

# RÔLE D'UN INTERMÉDIAIRE LIPIDIQUE DANS LE TRANSFERT DU MANNOSE À DES ACCEPTEURS GLYCOPROTÉIQUES ENDOGÈNES CHEZ *ASPERGILLUS NIGER*

R. LETOUBLON et R. GOT

*Laboratoire de Biochimie des membranes, Université Claude Bernard – Lyon I – 69621 Villeurbanne – France*

Received 18 July 1974

Previous studies from this laboratory have shown that a particulate preparation from *Aspergillus niger* catalyses the incorporation of mannose, from GDP-mannose, into a lipid fraction which has been identified as polyprenyl phosphate mannose (PPM). The results of kinetic studies presented in this communication suggest that PPM serves as an intermediate in the enzymatic transfer of mannosyl unit from GDP-mannose to endogenous glycoproteins.  $\beta$ -elimination or Pronase treatment and subsequent dialysis result respectively in 70% or 90% release of radioactivity. The absence of passive penetration of GDP-mannose across microsome membranes and the inhibitory effect of palmitoyl-CoA on mannose transfer are in good agreement with the involvement of PPM in the transport of mannose across membranes.

## 1. Introduction

La biosynthèse de polyisoprénol phosphate mannose, à partir de GDP-mannose a été décrite dans divers systèmes eucaryotes et l'intervention de cet intermédiaire dans la biosynthèse des glycoprotéines a été récemment démontrée dans le foie de rat [1], de hamster [2], dans un myélome de souris [3], dans l'oviducte de poule et la thyroïde de boeuf [4] ou dans la levure [5].

Des études préliminaires effectuées dans ce laboratoire avaient montré que des préparations microsomiques d'*Aspergillus niger* catalysaient l'incorporation de mannose, à partir de GDP-mannose, dans une fraction lipidique identifiée comme polyisoprénol phosphate mannose [6]. Les études cinétiques présentées dans cette note confirment que ce mannolipide est le véritable donneur de mannose aux accepteurs glycoprotéiques endogènes. Le rôle de cet intermédiaire lipidique comme transporteur de mannose à travers la membrane est évoqué.

## 2. Matériel et méthodes

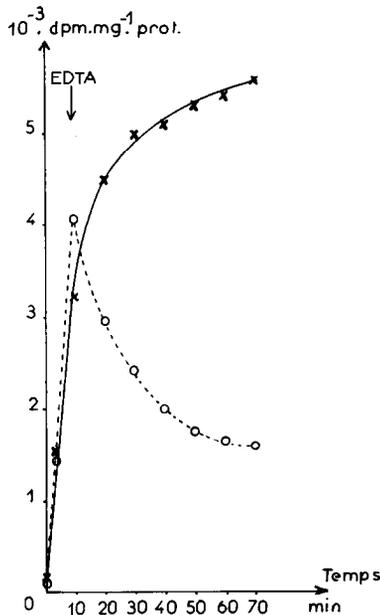
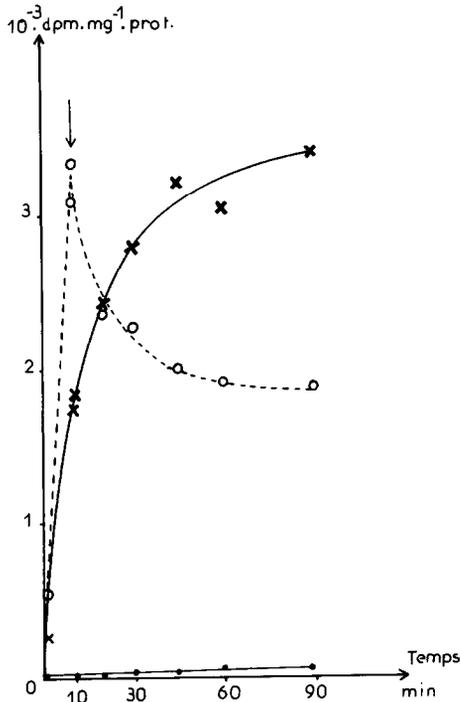
Les milieux d'incorporation contenant la prépara-

tion microsomique [7] ont été décrits précédemment [6] ainsi que l'extraction des lipides ou la récupération des protéines [8]. Les conditions selon lesquelles les cinétiques d'incorporation sont réalisées sont précisées dans la légende de la fig. 1.

La libération de la radioactivité liée après mannosylation est obtenue par  $\beta$ -élimination ou traitement à la pronase de la fraction protéique [5]. La perméabilité apparente des membranes microsomiques est étudiée selon Nilsson et al. [9].

## 3. Résultats et discussion

L'incubation en présence de GDP-[U- $^{14}$ C]mannose permet d'obtenir une incorporation de radioactivité dans les lipides et les protéines. Après élimination du précurseur radioactif, la poursuite de l'incubation donne les cinétiques de la fig. 1a: on observe une chute de la radioactivité lipidique alors que l'incorporation se poursuit normalement dans les accepteurs protéiques. Des courbes identiques sont obtenues sans élimination du précurseur radioactif, mais après addition d'EDTA (fig. 1b) qui inhibe la GDP-mannose: lipide mannosyl transférase dont le fonctionnement nécessite un cation divalent  $Mn^{2+}$  ou  $Mg^{2+}$  [6].



Il apparaît donc que le véritable donneur de manno-  
se aux glycoprotéines est le polyisoprénol phosphate  
mannose.

La cinétique d'hydrolyse, représentée sur la fig. 2,  
confirme d'ailleurs le caractère protéique des accep-  
teurs puisque l'action de la pronase durant 1 heure  
rend l'essentiel de la radioactivité non précipitable par  
l'acide trichloracétique à 10%. En outre, environ 70%  
de la radioactivité précipitable par l'acide trichloracé-  
tique devient dialysable en présence de NaOH 0,1 N  
(21°C; 24 hr). Il est admis que ce traitement rompt  
spécifiquement la liaison O-glycosidique à la sérine  
ou à la thréonine [10].

La raison d'être du polyisoprénol phosphate manno-  
se, intermédiaire obligatoire du transfert de manno-  
se aux glycoprotéines endogènes, se trouve donc posée.  
Un rôle éventuel peut être envisagé: celui de transpor-  
teur de manno-  
se à travers la membrane. Effective-  
ment il faut considérer que les accepteurs glycoprotéi-  
ques endogènes sont localisés sur la face interne des  
membranes du réticulum endoplasmique, alors que  
le GDP-mannose, donneur primaire, est situé dans la  
phase cytoplasmique soluble. Or les membranes  
microsomiques sont semi-perméables et la nécessité  
d'une translocation des sucres activés est apparue:  
en effet, si des molécules non chargées de poids  
moléculaire inférieur à 600, peuvent traverser ces  
membranes, les molécules chargées, acétate et mévalo-

Fig. 1. Cinétiques d'incorporation de manno-<sup>14</sup>C dans les fractions lipidiques (○—○) et protéiques (×—×) des microsomes d'*Aspergillus niger*. a) Le milieu d'incubation contient 100 μl d'une suspension de microsomes (0,2 mg de protéines) dans un tampon MES 0,05 M, pH 6,8, 0,5 mM en Mn Cl<sub>2</sub> et 10 μl d'une solution de GDP-[U-<sup>14</sup>C]mannose à 2 μCi/ml (Radiochemical Centre, Amersham; activité spécifique 143 mCi/mmol). Au temps 10 min (flèche verticale), le GDP-mannose est éliminé du milieu réactionnel par centrifugation 2 min à 15 000 g, suivie d'un lavage du culot par NaCl 0,1 M. L'incubation est poursuivie dans le même milieu, sans GDP-mannose. Aux temps indiqués, la radioactivité est déterminée dans les fractions lipidique, protéique ou la phase soluble (●—●) selon la méthode précédemment décrite [6]. (Des résultats similaires sont obtenus en présence de MgCl<sub>2</sub> (5 mM) à pH 8,8). b) Le milieu réactionnel est identique au précédent. Au temps 10 min, 10 μl d'une solution 12 mM d'EDTA sont ajoutés et l'incubation est poursuivie comme dans le cas précédent.

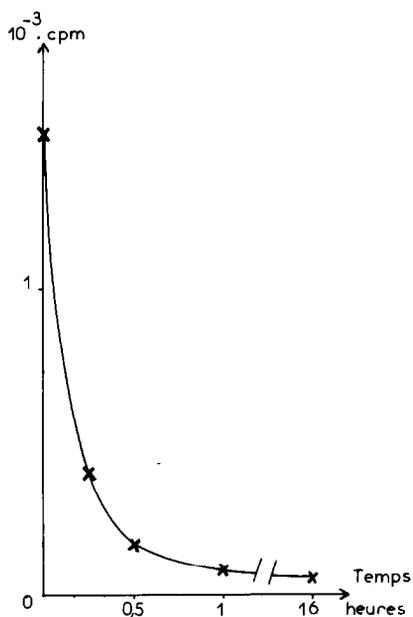


Fig. 2. Cinétique d'hydrolyse des protéines membranaires par la pronase. Après incorporation de mannose radioactif dans une suspension microsmique le précipité obtenue par le mélange chloroforme: méthanol (2/1) est repris dans 2 ml de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 0,5%, pH 8, et hydrolysé à  $37^\circ\text{C}$  par 0,1 mg de pronase. Des parties aliquotes sont prélevées aux temps indiqués et la radioactivité est déterminée dans les précipités obtenus par l'acide trichloracétique à 10% (concentration finale).

nate, sont complètement exclues de l'espace intramicrosmique [9].

Ainsi, les résultats du Tableau 1 montrent que le mannose pénètre librement à l'intérieur des vésicules microsmiques où l'UDP-glucose n'a pratiquement pas accès (cette expérience n'a pu être réalisée avec le GDP-mannose radioactif, puisque le mannose est métabolisé par les membranes microsmiques contrairement au glucose). Le polyisoprénol, essentiellement hydrophobe, semble donc tout indiqué pour servir de transporteur de mannose et permettre ainsi l'accès du substrat à la mannosyltransférase membranaire.

Il ne nous a pas été possible d'apporter une preuve directe à ce rôle de l'intermédiaire lipidique. Cependant, l'action du palmityl-CoA sur le transfert du mannose constitue un argument en faveur de cette hypothèse. En effet, cette substance cause une inhibi-

Tableau 1  
Perméabilité apparente des membranes microsmiques d'*Aspergillus niger* au mannose et à l'UDP-glucose

Temps (min)	Radioactivité (cpm) dans la phase intérieure des vésicules microsmiques	
	Mannose $^{14}\text{C}$	UDP-glucose $^{14}\text{C}$
2	100	40
10	200	30
36	300	50
60	340	60

Le milieu d'incubation est identique à celui de la fig. 1 à ceci près que le GDP-mannose radioactif est remplacé par le  $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ mannose (CEA, activité spécifique 150–200 mCi/mmol) ou l'UDP- $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ glucose (Radiochemical Centre, Amersham; activité spécifique 260 mCi/mmol). Aux temps indiqués, la réaction est arrêtée par centrifugation, le culot est lavé et extrait selon Folch et al. [8] et la radioactivité de la phase aqueuse, correspondant à l'intérieur des vésicules, est déterminée.

tion compétitive des systèmes de transport mitochondriaux [11]. Les courbes de la fig. 3 montrent que la palmityl-CoA est effectivement inhibiteur

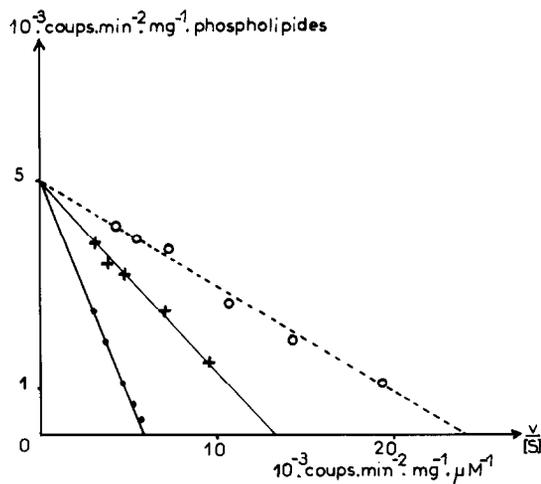


Fig. 3. Action du palmityl CoA sur la vitesse d'incorporation du mannose radioactif dans la fraction lipidique. La représentation utilisée est celle d'Eadie,  $v = f\left(\frac{v}{S}\right)$ . La vitesse d'incorporation est exprimée en cpm par minute d'incubation par mg de phospholipides, en l'absence (o - - o), et en présence de palmityl-CoA  $9 \times 10^{-5}\text{ M}$  (x — x) et  $1,8 \times 10^{-4}\text{ M}$  (● — ●).

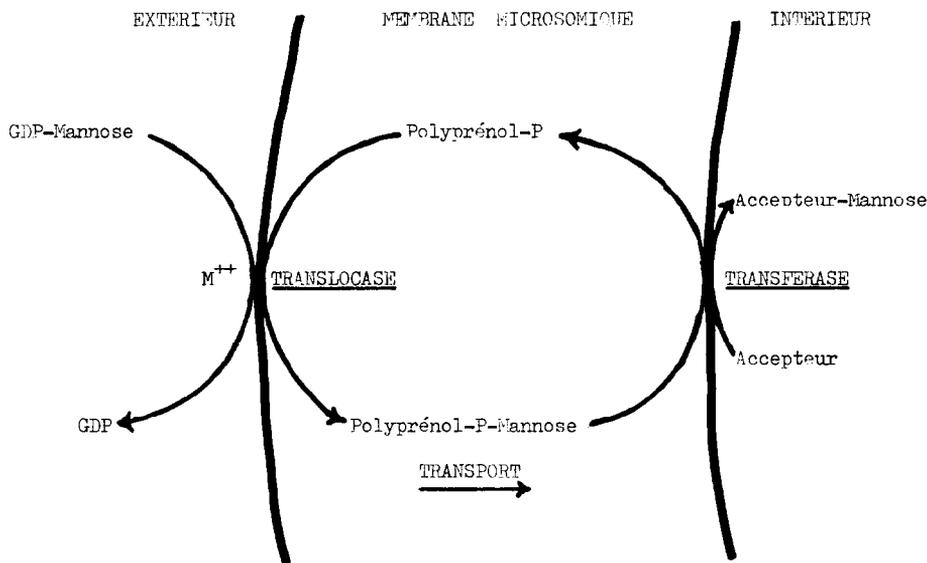


Fig. 4. Schéma du mécanisme postulé pour le transfert de mannose à un accepteur glycoprotéique endogène dans les microsomes d'*Aspergillus niger*.

compétitif de l'incorporation de mannose dans les accepteurs lipidiques ( $K_i = 8 \times 10^{-5}$  M).

Il faut également préciser qu'aucune incorporation n'a pu être obtenue sur accepteur exogène ou à partir du mannanolipide comme donneur. Ces faits expérimentaux sont en accord avec le mécanisme postulé. D'une part, les accepteurs exogènes se trouvent dans la phase soluble et ne sont, par conséquent, pas accessibles à la transférase localisée sur la face interne de la membrane; d'autre part, l'intermédiaire lipidique ne peut jouer son rôle de donneur secondaire de mannose que s'il est incorporé dans la membrane à travers de laquelle il permettrait justement le transport du glucide.

En conclusion, nous suggérons le mécanisme représenté sur la fig. 4. Une translocase, analogue à celle qui, dans la membrane des bactéries, participe à la biosynthèse des peptidoglycanes, catalyse la mannosylation du lipide, faisant passer le mannose d'une phase aqueuse à une phase lipidique, à travers laquelle il est transporté. Une mannosyltransférase à laquelle le mannanolipide a accès, catalyse alors l'incorporation du mannose dans les accepteurs glycoprotéiques situés sur la face interne de la membrane.

## Bibliographie

- [1] Behrens, N. H., Carminatti, H., Staneloni, R. J., Leloir, L. F. et Cantarella, A. I. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 70, 3390-3394.
- [2] Maestri, N. et De Luca, L. (1973) Biochem. Biophys. Res. Comm. 53, 1344-1349.
- [3] Baynes, J. W., Hsu, A. F. et Heath, E. C. (1973) J. Biol. Chem. 248, 5693-5704.
- [4] Waechter, C. J., Lucas, J. J. et Lennarz, W. J. (1973) J. Biol. Chem. 248, 7570-7579.
- [5] Babczinski, P. et Tanner, W. (1973) Biochem. Biophys. Res. Comm. 54, 1119-1124.
- [6] Letoubon, R., Comte, J. et Got, R. (1973) Eur. J. Biochem. 40, 95-101.
- [7] Letoublon, R., Richard, M., Louisot, P. et Got, R. (1971) Eur. J. Biochem. 18, 194-200.
- [8] Folch, J., Lees, H. et Sloane-Stanley, G. H. (1957) J. Biol. Chem. 226, 497-509.
- [9] Nilsson, R., Peterson, E. et Dallner, G. (1973) J. Cell. Biol. 56, 762-776.
- [10] Neuberger, A., Gottschalk, A. et Marshall, R. D. (1966) dans Glycoprotéins (Gottschalk, A., ed.), Vol. 5, p. 265, Elsevier, Amsterdam.
- [11] Morel, F., Lauquin, C., Duszynski, J. et Vignais, P. V. (1974) FEBS Letters 39, 133-138.