4	n.d.	-	-	2,1	n.d.	137	5

- v -

PREPARATION DES SUBSTRATS

I) PREPARATION DES OLIGOSACCHARIDES ET GLYCOASPARAGINES.

Les oligosaccharides Man₉GlcNAc et Man₄GlcNAc (Fig. 1) ont été préparés à partir d'urine de patients atteints de mannosidose (**STRECKER** *et al.*, 1976). L'oligosaccharide Man₄GlcNAc linéaire a été isolé du mélange de pentasaccharides par HPLC en phase réverse.

Les oligosaccharides Man₅GlcNAc et Man₇GlcNAc (Fig. 1) ont été préparés à partir d'ovalbumine d'oeuf de Poule. Les glyco-asparagines Man₅GlcNAc₂Asn et Man₇GlcNAc₂Asn sont obtenus par digestion pronasique d'ovalbumine d'oeuf de Poule, puis chromatographie sur colonne échangeuse d'ions (Dowex 50x2, 200-400 mesh, forme H⁺) (**MONTGOMERY et YU, 1963**). Une digestion de ces glyco-asparagines par l'endo-N-acétyl-B-D-glucosaminidase d'un Basidiomycète (**BOUQUELET** et al., 1980) permet d'obtenir les oligosaccharides correspondants.

Le glyco-asparagine Man₃GlcNAc₂Asn (Fig. 2) est préparé par digestion pronasique de la fraction IV de Cohn, puis digestion des glyco-asparagines libérés par un mélange d'enzymes bactériennes, fourni par М le Professeur S. BOUQUELET, contenant les activités α -neuraminidasique, α -fucosidasique, B-galactosidasique et β -hexosaminidasique. Le glyco-asparagine Man(α 1-6)Man(β 1-4)GlcNAc₂Asn (Fig. 2) a été isolé à partir d'urine de patients atteints d'aspartylglucosaminurie (AKASAKI et al., 1976).

La fonction NH₂ libre du résidu asparagine de ces glyco-asparagines, Man₃GlcNAc₂Asn et Man₂GlcNAc₂Asn, à été acétylée à l'aide d'anhydride acétique dans une solution saturée de bicarbonate de sodium.

Les oligosaccharides correspondants, Man₃GlcNAc et Man₂GlcNAc, sont

<u>Man_gGlcNAc</u>





$$Man(B1-4)GlcNAc$$

$$Man(\alpha 1-2)Man(\alpha 1-2)Man(\alpha 1-3)$$





<u>Man_GlcNAc</u>



Fig. 1 : Structures des différents substrats.

```
<u>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>Asn</u>
```

Man(
$$\alpha$$
1-6)
Man(β 1-4)GlcNAc(β 1-4)GlcNAc(β 1-N)Asn
Man(α 1-3)

```
<u>Man<sub>3</sub>GlcNAc</u>
```

Man(
$$\alpha$$
1-6)
Man(β 1-4)GlcNAc
Man(α 1-3)

Fig. 2 : Structures des différents substrats.

finalement préparés par digestion des glyco-asparagines par l'endo-Nacétyl-B-D-glucosaminidase d'un Basidiomycète (**BOUQUELET** et al., 1980).

ETUDES DES ACTIVITES α -D-MANNOSIDASIQUES

Les activités α -D-mannosidasiques des différentes fractions cellulaires préparées à partir du foie de Rat ont été étudiées dans les conditions suivantes.

I) α -D-MANNOSIDASES LYSOSOMIQUES.

Le culot de lysosomes est suspendu en tampon acétate de sodium 200 mM pH 5 contenant 0,5% en Triton X-100, homogénéisé à l'aide d'un appareil de DOUNCE (20 allers-retours) et finalement abandonné 2 h à + 4°C avant l'emploi. Au vu de l'extrême labilité des activités α -mannosidasiques lysosomiques, lors d'incubations de longues durées des additions d'homogénat lysosomique sont nécessaires toutes les 4 h. De plus, les activités α -1,3- et α -1,6-mannosidasiques requièrent la présence d'ions: de l'acétate de zinc est donc ajouté au milieu d'incubation à la concentration finale de 2,5 mM (MICHALSKI et al., 1990).

II) α -D-MANNOSIDASES CYTOSOLIQUES.

Le tampon utilisé est une solution de cacodylate de sodium 50 mM pH 6,2 (SHOUP et TOUSTER, 1976).

III) <u>a-D-MANNOSIDASES</u> DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE.

Le culot de membranes resuspendu en tampon cacodylate de sodium 50 mM pH 6 (**BISCHOFF et KORNFELD, 1983**) contenant 0,5 % en Triton X-100 est homogénéisé au moyen d'un appareil de DOUNCE (10 allers-retours), et abandonné 1 h à + 4°C avant usage. Les incubations sont réalisées en présence de 1-déoxymannojirimycine, à la concentration de 50 μ M afin d'inhiber la mannosidase I de l'appareil de Golgi (**BISCHOFF et KORNFELD**, **1984**), et de swainsonine, à la concentration de 20 μ M de manière à inhiber les α -mannosidases du lysosome (**DORLING et al., 1980**)

IV) a-D-MANNOSIDASES DE L'APPAREIL DE GOLGI.

Le culot est homogénéisé, de la même manière que précédemment, dans un tampon phosphate de sodium 10 mM pH 6 contenant 0,5% de Triton X-100 (TABAS et KORNFELD, 1979; TULSIANI et al., 1982).

SEPARATION ET ANALYSE DES PRODUITS D'HYDROLYSE

I) SEPARATION DES PRODUITS D'HYDROLYSE.

Les incubations sont arrêtées par addition de 1 volume d'éthanol à - 20°C. Après centrifugation, les surnageants sont dessalés sur colonnes couplées de Dowex 50x2 (200-400 mesh, forme H⁺) et 1x2 (200-400 mesh, forme CH₃COO⁻), puis sur colonne de Biogel P2 éluées par de l'eau. Les oligosaccharides sont séparés par HPLC sur colonne de type NH₂ (colonne Supelcosyl LC-NH₂, 0,4 x 25 cm, 5 μ m, Supelco Inc., Bellefonte, Pennsylvania).

L'élution est réalisée par un gradient acétonitrile/eau selon les conditions suivantes: passage d'un mélange 70/30 pendant 15 mn puis élévation jusqu'à 50% de la concentration en eau en 60 mn. Le débit est de 1 ml/mn et la détection des oligosaccharides est effectuée à 206 nm.

II) ANALYSE DES PRODUITS D'HYDROLYSE.

A) ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE.

Les différentes études cinétiques réalisées ont été analysées par chromatographie sur couche mince de silice. Sur une plaque Silicagel-60 (MERCK, R.F.A.) sont déposées des quantités correspondant à 10 μ g de matériel oligosaccharidique. Deux ou trois migrations successives, avec séchages intermédiaires, sont réalisées dans le solvant n-butanol acide acétique - eau (2: 1: 1,5). La plaque est révélée par le réactif à l'orcinol sulfurique (solution à 0,2% d'orcinol dans H₂SO₄ 20%). B) ANALYSE DES PRODUITS PAR RMN DU PROTON A 400 MHz.

L'analyse en RMN des oligosaccharides dissous dans ${}^{2}\text{H}_{2}$ O (99,95%, Commissariat à l'Energie Atomique, Saclay, France) est effectuée avec un appareil BRUKER AM-400 WB à 300 K. Les glissements chimiques (δ) sont mesurés par rapport au 2,2-diméthyl-2-silapentane sulfonate de sodium et, indirectement par rapport à l'acétone (δ CH₃ = 2,225 ppm). Les spectres sont interprétés par comparaison avec les valeurs fournies par la littérature (**VLIEGENTHART** *et al.*, 1983).

C) ANALYSE DES PRODUITS PAR SPECTROMETRIE DE MASSE.

1° Méthylation.

Les composés sont méthylés selon la méthode de PAZ PARENTE et al. (1984).

Les composés (200 μ g) sont dissous dans 200 μ l de diméthylsulfoxyde dans un tube en verre et la solution est placée dans un bain ultrasonique pendant 30 min. On ajoute ensuite 200 μ l de base (lithium méthylsulfinyl carbanion) à la solution que l'on place de nouveau au bain ultrasonique pendant 1 h. Après congélation, 400 μ l d'iodure de méthyle sont additionnés et l'alkylation se déroule pendant 1 h au bain ultrasonique. 1 ml d'eau contenant quelques cristaux de thiosulfate de sodium est ajouté, et le composé perméthylé est extrait par 3 fois 1 volume de chloroforme. Les phases organiques sont rassemblées, lavées abondamment à l'eau, évaporées sous courant d'azote et lyophylisées.

Le composé perméthylé est méthanolysé pendant 24 h à 80°C à l'aide de 0,5 ml de méthanol chlorhydrique 0,5 N. Après évaporation sous courant d'azote, les méthylglycosides partiellement méthylés sont

B) ANALYSE DES PRODUITS PAR RMN DU PROTON A 400 MHz.

L'analyse en RMN des oligosaccharides dissous dans ${}^{2}\text{H}_{2}$ O (99,95%, Commissariat à l'Energie Atomique, Saclay, France) est effectuée avec un appareil BRUKER AM-400 WB à 300 K. Les glissements chimiques (δ) sont mesurés par rapport au 2,2-diméthyl-2-silapentane sulfonate de sodium et, indirectement par rapport à l'acétone (δ CH₃ = 2,225 ppm). Les spectres sont interprétés par comparaison avec les valeurs fournies par la littérature (VLIEGENTHART et al., 1983).

C) ANALYSE DES PRODUITS PAR SPECTROMETRIE DE MASSE.

1° Méthylation.

Les composés sont méthylés selon la méthode de PAZ PARENTE et al. (1984).

Les composés (200 μ g) sont dissous dans 200 μ l de diméthylsulfoxyde dans un tube en verre et la solution est placée dans un bain ultrasonique pendant 30 min. On ajoute ensuite 200 μ l de base (lithium méthylsulfinyl carbanion) à la solution que l'on place de nouveau au bain ultrasonique pendant 1 h. Après congélation, 400 μ l d'iodure de méthyle sont additionnés et l'alkylation se déroule pendant 1 h au bain ultrasonique. 1 ml d'eau contenant quelques cristaux de thiosulfate de sodium est ajouté, et le composé perméthylé est extrait par 3 fois 1 volume de chloroforme. Les phases organiques sont rassemblées, lavées abondamment à l'eau, évaporées sous courant d'azote et lyophylisées.

Le composé perméthylé est méthanolysé pendant 24 h à 80°C à l'aide de 0,5 ml de méthanol chlorhydrique 0,5 N. Après évaporation sous courant d'azote, les méthylglycosides partiellement méthylés sont acétylés par 10 μ l de pyridine et 100 μ l d'anhydride acétique pendant une nuit à température ambiante.

2° Spectrométrie de masse.

L'identification des éthers méthyliques est réalisée selon la méthode décrite par **FOURNET** et al. (1981).

Les analyses sont effectuées à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse Girdel 300 à colonne capillaire de silicone OV 101 (0,3 mm x 25 m, gaz vecteur à pression d'Hélium 0,5 bar) couplé à un spectromètre de masse Riber Mag 10-10 (Rueil-Malmaison, France).

Les conditions chromatographiques sont les suivantes: la température du four est programmée de 100 à 180°C à 3°C/min, puis de 180 à 240°C à 6°C/min; la température de l'injecteur et du détecteur est de 240°C.

BIBLIOGRAPHIE

AKASAKI, M., SUHAGARA, K., FUNAKOSHI, I., AULA, P. et YAMASHINA, I. (1976) FEBS Lett. 69, 191-194. p. VI. BALCH, W., DUNPHY, W., BRAELL, W. et ROTHMAN, J. (1984) Cell 39, 405-416. p. III. BARRETT, A.J. (1972) in Lysosomes, a laboratory handbook, Dingle, J.T., ed., North Holland Publishing Co., Amsterdam, pp. 110-135. p. IV. BAUVOIS, B., CACAN, R., FOURNET, B., CAEN, J., MONTREUIL, J. et VERBERT, A. (1982) Eur. J. Biochem. 121, 567-572. p. IV. BEAUFET, H., AMAR-CORTESEC, A., FEYTMANS, E., THINES-SEMPOUX, D., WIBO, M., ROBBI, M. et BERTHET, J. (1974) J. Cell Biol. 61, 188-200. p. IV. BISCHOFF, J. et KORNFELD, S. (1983) J. Biol. Chem. 258, 7907-7910. p. XI. BISCHOFF, J. et KORNFELD, S. (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 125, 324-331. p. XI. BOUQUELET, S., STRECKER, G., MONTREUIL, J. et SPIK, G. (1980) Biochimie <u>62</u>, 43-49. p. VI, IX. BRIGHTWELL, R. et TAPPEL, A.L. (1968) Arch. Biochem. Biophys. 124, 333-343. p. IV. DEBEIRE, P., HOFLACK, B., CACAN, R., VERBERT, A. et MONTREUIL, J. (1977) Biochimie 59, 473-477. p. II. De DUVE, PRESSMAN, B.C., GIANETO, R., WATTIAUX, R. et APPELMANS, F. (1955) Biochem. J. 60, 604-617. p. I. DORLING, P.R., HUXTABLE, C.R. et COLEGATE, S.M. (1980) Biochem. J. 191, 649-651. p. XI. FOURNET, B., STRECKER, G., LEROY, Y. et MONTREUIL, J. (1981) Anal. Biochem. 116, 489-502. p. XIV. JONAS, A.J. (1986) Biochem. J. 236, 671-677. p. I.

MICHALSKI, J.C., HAEUW, J.F., WIERUSZESKI, J.M., MONTREUIL, J. et STRECKER, G. (1990) Eur. J. Biochem. <u>189</u>, 369-379. p. X.

MONTGOMERY, R. et YU, Y. (1963) J. Biol. Chem. <u>238</u>, 3547-3554. p. VI.

PAZ-PARENTE, J., CARDON, P., LEROY, Y., MONTREUIL, J., FOURNET, B. et RICARD, G. (1984) Carbohydr. Res. <u>141</u>, 41-47. p. VIII.

SHOUP, V.A. et TOUSTER, O. (1976) J. Biol. Chem. <u>251</u>, 3845-3852. p. X.

STRECKER, G., FOURNET, B., BOUQUELET, S., MONTREUIL, J., DHONDT, J.L. et FARRIAUX, J.P. (1976) Biochimie <u>58</u>, 579-586. p. VI.

TABAS, I. et KORNFELD, S. (1979) J. Biol. Chem. <u>254</u>, 11655-11663. p. XI.

TULSIANI, D.R.P., HUBBARD, S.C., ROBBINS, P.W. et TOUSTER, O. (1982) J. Biol. Chem. <u>257</u>, 3660-3668. p. XI.

VLIEGENTHART, J.F.G., DORLAND, C. et VAN HALBEEK, H. (1983) Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. <u>41</u>, 343-374. p. XIII.

