

EFFET DE PROTEINES BASIQUES DE FAIBLE POIDS MOLECULAIRE SUR LE TRANSFERT DE MANNOSE DANS LES MICROSOMES D'*ASPERGILLUS NIGER*

Robert LETOUBLON and René GOT

Laboratoire de Biologie et Technologie des Membranes, Université Claude Bernard, Lyon 1, 69621 Villeurbanne, France

Received 18 June 1977

SUMMARY

Basic proteins of low molecular weight activate the transfer of mannose to endogenous glycoprotein acceptors in microsomal membranes of *Aspergillus niger*. The enhancement of mannosyltransferase activity is linked to the activation of the transport of mannose across the membrane. The role of these polycationic proteins on the membrane permeability is discussed.

1. Introduction

Le transfert de mannose dans les membranes microsomiques d'*Aspergillus niger* est un phénomène relativement complexe qui se déroule en trois étapes. Tout d'abord une translocase catalyse l'incorporation de mannose, à partir de GDP-mannose cytosolique, à un polyprénol-phosphate. Le polyprénol-phosphate-mannose ainsi formé assure le transport de mannose à travers la membrane, jusqu'à la mannosyltransférase qui permet la liaison du résidu mannose aux chaînes polysaccharidiques d'accepteurs glycoprotéiques endogènes situés sur la face interne de la membrane [1,2].

Le transfert global est donc lié à la perméabilité membranaire. En comparant les cinétiques d'incorporation de [14 C]mannose, d'une part, au polyprénol phosphate et, d'autre part, aux accepteurs glycoprotéiques, nous avons un moyen de contrôler et de quantifier l'action de divers effecteurs sur la perméabilité.

On sait que les protéines et, plus particulièrement les protéines basiques de faible poids moléculaire comme le cytochrome *c* [3] ou le lysozyme [4] provoquent une augmentation de la perméabilité de vésicules phospholipidiques. Le but de ce travail est de déterminer l'action de telles protéines, non plus

sur la diffusion passive de petites molécules à travers des vésicules artificielles, mais sur un transport dûment caractérisé à travers des membranes biologiques.

2. Matériel et méthodes

La ribonucléase B (5 fois cristallisée, pancréas de boeuf) provenant de NBC, le lysozyme (3 fois cristallisé, blanc d'oeuf) et l'histone (type IIA, thymus de veau) de Sigma et le cytochrome *c* (cristallisé, coeur de cheval) de Boehringer. L' α -lactalbumine était purifiée au laboratoire [5] à partir de colostrum humain.

La préparation des membranes microsomiques a déjà été décrite [1], ainsi que les cinétiques d'incorporation [2]. Brièvement, le milieu d'incubation contient 100 μ l d'une suspension de microsomes (0.4 mg de protéines) dans un tampon Tris-HCl, 0.05 M, pH 8.5, 5 mM en $MgCl_2$ et 10 μ l d'une solution de GDP-[U- 14 C]mannose à 2 μ Ci/ml (Radiochemical Centre, Amersham; activité spécifique 143 mCi/mmol). Aux temps prévus, les fractions lipidiques et protéiques sont obtenues selon la méthode de Folch et al. [6]. Les protéines effectrices sont ajoutées au milieu, au début de l'incubation, sous un volume de 10 μ l.

3. Résultats et discussion

L'addition, au milieu d'incubation, de diverses protéines de faible poids moléculaire se traduit par une augmentation très nette de l'activité de la translocase qui catalyse le transfert du mannose, à partir du GDP-mannose soluble, au dolichol phosphate membranaire; la ribonucléase s'avère la plus efficace (fig.1a). La situation se présente un peu différemment pour le deuxième transfert, du dolichol-phosphate-mannose aux accepteurs glycoprotéiques endogènes;

l' α -lactalbumine est alors sans action, le lysosyme entraîne une activation limitée, cependant que la ribonucléase multiplie par 3 le transfert au bout de 30 min d'incubation, les vitesses initiales étant dans tous les cas peu modifiées (fig.2b).

Il est intéressant de constater qu'une corrélation semble exister entre le point isoélectrique des protéines et leur action sur le transfert global puisque les protéines à pH_i acide (α -lactalbumine, pH_i 5.1) ou trop alcalin (lysosyme, pH_i 11.0) sont pratiquement sans action; l'optimum d'activation se situerait aux

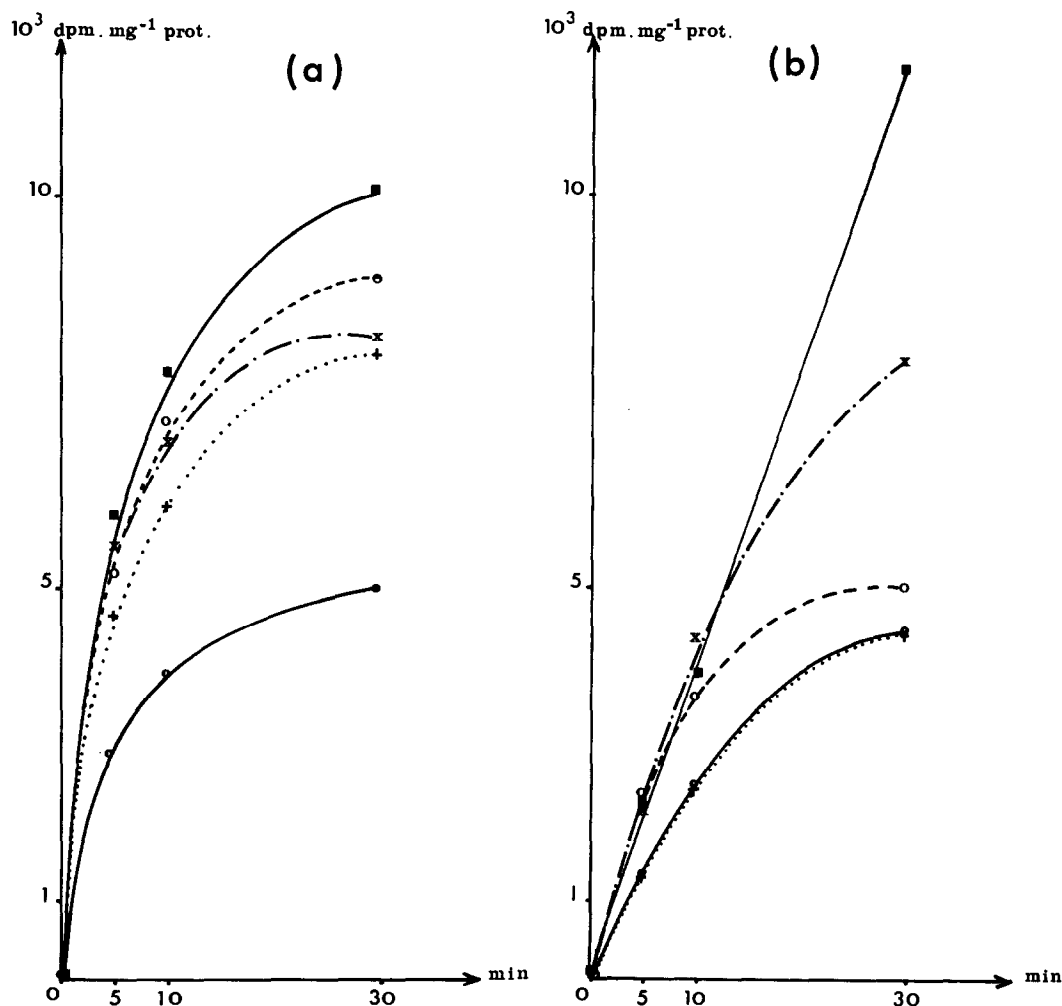


Fig.1. Action de la ribonucléase (■—■), du lysosyme (○- - -○), du cytochrome *c* (x·—·x) et de l' α -lactalbumine (+· · · ·+) sur le transfert de mannose au polyphénol-phosphate (a) et aux accepteurs glycoprotéiques endogènes (b), dans les microsomes d'*Aspergillus niger*. La concentration finale en protéine rajoutée est de 3.3 mg/ml. (○—○) Microsomes seuls.

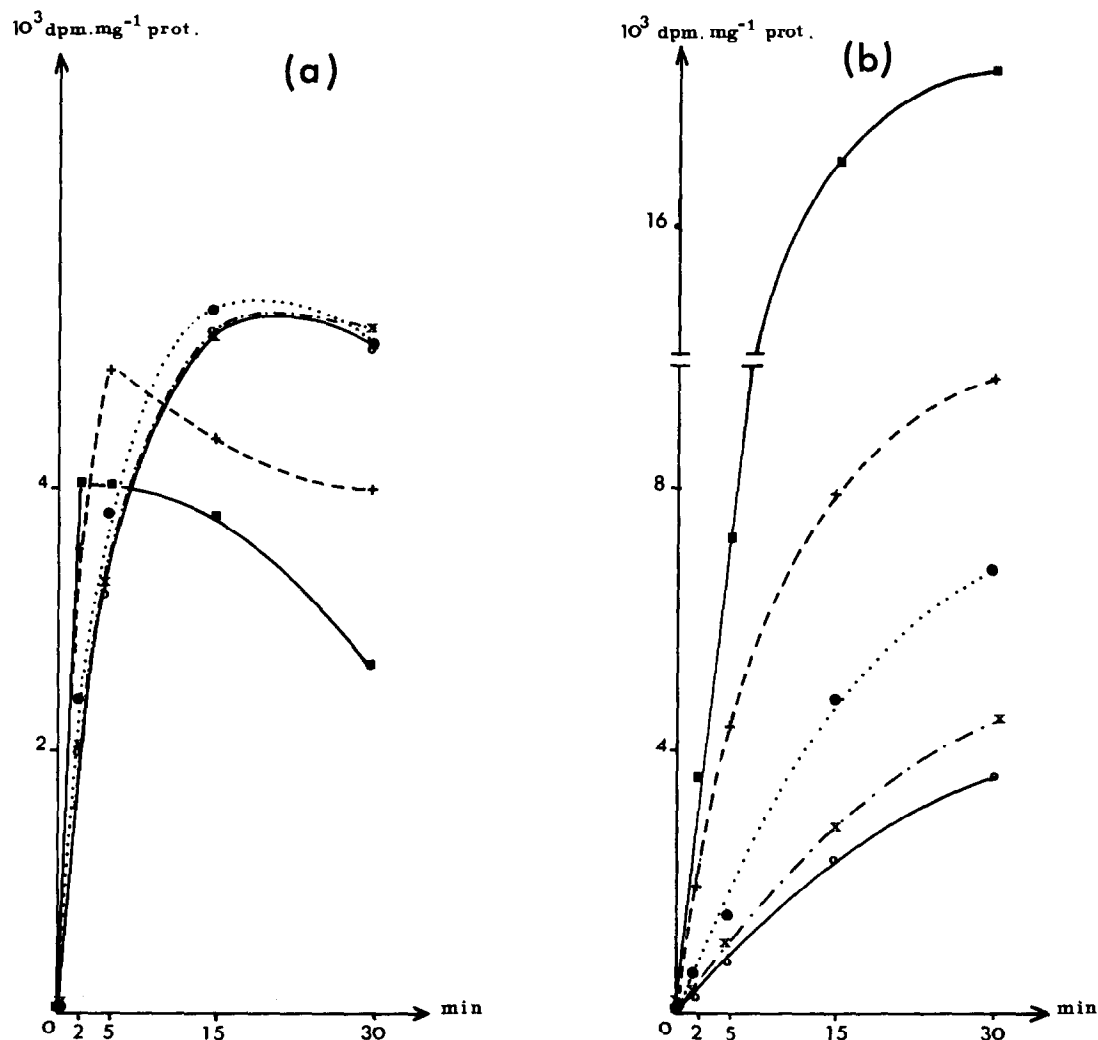


Fig.2. Action de l'histone IIA sur le transfert de mannose au polyphosphatidylphosphate (a) et aux accepteurs glycoprotéiques endogènes (b) dans les microsomes d'*Aspergillus niger*. Concentration finale en histone en mg/ml: 0.3 (X—X), 0.7 (●·····●), 1 (+---+), 2 (■—■). (○—○) Microsomes seuls.

alentours de pH 9.5 puisque la ribonucléase (pH_i 9.45) est plus active que le cytochrome *c* (pH_i 10.05).

Ces essais ont été réalisés à une concentration relativement élevée en protéines effectrices, mais restant inférieure au poids de protéines membranaires présentes. Afin de préciser le phénomène, on a utilisé une autre protéine basique de faible poids moléculaire, ayant un point isoélectrique correspondant à l'optimum d'activation, l'histone II A du

thymus de veau, qui s'est avérée particulièrement active.

Les résultats obtenus dans la translocation au lipide paraissent en contradiction avec les précédents. En effet, aux faibles concentrations en histone, aucune action ne se manifeste alors qu'aux concentrations les plus élevées, on observe une diminution considérable de l'incorporation du mannose dans le lipide (fig.2a). Mais ces résultats doivent être considérés en tenant

compte de ceux obtenus lors du transfert subséquent aux glycoprotéines endogènes: une activation est systématiquement obtenue, croissante en fonction de la quantité d'histone ajoutée au milieu, au moins dans certaines limites (fig.2b). Ces activations doivent être considérées au niveau de la vitesse initiale plutôt qu'au plateau de saturation. Ainsi, la vitesse initiale est multipliée par 10 pour une concentration en histone de 2 mg/ml et par 20 pour une concentration de 4 mg/ml (résultat non représenté).

Or, dans ces deux cas, l'incorporation au bout de 30 min est la même, vraisemblablement par saturation des accepteurs endogènes qui constituent alors un facteur limitant.

On sait que le véritable précurseur du transfert de mannose aux glycoprotéines endogènes est le dolichol-phosphate-mannose synthétisé à partir du GDP-mannose cytoplasmique. Si le transport à travers la membrane est facilité par l'histone, il y a consommation accrue de ce précurseur; si la demande est suffisamment importante, comme c'est le cas en présence d'histone, on observe une chute de la cinétique d'incorporation de mannose dans le dolichol-phosphate. Notons que, pour des concentrations voisines, on observe pour l'histone, comme pour la ribonucléase, une augmentation de la vitesse initiale de ce premier transfert. Simplement, dans le cas de la ribonucléase, le transport à travers la membrane doit présenter encore une limitation du deuxième transfert.

Un point doit être précisé: on pourrait considérer que les protéines basiques ajoutées au milieu d'incubation jouent le rôle d'accepteurs exogène de mannose. En fait, il n'en est rien. D'une part, on a jamais pu faire fonctionner une mannosyltransférase avec des accepteurs protéiques exogènes; d'autre part, une analyse électrophorétique en gel d'acrylamide, en présence de dodecylsulfate de sodium confirme qu'il n'y a pas coïncidence entre les protéines exogènes et les produits radioactifs de la réaction de mannosylation.

La fig.3 montre que la vitesse maximum d'incorporation de mannose dans la fraction glycoprotéique est augmentée en présence d'histone, sans que le K_m apparent soit modifié. Le mécanisme d'action est donc différent de celui mis en jeu dans la lactose synthetase de la glande mammaire où l' α -lactalbumine se complexe directement à la galactosyl-transférase pour en modifier les paramètres cinétiques [7]. La

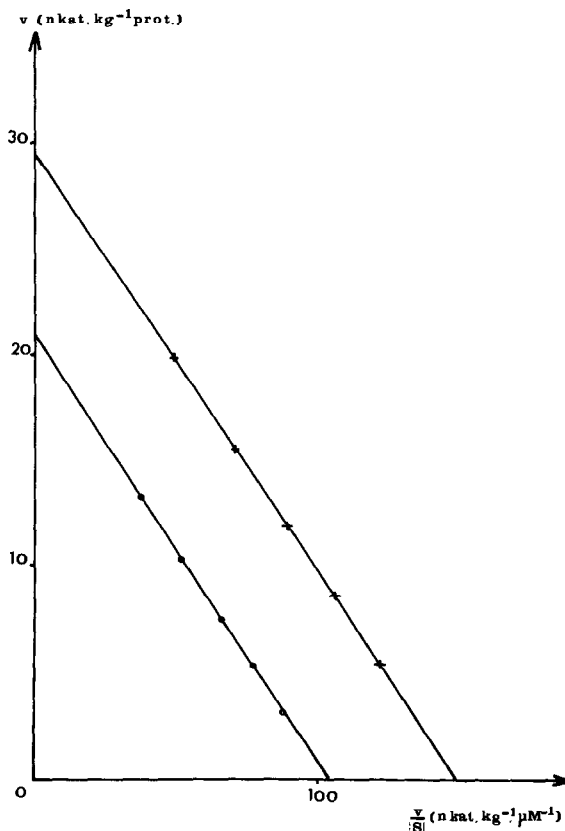


Fig.3. Action de l'histone IIA sur la vitesse d'incorporation du mannose dans les glycoprotéines endogènes des microsomes d'*Aspergillus niger*, à partir de GDP-[U-¹⁴C]mannose. Microsomes seuls (o—o); microsomes + histone IIA (0.4 mg/ml) (x—x).

stimulation du transfert d'un sucre, le xylose, par le lysosome ou la ribonucléase, a déjà été signalée, dans des cellules de tumeur d'ascite chez la souris [8], sans qu'une explication soit apportée. Dans ces deux cas, il n'y a pas intervention d'un intermédiaire lipidique et d'un transport à travers la membrane.

Le fait que l'activation se manifeste essentiellement sur l'incorporation de mannose à des accepteurs glycoprotéiques endogènes situés sur la face interne de la membrane suggère que les petites protéines basiques agissent au niveau de la membrane elle-même, vraisemblablement en tant que polycations établissant des liaisons avec les structures polyanioniques des membranes. D'ailleurs l'histone se fixe effectivement

sur les vésicules membranaires, la saturation étant atteinte pour une concentration d'histone sensiblement égale à la concentration des protéines membranaires. L'absence de stimulation observée avec une protéine ayant une structure similaire, mais de caractère anionique comme l' α -lactalbumine, est en accord avec cette hypothèse que nous cherchons à confirmer.

References

- [1] Létoublon, R., Comte, J. and Got, R. (1973) *Eur. J. Biochem.* 40, 95–101.
- [2] Létoublon, R. and Got, R. (1974) *FEBS Lett.* 46, 214–217.
- [3] Kaplan, J. H. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 311, 1–5.
- [4] Papahadjopoulos, D., Cowden, M. and Kimelberg, H. (1973) 330, 8–26.
- [5] Got, R. (1965) *Clin. Chim. Acta.* 11, 432–441.
- [6] Folch, J., Lees, H. and Sloane-Stanley, G. H. (1957) *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.
- [7] Brew, K., Vanaman, T. C. and Hill, R. L. (1968) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 59, 491–497.
- [8] Grebner, E. E. and Neufeld, E. F. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 192, 347–349.