

Note

**Incorporation de radioactivité à partir
d'UDP-D-galactose-1-³H, de GDP-D-mannose-1-¹⁴C
ou d'UDP-N-acétyl-D-glucosamine-1-¹⁴C,
à des accepteurs endogènes, dans les fractions microsomiques
du foie de congre (*Conger vulgaris*)***

MARIE-BÉNÉDICTE MARTEL-PRADAL, GISÈLE BERTHILLIER ET RENÉ GOT

Laboratoire de Biochimie, U E R Lyon-Sud, B P 12, 69-Oullins (France)

(Reçu le 17 novembre 1971; accepté après modification le 3 janvier 1972)

Les sérums de poisson sont généralement très riches en glycoprotéines puisqu'ils ne possèdent que peu ou pas d'albumine. On y retrouve d'ailleurs des glycoprotéines présentant de grandes analogies avec les glycoprotéines de mammifère, par leur fonction et par leur constitution¹⁻³. C'est ainsi que les protéines sériques d'un téléostéen apode, le congre, contiennent environ 5 fois plus d'hexoses ou d'hexosamines que les protéines du sérum humain, les monosaccharides correspondants étant les mêmes dans les deux cas, essentiellement D-galactose, D-mannose et N-acétyl-D-glucosamine.

Chez les mammifères, les glycoprotéines sériques sont synthétisées dans le foie, la fraction peptidique au niveau de l'ergastoplasme, la fraction polysaccharidique par des glycosyltransférases membranaires qui catalysent le transfert de chaque résidu glucidique à partir de leur forme coenzymatique active. Des systèmes acellulaires permettent d'étudier *in vitro* les caractéristiques de ces enzymes.

Le but de ce travail est de rechercher si de telles transférases, fonctionnant à partir d'UDP-D-galactose, de GDP-D-mannose et d'UDP-N-acétyl-D-glucosamine, existent dans le foie de congre et d'aborder l'étude de leur localisation dans des fractions submicrosomiques. La méthodologie couramment utilisée consiste à incuber des fractions microsomiques en présence de donneurs radioactifs puis de rechercher la radioactivité dans des accepteurs endogènes glycoprotéiques, c'est-à-dire dans des substances insolubles dans l'acide trichloracétique et les solvants des lipides.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Matériel — Les congres, capturés en juin dans la baie de Concarneau, pèsent 3 à 5 kg. Ils sont assommés et les foies sont prélevés immédiatement, lavés et dilacérés dans le tampon de broyage glacé.

*Dédié au Professeur Jean-Émile Courtois à l'occasion de son 65ème anniversaire.

Méthodes — Fractionnement cellulaire différentiel en saccharose 0,25 M⁴ Les morceaux de foie lavés sont broyés dans un broyeur Sorvall « Omnimixer » à hélice, par deux passages de 30 sec à vitesse maximale, en présence de trois fois leur poids de tampon Tris-HCl [chlorhydrate de tris(hydroxyméthyl)aminométhane] 0,02M, pH 7,5, 0,25M en saccharose. L'homogénat ainsi obtenu est fractionné par centrifugation pendant 5 min à $600 \times g$ en noyaux ou cellules non broyées et surnageant. Les 4/5 supérieurs du surnageant post-nucléaire sont centrifugés pendant 20 min à $18\,000 \times g$. Le culot mitochondrial est séparé et les 4/5 supérieurs du surnageant post-mitochondrial sont centrifugés pendant 1 h à $105\,000 \times g$ pour séparer les microsomes de la phase cytoplasmique non particulaire. Toutes les opérations sont effectuées à $+4^\circ$. Chaque fraction obtenue est mise en suspension dans le tampon de broyage et resédimentée deux fois.

Fractionnement cellulaire par une méthode adaptée de celle de Dallner⁵ Les microsomes préparés comme ci-dessus sont remis en suspension dans le même tampon Tris-HCl 0,25M en saccharose et 15mM en chlorure de césium; 6 ml de la suspension sont déposés sur 4 ml du même tampon, mais 1,3M en saccharose. Une centrifugation de 4 h à $144\,000 \times g$ dans le rotor 40-1 de l'ultracentrifugeuse Spinco (modèle L) permet de séparer un culot de membranes granulaires (« rough microsomes ») d'une zone située à l'interface des deux solutions de saccharose, contenant les membranes agranulaires (« smooth microsomes »). Cette zone, aspirée à l'aide d'une seringue, est diluée 10 fois par le tampon sans saccharose, tandis que les membranes granulaires sont remises en suspension dans le même tampon. Une dernière centrifugation de 2 h à $144\,000 \times g$ permet de sédimenter ces deux fractions.

Dosages enzymatiques — Les fractions subcellulaires sont remises en suspension dans le tampon de broyage, à une concentration de 10 mg de protéines par ml pour les microsomes totaux, 20 mg par ml pour les mitochondries et la phase cytoplasmique soluble et 3 mg par ml pour les deux fractions membranaires. Les activités enzymatiques suivantes sont dosées : cytochrome oxydase⁴ (E C 1.9.3.1) avec une unité définie selon de Duve *et al*⁶, succinate cytochrome c oxydoréductase⁷ (E C 1.3.99.1), phosphatase acide⁸ (E C 3.1.2.9), β -D-galactosidase (E C 3.2.1.23), α -D-mannosidase (E C 3.2.1.24) et *N*-acétyl- β -D-glucosaminidase⁹ (E C 3.2.1.30), NADH: cytochrome c oxydoréductase¹⁰ (E C. 1.6.2.1), D-glucose-6-phosphatase (E C 3.1.2.9) et 5'-nucléotidase (E C 3.1.3.5), le phosphate libéré étant dosé par la méthode de Fiske et Subbarow¹¹, ATPases (E C 3.6.1.3) activées par Na^+ , K^+ et Mg^{2+} , l'ADP formé étant dosé par la méthode de Avigand et England¹².

Pour déterminer les activités de transfert, les monosaccharides radioactifs sont incorporés dans des macromolécules glycoprotéiques à partir, respectivement, d'UDP-D-galactose- $I\text{-}^3\text{H}$ (N E N lot N° 489.096, 1 540 C/mol), de GDP-D-mannose- $I\text{-}^{14}\text{C}$ (N E N lot N° 483 706, 154 C/mol) ou d'UDP-*N*-acétyl-D-glucosamine- $I\text{-}^{14}\text{C}$ (N E N lot N° 483 156, 42 C/mol). Après 30 min d'incubation à 37° (les milieux d'incubation sont précisés dans le Tableau I), les protéines sont précipitées par l'acide trichloracétique à 10% sur filtre de fibre de verre (Glass fibre paper Whatman GF/B). Les filtres sont lavés par un mélange chloroforme-méthanol (2.1), séchés et leur

radioactivité est déterminée dans un compteur à scintillation liquide Packard Tri-Carb. Le liquide scintillateur est constitué de toluène (Merck) contenant 5 g/l de 2,5-diphényloxazole (PPO) et 0,3 g/l de 1,4-bis-2-(4-méthyl-5-phényloxazolyl)-benzène (Dimethyl-POPOP). La radioactivité spécifique est exprimée en c.p.m./mg de protéines. Tous les essais sont effectués en double exemplaire par rapport à des témoins ne contenant pas de suspension particulaire et des temps d'incubation nuls.

Les protéines sont dosées par la méthode du biuret.

RÉSULTATS

Le surnageant post-mitochondrial possède les trois activités de transfert recherchées. Quelques caractéristiques de fonctionnement des enzymes correspondantes sont données dans le Tableau I.

TABLEAU I

CARACTÉRISTIQUES DE FONCTIONNEMENT DES GLYCOSYLTRANSFERASES

Milieu d'incubation ^a	C.p.m./mg de protéines		
	Galactose-1- ³ H	Mannose-1- ¹⁴ C	2-Acetamido-2-desoxy-D-glucose-1- ¹⁴ C
Complet	250	1000	550
– Mn ²⁺	8	300	10
– Mn ²⁺ , + Mg ²⁺	90	1100	60
– Triton X-100	100		350
+ Triton X-100		350	

^aLes milieux d'incubation sont constitués de 150 μ l de tampon piperazine-glycylglycine 0,05M, pH 6,5, 100 μ l de la suspension de microsomes totaux, 5 μ l d'une solution de chlorure de magnésium (concentration finale 4mM), 10 μ l de Triton X-100 à 10% (sauf pour la D-mannosyltransferase) et 10 μ l de la solution de nucléotides radioactifs (soit 0,1 μ C pour 1 UDP-D-galactose-1-³H et 0,01 μ C pour le GDP-D-mannose-1-¹⁴C ou l'UDP-N-acétyl-D-glucosamine-1-¹⁴C).

La D-galactosyltransferase et la N-acétyl-D-glucosaminyltransferase requièrent la présence du cation Mn²⁺ et sont activées par le Triton X-100. Il faut préciser que cette activation est liée de façon très étroite au rapport Triton/protéine, un optimum étant atteint pour une concentration de 0,5% en Triton par mg de protéines.

Au contraire, la D-mannosyltransferase est inhibée par le Triton X-100, cette inhibition s'accroît lorsque la concentration en Triton augmente, elle est totale pour des concentrations de l'ordre de 2%. Cette transférase ne semble pas avoir un besoin absolu en Mn²⁺, toutefois, elle est activée lorsqu'on ajoute ce cation au milieu, le cation Mg²⁺ jouant un rôle équivalent.

Le Tableau II donne la répartition de diverses activités enzymatiques entre les 3 fractions subcellulaires obtenues par la méthode de fractionnement utilisée qui semble s'appliquer correctement au foie de congre. Ainsi, la fraction « Mitochondries », qui n'est en l'occurrence qu'un culot obtenu à 18 000 $\times g$, contient effective-

ment la quasi totalité de la cytochrome oxydase et de la succinate cytochrome c réductase, enzymes caractéristiques des mitochondries. Toutefois, une part non négligeable des lysosomes et des microsomes (25–30 %) sédimentent également avec cette fraction.

TABLEAU II

RÉPARTITION DE DIVERSES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES DANS LES FRACTIONS SUBCELLULAIRES DU FOIE DE CONGRE^a

Enzymes	Fractions subcellulaires		
	Mitochondries	Microsomes	Phase cyto-plasmique soluble
Cytochrome oxydase	99 ($2,6 \times 10^{-3}$)	1	0
Succinate cytochrome c réductase	98,5 (34×10^{-2})	1,5	0
Phosphatase acide	25 (2,9)	42 (4,7)	33 (3,7)
β -D-Galactosidase	26 (16×10^{-2})	28 (17×10^{-2})	46 (28×10^{-2})
α -D-Mannosidase	21 (9×10^{-2})	39,5 (17×10^{-2})	39,5 (17×10^{-2})
N-Acétyle- β -D-glucosaminidase	7	22 (3×10^{-2})	71 (1×10^{-1})
NADH cytochrome c réductase	28 ($0,9 \times 10^{-2}$)	66 (2×10^{-2})	6
D-Glucose-6-phosphatase	31 ($0,8 \times 10^{-2}$)	67 ($1,8 \times 10^{-2}$)	2
Na ⁺ K ⁺ ATPase	25 ($0,6 \times 10^{-2}$)	32 ($7,5 \times 10^{-2}$)	43 (1×10^{-1})
Mg ²⁺ ATPase	16	77 (0,63)	7
5'-Nucleotidase	25 ($0,6 \times 10^{-2}$)	46 ($1,2 \times 10^{-2}$)	29 ($0,75 \times 10^{-2}$)
D-Galactosyltransférase	6	90 (500 c p m /mg)	4
D-Mannosyltransférase	6	82 (2100 c p m /mg)	12
N-Acétyle-D-glucosaminyltransférase	18	78 (1100 c p m /mg)	4
D-Glucose-6-phosphate déshydrogénase	0	17	83 ($3,5 \times 10^{-2}$)

^aLa répartition est exprimée en % de l'activité récupérée, les chiffres entre parenthèses donnent les activités spécifiques des fractions les plus riches (en μ mole/min/mg de protéine)

Les microsomes, bien que contaminés par les lysosomes, possèdent cependant près de 70 % de la D-glucose-6-phosphatase et de la NADH cytochrome c réductase. C'est dans cette fraction que l'on trouve l'essentiel des glycosyltransférases dont la localisation microsomique paraît ainsi démontrée. Par rapport à l'homogénat total, on y récupère 80 % de la D-galactosyltransférase, 70 % de la D-mannosyltransférase et 75 % de la N-acétyle-D-glucosaminyltransférase. La D-glucose-6-phosphate-déshydrogénase est presque en totalité dans la phase cytoplasmique non particulaire.

Seule, la phosphatase acide, enzyme marqueuse des lysosomes, se répartit dans les trois fractions. Mais on sait que les lysosomes représentent un groupe d'organites cellulaires très hétérogène allant des prélysosomes, peut-être d'origine golgienne, à des lysosomes spécifiques de certaines activités enzymatiques ou à divers phagolysosomes.

Enfin, la classique méthode de Dallner, qui permet de séparer deux fractions microsomiques distinctes, s'avère particulièrement fructueuse pour la localisation des activités de transfert (Tableau III). En effet, si la 5'-nucléotidase, enzyme marqueuse des membranes plasmiques, la Mg²⁺-ATPase, la NADH cytochrome c réductase et

surtout la glucose-6-phosphatase se répartissent de façon sensiblement égale entre ces 2 fractions, ainsi qu'on pouvait s'y attendre¹⁴, la D-mannosyltransférase se retrouve en totalité dans les membranes granulaires, la D-galactosyltransférase dans les membranes lisses et la N-acétyl-D-glucosaminyltransférase se répartit pour 1/3 dans les membranes granulaires et pour 2/3 dans les membranes agranulaires

TABLEAU III

REPARTITION DE DIVERSES ACTIVITES ENZYMATIQUES DANS LES FRACTIONS MICROSOMIQUES OBTENUES PAR LA METHODE DE DALLNER^{5 a}

Enzymes	Membranes granulaires ("rough microsomes")	Membranes agranulaires ("smooth microsomes")
NADH cytochrome c réductase	56 (4×10^{-3})	44 ($3,3 \times 10^{-3}$)
D-Glucose-6-phosphatase	57 ($2,7 \times 10^{-3}$)	43 (2×10^{-3})
Na ⁺ K ⁺ ATPase	72 (24×10^{-2})	28 ($9,5 \times 10^{-3}$)
Mg ²⁺ ATPase	44 (0,12)	56 (0,15)
5'-Nucléotidase	47 ($1,25 \times 10^{-2}$)	53 ($1,42 \times 10^{-2}$)
D-Galactosyltransférase	0	100 (460 c p m /mg)
D-Mannosyltransférase	100 (280 c p m /mg)	0
N-Acétyl-D-glucosaminyltransférase	38 (185 c p m /mg)	62 (304 c p m /mg)

^aLa repartition est exprimée en % de l'activité récupérée, les chiffres entre parenthèses donnent les activités spécifiques (en μ mole/min/mg de protéine)

DISCUSSION

Ainsi, les principales glycosyltransférases hépatiques présentent des caractéristiques sensiblement identiques chez le congre et chez les mammifères, en particulier l'action du manganèse, qui semble assez générale chez ces enzymes, et l'effet activateur du Triton X-100 sur deux d'entre elles

L'essentiel des activités de transfert de l'homogenat se retrouve dans la fraction microsomique, ce qui confirme une localisation qui est celle de presque toutes les enzymes de ce type étudiées à ce jour

Les activités spécifiques de ces glycosyltransférases microsomiques du foie de congre sont relativement importantes. Ce fait est sans doute en rapport avec la teneur élevée du sérum de congre en glycoprotéines; rappelons que le sérum de congre contient environ deux fois plus d'hexoses et quatre fois plus d'hexosamines par ml que le sérum humain¹

Quant à la répartition submicrosomique, elle s'avère beaucoup plus nette dans le foie de congre que chez les mammifères. En effet, la D-mannosyltransférase du congre se retrouve intégralement dans les membranes granulaires, alors que chez le lapin, par exemple, environ 40% de celle-ci est localisée dans les membranes lisses¹⁵

De même, la D-galactosyltransférase est située en totalité dans les membranes lisses des hépatocytes de congre, alors qu'on l'a trouvée en quantité non négligeable dans les membranes granulaires du foie de lapin¹⁵ ou de rat, le reste étant localisé dans l'appareil de Golgi^{10 16}

La répartition de la *N*-acétyl-D-glucosaminyltransférase est voisine de celle mise en évidence chez les mammifères puisqu'on en retrouve dans les membranes granulaires et dans les membranes lisses, en particulier l'appareil de Golgi^{10 17}

Toutefois, il est bon de rappeler que tous les résultats rapportés ici ont été obtenus sur accepteurs endogènes. Il est donc possible que la répartition submicrosomique des activités de transfert soit liée non seulement à l'enzyme correspondante mais également à la présence de l'accepteur endogène dans la même fraction. Cependant, les accepteurs endogènes sont liés aux membranes comme les transférases où se trouve l'enzyme devrait se trouver le substrat. Si les accepteurs endogènes peuvent effectivement représenter un facteur limitant dans l'activité de transfert, il semble peu vraisemblable que leur localisation membranaire diffère totalement de celle des transférases. Nous préparons actuellement des glycoprotéines de sérum de sélacien qui pourraient être utilisées comme accepteur exogène et qui permettraient ainsi de lever ce doute.

Dans le foie, les accepteurs endogènes sont, en grande partie, des glycoprotéines sériques en cours de synthèse. Bien qu'on ne connaisse pas avec précision la constitution de ces glycoprotéines, les analogies de composition qu'elles présentent avec celles des mammifères permettent de supposer que leurs structures doivent être voisines.

Aussi peut-on penser que la localisation submicrosomique des glycosyltransférases est en rapport direct avec la position des sucres dans les chaînes polysaccharidiques des glycoprotéines. La *N*-acétyl-D-glucosaminyltransférase mise en évidence dans les membranes granulaires est sans doute responsable du transfert de la première *N*-acétyl-D-glucosamine, située à l'extrémité reductrice des chaînes. Cette D-glucosamine serait suivie d'un enchaînement de D-mannoses transférés par la D-mannosyltransférase ergastoplasmique. D'autres résidus *N*-acétyl-D-glucosamine se trouveraient en position plus externe, par exemple dans des *N*-acétyllactosamines terminales du côté non réducteur, d'où la présence dans les membranes lisses de *N*-acétyl-D-glucosaminyltransférase et de D-galactosyltransférase, le D-galactose n'apparaissant pas dans les parties internes des chaînes polysaccharidiques.

REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à exprimer leurs remerciements à MM Nguyen van Thoai et Le Gal, qui ont bien voulu les accueillir au laboratoire maritime de Concarneau.

RÉFÉRENCES

- 1 R. GOT, *C R Soc Biol*, 159 (1965) 2323
- 2 R. GOT, J. FONT ET Y. GOUSSEAU, *Comp Biochem Physiol*, 23 (1967) 317
- 3 R. GOT, J. FROT-COUTAZ, G. BERTHILLIER ET G. BERTAGNOLIO, *Comp Biochem Physiol*, 26 (1968) 947
- 4 F. APPELMANS, R. WATTIAUX ET C. DE DUVE, *Biochem J*, 59 (1955) 438
- 5 G. DALLNER, *Acta Pathol Microbiol Scand, Suppl*, 166 (1963)

Carbohydr Res, 24 (1972) 479-485

- 6 C DE DUVE, B C PRESSMANN, R GIANETTO, R WATTIAUX ET F APPELMANS, *Biochem J*, 60 (1955) 604
- 7 A HORVAT ET O TOUSTER, *Biochim Biophys Acta*, 148 (1967) 725
- 8 N H FISHMAN ET F LERNER, *J Biol Chem*, 200 (1953) 89
- 9 O P BAHL ET K M L AGRAWAL, *J. Biol Chem*, 243 (1968) 98
- 10 H SCHACHTER, I JABBAL, R L HUDGIN, L PINTERIC, E J MCGUIRE ET S ROSEMAN, *J Biol Chem*, 245 (1970) 1090
- 11 C H FISKE ET Y. SUBBAROW, *J Biol Chem*, 66 (1925) 375
- 12 G AVIGAND ET S ENGLAND, *J Biol Chem*, 243 (1968) 1511
- 13 G W LOHR ET H D WALLER, dans H U BERGMAYER (Ed), *Methods of Enzymatic Analysis*, Verlag Chemie, Weinheim, 1963, p 744
- 14 A LESKES, P SIEKEVITZ ET G E PALADE, *J Cell Biol*, 49 (1971) 288
- 15 J MOLNAR, M TETAS ET H CHAO, *Biochem Biophys Res Commun*, 37 (1969) 684
- 16 D J MORRE, L M MERLIN ET T W KEENAN, *Biochem Biophys Res Commun*, 37 (1969) 813
- 17 R R WAGNER ET M A CYNKIN, *Biochem Biophys Res Commun*, 35 (1969) 139