

Action de divers effecteurs sur l'activité biologique de la mannosyl-transférase microsomiale des splénocytes de Rat

Au cours de la biosynthèse des glycoprotéines, divers systèmes enzymatiques de transglycosylations assurent la fixation des chaînons glucidiques sur les polypeptides¹. La mise en place des unités de D-mannose, à partir de la forme coenzymatique active le GDP-mannose, est assurée par des mannosyl-transférases présentes aussi bien chez les êtres inférieurs que dans les tissus des animaux supérieurs²⁻⁶. Nous avons récemment mis en évidence⁷, au niveau des microsomes des cellules spléniques, une mannosyl-transférase très active. Elle catalyse le transfert du mannose sur des protéines endogènes, fonctionne à un pH optimum de 5,8, à une température optimale de 30 °C, est très sensible à la dénaturation thermique et à toute élévation de la force ionique. Son affinité pour le GDP-mannose est très grande ($K_m = 0,1 \mu M$). L'enzyme est activé par les ions Mn^{++} , les nucléotides et les nucléosides-triphosphates, alors qu'il est inhibé par les nucléosides-diphosphates, et un détergent, le Triton X 100.

Le système acellulaire microsomial mannosyl-transférase utilisé, préparé à partir des splénocytes de rats Wistar mâles de 250 g, comprend: 200 μl de la suspension de microsomes en tampon *Tris*-Maléate 0,05 M, pH 5,8 contenant 2 à 3 mg/ml de protéines dosées par la méthode de LOWRY et al.⁸; 10 μl de $MnCl_2$ permettant d'obtenir une concentration finale de $5 \times 10^{-3} M$ dans le milieu; 10 μl d'une solution contenant $1,2 \times 10^{-5}$ μ moles de GDP-mannose ¹⁴C (uniformément marqué, activité spécifique $1,7 \times 10^{-2}$ mCi/mM, NEN Corporation). Les incubations sont réalisées à 30 °C. Au terme du temps de biosynthèse, les macromolécules glycoprotéiques sont précipitées par addition d'acide trichloracétique (concentration finale p/v 10%) sur filtre de fibre de verre (Whatman Glass Paper, GF/B). Les précipités sont lavés par un mélange méthylal/méthanol (4/1), puis séchés pendant 1 h à 100 °C. La radioactivité est évaluée, en flacons normalisés de comptage, en présence de 5 ml de liquide scintillateur (PPO 5 g, diméthyl-POPOP 0,3 g, toluène 1 l) dans un compteur à scintillation liquide Tri-Carb Packard.

L'action de deux détergents, les Cemulsol NPT 6 et NPT 12 a été étudiée pour des concentrations allant de 0 à 1% dans le milieu réactionnel. La Figure 1 montre que le Cemulsol NPT 6 est légèrement activateur à la concentration de 0,2%, puis que des concentrations supérieures inhibent rapidement l'enzyme; le Cemulsol NPT 12 est inhibiteur à toute concentration de même que le désoxycholate de sodium. C'est une preuve de la très grande dépendance du système enzymatique à l'égard de son environnement architectural dans les microsomes.

L'activation observée avec les nucléosides-triphosphates (ATP et GTP) est retrouvée avec leurs analogues structuraux non hydrolysables, les $\beta \gamma$ -méthylène-ATP et $\beta \gamma$ -méthylène-GTP (Tableau). C'est la preuve que les nucléosides-triphosphates activent le système grâce à leurs propriétés conformationnelles et non pas grâce à un éventuel apport énergétique. L'introduction dans le système acellulaire microsomial d'un complexe fournisseur d'énergie (phosphoénol-pyruvate 5 μ moles, pyru-

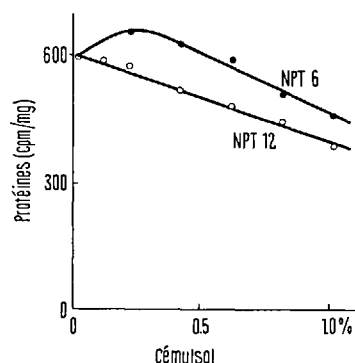


Fig. 1. Influence du Cemulsol NPT 6 et NPT 12 sur l'activité mannosyl-transférase microsomiale des splénocytes.

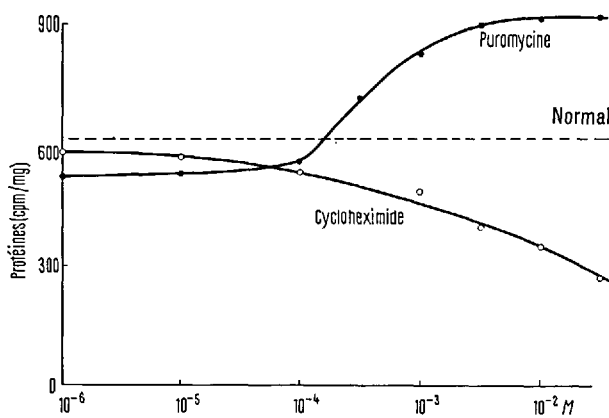


Fig. 2. Influence du Cycloheximide et de la Puromycine sur l'activité mannosyl-transférase microsomiale des splénocytes.

Action des nucléosides-triphosphates et de leurs analogues structuraux sur l'activité mannosyl-transférase microsomiale des splénocytes

Concentrations (M)	Effecteurs			
	ATP	$\beta \gamma$ CH ₂ ATP	GTP	$\beta \gamma$ CH ₂ GTP
10 ⁻³	1,70	1,75	1,25	2
10 ⁻⁴	1,52	1,53	1,50	1,80
10 ⁻⁵	1,44	0,96	1,66	1,60
10 ⁻⁶	1,30	0,84	1,83	1,40

Les résultats sont exprimés en valeur du rapport v/v_0 , v_0 étant la vitesse de la réaction en l'absence de l'effecteur étudié.

- P. LOUISOT et R. GOT, Bull. Soc. Chim. biol. 52, 455 (1970).
- R. LETOUBLON, M. RICHARD, P. LOUISOT et R. GOT, Europ. J. Biochem. 78, 194 (1971).
- M. RICHARD, R. LETOUBLON, P. LOUISOT et R. GOT, Biochim. biophys. Acta, 230, 603 (1971).
- J. F. CACCAM, J. J. JACKSON et E. H. EYLAR, Biochem. Biophys. Res. Commun. 35, 505 (1969).
- J. MOLNAR, H. CHAO et G. MARKIVIC, Arch. Biochem. Biophys. 134, 533 (1969).
- J. MOLNAR, M. TETAS et H. CHAO, Biochem. Biophys. Res. Commun. 37, 684 (1969).
- M. RICHARD, P. BROQUET, R. GOT et P. LOUISOT, Biochimie, 53, 107 (1971).
- O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR et R. J. RANDALL, J. biol. Chem. 193, 265 (1951).

vate-kinase 15 µg) ne modifie d'ailleurs pas la cinétique d'incorporation.

Le dithiothréitol à des concentrations comprises entre 10^{-3} et $10^{-6}M$ entraîne une inhibition de l'activité enzymatique voisine de 35%. Enfin la puromycine active la transglycosylation alors que le cycloheximide l'inhibe de manière significative (Figure 2). Ce résultat est important: il montre que, pour la mannosyl-transférase microsomique splénique, il n'est pas nécessaire que le polypeptide soit encore fixé aux polysomes pour que la transglycosylation ait lieu; au contraire le système est beaucoup plus efficace lorsque le polypeptide, détaché des polysomes par la puromycine, est à l'état libre dans le milieu. Quant au cycloheximide, il inhibe le système en le privant vraisemblablement des molécules protéiniques endogènes acceptrices du mannose ^{14}C .

Summary. The splenic cellular microsomal mannosyl-transferase is inhibited by detergent (Triton X 100 and Cemulsol), deoxycholate, dithiothreitol and cycloheximide, but activated by nucleoside-triphosphates (ATP and GTP) and analogous (β γ -methylene-ATP or GTP); the enzyme is also activated by puromycine. This is good evidence for the sensitivity of the enzyme to any alteration of subcellular architecture at the microsomal level, and for the possibility of good transglycosylation when polypeptide is detached of ribosomes.

M. RICHARD, P. BROQUET et P. LOUISOT

Université de Lyon, Unité Médicale d'Enseignement et de Recherches Lyon-Sud, Laboratoire de Biochimie, B.P. 12, F-69 Oullins (France), 10 March 1971.

Composition of Scales from the Moth *Xylophasia monoglypha*

Although there have been several detailed accounts of the ultrastructure of lepidopteran scales with some studies of molecular orientation¹⁻⁴ information is still sparse regarding the chemical composition of the macromolecules in these specialized cuticular projections. Such chemical studies as there are have been largely confined to tests for chitin based on solubility of scales in alkali or response to the chitosan test^{1,2,5}.

RICHARDS⁵ examined scales from a wide range of lepidopteran species demonstrating chitin to be present in most cases but absent in some. When first formed, scales seemed to be largely protein and had chitin added later. The elaborately organized iridescent scales of *Morpho cypris* apparently contained no chitin¹. PICKEN² noted that the earliest scale rudiments in the moth *Ephesia sericarium* contained more orientated protein than chitin while in the mature scales the chitin fraction increased considerably. These observations point to the architecture of the mature scale being a function of the fibrillar protein organization in the scale rudiment. Amino acid analyses of scales might therefore be expected to reflect the presence of structural protein. The present paper gives amino acid and glucosamine analyses for the scales and hairs of the moth *Xylophasia monoglypha*.

Scales were hydrolysed for 24-48 h with 6N HCl under nitrogen at 105°C. Aliquots of hydrolysate containing 0.03-0.05 mg material were taken for amino acid and amino sugar analysis in a Locarte amino acid analyser. Corrections were made to the computed analyses for hydrolytic losses of serine, threonine, tyrosine and glucosamine.

The amino acid compositions of the forewing scales, thorax hairs and tail tuft hairs are given in the Table together with analyses of scale and vein-free cuticle from the forewing and hair-free abdominal cuticle.

It has been demonstrated on several occasions that at the macromolecular level the arthropod cuticle consists of a complex association of proteins with the polysaccharide chitin, stabilized to a greater or lesser extent by 'tanning'⁶. It has also been shown that several different protein fractions can be obtained by selective extraction of cuticle and more recently that these fractions, each of which has a different amino acid composition, are not themselves homogeneous but contain mixtures of proteins⁷⁻⁹. The pattern of protein and amino acid composition in cuticle alters markedly during development some of the changes being attributable to sclerotization^{8,9}.

While it was prohibitively difficult to obtain sufficient quantities of scales for meaningful selective extraction of proteins, the present results indicate that their overall amino acid compositions do not differ too radically from that of the cuticle with which they have a common cellular origin and that their constituent proteins are therefore probably similar. This is particularly clear in the case of the wing cuticle and scales.

Amino acid and glucosamine composition of scales hairs and cuticle from *Xylophasia monoglypha*

Residue	Forewing scales	Thorax hairs	Tail hairs	Forewing cuticle	Abdominal cuticle
Aspartic acid	64	68	57	57	89
Threonine	36	36	31	34	60
Serine	66	70	56	82	83
Glutamic acid	77	69	69	72	106
Proline	57	101	66	74	69
Glycine	203	180	158	176	110
Alanine	145	103	94	140	126
Valine	66	73	119	82	58
Isoleucine	70	57	61	58	79
Leucine	82	80	129	79	15
Tyrosine	38	26	14	26	31
Phenylalanine	12	7	12	18	27
β -Alanine	pres.	pres.	pres.	pres.	pres.
Histidine	27	69	82	51	48
Lysine	24	39	28	34	57
Arginine	33	22	24	24	42
Glucosamine	342	182	616	234	341

Amino acids in residues per 1000 total residues. Glucosamine in residues per 1000 amino acid residues.

¹ T. F. ANDERSON and A. G. RICHARDS, *J. appl. Phys.* **13**, 748 (1942).

² L. E. R. PICKEN, *Phil. Trans. R. Soc. Ser. B*, **234**, 1 (1949).

³ A. KUHN and M. AN, *Biol. Zentbl.* **65**, 30 (1946).

⁴ K. SCHMIDT, *Zool. Jb. Anat.* **82**, 189 (1965).

⁵ A. G. RICHARDS, *Ann. Ent. Soc. Am.* **40**, 227 (1947).

⁶ K. M. RUDALL, *Adv. Insect Physiol.* **7**, 257 (1963).

⁷ R. H. HACKMAN and M. GOLDBERG, *J. Insect Physiol.* **2**, 221 (1958).

⁸ P. KARLSON, K. E. SEKERI and V. I. MARMARAS, *J. Insect Physiol.* **15**, 319 (1969).

⁹ R. P. SRIVASTAVA, *J. Insect Physiol.* **17**, 189 (1971).