Nº d'ordre : 561

50376 1982

147

50376 1982 147

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR ÈS SCIENCES

par

Bernard HOFLACK

Attaché de Recherches au C.N.R.S.

ÉTUDE DE LA N-GLYCOSYLATION DES PROTÉINES: MÉTABOLISME DES INTERMÉDIAIRES LIPIDIQUES SYNTHÉTISÉS PAR LES LYMPHOCYTES SPLÉNIQUES DE RAT.



Présentée le 3 novembre 1982 devant la Commission d'Examen

Président : Rapporteurs : J. MONTREUIL

- H. BEAUFAY
- F. HEMMING
- A. VERBERT
- P. MANDEL S. MAROUX

Examinateurs :

Ce travail a été réalisé sous la Direction de Monsieur le Professeur André VERBERT dans le Laboratoire de Chimie Biologique (Directeur : Professeur Jean MONTREUIL) de l'Université des Sciences et Techniques de Lille (Laboratoire Associé au C.N.R.S. n° 217 : Relations structure-fonction des constituants membranaires).

Il a bénéficié d'une aide de l'I.N.S.E.R.M. (C.R.L. n° 78-1-194-2 et C.R.L. n° 81-2015).

A André,

Il y a quelques années déjà, tu me dédicaçais ta propre thèse par ces mots : "Si le coeur t'en dit !". Jeune étudiant alors, je ne pouvais donner de réponse. Peu à peu, sur les chemins tortueux des RNA-polymérases puis sur ceux plus tortueux encore des glycosyltransférases, tu m'as fait découvrir et enseigné les qualités essentielles du chercheur qui résident dans l'action avec la joie du travail bien fait et surtout dans la réflexion, l'analyse et la critique des résultats. Pas à pas, nous avons pu construire "notre" thèse. Mais tout ceci ne serait rien sans le climat d'amitié et de confiance que tu as su entretenir au sein du groupe et c'est pourquoi, aujourd'hui, je peux te répondre : "Avec le coeur, on fait beaucoup de choses !".

A Monsieur le Professeur Jean MONTREUIL

En m'accueillant au Laboratoire de Chimie Biologique, vous m'avez donné la chance inestimable de rencontrer un "environnement scientifique" propice aux recherches que nous avons effectuées et qui vous tiennent particulièrement à coeur : la Biologie Moléculaire des Glycoconjugués. Je voudrais vous exprimer ma plus profonde gratitude pour la confiance que vous m'avez témoignée, en particulier en favorisant mon intégration dans un organisme de recherche. Votre haute autorité scientifique s'est souvent manifestée par des conseils avisés, critiques des plus constructives et encouragements. Je vous prie de trouver ici l'expression de ma plus profonde reconnaissance et de mon plus respectueux attachement, à jamais acquis.

A Monsieur le Professeur Henri BEAUFAY

Vous avez bien voulu accepter de juger cette thèse. Les travaux que vous avez effectués dans les domaines du fractionnement cellulaire d'une part, et de la synthèse des glycolipides polyisoprénoides d'autre part, montrent l'intérêt que vous portez à ce sujet. Je ressens avec fierté l'honneur que vous me faites.

A Monsieur le Professeur Frank HEMMING

My first steps in the field of dolichols have been done in your Laboratory. At this time, I took great advantages of the knowledge you had on lipid intermediates and their metabolism. Since that time, you have been continuously interested by the progress of our research on the dolichol cycle in lymphocytes. In the occasion, please, find here the expression of my gratitude for your advices and the kindness that you always evince me.

A Monsieur le Professeur Paul MANDEL

Nos discussions animées et fructueuses montrent quelle importance vous accordez aux ectoglycosyltransférases. Je suis heureux que vous ayez bien voulu juger ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

A Mademoiselle Suzanne MAROUX

Vous avez accepté d'être "ma marraine" au C.N.R.S. Vous suivez depuis quelques années mon travail de recherches. Je voudrais vous exprimer mes plus vifs remerciements pour l'intérêt que vous voulez bien lui porter. Mes remerciements s'adressent également à

René CACAN, avec qui une partie de ce travail a été effectuée ; ta haute compétence scientifique et ta bonne humeur toujours égale m'ont été très précieuses ;

Philippe DEBEIRE, qui m'a apporté sa collaboration et son aide sûre et efficace pour l'hydrazinolyse et l'analyse des produits obtenus.

Je ne saurais terminer sans remercier tous ceux qui,à titre divers,m'ont permis de mener à bien ce travail. J'adresse tout particulièrement mes remerciements à Brigitte BAUVOIS, Frédérique GUETTE et Philippe BULET pour l'amitié qu'ils m'ont témoignée et pour l'"ambiance chaleureuse" qu'ils ont su créer.

Qu'il me soit aussi permis de remercier Brigitte MAHIEU qui, avec compétence, a réalisé la frappe et la mise en page de ce mémoire. UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

DOYENS HONORAIRES DE L'ANCIENNE FACULTE DES SCIENCES

MM. R. DEFRETIN, H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES DES ANCIENNES FACULTES DE DROIT ET SCIENCES ECONOMIQUES, DES SCIENCES ET DES LETTRES

MM. ARNOULT, Mme BEAUJEU, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, CORSIN, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, GLACET, GONTIER, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET, KOURGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SAVARD, SCHILTZ, WATERLOT, WIEMAN, ZAMANSKI.

PROFESSEUR EMERITE

M. A. LEBRUN.

ANCIENS PRESIDENTS DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MM. R. DEFRETIN, M. PARREAU, J. LOMBARD, M. MIGEON.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. J. CORTOIS.

PROFESSEURS - CLASSE EXCEPTIONNELLE

м.	DURCHON Maurice	Biologie expérimentale
М.	GABILLARD Robert	Electronique
м.	HEUBEL Joseph	Chimie minérale
М.	MONTREUIL Jean	Biochimie
Μ.	PARREAU Michel	Analyse
Μ.	TRIDOT Gabriel	Chimie appliquée
м.	VIVIER Emile	Biologie cellulaire
М.	WERTHEIMER Raymond	Physique atomique et moléculaire

PROFESSEURS - 1ère CLASSE

М.	BACCHUS Pierre	
Μ.	BEAUFILS Jean Pierre	
Μ.	BIAYS Pierre	
Μ.	BILLARD Jean	
М.	BOILLY Bénoni	
М.	BONNOT Ernest	

Astronomie Chimie physique Géographie Physique du solide Biologie Biologie végétale

. . . / . . .

Μ. BOUGHON Pierre Μ. BOURIQUET Robert CELET Paul Μ. Μ. CHAMLEY Hervé COEURE Gérard м. CONSTANT Eugène Μ. CORDONNIER Vincent Μ. Μ. DEBOURSE Jean Pierre DELATTRE Charles М. M. ESCAIG Bertrand FAURE Robert М. FOCT Jacques Μ. FOURET René Μ. Μ. GRANELLE Jean Jacques Μ. GRUSON Laurent Μ. GUILLAUME Jean HECTOR Joseph Μ. М. LABLACHE COMBIER Alain Μ. LACOSTE Louis Μ. LAVEINE Jean Pierre Μ. LEHMANN Daniel Mme LENOBLE Jacqueline М. LHOMME Jean м. LOMBARD Jacques Μ. LOUCHEUX Claude LUCQUIN Michel Μ. Μ. MAILLET Pierre PAQUET Jacques Μ. POUZET Pierre Μ. Μ. PROUVOST Jean SALMER Georges Μ. Μ. SEGUIER Guy Μ. STANKIEWICZ François Μ. TILLIEU Jacques M. VIDAL Pierre M. ZEYTOUNIAN Radyadour

Algèbre Biologie végétale Géologie générale Géotechnique Analyse Electronique Informatique Gestion des entreprises Géologie générale Physique du solide Mécanique Métallurgie Physique du solide Sciences économiques Algèbre Microbiologie Géométrie Chimie organique Biologie végétale Paléontologie Géométrie Physique atomique et moléculaire Chimie organique biologique Sociologie Chimie physique Chimie physique Sciences économiques Géologie générale Analyse numérique Minéralogie Electronique Electrotechnique Sciences économiques Physique théorique Automatique Mécanique

PROFESSEURS - 2ème CLASSE

М. AL FAKIR Sabah M. ALLAMANDO Etienne M. ANCIAN Bernard ANTOINE Philippe Μ. BART André М. Mme BATTIAU Yvonne М. BEGUIN Paul Μ. BELLET Jean м. BERZIN Robert BKOUCHE Rudolphe м. M. BODARD Marcel Μ. BOIVIN Jean Claude Μ. BONNELLE Jean Pierre М. BOSCQ Denis M. BOUQUELET Stéphane Μ. BRASSELET Jean Paul BREZINSKI Claude Μ. М. BRIDOUX Michel

Algèbre Electronique et électrotechnique Spectrochimie Analyse Biologie animale Géographie Mécanique Physique atomique et moléculaire Analyse Algèbre Biologie végétale Chimie minérale Catalyse Probabilités Biochimie structurale Géométrie et topologie Analyse numérique Chimie physique

Μ. BRUYELLE Pierre . м. CAPURON Alfred Μ. CARREZ Christian Μ. CHAPOTON Alain COQUERY Jean Marie м. Mme CORSIN Paule CORTOIS Jean м. COUTURIER Daniel М. Μ. CRAMPON Norbert Μ. CROSNIER Yves MILE DACHARRY Monique M. DAUCHET Max M. DEBRABANT Pierre M. DEGAUQUE Pierre Μ. DELORME Pierre M. DEMUNTER Paul M. DENEL Jacques M. DE PARIS Jean Claude M. DEPREZ Gilbert DERIEUX Jean Claude м. MILE DESSAUX Odile M. DEVRAINNE Pierre М. DHAINAUT André Mme DHAINAUT Nicole M. DORMARD Serge м. DOUKHAN Jean Claude M. DUBOIS Henri M. DUBRULLE Alain М. DUBUS Jean Paul DYMENT Arthur М. Mme EVRARD Micheline M. FONTAINE Hubert М. FONTAINE Jacques FOURNET Bernard Μ. М. FRONTIER Serge GAMBLIN André М. GERVAIS Michel Μ. GLORIEUX Pierre Μ. М. GOBLOT Rémi GOSSELIN Gabriel М. M. GOUDMAND Pierre M. GREMY Jean Paul M. GREVET Patrick Μ. GUILBAULT Pierre Μ. HENRY Jean Pierre Μ. HERMAN Maurice Μ. HOUDART René Μ. JACOB Gérard Μ. JACOB Pierre JACQUILLAT Bertrand Μ. JOURNEL Gérard М. Μ. KREMBEL Jean Μ. LAURENT François Mme LECLERCQ Ginette LEFEVRE Christian Μ. MILE LEGRAND Denise MILE LEGRAND Solange

Géographie Biologie animale Informatique Electronique Psychophysiologie Paléontologie Physique nucléaire et corpusculaire Chimie organique Hydrogéologie et environnement Electronique Géographie Informatique Géologie appliquée Electronique Physiologie animale Sociologie Informatique Analyse Physique du solide et cristallographie Microbiologie Spectroscopie de la réactivité chimique Chimie minérale Biologie animale Biologie animale Sciences économiques Physique du solide Spectroscopie hertzienne Spectroscopie hertzienne Spectrométrie des solides Mécanique Chimie appliquée Dynamique des cristaux Electronique, électrotechnique, automatique Biochimie structurale Ecologie numérique Géographie urbaine, industrielle et démographie Gestion Physique moléculaire et rayonnements atmosphé-Algèbre riques Sociologie Chimie Physique Sociologie Sciences économiques Physiologie animale Génie mécanique Physique spatiale Physique atomique et moléculaire Informatique Probabilités et statistiques Gestion Spectroscopie hertzienne Biochimie Automatique Catalyse Pétrologie Algèbre Algèbre

- 3 --

. . . / . . .

Mme LEHMANN Josiane LEMAIRE Jean Μ. LENTACKER Firmin Μ. LEROY Jean Marie Μ. LEROY Yves Μ. Μ. LESENNE Jacques М. LEVASSEUR Michel Μ. LHENAFF René LOCQUENEUX Robert Μ. Μ. LOSFELD Joseph LOUAGE Francis Μ. MACKE Bruno М. MAHIEU Jean Marie Μ. MAIZIERES Christian Μ. MILE MARQUET Simone MESMACQUE Gérard Μ. MESSELYN Jean Μ. M. MESSERLIN Patrick M. MIGNOT Fulbert M. MONTEL Marc MONTUELLE · Bernard Μ. Mme N'GUYEN VAN CHI Régine M. NICOLE Jacques Μ. NOTELET Francis PARSY Fernand Μ. MILE PAUPARDIN Colette M. PECQUE Marcel PERROT Pierre Μ. Μ. PERTUZON Emile M. PETIT Francis M. PONSOLLE Louis M. PORCHET Maurice M. POVY Lucien RACZY Ladislas м. RAOULT Jean François М. M. RICHARD Alain М. RIETSCH François ROGALSKI Marc Μ. ROUSSEAU Jean Paul М. ROY Jean Claude м. Mme SCHWARZBACH Yvette Μ. SCHAMPS Joël SIMON Michel Μ. SLIWA Henri Μ. SOMME Jean Μ. MIIe SPIK Geneviève M. STERBOUL François TAILLIEZ Roger Μ. THERY Pierre Μ. TOULOTTE Jean Marc Μ. Μ. TURREL Georges VANDORPE Bernard м. VAST Pierre Μ. VERBERT André Μ. VERNET Philippe Μ. M. VILETTE Michel

WALLART Francis

WARTEL Michel

Μ.

Μ.

Analyse Spectroscopie hertzienne Géographie Chimie appliquée Electronique, électrotechnique, automatique Electrotechnique Sciences économiques Géographie Physique théorique Informatique Electronique Physique moléculaire et rayonnements atmosphé-Physique atomique et moléculaire. riques Automatique Probabilités Génie mécanique Physique atomique et moléculaire Sciences économiques Analyse numérique Physique du solide Biologie et biochimie appliquées Géographie Chimie analytique Electronique, électrotechnique, automatique Mécanique Biologie physiologie végétales Chimie organique Chimie appliquée Physiologie animale Chimie organique, minérale et analytique Chimie physique Biologie animale Automatique Electronique Géologie structurale Biologie animale Physique des polymères Analyse Physiologie animale Psychophysiologie Géométrie Spectroscopie moléculaire Sociologie Chimie organique Géographie Biochimie Informatique Génie alimentaire Electronique, électrotechnique, automatique Automatique Spectrochimie Infrarouge et Raman Chimie minérale Chimie inorganique Biochimie Génétique Résistance des matériaux Spectrochimie Infrarouge et Raman Chimie inorganique

. . . / . . .

M. WATERLOT MichelM. WERNER GeorgesM. WOSNIAK MichelMme ZINN JUSTIN Nicole

Géologie générale Informatique fondamentale appliquée Hydrométallurgie Algèbre

•

ABREVIATIONS

- Arg : L-Arginine
- Asn : L-Asparagine
- Dol : Dolichol
- Fuc : L-Fucose
- Gal : D-Galactose
- GalNAc : N-acétyl-D-galactosamine
- GDP-Man : Guanosine diphosphate mannose
- Glc : D-Glucose
- GlcNAc : N-acétyl-D-glucosamine
- GlcNAc-P-P-Dol : Dolichol diphosphate N-acétyl-D-glucosamine
- (GlcNAc)₂-P-P-Dol : Dolichol diphosphate di-N-acétylchitobiose
- Glc-P-Dol : Dolichol phosphate D-glucose
- GlcUA : Acide D-glucuronique
- Gly : L-Glycine
- Hyl : L-Hydroxylysine
- Man : D-Mannose
- Man-P-Dol : Dolichol phosphate D-mannose
- NeuAc : Acide N-acétylneuraminique
- Oligosaccharide-P-P-Dol : Dolichol diphosphate oligosaccharide
- P-Dol : Dolichol phosphate
- Ser : L-Sérine
- Thr : L-Thréonine
- UDP-Glc : Uridine diphosphate D-glucose
- UDP-GlcNAc : Uridine diphosphate N-acétyl-D-glucosamine
- Xyl : D-Xylose

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

GENERALITES

CHAPITRE I : DONNÉES GÉNÉRALES SUR LA STRUCTURE DES GLYCANNES DES GLYCOPROTÉINES	p.	12
I - LES O-GLYCOSYLPROTEINES	p.	12
A - LIAISON GLYCANNE-SERINE (THREONINE)	p.	13
B - <u>GLYCANNES CONJUGUES A L'HYDROXYLYSINE OU L'HYDROXY</u> - <u>PROLINE</u>	p.	15
II - LES N-GLYCOSYLPROTEINES	p.	15
III - <u>CONCLUSIONS</u>	p.	18
CHAPITRE II : BIOSYNTHÈSE DE GLYCANNES DE GLYCOPROTÉINES	p.	20
I - DONNEES GENERALES SUR LES SYSTEMES GLYCOSYLTRANSFERASIQUES	p.	20
A - LES GLYCOSYLTRANSFERASES	p.	20
B - LES AUTRES PARTENAIRES DE LA REACTION	p.	21
II - BIOSYNTHESE DES N-GLYCANNES	p.	23
A - LE CYCLE DES DOLICHOLS	p.	23
1 - Etapes de l'assemblage du dolichol-pyrophosphate-oligosaccharide	p.	24
 a - Le transporteur : le dolichol-phosphate b - Les premières étapes de la synthèse de l'oligosaccha- ride 	р. р.	24 26
c - Addition des résidus de mannose d - Addition de résidus de glucose	р. р.	26 28
2 - Localisation du cycle des dolichols dans les membranes	р.	29
B - TRANSFERT DE L'OLIGOSACCHARIDE SUR LA PROTEINE	p.	30
1 - Spécificité de l'oligosaccharidyltransférase	p.	30
2 - Influence de la conformation de l'accepteur peptidique	p.	33
3 - Localisation du transfert de l'oligosaccharide	p.	34

C - MATURATION DE LA N-GLYCOSYLPROTEINE	p.	38
1 - Formation de glycannes de type oligomannosidique	p.	38
a - Déglucosylation du glycanne b - Elagage de quatre résidus de mannose	р. р.	38 39
2 - Synthèse de glycannes de type hybride et N-acétyllactosaminique	p.	41
a - La maturation sous la dépendence de la N-acétylglu- cosaminyltransférase I	p.	42
b - Allongement du glycanne	p.	44
III - <u>UN EXEMPLE DE LA BIOSYNTHESE DES O-GLYCANNES</u>	p.	46
CHAPITRE III : CONTRÔLE DE LA BIOSYNTHESE DES GLYCOPROTÉINES	p.	49
I - <u>REGULATION GENETIQUE DES GLYCOSYLTRANSFERASES</u>	p.	49
II - CONTROLE DU TAUX INTRACELLULAIRE DES SUBSTRATS	p.	49
A - LES DONNEURS	p.	50
B - LES ACCEPTEURS	p.	50
III - INFLUENCE DE LA STRUCTURE DE L'ACCEPTEUR	p.	51
A - TRANSFERT D'UN OLIGOSACCHARIDE SUR UNE PROTEINE ET SA MATURATION	p.	51
B - FIN DE SYNTHESE DES CHAINES OLIGOSACCHARIDIQUES	p.	54
IV - AUTRES FACTEURS DE CONTROLE DE LA BIOSYNTHESE DES GLYCOPROTEINES	p.	54
V - LES INHIBITEURS DE LA GLYCOSYLATION	p.	56
A - LES MONOSACCHARIDES SIMPLES	p.	57
B - LES SUCRES MODIFIES	p.	57
C - LES ANTIBIOTIQUES	p.	57

...

•

CHAPITRE IV : MÉTABOLISME DES CONSTITUANTS MEMBRANAIRES :	
GLYCOPROTÉINES, GLYCOSYLTRANSFÉRASES	p. 60
I - DONNEES GENERALES SUR L'INTERCONVERSION DES MEMBRANES CELLULAIRES	p. 60
II - METABOLISME DES GLYCOPROTEINES MEMBRANAIRES	p. 62
A - LEUR RENOUVELLEMENT	p. 62
B - VARIATIONS DE LA COMPOSITION ET DE LA STRUCTURE DES GLYCOPROTEINES DE SURFACE	p. 66
1 - Disparition de glycoprotéines spécifiques	p. 66
2 - Variations de l'état de sialylation des surfaces cellulaires	p. 67
3 - Changements dans la structure des glycannes	p. 67
III - <u>LES GLYCOSYLTRANSFERASES DE LA MEMBRANE PLASMIQUE</u>	p. 68
CHAPITRE V : CONCLUSIONS	p. 74
TRAVAUX PERSONNELS	
CHOIX DU MODÈLE EXPÉRIMENTAL	p. 76
MISE EN ÉVIDENCE DE GLYCOSYLTRANSFÉRASES DE SURFACE IMPLIQUÉES DANS LE CYCLE DES DOLICHOLS ET DESTINÉE DES INTERMÉDIAIRES LIPIDIQUES SYNTHÉTISÉS	p. 78
I - MISE EN EVIDENCE DE LA DEGRADATION DES DOLICHOL-PYROPHOSPHATE- OLIGOSACCHARIDES	p [.] 79
II - <u>DEMONSTRATION DE LA PRESENCE D'ECTOGLYCOSYLTRANSFERASES A LA</u> <u>SURFACE DES LYMPHOCYTES SPLENIQUES DE RAT</u>	p. 89
INFLUENCE DE LA GLUCOSYLATION SUR LA DESTINÉE DES	p. 97
DOLICHOL-PYROPHOSPHATE-OLIGOSACCHARIDES	

TRANSFERT ET DÉGRADATION DES DOLICHOL-PYROPHOSPHATE- p. 105 OLIGOSACCHARIDES À LA SURFACE DU LYMPHOCYTE I - <u>SYNTHESE DE N,N'-DIACETYLCHITOBIOSYLPROTEINES ET LEUR MANNOSYLATION</u> p. 106

•

II - TRANSFERT ET DEGRADATION DE DOLICHOL-PYROPHOSPHATE-OLIGOSACCHARI- p. 113 DES GLUCOSYLES OU NON

DISCUSSION

.

RESUME ET CONCLUSIONS

APPENDICE TECHNIQUE

I - LES LYMPHOCYTES SPLENIQUES DE RAT	p.	130
A - PREPARATION	p.	130
B - NUMERATION ET VIABILITE CELLULAIRE	p.	130
C - CONTROLE DE L'INTEGRITE DES LYMPHOCYTES PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE	p.	131
II - EXTRACTION SEQUENTIELLE DES INTERMEDIAIRES LIPIDIQUES	p.	133
III - CARACTERISATION DES PRODUITS OBTENUS DANS LES PHASES ORGANIQUES	p.	133
A - CARACTERISATION PAR CHROMATOGRAPHIE DE COUCHE MINCE	p.	135
B - <u>COMPORTEMENT CHROMATOGRAPHIQUE DES INTERMEDIAIRES</u> <u>LIPIDIQUES SUR COLONNE D'ECHANGE D'IONS (DEAE-cellulose</u>)	p.	135
C - TRAITEMENTS MENAGES PAR LES ACIDES ET LES BASES	p.	140
IV - CARACTERISATION DES GLYCANNES DES GLYCOPROTEINES NEOSYNTHETISEES	p.	140
V - MARQUAGE EXTERNE PAR LE BOROHYDRURE DE POTASSIUM DES OLIGOSACCHA-	p.	141

RIDES-P-P-DOL

INTRODUCTION

•

D'abord considérés comme des composés biologiques mineurs, les glycoconjugués suscitent depuis quelques années un intérêt sans cesse croissant. De nombreuses équipes de chercheurs, -biologistes, biochimistes, pathologistes-, ont donné aux glycoconjugués leurs titres de noblesse en démontrant leur importance, notamment celle de la copule glucidique qu'ils comportent, dans de nombreux phénomènes biologiques et dans bien des cas pathologiques, établissant ainsi les bases d'une Biologie Moléculaire et d'une Pathologie Moléculaire des glycoconjugués, des glycoprotéines en particulier.

Des rôles très variés ont été attribués aux glycoprotéines. Molécules solubles, ce sont par exemple des transporteurs (transferrines), des hormones (hormone gonadotrope chorionique). Intégrées dans les membranes plasmiques et exposant leur glycanne au milieu extracellulaire, elles participent à la vie sociale de la cellule : ce sont alors des antigènes membranaires dont la structure subit de profondes modifications au cours de la transformation maligne ou des sites récepteurs de virus et d'hormones ou encore des composés impliqués dans la reconnaissance et l'adhésion cellulaire (voir la revue générale de HUGHES -1-). Ces quelques exemples suffisent pour illustrer leur importance biologique.

Parallèlement à ces observations et grâce à la mise au point de méthodes analytiques de plus en plus fines, de nombreuses structures primaires de la partie glucidique -ou *glycanne*- des glycoprotéines étaient déterminées et les lois relatives aux séquences oligosaccharidiques établies (voir la revue de MONTREUIL -2-). Ces découvertes permirent de dégager le concept "glycannes, signaux de reconnaissance" en montrant comment la diversité de ces derniers pouvait expliquer les rôles variés attribués aux glycoprotéines.

S'appuyant sur les précieuses données structurales, les grandes lignes des mécanismes généraux de la biosynthèse des glycoprotéines commencent à être tracées, que ces dernières soient destinées à être sécrétées ou à participer à l'architecture des membranes plasmiques,

- 1 -

(HUBBARD et IVATT -3-). Actuellement, il est reconnu que, dans le reticulum endoplasmique rugueux, un oligosaccharide est transféré en bloc à partir d'un intermédiaire lipidique (PARODI et LELOIR -4-) sur la protéine en voie de synthèse et qu'il subit une maturation dans l'appareil de Golgi (SCHACHTER -5-). Puis, par le mécanisme du "membrane flow", la glycoprotéine mature s'intègre dans la membrane plasmique ou est déversée dans le milieu extracellulaire.

Cependant, un autre schéma de synthèse des glycoprotéines membranaires peut être envisagé : celui d'une synthèse partielle ou totale du glycanne des glycoprotéines par des glycosyltransférases de la membrane plasmique. En effet, la cellule doit faire face aux agressions du milieu extérieur et maintenir une architecture membranaire déterminée. Un tel système pourrait constituer un mécanisme rapide de réparation ou de synthèse des glycannes de surface. Cette voie métabolique nécessite, au niveau de la membrane plasmique, la présence d'accepteurs, de sucres précurseurs et d'ectoglycosyltransférases fonctionnelles. Dans le cas d'un processus de réparation ou de l'achèvement de la synthèse de glycannes, quelques activités enzymatiques seulement (ectogalactosyl-, ectosialyl- et ectofucosyltransférases) doivent être détectées à la surface de la cellule. Par contre, si la synthèse in toto du glycanne est possible, toute la machinerie enzymatique indispensable à cette dernière, c'est-à-dire non seulement les enzymes mais aussi les intermédiaires lipidiques, doit être présente à la surface de la cellule.

La démonstration de l'existence de galactosyl-, sialyl- et fucosyltransférases sur les membranes plasmiques des lymphocytes spléniques de Rat ayant été apportée au Laboratoire, nous avons donc utilisé ce modèle expérimental et nous nous sommes attaché dans ce travail à rechercher à leur surface, les activités glycosyltransférasiques (N-acétylglucosaminyl- et mannosyltransférasiques) qui permettent la synthèse d'oligosaccharides liés à des intermédiaires lipidiques et leur utilisation dans les processus de glycosylation des protéines. En outre, nous avons tenté de préciser quels étaient les mécanismes mis en jeu au cours de ces réactions complexes.

- 2 -

Avant de décrire les résultats de nos recherches, nous rappellerons l'état des connaissances actuelles sur le rôle, la structure et la biosynthèse des glycannes des glycoprotéines.

Nos recherches sur les ectoglycosyltransférases ont fait l'objet des publications suivantes. Les travaux développés dans ce mémoire correspondent aux publications 5, 7, 8, 9, 10.

- 1 Ph. DEBEIRE, B. HOFLACK, R. CACAN, A. VERBERT et J. MONTREUIL Effect of cyclic nucleotides in *in vitro* assays of rat liver galactosyltransferase. Biochimie, 59 (1977) 473-476
- 2 R. CACAN, A. VERBERT, B. HOFLACK et J. MONTREUIL Occurence of an intracellular inhibitor of ectosialyltransferase in lymphocytes. FEBS-Letters, 81 (1977) 53-56
- 3 B. HOFLACK, R. CACAN et A. VERBERT Occurence of two fucosyltransferase activities at the lymphocyte outer surface. Eur. J. Biochem., 88 (1978) 1-6
- 4 A. VERBERT, R. CACAN, B. HOFLACK et J. MONTREUIL Comparative study of ectogalactosyl- and ectosialyltransferase of lymphocytes. In Glycoconjugate Research, Proceedings of the Fourth International Symposium on Glycoconjugates, Woods Hole, 1977, Academic Press, New York, 2 (1979) 1091-1094
- 5 B. HOFLACK, R. CACAN et A. VERBERT
 The dolichol pathway at the plasma membrane of rat spleen lymphocytes.
 In Glycoconjugates, Proceedings of the Fifth International Symposium
 on Glycoconjugates, Kiel, 1979, George Thieme, Stuttgart (1979) 220-221

- 6 B. HOFLACK, R. CACAN, J. MONTREUIL et A. VERBERT
 Detection of ectosialyltransferase activity using whole cells :
 correction of misleading results due to the release of intracellular
 CMP-N-acetylneuraminic acid.
 Biochim. Biophys. Acta, 568 (1979) 348-356
- 7 R. CACAN, B. HOFLACK et A. VERBERT
 Fate of oligosaccharide-lipid intermediates synthesized by resting
 rat spleen lymphocytes.
 Eur. J. Biochem., 106 (1980) 473-479
- 8 B. HOFLACK, R. CACAN et A. VERBERT
 Metabolism of lipid-linked oligosaccharide intermediates in rat
 spleen lymphocytes : evidence for ectoglycosyltransferase activities.
 Eur. J. Biochem., 112 (1980) 81-86
- 9 B. HOFLACK, R. CACAN et A. VERBERT Influence of the glucosylation on the cleavage of Dolichyl diphosphate oligosaccharides into phosphooligosaccharides. Eur. J. Biochem., 117 (1981) 285-290
- 10 B. HOFLACK, Ph. DEBEIRE, R. CACAN, J. MONTREUIL et A. VERBERT Dolichol dependent synthesis of N,N'-diacetylchitobiosyl proteins and their further mannosylation : a second route for glycosylation of proteins in rat-spleen lymphocytes. *Eur. J. Biochem.*, 124 (1982) 527-531
- 11 R. CACAN, B. HOFLACK et A. VERBERT Effect of bis (para-nitrophenyl) phosphate on the biosynthesis and the utilization of lipid-intermediates. Biochem. J., 205 (1982) 603-609

Nous avons, en outre, collaboré à diverses recherches sur les glycosyltransférases. Elles ont fait l'objet des deux publications suivantes :

- 4 -

- 1 H. DREYFUS, S. HARTH, A. GOMEZ de GARCIA, B. HOFLACK, P. MANDEL et J.C. LOUIS
 Ganglioside sialylation during maturation of cultured neurons.
 Biochem. Soc. Trans., 9 (1981) 102-103
- 2 P. MANDEL, H. DREYFUS, J.C. LOUIS, B. HOFLACK et S. HARTH Ectoglycosyltransferases at the surface of cultured neurons. Trans. Amer. Soc. Neur., 12 (1981) 156

GENERALITES

Les glycoprotéines forment avec les glycolipides une très vaste classe de constituants appelés glycoconjugués qui résultent de l'association d'une copule glucidique ou *glycanne* avec une protéine ou un lipide. Nous nous limiterons à la description des glycoprotéines : leur rôle, la structure et la biosynthèse de leur partie saccharidique.

Les glycoprotéines sont très largement répandues dans le monde vivant. On les retrouve chez les virus, les bactéries, les champignons, les cellules végétales et animales. Solubles ou intégrées dans les membranes, elles assurent des fonctions biologiques très diverses : des enzymes (ribonucléase et amylase, par exemple), des hormones (hormone gonadotrope chorionique), des immunoglobulines, certaines protéines de transport (les transferrines), certains antigènes de groupes sanguins de la membrane de l'hématie sont des glycoprotéines. Au cours de ces dernières années, les efforts des chercheurs se sont focalisés sur le rôle joué par la partie glycannique de ces macromolécules et quelques exemples suffisent pour illustrer l'importance de leur copule glucidique dans de nombreux phénomènes cellulaires fondamentaux.

Tout d'abord, d'un point de vue physico-chimique, le glycanne contribue à l'établissement et au maintien de la conformation de la protéine. Un exemple intéressant est apporté par les travaux du groupe de KORNFELD (GIBSON *et al.* -6-) sur la glycoprotéine G du virus de la stomatite vésiculeuse. En bloquant la glycosylation de cette protéine soit par la tunicamycine, antibiotique inhibant la première réaction de la synthèse des N-glycannes (voir p. 57), soit en cultivant des mutants cellulaires à température élevée, ces auteurs ont observé que la protéine non glycosylée formait des agrégats à l'intérieur de la cellule hôte. Ne possédant pas la conformation spatiale désirée (GIBSON *et al.* -7-), elle ne pouvait participer à l'assemblage du virus. Des résultats analogues ont été obtenus avec d'autres virus (GIBSON *et al.* -8-).

L'effet protecteur des glycannes contre les attaques protéolytiques est particulièrement illustré par les expériences

- 6 -

de LOH et GAINER (9). Certaines hormones du Xenopus laevis (Adrénocorticotropine, β -lipotropine, β -endorphine, α -MSH) possédent un précurseur commun glycosylé. Des protéases spécifiques coupent cette glycoprotéine et donnent naissance à quatre glycopeptides possédant chacun leur activité hormonale propre. Par contre, si le précurseur est synthétisé en présence de tunicamycine sous la forme non glycosylée, les protéases ne reconnaissent plus leurs sites spécifiques de coupure et produisent des peptides atypiques et dépourvus d'activité hormonale. Cet effet protecteur du glycanne contre les attaques protéolytiques a été aussi décrit pour l'hémagglutinine du virus *influenza* (SCHWARZ *et al.* -10-) et la fibronectine des cellules embryonnaires de Poulet (OLDEN *et al.* -11-).

Si les glycannes des glycoprotéines semblent intervenir dans les phénomènes de transport au travers des membranes plasmiques (OLDEN *et al.* -12-), ils sont surtout reconnus pour être porteurs de signaux de reconnaissance. Un des premiers exemples a pu être apporté par l'étude de certaines activités de groupes sanguins à la surface du globule rouge. Il a été démontré que des chaînes oligosaccharidiques liées O-glycosidiquement à la glycophorine, glycoprotéine majeure de la membrane de l'hématie humaine, sont des déterminants antigéniques M et N (voir les revues de WINZLER -13-, HUGHES -14-). L'activité du groupe I est attribuée à un glycanne lié N-glycosidiquement à une protéine différente de la glycophorine (EBERT *et al.* -15-).

Cependant, la démonstration éclatante du rôle des glycannes comme messages destinés à des cellules-cibles a été apportée par le groupe d'ASHWELL (voir la revue de ASHWELL et MORREL -16-). Ces auteurs ont montré que la désialylation des glycoprotéines circulantes, provoquant l'apparition de résidus de galactose à l'extrémité non réductrice du glycanne, conduit à leur rapide disparition du courant sanguin. Ces asialoglycoprotéines sont reconnues par des récepteurs spécifiques de l'hépatocyte de Mammifère où elles sont métabolisées.

- 7 -

Ces récepteurs sont de nature glycoprotéique (KAWASAKI et ASHWELL -17-) et leur sialylation est nécessaire à la reconnaissance (STOCKERT et al. -18-). Ils seraient aussi capables de fixer des cellules comme les hématies. JANCIK et al. (19) ont montré qu'après transfusion d'érythocytes désialylés dans un système homologue, ces cellules disparaissent rapidement de la circulation, sont reconnues par le foie où elles sont détruites. Dans le cas des glycoprotéines circulantes, des systèmes de reconnaissance faisant intervenir des résidus glycosyl autresque le galactose ont été décrits : l'hépatocyte aviaire capterait certaines glycoprotéines dont le glycanne possède de la N-acétylglucosamine (KAWASAKI et ASHWELL -20-). PRIEELS et al. (21) ont observé la capture par l'hépatocyte de Mammifères de la lactotransferrine marquée dont le glycanne possède un fucose (voir p. 17).

Des mécanismes analogues permettraient d'expliquer l'origine des enzymes lysosomiaux (voir les revues de NEUFELD -22-, NEUFELD et ASHWELL -23-). Ces enzymes de nature glycoprotéique seraient secrétés dans le milieu extracellulaire puis internalisés dans les lysosomes grâce à des récepteurs spécifiques du mannose-6-phosphate dans le cas des fibroblastes humains (KAPLAN *et al.* -24-), du mannose et de la N-acétylglucosamine dans le cas des cellules du système réticulo-endothélial (STAHL *et al.* -25-).

La reconnaissance puis l'adhésion cellulaire sont les phénomènes qui président à la formation des tissus. Les mécanismes restent encore mal définis. Cependant, le concept d'ASHWELL, interaction glycanne-récepteur, peut être appliqué pour comprendre la spécificité de la reconnaissance entre deux entités cellulaires.

Tout d'abord, à l'aide de modèles d'étude simples comme l'adhésion d'un virus sur une cellule, la participation des motifs oligosaccharidiques de la cellule hôte a pu être démontrée. En effet MARKWELL et PAULSON (26) en traitant par la neuraminidase leur culture cellulaire, ont montré que le virus Sendai ne pouvait infecter la cellule hôte. Par contre, la virulence de la particule virale peut être restaurée

- 8 -

si des cellules désialylées sont au préalable incubées en présence de CMP-NeuAc et d'une sialyltransférase purifiée. Le virus reconnaitrait spécifiquement un résidu d'acide sialique branché en α -2,3 sur un oligosaccharide lié O-glycosidiquement à une protéine membranaire de la cellule hôte.

Dans des systèmes cellulaires plus complexes, un grand nombre d'observations sont en faveur du rôle primordial joué par la partie saccharidique des glycoprotéines dans les phénomènes de reconnaissance entre deux cellules aboutissant à leur adhésion (voir les revues de HUGHES -27-, FRAZIER et GLASER -28-). Il est couramment observé que les modifications des membranes plasmiques de cellules par attaque protéolytique ménagée, oxydation periodique ménagée (SCHMELL *et al.* -29-) ou traitement par la neuraminidase (KEMP -30-) par exemple, perturbent l'agrégation de cellules d'une population donnée.

Dans les années 1970, ROSEMAN suggéra une interaction entre les glycannes d'une cellule et les glycosyltransférases de surface (ectoglycosyltransférases) d'une autre cellule (OPPENHEIMER et al. -31-). Jusqu'à ce jour, l'intervention des ectoglycosyltransférases dans un tel phénomène n'a pu être réellement démontrée. Par contre, des lectines membranaires ont été caractérisées à la surface de cellules : l'adhésion entre deux cellules peut alors se faire soit directement par interaction spécifique entre le glycanne d'une cellule et la lectine d'une autre cellule (voir la revue de BARTLES et FRAZIER -32-), soit par l'intermédiaire d'un facteur d'agrégation qui est dans ce cas une glycoprotéine (HENKART et al. -33-). Enfin, un autre mécanisme expliquant l'adhésion cellulaire est illustré par les études de MÜLLER et al. (34) sur des cellules d'éponge où un facteur d'agrégation associé à une activité sialyltransférasique interagit avec les glycannes membranaires de deux cellules. Ces différentes hypothèses expliquant les mécanismes de reconnaissance et d'adhésion cellulaire sont schématisées dans la Figure 1 (p.10)

- 9 -



Glycanne

Lectine ou ectoglycosyltransférase



Facteur d'agrégation (glycoprotéine)



Lectine ou glycosyltransférase

FIGURE 1 : Les différentes hypothèses expliquant l'adhésion et la reconnaissance des cellules eucaryotes et nécessitant l'intervention des glycoconjugués membranaires

Le nombre d'hypothèses émises, tentant d'expliquer le mécanisme fondamental de la reconnaissance cellulaire prouvent la complexité de ces phénomènes et que des interactions autres que celles décrites par ASHWELL doivent être mises en jeu (KUHLENSCHMIDT *et al.* -35-) puisque l'addition de galactoprotéine dans le cas d'hépatocytes de Rat, d'agalactoprotéine dans le cas d'hépatocytes de Poulet ne modifie pas les propriétés d'adhésion et de reconnaissance de ces cellules.

Cependant, les quelques exemples mentionnés prouvent le rôle fondamental des glycannes des glycoprotéines. Ils montrent que la spécificité de nombreux composés naturels ne doit pas être écrite seulement en termes d'acides aminés et de nucléotides, mais aussi en termes d'oligosaccharides. (N. SHARON).

CHAPITRE I : DONNÉES GÉNÉRALES SUR LA STRUCTURE DES GLYCANNES DES GLYCOPROTÉINES

Ce chapitre rappelle brièvement la classification et la structure des glycannes liés aux protéines (voir les revues de SPIRO -36-, KORNFELD et KORNFELD -37-38-, MONTREUIL -39-40-). Grâce à des exemples précis, nous essayerons de faire ressortir les quelques concepts qui se dégagent actuellement de toutes les études qui permirent d'établir la séquence primaire de plus d'une centaine de glycannes. Les informations recueillies jusqu'à ce jour dans ce domaine, sont relatives aux glycoprotéines solubles et aux glycoprotéines de membrane de virus enveloppés qui contrairement aux glycoprotéines membranaires, peuvent être obtenues en grande quantité.

D'une façon générale, les glycoprotéines sont classées en fonction de la nature de la liaison covalente glycanne-protéine. On distingue :

 1 - les liaisons de type O-glycosidique. Elles conduisent aux O-glycosylprotéines.

2 - les liaisons de type N-glycosidique qui se rencontrent dans les N-glycosylprotéines.

I - LES O-GLYCOSYL PROTEINES

Cette classe de glycoprotéines peut être divisée en deux grands sous-groupes. Ce sont :

- d'une part, les glycoprotéines dont le glycanne est lié à la sérine ou à la thréonine.

- d'autre part, celles dont la copule glucidique est conjuguée à l'hydroxylysine ou à l'hydroxyproline.

A - LIAISON GLYCANNE-SERINE (THREONINE)

Ce type de liaison glycanne-protéine fut pour la première fois caractérisée dans les mucines. Le monosaccharide le plus souvent engagé dans cette conjugaison est la N-acétylgalactosamine. Comme le montre le tableau I (p. 14), il existe une très grande hétérogénéité dans les chaînes oligosaccharidiques : elles peuvent être simples comme le glycanne de l'érythrocyte Tn-réactif (GalNAc (α 1-3)-Ser) mais sont bien souvent complexes comme dans le cas des déterminants de groupes sanguins (voir la revue de HUGHES -47-). Le point commun de toutes ces structures est le motif disaccharidique Gal(β 1-3)-GalNAc toujours retrouvé au point d'attache, préférentiellement dans une séquence peptidique riche en proline.

D'autres résidus glycosyl comme le xylose peuvent être engagés dans une liaison avec la sérine ou la thréonine. Ce type de substitution de l'acide aminé est rencontré dans les protéoglycannes (voir la revue de RODEN et HOROWITZ -48-, RODEN -49-). Les motifs oligosaccharidiques de cette famille de composés sont constitués en général d'unités de répétition qui peuvent être sulfatées ou non et sont attachés à la protéine par un noyau tétrasaccharidique commun. Les structures de ces composés (héparine, héparine sulfate, dermatane sulfate) sont bâties de façon analogue à celle des chondroîtines sulfates présentées ci-après :

 $= \begin{bmatrix} \operatorname{GalNAc}(\beta_{1}-4) - \operatorname{GlcuA}(\beta_{1}-3) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \operatorname{GalNAc}(\beta_{1}-4) - \operatorname{GlcuA}(\beta_{1}-3) - \operatorname{Gal}(\beta_{1}-3) - \operatorname{Gal}(\beta_{1}-4) - \operatorname{Xyl}(\beta_{1}-3) - \operatorname{Ser} \\ 4 \text{ ou } 6 \text{ n} \\ \operatorname{SO}_{3}^{-} \end{bmatrix}$



Séquence du point d'attache

- 13 -

TABLEAU I

EXEMPLES DE GLYCANNES LIES O-GLYCOSIDIQUEMENT A LA SERINE (ou THREONINE)

STRUCTURE DU GLYCANNE	Origine	REFERENCES
GalNAc (01-3) -Ser	Erythrocytes Tn-réactifs	DAHR et al. (41)
Gal(β1-3)-GalNAc(α1-3)-Ser	Epiglycanine de cellules TA 3	CODINGTON et al. (42)
Νευλ ς (α2-3) -Gal (β1-3) -GalNAc (α1-3) -Ser	Immunoglobuline A isolée du lait humain	PIERCE-CRETEL et al. (43)
Gal(β1-3)-GalNAc(α1-3)-Ser (α2-6) Νευλς	Glycoprotéine de cerveau de Rat	FINNE (44)
NeuAc (α2-3) -Gal (β1-4) -GlcNAc (β1-3) -Gal (β1-3) -GalNAc (α1-3) -Ser (α2-6) NeuAc	Epiglycanine de cellule TA 3	VAN DEN EIJNDEN et al. (45)
$Gal(\beta 1-4) - GlcNAc(\beta 1-3) - Gal(\beta 1-3)$ $Gal(\beta 1-4) - GlcNAc(\beta 1-6)$ $Gal(\beta 1-4) - GlcNAc(\beta 1-6)$	Partie interne de substances de groupes sanguins	OATES et al. (46)





Figure 2 : EXEMPLES DE STRUCTURES DE GLYCANNES DE TYPE OLIGOMANNOSIDIQUE

A - Glycopeptide B-1 de cellules ovariennes de Hamster chinois. (LI et KORNFELD -57-)

B - Glycopeptide GP-V de l'ovalbumine (CONCHIE et STRACHAN -58-).

Coués en édifices macromoléculaires autour de l'acide hyaluronique protéoglycannes forment le "tissu conjonctif intercellula $\check{}$ troitement associé aux membranes plasmiques, formant une r₁ appelée glycolemme.

Enf:autres résidus tels que le mannose (protéoglycannes du cerveau de FINNE *et al.* -50-) ou le galactose ont pu être identifiés dan liaison glycanne-protéine.

B - GANNES CONJUGUES A L'HYDROXYLYSINE OU L'HYDROXYPROLINE

Ce typie liaison fut mis en évidence pour la première fois par SPIRO (5 cans des glycoprotéines issues de membranes basales glomérulaieset fut par la suite retrouvé dans les glycoprotéines constitutives du collagène (voir la revue de BUTLER -52-). L'hydroxylysine ou l'/droxyproline est substituée par un résidu galactosyl ou par le (saccharide Glc(α 1-2)-Gal. L'acide aminé glycosylé est toujoursprésent dans une séquence peptidique caractéristique : Gly-X-HylGly-X-Arg.

L'étude de glycoprotéines de type extensine, issue de parois de cellules végétales, ont montré que l'hydroxyproline peut être aussi glycosylée par l'intermédiaire d'un ou de plusieurs résidus d'arabinose liés en α 1-3 ou β 1-2 (ASHFORD et al. -53-).

II - LES N-GLYCOSYLPROTEINES

Jusqu'à présent, un seul type de branchement glycanne-protéine a été caractérisé dans les N-glycosylprotéines. Cette liaison fait intervenir la N-acétylglucosamine d'une part et l'asparagine d'autre part. Ce paragraphe ne concernera pas les glycannes linéaires ou nglycannes que l'on trouve dans les protéoglycannes (voir les revues de RODEN et HOROWITZ -54-, RODEN -55-) mais se limitera aux glycannes ramifiés ou iso-glycannes en général plus complexes, et souvent impliqués dans de nombreux phénomènes cellulaires (voir la revue de MONTREUIL -56-).

Les motifs glycanniques de ces glycoprotéines ont pour originalité de posséder en commun le même noyau pentasaccharidique lié par une liaison β -glycosylaminique à une asparagine toujours inclue dans le tripeptide Asn-X-Thr(Ser) appelé "sequon". Cette partie invariable résulte de l'association d'un mannotriose et du di-N-acétylchitobiose et possède la structure suivante :



Les différentes structures glycanniques se créent par substitution de ce noyau pentasaccharidique par des motifs oligosaccharidiques très divers. Ceux-ci conférent au glycanne son originalité. Différentes familles sont distinguées en fonction de la nature des monosaccharides qui complètent cette partie invariable.

1 - Les glycannes de type oligomannosidique ne renferment que de la N-acétylglucosamine et du mannose (voir fig. 2 p. 14).

2 - La substitution en 2, 4 et 6 des mannoses en position 4 et 4' par des chaînons de N-acétyllactosamine conduit à la formation de glycannes de type N-acétyllactosaminique di, tri ou tétraantennés. Plus récemment, des structures nouvelles ont été décrites : celles pentaantennées dans des préparations d'ovomucoïde et celles dites poly-N-acétyllactosaminiques retrouvées dans les glycoprotéines membranaires de Thymocytes (voir Tableau II p. 17).

TABLEAU II

EXEMPLES DE STRUCTURES DE TYPE N-ACETYLLACTOSAMINIQUE

4

	STRUCTURE		ORIGINE	REFERENCES
· · ·	Bi-antennée			
	Neuλc (α2-6)-Gal (β1-4)-GlcNAc (β1-2)-Man (α1-3)			
		$Man (\beta 1-4) - GlCNAC (\beta 1-4) - GlCNAC (\beta 1-4) - Asn$	Sérotransferrine Humaine	SPIK et al. (59)
	NquAc (α2-6)-Gal (β1-4)-GlcNAc (β1-2)-Man (α1-6)			
	NeuAc (α2-6)-Gal (β1-4)-GleNAc (β1-2)-Han (α1-3)			
•	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	Man (\$1-4) -GICNAC (\$1-4) -GICNAC (\$1-4) -Asn	Lactotransferrine Humaine	SPIK et al. (60)
	Gal (β1-4)-GlcNAC (β1-2)-Man (α1-6)	(a1-6)		
	(a1-3)	Fuc		
	Fuc			
	Noule (a2-6)-Gal (\$1-4)-Glenke (\$1-2)-Man (a1-3)			
	GLCNAG (B1-4)	Man (\$1-4) -GICNAC (\$1-4) -GICNAC (\$1-4) -Asn	Immunoglobuline A ₁ Humaine	BAEZINGER et KORNFELD (61
	Gal (81-4)-GleNAC (81-2)-Man (01-6)		•	
·				
	Tri-antennée			
	Gal (81-4)-GLCNAC (81-2)-Han (01-3)	,		
		Man (β1-4) -GICNAC (β1-4) -GICNAC (β1-4) -Asn	Orosomucoide Humaine	FOURNET et al. (62)
	NeuAc (02-6) -Gal (81-4) -GICNAc (81-2)	/		
	NeuAc (02-6)-Gal (81-4)-G1cNAc (81-6)			
	Têtra-antennêe			······
	Gal (\$1-4) -GICNAC (\$1-4)			
	Gal (81-4) -GleNAC (81-2)	Λ		
		Man (\$1-4)-GICNAC (\$1-4)-GICNAC (\$1-4)-Asn	Asialo-orosomucofde Humaine	SCHMID et al. (63)
	Gal (81-4) -GICNAC (81-2)		· ·	
	Gal (β1-4) -GlcNAc (β1-6) Han (α1-6)			
	Penta-antennée		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	
	NeuAc (02-6)-Gal (81-4)-GlcNAc (81-4)			
	Han (01-3)			
	Gal (01-4)-Gal (81-4)-GlcNAc (81-2)	\mathbf{X}		
	GICNAC (81-4)	$\frac{1}{2} \operatorname{Man}(\beta_1 - 4) - \operatorname{GlcNAC}(\beta_1 - 4) - \operatorname{GlcNAC}(\beta_1 - 4) - \operatorname{Ann}(\beta_1 - 4$	Ovomucoide de Tourterelle	PRANCOTO CORREDO AT -0
	Gal (01-4)-Gal (81-4)-GICNAC (81-2)			(63a)
	Gal (81-4)-GICNAC (81-4)-Man (01-6)			
	Gal (81-4)- GLCNAC (81-5)			,
	Polu-N-actullactosaminioue		······	
♪ -	Gal (81-3) -Gal (81-4) -GicNac (81-4).			
57	Gal(B1-3) = Gal(B1-3) = Gal(B1-3)			
/	dar(b1=3)=dar(b1=4)=010000(b1=5)			•
Neuto (02-6)-01/81-	1) - Clowner (81-3) - C-3 (81-4) - Clowner (81-2)	man (p1-4)-GLENAC (p1-4)-GLENAC (B1-4)-Aan	de Thymocytes de Veau	YOSHIMA et al. (64)
Neuto (02-6)-01 101	$\frac{1}{2} - \frac{1}{2} - \frac{1}$		• ···• ··· ···	
meunc (02-03-G21(\$1-4	4)-GICNAC (D1-3)-GA1 (D1-4)-GLCNAC (D1-6)			

- 17 -

.

Les différentes antennes peuvent être substituées par un nombre variable de résidus d'acide sialique et de fucose.

3 - Des structures dites hybrides, compromis entre le type oligomannosidique et N-acétyllactosaminique, ont été mises en évidence. Le glycopeptide GP-I de l'ovalbumine (YAMASHITA *et al.* -65-) servira d'exemple pour illustrer ces structures :

Gal (β 1-4)-GlcNAc (β 1-4) \sim GlcNAc $(\beta 1-2)$ -Man $(\alpha 1-3)$ Man $(\beta 1-4)$ -GlcNAc $(\beta 1-4)$ -GlcNAc $(\beta 1)$ -Asn $Man(\alpha 1-3)$ Man(α1-6) Man $(\alpha 1 - 6)$

III - <u>CONCLUSIONS</u>

Les études effectuées jusqu'à présent pour élucider les structures primaires des glycannes montrent qu'une même chaîne peptidique peut porter à la fois des O-glycannes et des N-glycannes comme dans le cas de la glycophorine. D'autre part, quel que soit le type de liaison glycanne-protéine envisagé, la séquence glycannique du point d'attache est une composante invariable de la molécule. Par contre, une très forte microhétérogénéité est déterminée par les résidus glycosyl disposés à sa périphérie. Une question se pose : la même chaîne peptidique peut-elle porter un ou plusieurs variants glycanniques ? BAYARD et KERKAERT (66), dans le cas particulier de l' α -foetoprotéine ont montré que cette protéine ne portait à la fois qu'un type de structure glycannique.

Il est remarquable de noter que cette dualité, partie variable, partie invariable est aussi retrouvée pour les glycolipides (voir la revue de HAKOMORI -67-). En outre, des similitudes structurales de la
partie variable sont observées entre les glycolipides et les glycoprotéines (RAUVALA et FINNE -68-). Cette identité dans les structures variables peut indiquer que ces motifs oligosaccharidiques sont synthétisés par les mêmes glycosyltransférases mais aussi qu'ils supportent les mêmes fonctions biologiques (signaux de reconnaissance, adhésion cellulaire).

Enfin, toutes ces structures sont des éléments précieux pour élucider et comprendre toutes les étapes de leur synthèse.

CHAPITRE II : BIOSYNTHÈSE DE GLYCANNES DE GLYCOPROTÉINES

I - DONNEES GENERALES SUR LES SYSTEMES GLYCOSYLTRANSFERASIQUES

Quelle que soit la réaction de glycosylation examinée, celle-ci fait intervenir une glycosyltransférase spécifique, un glycosyl nucléotide et un accepteur.

Glycosyl-nucléotide + Accepteur <u>Glycosyltransférase</u> Accepteur glycosylé + nucléotide

A - <u>LES GLYCOSYLTRANSFERASES</u> (voir les revues de MONTREUIL -69-SCHACHTER et ROSEMAN -70-)

Les glycosyltransférases, largement répandues dans le monde vivant, montrent des maxima d'activité envers le pH, la température et la force ionique au voisinage des valeurs physiologiques. Leur bon fonctionnement nécessite, en général, la présence de cations bivalents comme le manganèse ou le magnésium. Ces enzymes montrent un très haut degré de spécificité pour le sucre précurseur et pour le résidu glycosyl situé à la partie terminale non réductrice de l'accepteur. C'est pourquoi le concept "une liaison-un enzyme", tout d'abord formulé sur des preuves indirectes, a pu être établi à partir des travaux de différents laboratoires s'attachant à purifier les glycosyltransférases. La suite de ce chapitre en est une bonne démonstration.

Les glycosyltransférases intracellulaires sont des protéines en général liées aux membranes et leur solubilisation nécessite l'emploi de détergents qui peuvent parfois influer sur l'expression de leur activité. Cette étroite association glycosyltransférases-membranes est un lourd handicap pour purifier ces enzymes intracellulaires et étudier leurs caractéristiques et performances. Un grand nombre de ces données ont été apportées par l'étude des glycosyltransférases solubles des fluides biologiques qui sont plus accessibles.

B - LES AUTRES PARTENAIRES DE LA REACTION

Le sucre donneur est toujours un dérivé phosphorylé. Ce peut être un glycosylnucléotide (GDP-mannose, UDP-galactose, CMPacide sialique, etc...) (voir la revue de STURGES *et al.* -71-) ou un glycolipide (sucre lié au dolichol-phosphate, rétinol-phosphate...) (voir la revue de PARODI et LELOIR -72-). La rupture par la glycosyltransférase envisagée, de la liaison phosphoester ou phosphodiester, hautement énergétique, apportera l'énergie nécessaire à la formation de la liaison glycosidique.

Les monosaccharides sont généralement liés par une liaison α sur le nucléotide. Quelques uns seulement sont en configuration β . C'est, par exemple, le cas de l'acide sialique. Or, lorsque celui-ci est branché sur un oligosaccharide, l'anomérie est de type α . Lors du transfert du résidu glycosyl sur l'accepteur, une inversion d'anomérie semble se produire. HERSCOVICS *et al.* (72a) ont montré que des préparations de microsomes obtenues de pancréas de Veau catalysent le transfert de mannose à partir du GDP- α -mannose sur le dolichol-phosphate pour former le β -mannose-phospho-dolichol. Ces inversions d'anoméries sont illustrées dans la Figure 3 (p. 22). Cependant, cette loi ne peut être généralisée car le transfert de certains monosaccharides échappe à cette règle : on sait actuellement que certains résidus mannosyl liés en α au reste de la molécule sont transférés à partir du GDP- α -mannose. Le mécanisme fin de la réaction de transfert reste donc à préciser.

L'accepteur peut être une protéine, une glycoprotéine ou un glycolipide (voir paragraphes suivants). La plupart des réactions de transfert ont été étudiées grâce à l'emploi de glycoprotéines ou de glycopeptides exogènes de structures connues. Ils se sont révélés

- 21 -



FIGURE 3 : Exemples de l'inversion de l'anomérie des monosaccharides au cours de la réaction de transfert être de puissants outils pour explorer la spécificité des différentes glycosyltransférases.

II - BIOSYNTHESE DES N-GLYCANNES

Le chapitre précédent a montré la très grande diversité des structures des oligosaccharides liés N-glycosidiquement à la protéine, qu'ils soient de type oligomannosidique, hybride ou N-acétyllactosaminique. Si, au premier abord, leur biosynthèse semble suivre des voies différentes, les études effectuées dans ce domaine au cours de ces dix dernières années ont montré que leur élaboration s'effectuait de la manière suivante :

- 1 Synthèse d'un oligosaccharide précurseur sur un intermédiaire lipidique : c'est le cycle des dolichols.
- 2 Transfert en bloc de l'oligosaccharide sur la protéine.
- 3 Maturation du glycanne précurseur : c'est la formation des structures de type oligomannosidique et hybride. L'allongement séquentiel de la fraction saccharidique obtenue après maturation donnera naissance aux glycannes de type N-acétyllactosaminique.

A - LE CYCLE DES DOLICHOLS

En 1972, l'équipe de LELOIR rapporta qu'un oligosaccharide glucosylé lié à un lipide pouvait être synthétisé par des préparations subcellulaires de foie de Rat (PARODI *et al.* -73-). Ces travaux ont été ultérieurement confirmés par de nombreuses équipes (voir les revues de BEHRENS et TABORA -74-, PARODI et LELOIR -75-, STANELONI et LELOIR -76-). Cet oligosaccharide est lié par un groupement pyrophosphate à un transporteur lipidique de nature isoprénique de type dolichol (GOUGH et HEMMING -77-). Les progrès récents des techniques de détermination de structure primaire de glycannes ont permis de montrer que l'oligosaccharide est de type Glc₃ Man₉ GlcNAc₂ (LI *et al.* -78-, HUBBARD et ROBBINS -79-, SPIRO *et al.* -80-) et sa structure est présentée dans la Figure 4 (p. 25).

1 - Etapes de l'assemblage du dolichol-pyrophosphate-oligosaccharide

a - Le transporteur : le dolichol-phosphate

Bien que la participation du dolichol-phosphate dans les réactions de N-glycosylation soit bien établie, son rôle exact dans le processus reste à déterminer.

Le terme de dolichol qualifie une famille de dérivés polypréniques constitués de 16 à 20 unités de répétition isoprène dont la dernière, en position α est toujours saturée (voir la revue de HEMMING -81-). La caractéristique de cette chaîne polycarbonée est sa taille (100 Å) lui permettant de traverser la bicouche lipidique des membranes (voir Figure 5 p. 25).

Le dolichol-phosphate joue le rôle de transporteur lors de l'élaboration de l'oligosaccharide ; c'est aussi un accepteur dans la synthèse des sucres donneurs : dolichol-phosphate-mannose (Man-P-Dol) et dolichol-phosphate-glucose (Glc-P-Dol) synthétisés respectivement à partir du GDP-mannose et de l'UDP-glucose (voir les revues de PARODI et LELOIR -82-, BEHRENS et TABORA -83-).

D'autres intermédiaires lipidiques ont été mis en évidence tels que les ficaprénols chez les plantes et les rétinols ou vitamine A chez les Mammifères (SASAK et DE LUCA -84-). Le rôle joué par ces lipides reste à déterminer.

- 24 -



FIGURE 4 : Structure du dolichol-pyrophosphate-oligosaccharide glucosylé



FIGURE 5 : Substitutions du dolichol-phosphate par le mannose, le glucose et la N-acétylglucosamine-1-phosphate

b - Les premières étapes de la synthèse de l'oligosaccharide

La première étape de la synthèse d'un oligosaccharide lié à un intermédiaire lipidique comprend la formation à partir de l'UDP-N-acétylglucosamine, de dolichol-pyrophosphate-N-acétylglucosamine (GlcNAc-PP-Dol) et sa conversion en (GlcNAc)₂-P-P-Dol. (voir la revue de ELBEIN -85-).

 $UDP-\alpha-GlcNAc + P-Dol - GlcNAc(\alpha 1) - P-P-Dol + UMP$

 $UDP-\alpha-GlcNAc + GlcNAc(\alpha 1) - P - P - Dol - GlcNAc(\beta 1 - 4) - GlcNAc(\alpha 1) - P - P - Dol + UDP$

Les différents enzymes (N-acétylglucosaminyl-1-phospho-transférase et N-acétylglucosaminyltransférase) impliqués dans ces deux réactions de transfert ont été retrouvés dans différents tissus (aorte, oviducte et Levure) et ont pu être isolés. PALAMARCZYK *et al.* (86), utilisant comme accepteur des dérivés isopréniques de type dolichol possédant un nombre variable d'unités de répétition ont montré que ces enzymes possèdent une haute spécificité pour les longues chaînes isopréniques.

c - Addition des résidus de mannose

Dans de nombreux systèmes, un trisaccharide lié au dolichol a été caractérisé comme produit intermédiaire de réaction et a pu être identifié au β Man- β GlcNAc-GlcNAC. Des préparations purifiées de l'enzyme catalysant le transfert de ce premier résidu de mannose ont permis de montrer que le substrat utilisé est le GDP-mannose et non le dolicholphosphate-mannose (voir la revue de STRUCK et LENNARZ -87-).

CHAPMAN *et al.* (88) a isolé de cultures de cellules ovariennes de Hamster chinois une série complète d'oligosaccharides liés aux dolichols et renfermant entre un et neuf résidus de mannose. L'établissement de toutes ces structures a permis d'élucider l'ordre dans lequel sont ajoutés les monosaccharides au cours de la synthèse de Glc₃ Mang GlcNAc₂-P-P-Dol. La séquence des événements est résuméedans la Figure 6 (p. 27).



FIGURE 6 : Les différentes étapes de la synthèse du dolicholpyrophosphate-oligosaccharide dans les cellules ovariennes de Hamster chinois, d'après CHAPMAN et al. (voir p. 26).

· · · · · · ·

Si longtemps le dolichol-phosphate-mannose a été considéré comme seul donneur de résidus mannosyl pour élaborer un dolichol-pyrophosphateoligosaccharide, de récentes études ont restreint sa contribution à l'addition des quatre derniers. Il est maintenant démontré que le GDP-mannose est le donneur des cinq premiers mannoses. En effet, l'inhibition de la synthèse du dolichol-phosphate-mannose dans des cultures cellulaires peut être obtenue soit par addition au milieu d'un antibiotique comme l'amphomycine (KANG et al. -89-) ou en employant des milieux de cultures dépourvus de glucose (GERSHMAN et ROBBINS -90-). Cette absence de synthèse a été aussi observée dans des lignées cellulaires qui ont subi une mutation (KORNFELD et al. (91). Dans tous les cas cités précédemment, un héptasaccharide glucosylé ou non, lié au dolichol est synthétisé. Il a été identifié à un glycanne de type Man5 GlcNAc2. Ces travaux ont été confirmés par la suite par SPENCER et ELBEIN (92) et JENSEN et SCHUTZBACK (93) qui incubant en présence de GDP-mannose des préparations enzymatiques purifiées ne synthétisant pas de dolichol-phosphate-mannose, ont identifié comme produit de réaction, le même heptasaccharide lié au dolichol.

d - Addition de résidus de glucose

Les réactions dans lesquelles les résidus de glucose sont tranferés sur le dolichol-pyrophosphate-oligosaccharide ont été beaucoup moins caractérisées que celles faisant intervenir le mannose et la N-acétylglucosamine (voir la revue de PARODI et LELOIR -94-). Cette étape de la synthèse de l'oligosaccharide-P-P-Dol semble faire intervenir deux glucosyltransférases distinctes (MURPHY et SPIRO -95-) utilisant comme donneur de résidus glucosyl , le dolichol-phosphateglucose (STANELONI et al. -96-) et comme substrat accepteur un dolicholpyrophosphate-oligosaccharide contenant entre 5 et 9 résidus de mannose (CHAPMAN et al. -97-98-). La nature des liaisons reliant les résidus de glucose au reste de la molécule (LI et al. -99-, LIU et al. -100-) sont en faveur de deux activités enzymatiques. 2 - Localisation du cycle des dolichols dans les membranes

Il est actuellement admis que la synthèse du dolicholpyrophosphate-oligosaccharide s'effectue dans le reticulum endoplasmique rugueux. Cependant, une série de travaux ont montré que les enzymes catalysant ces réactions peuvent être retrouvés dans d'autres compartiments cellulaires (RUPAR *et al.* -101-) et notamment dans les membranes plasmiques (PIERCE *et al.* -102-).

En outre, il est particulièrement intéressant de localiser les intermédiaires lipidiques, ainsi que les enzymes les synthétisant, dans le contexte de la membrane (face cytoplasmique ou face luminale) (voir la revue de HANOVER et LENNARZ -103-). En effet, un certain nombre de questions ont suscité l'intérêt de ces recherches. Les glycosylnucléotides (GDP-Man, UDP-GlcNAc, UDP-Glc) sont synthétisés dans le cytoplasme (voir les revues de STURGESS et al. -104-, SCHACHTER -105-), la N-glycosylation des protéines a lieu, comme nous le verrons ultérieurement, dans la cisterne du reticulum endoplasmique. Plus récemment, Mac CLOSKEY et TROY (106-107) ont suivi par résonnance paramagnétique électronique, le comportement, dans des membranes artificielles, du dolichol-phosphate portant un marqueur de spin. Ils ont démontré que ce composé a des mouvements transmembranaires (flip-flop) très lents (t 1/2 supérieur à 5 heures à 25°C). Par contre, ils ont suggéré que, s'il est impliqué dans les réactions de glycosylation de la chaîne K des immunoglobulines de cellules MOPC 46, le dolicholphosphate peut effectuer un mouvement d'aller et retour dans la membrane à la fréquence d'un par seconde.

L'attaque protéolytique ménagée de microsomes a été, jusqu'à présent, la seule méthode utilisée pour préciser l'orientation du site actif des enzymes catalysant le transfert de monosaccharides sur un intermédiaire lipidique. Par exemple, SNIDER et al. (108) ont conclu que la synthèse du dolichol-phosphate-mannose ainsique celle du dolichol-phosphate-glucose s'effectuent du côté cytoplasmique de la membrane. NILSSON et al. (109) situent aussi le transfert de mannose sur la face cytoplasmique. Ces résultats sont en fait peu démonstratifs car ils ne peuvent exclure l'existence d'enzymes transmembranaires dont le site actif serait orienté vers la cisterne du reticulum endoplasmique.

Par une approche originale, utilisation d'une galactosyltransférase soluble, enzyme ne pénétrant pas à l'intérieur de vésicules membranaires scellées, HANOVER et LENNARZ (110) ont montré que les produits de réaction sont orientés vers le lumen de ces vésicules membranaires. En effet, la formation de Gal-GlcNAc₂-P-P-Dol n'est observée qu'après dissociation des vésicules scellées par les détergents.

Si de nombreux points restent encore à clarifier, les différentes hypothèses concernant le transfert de monosaccharides sur les intermédiaires lipidiques sont rassemblées dans les Figures 7 et 8 (p. 31).

B - TRANSFERT DE L'OLIGOSACCHARIDE SUR LA PROTEINE

La N-glycosylation d'une protéine fait intervenir un enzyme membranaire : la "dolichyl diphosphoryl oligosaccharide-protéine oligosaccharidyltransférase". Les substrats de cet enzyme sont un oligosaccharide lié à un intermédiaire lipidique et une chaîne polypeptidique n'ayant pas encore acquis sa conformation définitive.

1 - Spécificité de l'oligosaccharidyltransférase

Les résultats obtenus dans ce domaine sont très discordants et dépendent essentiellement de la méthode d'approche utilisée (voir la revue de HUBBARD et IVATT -112-) (voir Tableau III p. 32).

Les études réalisées *in vivo* accordent à l'oligosaccharidyltransférase une certaine spécificité vis-à-vis d'un intermédiaire lipidique dont l'oligosaccharide est glucosylé. En effet, dans de

- 30 -



FIGURE 7 : Synthèse des intermédiaires de glycosylation dans les membranes (d'après HEMMING, communication personnelle)

- E1 : N-acétylglucosaminyltransférases
- E2, E3, E4 : mannosyltransférases
- E5, E6 : Glucosyltransférases



FIGURE 8 : Mécanismes possibles de l'assemblage dans la membrane du dolichol-pyrophosphate-chitobiose (d'après HANOVER et LENNARZ -111-)



TABLEAU III

OLIGOSACCHARIDES TRANSFERES IN VIVO ET IN VITRO PAR L'OLIGOSACCHARIDYLTRANSFERASE

SYSTEMES UTILISES	STRUCTURE DE L'OLIGOSACCHARIDE LIE AU DOLICHOL	OLIGOSACCHARIDE TRANSFERE SUR LES PROTEINES	REFERENCES
IN VIVO			
Fibroblastes d'embryons de Poulet infectés ou non par le VSV et le virus Sindbis	Glc ₃ -Man ₉ -GlcNAc ₂ -P-P-Dol	Glc _j -Man _g -GlcNAc ₂ -Asn	HUBBARD et ROBBINS (113)
Coupes de thyroide	Glc ₃ -Man ₉ -GlcNAc ₂ -P-P-Dol	Glc ₃₋₀ -Man ₉ -GlcNAc ₂ -Asn	GODELAINE et al. (114)
Cellules de lymphome murin (classe E Thy-i négatif) infectées ou non par le VSV	Glc3-Man5-GlcNAc2-P-P-Dol	Glc ₃₋₁ -Man ₅ -GlcNAc ₂ -Asn	KORNFELD et al. (115)
Cellules ovariennes de Hamster chinois cultivées sans glucose	Man ₅ -GlcNAc ₂ -P-P-Dol	Man ₅ -GlcNAc ₂ -Asn	REARICK et al. (116)
<u>IN VITRO</u>	OLIGOSACCHARIDE-P-P-DOL EXOGENE UTILISE	RADIOACTIVITE LIEE AUX PROTEINES	
	GlcNAc ₂ -P-P-Dol	+ (GlcNAc ₂ -Asn)	CHEN et LENNARZ (117)
Oviducte de Poule	βMan-GlcNAc2-P-P-Dol	+ (βMan-GlcNAc ₂ ~Asn)	CHEN et LENNARZ (118)
	Mann-GlcNAc2-P-P-Dol	+	WAECHTER et LENNARZ (119)
Cerveau de Veau	GlcNAc2-P-P-Dol	+ (GlcNAc ₂ -Asn)	HARFORD et WAECHTER (120)
Fibroblastes	Glc3-Man9-GlcNAc2-P-P-Dol	+	ROBBINS et al. (121)
Thyroide	Glc3-Mang-GlcNAc2-P-P-Dol	+	MURPHY et SPIRO (122)
Foie de Rat	Glc ₁₋₃ -Man ₉ -GlcNAc ₂ -P-P-Dol	+ (Disparition du Glc ₃ Man ₉ -GlcNAc ₂ -P-P-Dol)	STANELONI et al. (123)
Fibroblastes NIL 8	Glc ₃ -Man ₉ -GlcNAc ₂ -P-P-Dol Man ₉ -GlcNAc ₂ -P-P-Dol	+ (très rapidement transféré) +	TURCO et al. (124)
Saccharomyces cerevisiae (microsomes)	Glc ₃ -Man ₉ -GlcNAc ₂ -P-P-Dol Man ₉ -GlcNAc ₂ -P-P-Dol GlcNAc ₂ -P-P-Dol	+ (très rapidement transféré) + +	TRIMBLE et al. (125) LEHLE (126)
Saccharomyces cerevisiae (oligosaccharidyltransférase purifiée)	Glc ₃ -Man ₉ -GlcNAc ₂ -P-P-Dol Man ₉ -GlcNAc ₂ -P-P-Dol GlcNAc ₂ -P-P-Dol	Glc ₃ -Man ₉ -GlcNAc ₂ -Asn - +	SHARMA et al. (127)

Le signe + indique que la radioactivité associée à l'oligosaccharide lié au dolichol a été transférée sur les accepteurs protéiques endogènes. <u>Remarque</u> : dans le cas des fibroblastes (ROBBINS et al -121), l'oligosaccharide-P-P-Dol glucosylé a été synthétisé à partir des glycosylnucléotides correspondants. nombreux systèmes, des cinétiques de marquage ont permis de conclure que l'oligosaccharide le mieux transféré sur la protéine est de type $\operatorname{Glc_3 Man_9 GlcNAc_2}$ (HUBBARD et ROBBINS -128-, KORNFELD *et al.* -129-). De même, lorsque la synthèse du dolichol-phosphate-mannose est inhibée *in vivo* (cas des cellules de lymphome murin E-Thy 1-négatif), l'oligosaccharide préférentiellement transféré sur la protéine est un oligosaccharide tronqué glucosylé (Glc_{3 Man_5}GlcNAc₂) (KORNFELD *et al.* -130-).

Par contre, in vitro, dans des systèmes plus simples (préparations membranaires, enzyme solubilisé et partiellement purifié) l'oligosaccharidyltransférase peut brancher sur des accepteurs peptidiques endogènes ou exogènes, aussi bien de courts chaînons saccharidiques comme le di-N-acétylchitobiose que des oligosaccharides plus complets glucosylés ou non de type Mann GlcNAc2 (voir la revue de STRUCK et LENNARZ -131-). Selon certains auteurs, l'efficacité du transfert dépend de l'état de glucosylation de l'intermédiaire lipidique (MURPHY et SPIRO -132-, TRIMBLE et al. -133-, STANELONI et al. -134-) : si curieusement le traitement du donneur par l' a-mannosidase ne perturbe pas la N-glycosylation, la perte d'un ou deux résidus glucosyl affecte profondément sa vitesse de transfert sur l'accepteur protéique (SPIRO et al. -135-). Dans d'autres systèmes, l'oligosaccharidyltransférase ne montre pas une telle préférence (RONIN et al. -136-). Récemment, grâce à une préparation purifiée de l'enzyme solubilisé à partir des membranes de Levure, SHARMA et al. (137) ont montré que la taille de l'oligosaccharide n'influe pas sur l'affinité de l'enzyme vis-à-vis du donneur lipidique mais conditionne l'affinité à l'égard de l'accepteur protéique.

2 - Influence de la conformation de l'accepteur peptidique

Il est actuellement bien démontré que la N-glycosylation ne peut avoir lieu que si le chaînon Asn-X-Thr(Ser) appelé "séquon" est présent dans la chaîne peptidique. Toute modification de cette séquence code entraîne la perte de sa capacité d'accepter un oligosaccharide : RONIN et al. (138) utilisant comme accepteur des peptides synthétiques dont

- 33 -

l'un de ces amino-acides est substitué, n'observent plus le transfert de l'oligosaccharide. Cependant, celle-ci est un élément nécessaire mais non suffisant. En effet, un tiers seulement des sites Asn-X-Thr(Ser) connus dans les protéines eucaryotes est glycosylé.

PLESS et LENNARZ (139) firent une approche similaire du problème : emploi de préparations de membranes d'oviducte de Poule comme source enzymatique, dolichol-pyrophosphate-oligosaccharide exogène comme donneur et protéines déglycosylées comme accepteurs. Aucune de celles-ci n'a pu être glycosylée in vitro sous sa forme native ; par contre, l'oligosaccharide peut être transféré si les protéines sont dénaturées. La N-glycosylation nécessite donc l'accessibilité du séquon porté par une protéine n'ayant pas encore acquis sa conformation définitive. Cette situation particulière est réalisée lorsque la séquence code est présente dans un coude β de la protéine. BEELEY (140) puis AUBERT et al. (141) ont en effet mentionné que les N-glycannes de nombreuses glycoprotéines examinées sont situés dans/ou à proximité d'un coude β de la protéine (voir Figure 9 p. 35). L'affinité de l'oligosaccharidyltransférase pour le tripeptide présent dans un coude β peut être utilisée pour purifier cet enzyme (AUBERT et al. -143-).

3 - Localisation du transfert de l'oligosaccharide

Les protéines de membranes et de sécrétion sont synthétisées par les polysomes liés aux membranes du reticulum endoplasmique rugueux. BLOBEL et DOBBERSTEIN (144) ont pour la première fois dé-

montré comment une chaîne peptidique naissante traverse la membrane grâce à une séquence hydrophobe qui sera par la suite excisée, et se retrouve dans la partie luminale du reticulum endoplasmique rugueux pour être ensuite excrétée. Certaines protéines possédant une séquence hydrophobe dans la région C-terminale, restent associées à la bicouche lipidique de la membrane. La localisation préférentielle d'une activité

- 34 -



FIGURE 9 : Structure secondaire de l'orosomucoïde selon CHOU et FASMAN (142). La séquence peptidique possède différents états de conformation : hélice (0), feuillet β (Δ), pelotte (-), coude β (\clubsuit). Les résidus asparaginyl 15, 38, 54, 75 et 85 portent des glycannes. enzymatique associée au transfert d'un oligosaccharide sur des protéines endogènes dans le reticulum endoplasmique rugueux (CZICHI et LENNARZ -145-) a suggéré qu'il existe une étroite relation temporelle entre la synthèse de la chaîne peptidique et sa N-glycosylation. Dans de nombreux cas, synthèse de l'ovalbumine (KIELY *et al.* -146-), glycoprotéines du VSV (ROTHMAN et LODISH -147-) par exemple, les chaînes polypeptidiques sont glycosylées alors qu'elles sont encore attachées aux ribosomes. Cependant, les oligosaccharides pourraient être transférés après que la synthèse de la protéine soit terminée.

Un certain nombre d'arguments sont en faveur de la localisation cisternale de l'oligosaccharidyltransférase :

1 - les glycannes des glycoprotéines sont accessiblespar le côté cisternal du reticulum endoplasmique : ils ne sont $libérés par action de la <math>\beta$ -endo-N-acétylglucosaminidase (agent non perméant) que lorsque des vésicules membranaires scellées sont traitées par des détergents (voir la revue de HANOVER et LENNARZ -148-).

2 - les peptides synthétisés par des systèmes acellulaires ne sont glycosylés que s'ils sont insérés dans la membrane (LINGAPPA *et al.* -149-).

3 - la chaîne peptidique doit comprendre entre 45 et 90 acides aminés avant d'être glycosylée (GLABE et al. -150-). Cette longueur minimale correspond à l'épaisseur de la bicouche lipidique.

La Figure 10 (p. 37) rassemble les connaissances actuelles dans ce domaine.



- 37 -









C - MATURATION DE LA N-GLYCOSYLPROTEINE

Il est aujourd'hui acquis que les N-glycosylprotéines de type oligomannosidique et de type N-acétyllactosaminique sont synthétisées à partir d'un précurseur commun glucosylé. De nombreux exemples ont permis de généraliser ce phénomène : glycoprotéines du VSV (TABAS et al. -151-) du virus Sindbis (ROBBINS et al. -152-), fibronectine (CHOI et HYNES -153-) etc...

La diversité des glycoprotéines matures suggère que le glycanne, après son transfert sur la protéine, subit un certain nombre de transformations. Celles-ci s'effectueront au cours du transport de la glycoprotéine dans les différents compartiments cellulaires par le "membrane flow".

1 - Formation de glycannes de type oligomannosidique

a - Déglucosylation du glycanne

La première étape de l'élagage du motif glycannique de la glycoprotéine est l'excision des résidus glucosyl. Les études cinétiques de cette réaction enzymatique dans des systèmes cellulaires tels que les cellules ovariennes de Hamster chinois infectées par le VSV (KORNFELD *et al* -154-), la Levure (PARODI -155-), les fibroblastes (HUBBARD et ROBBINS -156-) situent la déglucosylation immédiatement après le transfert de l'oligosaccharide sur la protéine.

Des préparations subcellulaires, exprimant des activités α -glucosidasiques ont été obtenues à partir de différentes sources : thyroīde (GODELAINE *et al.* -157-), oviducte (ELTING *et al.* -158-), foie de Rat (UGALDE *et al.* -159-) etc... Au moins deux activités glucosidasiques sont actives sur l'oligosaccharide libre ou lié soit à la protéine soit au dolichol (SPIRO *et al.* -160-). La première (glucosidase I) en hydrolysant la liaison α -1,2 libère le résidu glucosyl le plus externe (GRINNA et ROBBINS -161-). La seconde (glucosidase II-III) inactive sur une structure de type Glc₃ Man₉ GlcNAc₂, transforme l'oligosaccharide contenant un ou deux résidus glucosyl en oligosaccharide non glucosylé (Man₉ GlcNAc₂) (UGALDE *et al.* -162-, MICHAEL et KORNFELD -163-) (voir Figure 11 p. 37).

Dans le foie de Rat, les glycosidases I et II-III ont été identifiées en tant que protéines membranaires et ont été localisées sur la surface luminale du reticulum endoplasmique lisse et rugueux (GRINNA et ROBBINS -164-).

b - Elagage de quatre résidus de mannose

Peu de glycoprotéines matures de type oligomannosidique possédent un glycanne contenant deux résidus de N-acétylglucosamine et neuf de mannose (voir Chapitre I p. 14). L'existence de glycannes plus courts comme un de ceux de l'ovalbumine, suggère que la maturation consiste aussi dans l'élimination de un à quatre résidus mannosyl.

Des cinétiques de marquage *in vivo*, suivie d'expériences de chasse, ont suggéré que les mannosidases ne sont pas associées au reticulum endoplasmique. En effet, le temps de latence observé pour visualiser leur action peut correspondre au temps mis par la protéine pour migrer vers l'appareil de Golgi (HUBBARD et ROBBINS -165-).

Deux activités mannosidasiques hydrolysant les liaisons α -1,2 ont été retrouvées dans le Golgi : la première (mannosidase I) purifiée par OPHEIM et TOUSTER (166) en utilisant un substrat synthétique, le paranitrophényl- α -D-mannoside ; la seconde (mannosidase II) nécessite l'emploi de substrats naturels (oligomannosides marqués) pour être détectée (TABAS et KORNFELD -167-, TULSIANI *et al.* -168-). Une des suites possibles des réactions catalysées par ces enzymes est présentée dans la figure 12 (p. 40).

- 39 -



FIGURE 12 : Maturation d'un motif oligomannosidique porté par les néoglycoprotéines de cellules ovariennes de Hamster chinois (LI et KORNFELD -169-) La maturation des structures oligomannosidiques donne naissance aux glycannes plus complexes de type hybride et N-acétyllactosaminique. Actuellement, le ou les facteurs dirigeant un glycanne vers un type de structure donné restent encore à découvrir. Néanmoins, certains travaux ont fait ressortir l'importance de la structure spatiale de la protéine. Il serait attrayant d'imaginer que les α -mannosidases golgiennes pourraient agir ou non sur le glycanne en fonction d'une certaine conformation de la protéine au voisinage du site asparaginyl ; leur faible activité expliquerait alors la présence de structures oligomannosidiques dans les glycoprotéines.

2 - Synthèse de glycannes de type hybride et N-acétyllactosaminique

La plupart des oligosaccharides liés N-glycosidiquement à la protéine ne restent pas sous la forme oligomannosidique mais sont convertis en glycannes plus complexes de type N-acétyllactosaminique. Ce processus de transformation nécessite l'excision de deux résidus mannosyl et l'addition séquentielle de N-acétylglucosamine, de galactose, d'acide sialique et de fucose. Les différentes voies métaboliques aboutissant à la formation d'un glycanne mature nécessitent l'intervention de nombreuses glycosyltransférases localisées dans l'appareil Golgi. L'étude de ces différentes réactions de transfert a fait l'objet des recherches des groupes de SCHACHTER, HILL et VAN DEN EIJNDEN (voir les revues de SCHACHTER -170-171-172-) qui après purification des enzymes, étudièrent leur spécificité vis-à-vis des glycopeptides de structure connue. Certaines de ces réactions ont pu être décrites *in vivo* grâce à l'emploi de lignées cellulaires défectives en certaines glycosyltransférases(voir la revue de STANLEY -173-).

La synthèse de tels types de glycannespeut être divisée en deux grandes périodes :

 - la maturation de l'oligosaccharide sous la dépendance de la N-acétylglucosaminyltransférase I ;

- 41 -

- l'allongement des motifs saccharidiques.

a - La maturation sous la dépendence de la N-acétylglucosaminyltransférase I

Les oligosaccharides destinés à être convertis en glycannes plus élaborés suivent vraisemblablement les voies métaboliques indiquées dans la Figure 13 (p. 43).

L'isolement d'un heptasaccharide $(Man_5GlcNAc_2)$ de protéines accumulées par des mutants de cellules ovariennes de Hamster chinois appelés Pha^{RI} a tout d'abord suggéré la duplicité des N-acétylglucosaminyltransférases responsables de la maturation des oligomannosides (LI et KORNFELD -174-). En effet, ces cellules sont dépourvues de N-acétylglucosaminyltransférase I mais possèdent une activité Nacétylglucosaminyltransférasique II normale (NARASIMHAN *et al.* -175-). En outre, OPPENHEIMER *et al.* (176) ont montré que des anticorps obtenus contre la N-acétylglucosaminyltransférase I de foie de Porc n'ont pas de réactions croisées avec la transférase II de la même source.

L'isolement à partir de colostrum de Vache (HARPAZ et SCHACHTER -177-), de foie de Lapin (OPPENHEIMER et HILL -178-) ou de la muqueuse bronchique (MENDICINO *et al.* -179-) et la purification de la Nacétylglucosaminyltransférase I ont permis d'étudier ses paramètres de fonctionnement. Cet enzyme utilise comme substrat aussi bien les oligosaccharides-peptides $Man_5GlcNAc_2Asn$ que $Man_3GlcNAc_2Asn$ mais sa très haute affinité pour la première structure suggère qu'elle est effectivement le substrat physiologique. Cependant, d'autres voies métaboliques doivent exister, mineures dans le cas de cellules normales, prédominantes dans le cas de cellules mutantes (lymphome murin E-Thy 1négatif : CHAPMAN *et al.* -180-).

Des mannosidases localisées dans l'appareil de Golgi, excisent ensuite les liaisons α -1,6 et α -1,3 des résidus mannosyl externes.



FIGURE 13 : Maturation de l'héptasaccharide-peptide précédant la synthèse d'un glycanne de type N-acétyllactosaminique. (Flêche continue : voie métabolique majeure, flêche discontinue : autre suite de réactions possible).

TABAS et KORNFELD (181) puis HARPAZ et SCHACHTER (182) ont montré que ces enzymes possèdent une très haute affinité par un oligosaccharide de structure GlcNAc-Man₅-GlcNAc₂ suggérant ainsi que ces α -mannosidases agissent sous l'extrême dépendance de la N-acétylglucosaminyltransférase I. Ainsi, la faible activité de cet enzyme et/ou des α -mannosidases "tardives" expliquerait la présence sur les protéines de glycannes de type hybride comme celui de l'ovalbumine.

b - Allongement du glycanne

Les antennes des glycannes de type N-acétyllactosaminique se forment par addition de résidus monosaccharidiques (N-acétylglucosamine, galactose, acide sialique, fucose) à partir des glycosylnucléotides correspondants. Les différentes glycosyltransférases mises en jeu sont des enzymes membranaires, localisées préférentiellement dans l'appareil de Golgi (voir la revue de SCHACHTER -183-), dont le site actif est dirigé vers l'espace intracisternal (FLEISCHER -184-).

In vitro, l'oligosaccharide GlcNAc-Man₃-GlcNAc₂ est le substrat de plusieurs enzymes :

1 - La N-acétylglucosaminyltransférase II : par addition de N-acétylglucosamine lié en β -1,2, elle amorce la synthèse de la seconde antenne (voir Figure 13 p. 43) (NARASIMHAN et al. -185-, HARPAZ et SCHACHTER -186-, OPPENHEIMER et al. -187-).

 $2 - L'\alpha - 1,6$ fucosyltransférase : elle greffe un résidu fucosyl sur la N-acétylglucosamine du point d'attache (voir Figure 16 p. 52). L'addition de fucose ne se réalise qu'après action de la N-acétylglucosaminyltransférase I (WILSON *et al.* -188-, LONGMORE et SCHACHTER -189-).

Enfin, des glycosyltransférases spécifiques vont conférer au glycanne son originalité (Figure 14 p. 45). Elles catalysent les transferts successifs :

- 44 -



FIGURE 14 : Synthèse des isoglycannes de type N-acétyllactosaminique bi, tri, tétraantennés et de type polyN-acétyllactosaminique. (Les flèches en trait discontinu indiquent que ces réactions n'ont pas été caractérisées <u>in vitro</u>).

- 45 -

1 - de galactose formant ainsi le chaînon de N-acétyllactosamine (Gal(β 1-4)-GlcNAc). Ces N-acétylglucosaminide(β 1-4)galactosyltransférases ont été caractérisées dans de nombreux tissus (voir la revue de SCHACHTER -190-).

2 - de fucose lié en α 1-3 sur la N-acétylglucosamine externe (PAULSON et al. -191-) ou en α 1-2 sur le galactose terminal (BEYER et al. -192-).

3 - d'acide sialique. Ce monosaccharide est transféré par des sialyltransférases spécifiques sur le C3 ou le C6 du galactose en position terminale non réductrice (VAN DEN ELJNDEN et SCHIPHORST -193-, PAULSON et al. -194-).

Ces différentes réactions aboutissent à la formation d'un glycanne biantenné mature. Cependant, de nombreux oligosaccharides possèdent plus de deux antennes. Jusqu'à présent, la présence de tels types d'activités enzymatiques n'a pu être détectée dans des préparations enzymatiques purifiées.

III - UN EXEMPLE DE LA BIOSYNTHESE DES O-GLYCANNES

D'une façon générale, la synthèse des oligosaccharides liés à des résidus de sérine ou de thréonine par l'intermédiaire de la N-acétylgalactosamine (type mucine) s'effectue de manière beaucoup plus simple que celle que nous venons de décrire pour les glycannes des N-glycosylprotéines (voir les revues de MONTREUIL -195-, SCHACHTER -196-, -197-).

Elle est caractérisée par les points suivants :

 1 - L'assemblage de l'oligosaccharide ne semble pas s'effectuer sur un intermédiaire lipidique.

2 - Il n'existe pas de processus de maturation des glycannes préalablement synthétisés.

- 46 -



- 47 -

3 - Le transfert de la N-acétylgalactosamine à partir de l'UDP-GalNAc sur un accepteur approprié contenant des résidus de sérine ou de thréonine, constitue la première étape.

 4 - L'addition séquentielle des monosaccharides à partir des glycosylnucléotides correspondants dépend de la présence ou non des glycosyltransférases respectives dans le tissu.

La synthèse des mucines des glandes sous-maxillaires de Boeuf et de Mouton a été très bien étudiée : les enzymes catalysant les différentes réactions ont été isolées et leurs paramètres de fonctionnement parfaitement définis (SCHACHTER -198-, BEYER -199-). Elle nous servira donc d'exemple pour illustrer ce type de synthèse dont les différentes étapes sont rassemblées dans la Figure 15 (p. 47).

CHAPITRE III : CONTRÔLE DE LA BIOSYNTHESE DES GLYCOPROTÉINES

Une même cellule synthétise une grande variété de glycoprotéines. La diversité des oligosaccharides liés aux protéines de membrane ou de sécrétion pose la question suivante : comment la cellule contrôle-t-elle la biosynthèse d'une glycoprotéine ? Le grand nombre de théories proposées reposant sur peu de résultats expérimentaux,fait ressortir l'importance du problème et les nombreux points d'interrogation.

I - REGULATION GENETIQUE DES GLYCOSYLTRANSFERASES

Contrairement à la synthèse protéique nécessitant le transfert de l'information contenue dans le génome et la présence d'un modèle, l'assemblage de structures oligosaccharidiques ne fait pas intervenir un tel mécanisme. Les gènes contrôlent la synthèse d'un oligosaccharide en codant ou non pour les différentes glycosyltransférases. Cette interprétation simple du contrôle génique "un gène, une liaison osidique", fut d'abord émise par ROSEMAN (201). Elle est particulièrement illustrée par la synthèse des antigènes de groupes sanguins humains (système A, B, O, Lewis) (voir la revue de SCHACHTER -202-).

II - CONTROLE DU TAUX INTRACELLULAIRE DES SUBSTRATS

Un mode simple (quoique peu spécifique) de régulation du transfert d'un monosaccharide sur un accepteur (de nature protéique ou lipidique) est le contrôle du taux intracellulaire des différents substrats (donneurs et accepteurs).

A - LES DONNEURS

La concentration intracellulaire des glycosylnucléotides par exemple, peut être modulée de deux façons :

1 - Régulation de leur synthèse (voir la revue de SCHACHTER -203)

2 - Régulation de leur dégradation (voir la revue de MONTREUIL -204). Des enzymes, les pyrophosphatases, capables d'hydrolyser les glycosylnucléotides ont été caractérisées dans de nombreux systèmes (EVANS -205-, SPIK et al. -206-). Elles catalysent la réaction suivante :

 XDP-Sucre
 XMP + Sucre-1-P
 Sucre + Pi

 pyrophosphatase
 phosphatase

Les pyrophosphatases semblent être inhibées dans les cellules transformées par des virus (SELA et al. -207-).

B - LES ACCEPTEURS

Le dolichol-phosphate peut être un facteur limitant les réactions de N-glycosylation. En effet, GOUGH et HEMMING (208) ont montré qu'il était présent dans les tissus en très faible quantité. D'autre part, l'inhibition de la synthèse de dolichol par addition à des milieux de culture de cholestérol, de coenzyme Q ou d'inhibiteurs de l'hydroxyméthylglutaryl-coenzyme A réductase, est rapidement suivie d'un arrêt de la N-glycosylation des protéines (CARSON et LENNARZ -209-). En outre, WEDGWOOD et STROMINGER (210) ont caractérisé une phosphatase intervenant dans le recyclage du dolichol-pyrophosphate libéré après la réaction de transfert de l'oligosaccharide. La déphosphorylation du dolicholpyrophosphate pourrait donc être un des moyens de régulation du taux intracellulaire du phosphoryldolichol.

III - INFLUENCE DE LA STRUCTURE DE L'ACCEPTEUR

Nous ne discuterons pas dans ce paragraphe de l'importance de la conformation de l'accepteur protéique lors de sa glycosylation (voir p. 33), mais nous nous attacherons à montrer comment la structure du glycanne elle-même, peut "guider" les glycosyltransférases dans la synthèse d'un oligosaccharide donné qu'il soit lié N-glycosidiquement ou O-glycosidiquement à la protéine.

A - TRANSFERT D'UN OLIGOSACCHARIDE SUR UNE PROTEINE ET SA MATURATION

La première étape de la biosynthèse d'une N-glycosylprotéine est comme, nous l'avons vu précédemment (voir p. 30), le transfert d'un oligosaccharide sur un accepteur peptidique à partir d'un substrat glycolipidique. La caractérisation du dolichol-pyrophosphate- oligosaccharide glucosylé comme seul intermédiaire *in vivo* d'une part, la vitesse de transfert de cet oligosaccharide glucosylé d'autre part, ont suggeré que la présence de glucose dans la molécule était le "signal" de son transfert sur l'accepteur peptidique.

Les réactions de glycosylation s'effectuant pendant la maturation des glycannes de type oligomannosidique montrent parfaitement comment la structure d'un oligosaccharide accepteur peut déterminer le transfert ultérieur d'un monosaccharide donné (N-acétylglucosamine, fucose). SCHACHTER et son groupe ont défini les différentes voies métaboliques possibles en recherchant la spécificité de substrat des glycosyltransférases pour des glycopeptides de structure connue (voir Figure 16 p. 52). Les enzymes-clefs sont :

- la N-acétylglucosaminyltransférase I
- la N-acétylglucosaminyltransférase III
- la N-acétylglucosaminide (α1-6) fucosyltransférase.

- 51 -



FIGURE 16 : Voies de synthèse des N-glycannes di-antennés (Réactions démontrées <u>in vitro</u>; hypothétiques-----; réactions qui ne peuvent avoir lieu----). M, Man ; Gn, GlcNAc ; F, Fuc ; T, Transférase ; R, GlcNAc(β1-4)-GlcNAc(β1)-Asn-X (D'après SCHACHTER : voir p. 52).

ĤIJ;

1 - La N-acétylglucosaminyltrans férase I : C'est le premier point-clef de la maturation des oligomannosides $(Man_5-GlcNAc_2)$ (voir la revue de SCHACHTER -211-). Aucun autre monosaccharide n'est ultérieurement transféré si cette glycosyltransférase n'a pas greffé une N-acétylglucosamine sur le C2 de l'(α 1-3) mannose. Cet enzyme permet donc la synthèse de structures bi-antennées.

2 - La N-acétylglucosaminyltrans férase III : L'"intersecting" N-acétylglucosamine assure une fonction importante dans le contrôle de la synthèse des structures hybrides. NARASHIMAN *et al.* (212) ont démontré l'existence de N-acétylglucosaminyl III et III' qui lie la N-acétylglucosamine en β 1-4 sur le β -mannose du noyau pentasaccharidique. La présence de cette "intersecting" N-acétylglucosamine empêche toute action postérieure

- des mannosidases golgiennes qui convertissent les structures possédant cinq mannoses en composés à trois mannoses ;
 de l'(α1-6) fucosyltransférase ;
- de la N-acétylglucosaminyltransférase II.

3 - L'(α 1-6) fucosyltrans férase : WILSON et al. (213) puis LONGMORE et SCHACHTER (214) ont montré que l'addition de fucose lié en α 1-6 sur la N-acétylglucosamine du point d'attache ne peut se faire que si la (β 1-2) N-acétylglucosamine est branchée sur l'(α 1-3) mannose. Cette spécificité de l'(α 1-6) fucosyltransférase pour des structures oligosaccharidiques bien définies explique pourquoi les glycannes de type oligomannosidique ne contiennent jamais de fucose (voir p. 14).

De la même manière, le galactose et l'acide sialique sont transférés sur l'accepteur dans un ordre défini. En utilisant des glycopeptides désialylés et dégalactosylés comme accepteurs, RAO et MENDICINO (215) ont remarqué que la présence du premier résidu β galactosyl sur la partie non réductrice du chaînon GlcNAc(β 1-2)-Man(α 1-3) influence la vitesse de transfert du second galactose. VAN DEN EIJNDEN *et al.* (216) ont mis en évidence un mécanisme analogue pour le branchement de l'acide sialique sur les galactoses externes. Les nombreuses structures monosialylées sont en faveur d'une telle voie métabolique.

B - FIN DE SYNTHESE DES CHAINES OLIGOSACCHARIDIQUES

Des mécanismes d'exclusion mutuelle des réactions de glycosylation ont été décrits et concernent essentiellement les voies métaboliques aboutissant à la formation des séquences terminales non réductrices des glycannes des glycoprotéines de Mammifères. BEYER et al. (217) ont étudié le transfert de l'acide sialique et de fucose sur des oligosaccharides présents dans l'asialotransferrine (Gal(β 1-4)-GlcNAc(β 1-2)-Man-R) et la glycoprotéine antigel de Poisson de l'Antartique (Gal(β 1-3)-GalNAc(α 1)-Thr) en utilisant comme source enzymatique six glycosyltransférases purifiées. L'action séquentielle de ces transférases sur les substrats modèles leur a permis d'établir le schéma présenté dans la Figure 17 (p. 55). Un de leurs apports majeurs a été de démontrer que le résidu de Nacétyllactosamine (Gal(β 1-4)-GlcNAc) de l'asialotransferrine peut être soit sialylé par une β -galactoside (α 2-6) sialyltransférase soit fucosylé par une β -N-acétylglucosaminide (α 1-3) fucosyltransférase et que le transfert de l'un de ces deux résidus glycosyl inhibe totalement le transfert de l'autre. Ce mécanisme est en accord avec les structures des glycannes qui ont été établies jusqu'à présent.

IV - AUTRES FACTEURS DE CONTROLE DE LA BIOSYNTHESE DES GLYCOPROTEINES

Un certain nombre de facteurs interviennent dans la biosynthèse des glycoprotéines en modifiant de manière qualitative ou quantitative les différentes activités glycosyltransférasiques (voir la revue de SCHACHTER -218-).


FIGURE 17 : Voies de synthèse possibles des extrémités des glycannes liés O-glycosidiquement (A) et N-glycosidiquement (B) à la protéine. Les barres pleines indiquent que la réaction est impossible, les barres hachurées montrent que la réaction s'effectue lentement. (D'après BEYER et al. : voir p. 54). Une grande variété d'effets inhibiteurs ou activateurs ont été décrits en étudiant l'action de différents nucléotides sur les glycosyltransférases (MOOKERJEA *et al.* -219-). En général, les effets activateurs sont indirects et résultent de l'inhibition des pyrophosphatases par ces nucléotides (DEBEIRE *et al.* -220-). Les glycosylnucléotides peuvent réguler parfois certaines réactions enzymatiques. RONIN *et al.* (221) ont montré que le GDP-mannose, lorsqu'il est utilisé à haute concentration, peut inhiber le transfert de glucose sur un oligosaccharide lié à un intermédiaire lipidique.

Un des exemples intéressant de la modification d'une activité glycosyltransférasique est celui de l'association de l' α-lactalbumine et de l'UDP-galactose : N-acétylglucosaminyltransférase (voir la revue de SCHACHTER -222-). Il est reconnu que cette protéine transforme la N-acétyllactosamine synthétase en lactose synthétase. Cet enzyme est présent dans de nombreux tissus,particulièrement dans la glande mammaire, où il dirige la synthése du lactose. Ce mode de régulation pourrait être étendue à d'autres glycosyltransférases et permettrait à la cellule d'utiliser un nombre limité de transférases pour une très large variété d'oligosaccharides.

V - LES INHIBITEURS DE LA GLYCOSYLATION

D'abord remarquées pour leurs propriétés antivirales (SCHWARZ et al. -223-), certaines substances se sont révélées être des inhibiteurs des réactions de glycosylation. Nous décrirons dans ce paragraphe le mode d'action de quelques unes d'entre elles (voir les revues de STRICK et LENNARZ -224-, SCHWARZ et DATEMA -225-, SCHWARZ et al. -226-). Ces inhibiteurs sont des précieux outils aussi bien pour explorer le rôle biologique de la partie glycannique des glycoprotéines que pour disséquer certains mécanismes des réactions de glycosylation. Ils peuvent être répartis en plusieurs classes :

- 56 -

- les monosaccharides simples
- les sucres modifiés
- les antibiotiques

A - LES MONOSACCHARIDES SIMPLES

Des substances métaboliques usuelles comme la glucosamine, peuvent inhiber les réactions de glycosylation lorsqu'elles sont présentes à haute concentration dans les milieux de culture cellulaire. In vitro, ce toxique est inefficace, in vivo un de ses points d'impact est l'inhibition de la synthèse du dolichol-pyrophosphate-oligosaccharide. Cependant, aucun intermédiaire métabolique non physiologique comme l'UDP-glucosamine n'a pu être détecté, indiquant que la glucosamine agit sur une étape située en amont de l'assemblage de l'oligosaccharide.

B - LES SUCRES MODIFIES

Contrairement à la glucosamine, les sucres modifiés comme le 2-désoxyglucose (analogue du glucose et du mannose), le fluoromannose, le fluoroglucose sont convertis *in vivo* en glycosylnucléotides (GDP-désoxyglucose, GDP-fluoroglucose, GDP-fluoromannose). Ces derniers, par compétition avec les précurseurs naturels inhibent le transfert de mannose, de fucose et de N-acétylglucosamine sur le dolichol-phosphate. L'UDP-désoxyglucose n'affecte que la synthèse du dolichol-phosphate glucose.

C - LES ANTIBIOTIQUES

Certains antibiotiques en agissant directement sur des enzymes impliqués dans le cycle de dolichols, bloquent la N-glycosylation des protéines. Le plus utilisé, peut être parce que le plus spécifique est la tunicamycine (Figure 18 p. 58) : analogue hydrophobe de l'UDP-Nacétylglucosamine, il inhibe le transfert de N-acétylglucosamine-1phosphate sur le dolichol-phosphate (TAKATSUKI *et al.* -227-).

- 57 -



FIGURE 18 : Comparaison des structures du dolichol-phosphate, de l'UDP-N-acétylglucosamine (a) et de la tunicamycine (b).



FIGURE 19 : Sites d'action des inhibiteurs du cycle des dolichols



.

Deux autres antibiotiques, inhibiteurs de la synthèse des parois bactériennes sont aussi employés dans les systèmes eucaryotes. Ce sont :

 1 - La bacitracine qui forme des complexes avec le dolicholpyrophosphate, empêchant ainsi sa déphosphorylation et la réutilisation du dolichol-phosphate pour la synthèse d'un oligosaccharide (ELBEIN -228-).

2 - L'amphomycine : ELBEIN et ses collaborateurs (KANG et al.
-229-) ont montré qu'elle inhibe in vitro le transfert de mannose et de N-acétylglucosamine sur les intermédiaires lipidiques correspondants.

Les points d'impact de ces quelques substances inhibitrices sont présentés dans la Figure 19 (p. 58). Il est à noter qu'elles agissent en général sur les premières étapes des réactions aboutissant à la Nglycosylation des protéines. La recherche d'autres inhibiteurs spécifiques des dernières étapes en particulier (transfert de l'oligosaccharide sur la protéine), permettrait de répondre aux nombreuses questions que pose encore la N-glycosylation des protéines.

CHAPITRE IV : MÉTABOLISME DES CONSTITUANTS MEMBRANAIRES : GLYCOPROTÉINES, GLYCOSYLTRANSFÉRASES

Les chapitres précédents nous ont montré comment une glycoprotéine est synthétisée dans le reticulum endoplasmique rugueux et comment s'effectue la maturation de son glycanne dans l'appareil de Golgi. Or,les glycoprotéines, qu'elles soient de sécrétion ou destinées à être intégrées dans les membranes plasmiques,doivent traverser ces différents compartiments avant d'atteindre leur destination respective : le milieu extracellulaire ou la surface de la cellule. Dans ce présent chapitre, nous décrirons brièvement les mécanismes responsables du mouvement des composants membranaires ("membrane flow", recyclage des vésicules) pouvant expliquer à la fois le métabolisme des glycoprotéines de la membrane plasmique et la présence d'activités glycosyltransférasiques à la surface de la cellule.

I - DONNEES GENERALES SUR L'INTERCONVERSION DES MEMBRANES CELLULAIRES (voir les revues de MORRE et al. -230-, WAKSMAN et al. -231-)

Les premières données expérimentales sur les relations qu'il peut exister entre les différents compartiments cellulaires ont tout d'abord été d'ordre morphologique. Des études de microscopie ont montré que :

2 - il existe une continuité spatiale entre les différents compartiments cellulaires soit directe (membrane nucléaire, reticulum endoplasmique), soit indirecte par l'intermédiaire de fins tubules qui

- 60 -

relient par exemple l'appareil de Golgi aux vésicules de sécrétion , ces dernières aux membranes plasmiques.

3 - des vésicules de transport relient les différents organites intracellulaires. Elles permettraient le transfert de matériel quand il n'existe pas de continuité directe.

Des apports biochimiques ont confirmé les différences morphologiques existant entre les membranes intracellulaires (voir la revue de MORRE -232-). L'analyse de fractions membranaires isolées a montré qu'elles pouvaient être différenciées de par certains de leurs constituants : les protéines fixant les ribosomes sont retrouvées préférentiellement dans le reticulum endoplasmique, la membrane plasmique est riche en 5'nucléotidase, etc...

Le concept de diffusion latérale des composants membranaires est primordial pour expliquer la migration vectorielle des constituants membranaires entre les territoires cellulaires adjacents où les membranes montrent une continuité. Cette diffusion latérale d'un composé dans une membrane a été bien illustrée pour les glycoprotéines de surface. Celles-ci, disposées dans le plan de la membrane, peuvent sous l'action de ligands bivalents comme les lectines, se regrouper dans des régions particulières de la membrane (phénomène de "capping"). Ce phénomène peut être étendu aux glycoprotéines des membranes intracellulaires (voir la revue de WAKSMAN *et al.* -233-).

La diffusion simple des molécules dans les bicouches lipidiques ne peut à elle seule expliquer les mouvements des constituants membranaires à l'intérieur de la cellule. Invariablement dans les cinétiques de marquage, les protéines radioactives apparaissent d'abord dans le reticulum endoplasmique rugueux puis dans le reticulum endoplasmique lisse, l'appareil de Golgi et enfin la membrane plasmique. Cependant, les protéines membranaires sont synthétisées beaucoup plus lentement que les protéines de sécrétion (FRANKE *et al.* -234-).

- 61 -

Ces différentes observations ont suggeré le concept du recyclage des vésicules, c'est à dire qu'à chaque limite entre les différents compartiments cellulaires, des vésicules chargées en composés membranaires ou de sécrétion peuvent bourgeonner d'un compartiment, fusionner avec les membranes d'un autre compartiment en y déversant son contenu et revenir vers son compartiment d'origine (voir Figure 20 p. 63). Ces mouvements de matériel membranaire ont surtout été décrit entre l'appareil de Golgi et la membrane plasmique, entre la membrane plasmique et les lysosomes. Ce sont :

1 - l'exocytose : transport et "décharge" de matériel intracellulaire dans l'espace extracellulaire par l'intermédiaire de vacuoles ou de vésicules de sécrétion qui fusionnent avec la membrane plasmique.

2 - l'endocytose : la membrane plasmique s'invagine en captant ou non du matériel extracellulaire, et forme ainsi des vésicules cytoplasmiques. Certaines d'entre elles fusionnent avec les lysosomes, d'autres avec l'appareil de Golgi (HERZOG -235-).

II - METABOLISME DES GLYCOPROTEINES MEMBRANAIRES

A - LEUR RENOUVELLEMENT

---- · · ·

Les glycoprotéines membranaires ne sont pas des composés stables mais sont continuellement renouvelées. Par la mesure de la décroissance de radioactivité de glycoprotéines marquées, leur demi-vie a pu être calculée : une centaine d'heurespour les glycoprotéines d'hépatome de Rat (TWETO et DOYLE -236-), 30 heures pour celles de cellules TA3 (HUGHES *et al.* -237-), 20 heures pour le récepteur d'asialoglycoprotéines d'hépatocytes de Rat (WARREN et DOYLE -238-), 45 heures dans le cas de la LETS-protéine de fibroblastes d'embryon de Poulet (YAMADA et WESTON -239-). En outre, la cellule doit remplacer les composants libérés de la



FIGURE 20 : Représentation schématique des continuités et des mouvements des membranes à l'intérieur de la cellule. (1) L'enveloppe nucléaire montre fréquemment des continuités avec (2) le reticulum endoplasmique rugueux. * Continuité entre le reticulum endoplasmique rugueux et les membranes externes des mitochondries. (3) Reticulum endoplasmique lisse et éléments de transition. (3a) Certaines vésicules de transition semblent fusionner pour former de nouvelles cisternes de l'appareil de Golgi. (3b) D'autres participent à la formation de vacuoles, de lysosomes ou de la membrane plasmique. (4) Région de l'enveloppe nucléaire correspondant à (3). (5) Dictyosomes de l'appareil de Golgi. (6) Continuité directe entre le reticulum endoplasmique et une vésicule de sécrétion en formation. (?) Vacuole en formation. (8) Vésicule de sécrétion mature en mouvement dans la cellule. (9) Fusion d'une vésicule de sécrétion avec la membrane plasmique : exocytose. (10) Comme en (7) sauf que les vésicules sont partiellement recouvertes d'un "manteau". (11) Comme en (8). (12) Comme en (9). (12a) Fusion de la vésicule avec la membrane plasmique. (12b) Le "manteau" reste associé avec la membrane plasmique après susion de la vésicule. (13) Vésicules "enrobées" de l'appareil de Golgi. (14) Bourgeonnement de la membrane plasmique (sécrétion de globules gras, virus, etc...). (15) Formation de vésicules à partir du reticulum endoplasmique rugueux. (16) Phagocytose. (17) Pinocytose. (18) Comme en (16) et (17) sauf que les vésicules sont "enrobées". (19) Lysosome secondaire. (20) Cisternes de l'appareil de Golgi.

BUS

LILL

membrane plasmique au cours des attaques du milieu extérieur (glycosidases, protéases). Enfin, répondant à des stimulations extérieures, elle doit synthétiser des glycoprotéines particulières.

Des cinétiques de marquage, couplées à une exploration autoradiographique, ont apporté des preuves des mouvements intracellulaires des glycoprotéines membranaires. Les sucres internes du noyau pentasaccharidique du glycanne (mannose, N-acétylglucosamine) sont incorporés dans le reticulum endoplasmique rugueux (WHUR et al. -240-). Ensuite, la formation de grains d'argent est visualisée successivement dans l'appareil de Golgi puis sur les membranes des surfaces cellulaires. Si le monosaccharide marqué est le fucose, le galactose ou la N-acétylmannosamine (précurseur de l'acide sialique), la radioactivité est rapidement retrouvée dans l'appareil de Golgi puis, plus tard au niveau des membranes plasmiques. L'uniformité du mécanisme, montré dans de nombreux systèmes (NEUTRA et LEBLOND -241-, PELLETIER -242-, HADDAD et al. -243-, BENNET et al. -244-), semble généraliser le phénomène. Le transfert des glycoprotéines vers la membrane plasmique est accomplie grâce à de petites vésicules (FLICKINGER -245-). Deux processus peuvent être envisagés :

- l'un non sélectif : les membranes des saccules golgiens sont directement converties en vésicules de transport entraînant ainsi leurs constituants.

- l'autre plus restrictif : les glycoprotéines d'une population donnée, par diffusion lattérale dans le plan de la membrane se rassemblent dans une région déterminée pour former une vésicule (BENNET et LEBLOND -246-).

La migration à l'intérieur de la cellule des glycoprotéines membranaires a été très bien illustrée par l'étude de la formation de virus tels que le virus de la Stomatite vésiculeuse qui est enveloppé d'une partie de la membrane plasmique de la cellule hôte dans laquelle est intégrée la glycoprotéine virale G (voir Figure 21 p. 65). Cette protéine membranaire est glycosylée dans le reticulum endoplasmique rugueux (ROTHMAN et LODISH -247-, ROTHMAN et al. -248-). Puis elle migre par le

- 64 -



FIGURE 21 : Biosynthèse de la glycoprotéine G et assemblage du virus de la Stomatite Vésiculeuse (D'après ROTHMAN et LODISH : voir p. 64).



ETAT 1

Glycoprotéines de la membrane fortement sialvlées

Activité sialyltransférasique spécifique élevée

Haute teneur en glycannes de type oligomannosidíque

Absence de glycoprotéines de haut poids moléculaire etat 2

Glycoproteines faiblement sialylées

Activité sialyltransférasique spé-•cifique faible

Faible teneur en glycannes de type oligomannosidique

Présence de glycoprotéines de haut poids moléculaire



FIGURE 22 : Evolution des propriétés des surfaces cellulaires en relation avec la croissance et la transformation.

"membrane flow" vers l'appareil de Golgi où son glycanne subit la maturation, enfin elle s'intègre dans la membrane plasmique. Les glycoprotéines G se regrouppent dans des régions déterminées de la membrane plasmique où le virion bourgeonnera.

B - VARIATIONS DE LA COMPOSITION ET DE LA STRUCTURE DES GLYCOPROTEINES DE SURFACE

Des variations de glycoprotéines membranaires sont couramment observées au cours de la croissance ou de la transformation cellulaire (voir la revue de ATKINSON et HAKIMI -249-) (voir Figure 22 p.65). Ces modifications peuvent être de différents ordres :

- apparition ou disparition de glycoprotéines
- variation de leur état de sialylation
- changement de la structure de leurs glycannes.

1 - Disparition de glycoprotéines spécifiques

Une famille de glycoprotéines de haut poids moléculaire (250.000 D), isolées de fibroblastes semble être en relation avec la transformation néoplasique. Ces glycoprotéines sont connues sous des noms variables comme "LETS protein" (large external transformation sensitive), "galactoprotéine", "cell surface protein" ou "fibroblast surface antigen". Ces glycoprotéines disparaissent au cours de la transformation cellulaire (HYNES -250-). Il existe cependant des exceptions dépendants de l'agent induisant la transformation et les travaux de KAHN et SHIN (251) ont montré que, *in vitto*, la perte de cette protéine n'est pas un traceur spécifique de la tumorigénicité. Par contre, ajoutée aux milieux de culture,elle restitue à de nombreuses cellules transformées, leur morphologie et leurs propriétés d'adhésion et d'inhibition de contact (ALI *et al.* -252-, YAMADA *et al.* -253-). 2 - Variations de l'état de sialylation des surfaces cellulaires.

Un des phénomènes les plus couramment observé est l'hypersialylation des O et N-glycannes des glycoprotéines membranaires des cellules en croissance ou des cellules transformées. Par des expériences de marquage *in vivo* et de tamisage moléculaire, de nombreux auteurs ont montré que les glycopeptides obtenus de cellules en voie de division possédent un poids moléculaire plus élevé que les glycopeptides provenant de cellules au repos (GLICK et BUCK -254-, MURAMATSU *et al.* -255-). De telles variations ont été retrouvées pour les cellules transformées (VAN BEEK *et al.* -256-257-). WARREN et ses collaborateurs (258) ont démontré que :

- la différence de taille peut être attribuée à la présence d'acide sialique à la partie terminale des oligosaccharides puisqu'après traitement des glycopeptides par la neuraminidase, aucune différence n'est alors observée dans leurs profils d'élution.

- cette hypersialylation résulte, dans le cas de cellules transformées, d'une activité sialyltransférasique trois fois plus importante que celle de cellules non transformées. Cette sialyltransférase semble très spécifique de certains glycopeptides de cellules néoplasiques. En effet, le transfert d'acide sialique sur les accepteurs endogènes ou l'asialofétuine est identique dans les cas des cellules normales et transformées.

3 - Changements dans la structure des glycannes.

Les cellules en croissance ou transformées ont une composition glycannique différente de celle de la cellule normale au repos. En général, les membranes des cellules en voie de différenciation, sont plus riches en glycannes de type oligomannosidique (MURAMATSU *et al.* -259-, CECCARINI et ATKINSON -260-, RUPAR et COOK -261-). En outre, HAKIMI et ATKINSON (262) ont montré,grâce à l'emploi d'une sonde (une glycoprotéine du virus Sindbis), que ces oligomannosides contiennent plus de mannose lorsque la cellule est en croissance rapide. Ces résultats semblent indiquer que la synthèse des glycannes des glycoprotéines est incomplète dans les cellules en voie de différenciation et/ou que le trafic des vésicules de sécrétion est accru.

Les quelques variations aussi bien quantitatives que qualitatives que nous venons de décrire concernant les glycannes des glycoprotéines membranaires, seraient des causes suffisantes pour expliquer les propriétés nouvelles acquises par les membranes au cours de la croissance et en particulier lors de la transformation cancéreuse. En effet, les cellules transformées se caractérisent par :

- de nouvelles propriétés antigéniques (FEIZI -263-)
- la propriété d'être très fortement agglutinées par les lectines (POLLACK et BURGER -264-)
- leur faible adhésion aux cellules adjacentes (COMAN -265-)
- la perte de la propriété d'inhibition de contact (STOKER et RUBIN -266-).

III - LES GLYCOSYLTRANSFERASES DE LA MEMBRANE PLASMIQUE

L'analyse de fractions hautement purifiées contenant des membranes intracellulaires, a révélé que leurs constituants sont localisés dans des organites cellulaires bien définis (PIERCE *et al.* -267-). Cependant, cette différentiation des membranes ne semble pas relever de la loi du "tout ou rien". En effet, l'adénylcyclase activée par le glucagon (YUNGHANS et MORRE -268-), les sites récepteurs de l'insuline (BERGERON *et al.* -269-), des lectines (WINQVIST *et al.* -270-), en dehors de leur localisation première dans les membranes plasmiques, ont été caractérisés dans les membranes intracellulaires et en particulier dans l'appareil de Golgi. De même SANDER et SINGAL (271) ont conclu que la thiamine pyrophosphatase présente dans l'appareil de Golgi où elle avait été exclusivement localisée, peut être intégrée dans des vésicules qui la conduiront vers la membrane plasmique.

- 68 -

Il ne serait donc pas surprenant que les membranes plasmiques expriment des activités glycosyltransférasiques qui, comme nous l'avons vu précédemment (voir chapitre biosynthèse p. 20), ont d'abord été localisées préférentiellement soit dans le reticulum endoplasmique, soit dans l'appareil de Golgi. Ces enzymes pourraient rejoindre les surfaces cellulaires par le mécanisme du "membrane flow". Comme le montre le tableau IV (p. 70), un très grand nombre d'activités glycosyltransférasiques ont été détectées à la surface de nombreuses cellules (voir la revue de PIERCE *et al.* -288-) :

- N-acétylglucosaminyltransférases
- Mannosyltransférases
- Glucosyltransférases
- Galactosyltransférases
- Sialyltransférases
- Fucosyltransférases
- N-acétylgalactosaminyltransférases

Ces résultats reposent essentiellement sur des données biochimiques, mesure de la radioactivité incorporée par les cellules entières sur les accepteurs endogènes et exogènes à partir de glycosylnucléotides. Des preuves ultrastructurales n'ont été apportées que pour l'ectosialyltransférase de cellules leucémiques L-1210 (PORTER et BERNACKI -289-).

Un très grand nombre d'études ont été réalisées jusqu'à présent pour visualiser des variations possibles d'activités glycosyltransférasiques au cours de la croissance, de la différentiation (voir la revue de PIERCE *et al.* -290-) ou de la transformation cellulaire (SHUR et ROTH -291-). Cependant, aucune corrélation n'a pu être faite entre ces phénomènes et les changements d'activité des ectoglycosyltransférases. En effet, suivant le système cellulaire examiné, leurs activités augmentent, diminuent ou ne montrent pas de variations. SASAKI et ROBBINS (291) pour les cellules de Hamster transformées ou non par le virus du polyome, DATTA (293) pour les cellules BHK, 3T3 transformées ou non par ce même virus, montrent une diminution de 50 p. cent de l'activité sialyltransférasique dans les cellules transformées. Par contre, PATT et GRIMES (294) n'observent pas

TABLEAU IV

ACTIVITES GLYCOSYLTRANSFERASIQUES DETECTEES A LA SURFACE DES CELLULES

TYPE CELLULAIRE	GLYCOSYLTRANSFERASES DETECTEES	REFERENCES
Fibroblastes d'embryons de Poulet	N-acétylglucosaminyltransférases Mannosyltransférases Glucosyltransférases Galactosyltransférases Sialyltransférases N-acétylgalactosaminyltransférases	BOSMANN et al. (272), MORGAN et BOSMANN (273)
Fibroblastes de Souris Swiss SW 3T3, SV 3T3, PY 3T3	N-acétylglucosaminyltransférases Mannosyltransférases Galactosyltransférases Sialyltransférases N-acétylgalactosaminyltransférases	PATT et GRIMES (274)
Fibroblastes de Souris Balb/c 3T3, MSV 3T3, PY 3T3	N-acétylglucosaminyltransférases Mannosyltransférases Glucosyltransférases Galactosyltransférases Sialyltransférases N-acétylgalactosaminyltransférases	PATT et al. (275)
Cellules intestinales de Rat	N-acétylglucosaminyltransférases Mannosyltransférases Glucosyltransférases Galactosyltransférases Sialyltransférases Fucosyltransférases	WEISER (276)
Cellules de foie de Poulet	N-acétylglucosaminyltransférases Mannosyltransférases Galactosyltransférases Fucosyltransférases Sialyltransférases	ARNOLD et al. (277) ARNOLD et al. (278)
Chlamydomonas	N-acétylglucosaminyltransférases Mannosyltransférases Glucosyltransférases Galactosyltransférases Sialyltransférases Fucosyltransférases	MCLEAN et BOSMANN (279) BOSMANN et MCLEAN (280)
Fibroblastes de Souris Balb/c	Mannosyltransférases	PATT et GRIMES (281)
Cellules d'oviducte de Poule	Mannosyltransférases	STRUCK et LENNARZ (282)
Membranes plasmiques d'érythrocytes de Lapin	Glucosyltransférases Mannosyltransférases N-acétylglucosaminyltransférases	PARODI et MARTIN- BARRIENTOS (283)
Lymphocytes spléniques de Rat	Galactosyltransférases Sialyltransférases Fucosyltransférases	VERBERT et al. (284) HOFLACK et al. (285) HOFLACK et al. (286)
Cellules BHK	Galactosyltransférases	LAMONT et al. (287)

BUS

.

٠

de modifications dans le transfert d'acide sialique, de galactose, de Nacétylglucosamine, de mannose, de glucose entre les cellules normales et transformées. D'autre part, concernant la croissance cellulaire, les travaux de WEBB et ROTH (295) ne montrant pas de différences d'activité de l'ectogalactosyltransférase de cellules 3T3 et 3T12 au cours du cycle cellulaire, ne sont pas confirmés par ceux de BOSMANN (296). En effet, ce dernier mesure des activités galactosyl-, sialyl- et N-acétylglucosaminyltransférasiques élevées pendant la phase S, faibles au cours de la mitose. Les résultats contradictoires obtenus sont vraisemblablement à relier aux conditions expérimentales employées par les différents auteurs ne tenant pas toujours compte des nombreuses sources d'erreurs possibles (KEENAN et MORRE -297-).

Quelles significations peut-on donner à la présence de glycosyltransférase à la surface des cellules : sont-elles simplement le reflet du métabolisme des membranes internes (endocytose, exocytose) ou ont-elles un rôle physiologique bien déterminé. De nombreux auteurs ont tenté de répondre à ces questions en recherchant l'implication des ectoglycosyltransférases dans de nombreux phénomènes de surface. Sans pouvoir apporter de réponses claires, ils ont suggeré que celles-ci pourraient être impliquées dans :

1 - la biosynthèse et/ou la réparation des glycannes des glycoprotéines de surface. La biosynthèse totale d'un glycanne nécessite la présence sur la membrane plasmique de toutes les activités glycosyltransférasiques nécessaires à son élaboration. Actuellement, seul WEISER (298) a retrouvé toutes les glycosyltransférases sur une même cellule. D'autre part,les glycosylnucléotides sont localisés dans le cytoplasme et leur passage à travers les membranes nécessite soit des systèmes de transport soit des intermédiaires lipidiques comme l'a proposé LENNARZ (299) (voir Figure 23 p. 72). Jusqu'à présent, le transfert de fucose, d'acide sialique, de galactose sur des oligosaccharides à partir des intermédiaires lipidiques n'a pu être montré dans les cellules eucaryotes. En outre, aucun des enzymes intervenant dans le processus de maturation des N-glycannes n'a été caractérisé à la surface des cellules.

- 71 -



FIGURE 23 : Modèle de glycosylation des glycoprotéines de la membrane plasmique par les intermédiaires lipidiques. (D'après LENNARZ : voir p. 71). (Gly△ et Gly* représentent des résidus glycosyl différents).

2 - le contrôle de la croissance cellulaire. Cette hypothèse repose sur les observations de CEBULA et ROTH (300) qui rapportent les variations des activités glycosyltransférasiques de cellules 3T3 comme fonction des contacts cellulaires alors que celles de cellules transformées (3T12 et SV3T3) ne possédant pas d'inhibition de contact, ne varient pas.

3 - l'adhésion et la reconnaissance (voir la revue de PIERCE et al. -301-). Les premiers arguments ont été donnés par ROTH et al. -302-) en montrant que l'association de cellules de neurorétine pouvait être perturbée soit par addition de polysaccharide soit par traitement préalable des cellules par la β -galactosidase. De même, LLOYD et COOK (303) après avoir décrit l'existence d'une ectosialyltransférase à la surface de fibroblastes de Rats montrèrent que leur adhésion était stimulée lorsque ceux-ci sont traités par la neuraminidase. De plus, des substrats glycoprotéiniques possédant des résidus terminaux de N-acétylgalactosamine abolissent l'effet de cette glycosidase. L'adhésion cellulaire semble donc nécessiter la présence d'une galactosyltransférase dans le cas des cellules de neurorétine, d'une sialyltransférase dans le cas des fibroblastes de Rat. Cependant, ces résultats peuvent être interprétés d'une autre manière : la présence de lectines membranaires. Actuellement, la participation des ectoglycosyltransférases dans de tels phénomènes n'a pu être parfaitement démontrée.

- 73 -

CHAPITRE V : CONCLUSIONS

Les généralités que nous venons de présenter sur la Biologie Moléculaire des glycoprotéines ont fait apparaître tout d'abord la complexité des réactions conduisant à la synthèse de leurs glycannes. Celle-ci est très bien illustrée par l'élaboration des motifs oligosaccharidiques liés N-glycosidiquement à la protéine qui comprend trois étapes importantes :

 1 - La synthèse d'un oligosaccharide précurseur lié à un intermédiaire de type dolichol. Cet oligosaccharide est composé de N-acétylglucosamine, de mannose et de glucose. Cette étape pose essentiellement deux questions :

> quel est le rôle joué par la partie lipidique ?
> pourquoi la cellule assemble-t-elle un glycanne complexe renfermant des résidus de glucose qui ne participent pas à la confection des glycannes matures ?

2 - Le transfert de l'oligosaccharide sur un accepteur protéique contenant une séquence code situé dans un coude β . La spécificité de l'oligosaccharidyltransférase vis-à-vis de son substrat lipidique nécessite d'être clarifiée.

3 - La maturation de la partie saccharidique. Des résidus de glucose et de mannose sont libérés de l'oligosaccharide précurseur par des glucosidases et des mannosidases. Puis des glycosyltransférases hautement spécifiques transfèrent du galactose, de la N-acétylglucosamine, de l'acide sialique et du fucose, synthétisant ainsi une très grande diversité de glycannes.

Si les grandes voies de biosynthèse commencent à être bien définies, nous possédons actuellement peu d'informations quant aux mécanismes de régulation. Ils sembleraient faire intervenir : 1 - la quantité de substrat disponible, donneur et accepteur. Bien connu pour les glycosylnucléotides, peut-on retrouver ce type de régulation pour le cycle des dolichols ?

2 - la spécificité des enzymes mis en jeu pour un motif oligosaccharidique donné. Ce dernier mode de régulation a été surtout décrit pour l'addition des sucres terminaux et la maturation des glycannes. Quelques données seulement, encore confuses, concernent le transfert de l'oligosaccharide précurseur sur la protéine.

Synthétisées à l'intérieur de la cellule (reticulum endoplasmique rugueux, appareil de Golgi), les glycoprotéines rejoignent leur destination finale (membrane plasmique ou milieu extracellulaire) par le système du "membrane flow" qui peut entraîner à la surface cellulaire des glycosyltransférases.

Les problèmes sont donc posés : existe-t-il sur la membrane plasmique des glycosyltransférases capables de synthétiser un oligosaccharide sur un intermédiaire lipidique et des enzymes pouvant le transférer sur des accepteurs protéiques ? Comment l'activité de ces enzymes est-elle régulée ? C'est à ces questions que nous avons essayé de répondre au cours de nos travaux.

TRAVAUX PERSONNELS

CHOIX DU MODÈLE EXPÉRIMENTAL

Deux stratégies de recherche sont en général utilisées pour détecter sur la membrane plasmique, la présence d'activités glycosyltrans férasiques : l'emploi comme source enzymatique soit des membranes plasmiques purifiées soit de cellules entières. Le premier type d'approche fait apparaitre deux inconvénients majeurs : d'une part, jusqu'à présent, aucune méthode de préparation ne permet d'obtenir des membranes plasmiques pures non contaminées par des membranes intracellulaires lisses (reticulum endoplasmique lisse, appareil de Golgi) très riches en activités glycosyltransféras iques et d'autre part, l'utilisation de telles préparations ne permet pas de préciser avec exactitude l'orientation du site actif des glycosyltransférases vers le milieu intra-ou extracellulaire.

La seconde voie d'approche semble donc plus adéquate pour mettre en évidence des activités ectoglycosyltransférasiques. Dans des conditions idéales, le précurseur (le glycosylnucléotide) marqué ne pénètre pas dans la cellule, et seuls les ectoenzymes sont détectés.



L'utilisation de cellules entières pose cependant un certain nombre de problèmes et le choix du type de cellule dépend de deux critères principaux :

- 76 -

1 - Les activités de surface étant faibles, les quantités de cellules à employer dans un milieu d'incubation doivent être importantes (supérieures à 5.10⁸ cellules/ml). Il faut donc une souche de cellules qui s'obtienne avec un rendement élevé.

2 - Les cellules doivent être obtenues sans traitement chimique ou enzymatique qui pourrait modifier ou faire disparaître des activités enzymatiques qui sont, par définition, exposées au milieu extracellulaire. Toute souche de cellules cultivée sur support et donc détachable par traitement à l'EDTA ou à la trypsine ne se prête donc pas à ce genre d'investigations. De plus, ces traitements fragilisent les membranes, les rendent perméables aux précurseurs et peuvent dévoiler des activités glycosyltransférasiques intracellulaires.

Une cellule répond à ces différentes exigences : le lymphocyte. Son isolement à partir de la rate de Rat ne requiert aucun traitement chimique ou enzymatique : il est obtenu par simple dissociation mécanique de l'organe suivie d'une hémolyse des hématies contaminantes (voir appendice technique). Bien que les populations de cellules obtenues ne soient pas homogènes (mélange de lymphocytes T et B), les lymphocytes constituent un excellent matériel pour aborder le problème. MISE EN ÉVIDENCE DE GLYCOSYLTRANSFÉRASES DE SURFACE IMPLIQUÉES DANS LE CYCLE DES DOLICHOLS ET DESTINÉE DES INTERMÉDIAIRES LIPIDIQUES SYNTHÉTISÉS

Quelques auteurs ont conclu que des cellules en culture comme les fibroblastes de Souris Balb/c (PATT et GRIMES -304-) ou d'oviducte de Poule (STRUCK et LENNARZ -305-) ou des organites unicellulaires comme les chlamydomonas (BOSMANN et McLEAN -306-) expriment à leur surface des activités glycosyltransférasiques capables de transférer du mannose ou de la N-acétylglucosamine à partir des glycosylnucléotides correspondants sur des intermédiaires lipidiques endogènes de type dolichol. Cependant, comme KEENAN et MORRE (307) puis PIERCE *et al.* (308) l'ont suggeré, les mesures d'incorporation de sucre radioactif sur des accepteurs endogènes peuvent être faussées par des causes d'erreurs et les conclusions apportées erronées. En effet :

1 - Les glycosylnucléotides sont aussi les substrats de pyrophosphatases membranaires. Ils sont rapidement dégradés en monosaccharides-1phosphates, puis par les phosphatases en monosaccharides libres (SPIK *et al.* -309-) directement assimilables par la cellule. Pris en charge par les systèmes cytoplasmiques d'activation, ceux-ci peuvent être transformés en substrat utilisable par les glycosyltransférases intracellulaires. Dans ce cas, les activités enzymatiques mesurées ne sont pas dues à une utilisation à la surface des précurseurs mais à une glycosylation intracellulaire. Cette cause d'erreur peut être éliminée par addition dans le milieu d'incubation de nucléotides monophosphates qui inhibent les pyrophosphatases et du sucre non marqué correspondant qui diminue l'entrée de sucre radioactif dans la cellule (VERBERT *et al.* -310-).

2 - Les activités glycosyltransférasiques de surface sont souvent très faibles par rapport aux activités intracellulaires. Or, toute population cellulaire contient un faible pourcentage de cellules cassées. La lyse cellulaire provoque la libération dans le milieu d'incubation, de membranes

- 78 -

internes. Les glycosyltransférases intracellulaires ainsi dévoilées peuvent alors s'exprimer et leur activité peut expliquer, à elle seule, l'incorporation mesurée pour l'ensemble de la population. D'autre part, des précurseurs nucléotidiques endogènes, contenus dans le cytosol, peuvent perturber la mesure des activités glycosyltransférasiques de surface (HOFLACK et al. -311-).



intracellulaire

Après avoir mis au point un milieu d'incubation tenant compte de la première objection des détracteurs de l'existence des ectoglycosyltransférases, utilisant comme précurseur radioactif le GDP-mannose, nous nous sommes attaché à visualiser la synthèse par des enzymes de surface, des différents intermédiaires lipidiques (Man-P-Dol, oligosaccharide-P-P-Dol) et leur implication éventuelle dans la réaction ultime de glycosylation, à savoir le transfert de l'oligosaccharide formé sur les accepteurs protéiques endogènes.

I - MISE EN EVIDENCE DE LA DEGRADATION DES DOLICHOL-PYROPHOSPHATE-OLIGOSAC-CHARIDES

Mis en présence de GDP-mannose marqué, les lymphocytes spléniques synthétisent le dolichol-phosphate-mannose et le dolichol-pyrophosphate-

oligosaccharide. Ces intermédiaires lipidiques sont analogues à ceux retrouvés dans d'autres systèmes comme celui de foie de Porc. Les premiers résultats obtenus montrent que la membrane plasmique du lymphocyte est pauvre en accepteurs endogènes (comme le dolicholpyrophosphate-chitobiose) précurseurs des dolichol-pyrophosphateoligosaccharides. L'addition d'UDP-N-acétylglucosamine dans le milieu d'incubation permet d'obtenir une synthèse accrue d'oligosaccharide-P-P-Dol. D'autre part, une quantité non négligeable de radioactivité est associée aux protéines endogènes.

L'analyse des produits contenus dans cette phase aqueuse nous a permis d'isoler un composé de haut poids moléculaire dont les caractéristiques sont les suivantes :

- Son poids moléculaire est analogue à celui d'un oligosaccharide obtenu par hydrolyse acide douce des dolichol-pyrophosphate-oligosaccharides.

- C'est une molécule chargée : un traitement par la phosphatase alcaline le transforme en composé neutre.

La caractérisation des produits obtenus après action de la
 β-endo-N-acétylglucosaminidase H (qui hydrolyse la liaison reliant les deux résidus de N-acétylglucosamine d'oligomannosides) montre que le phosphate estérifie l'hydroxyl du C₁ de la première glucosamine de l'oligosaccharide.
 Sa synthèse est inhibée par la tunicamycine et la bacitracine.

Ces différents résultats démontrent que les dolichol-pyrophosphateoligosaccharides peuvent être engagés dans une autre voie métabolique que celle du transfert de l'oligosaccharide sur la protéine : leur dégradation en phosphooligosaccharides solubles. Celle-ci fait intervenir un enzyme capable de couper la liaison pyrophosphate. Ce processus de dégradation pourrait ainsi réguler le taux intracellulaire des oligosaccharides-P-P-Dol et en conséquence la N-glycosylation des protéines.



Fate of Oligosaccharide-Lipid Intermediates Synthesized by Resting Rat-Spleen Lymphocytes

René CACAN, Bernard HOFLACK, and André VERBERT

Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et Techniques de Lille

(Received October 30, 1979)

Using conditions to avoid the utilization of labelled precursors by intracellular glycosyltransferases, experiments are described demonstrating that intact rat-spleen lymphocytes are capable of utilizing exogenous GDP-mannose and UDP-N-acetylglucosamine to synthesize dolichyl monophosphate mannose and dolichyl diphosphate oligosaccharides. Kinetic and chase experiments show that dolichyl diphosphate oligosaccharides are either utilized for the transfer of their carbohydrate moieties to protein acceptors or further degraded. Since glycosylation of proteins is limited in resting lymphocytes, the degradation pathway appears as a major event in the fate of the dolichyl diphosphate oligosaccharides synthesized in vitro. These dolichyl diphosphate oligosaccharides are degraded into phospho-oligosaccharides and oligosaccharides which are released in the medium. This enzymatic cleavage of the phosphodiester bond is inhibited by bacitracin. The phospho-oligosaccharides are susceptible to alkaline phosphatase giving neutral oligosaccharides and they are cleaved by endo-N-acetyl- β -D-glucosaminidase H leaving N-acetylglucosamine 1-phosphate and neutral oligosaccharides. These data suggest that splitting of the phosphodiester bond of dolichyl diphosphate oligosaccharides, dephosphorylation and/or endo-N-acetyl- β -D-glucosaminidase hydrolysis of the phosphorylated oligosaccharides could represent the beginning of the catabolic pathway of dolichyl diphosphate oligosaccharides.

Cumulative evidence from the studies in vitro of several laboratories has lead to a model for the assembly of an oligosaccharide-lipid intermediate involved in the synthesis of the asparagine-linked carbohydrate moieties of glycoproteins [1]. Most of this evidence has been obtained with microsomal membranes [1-3] although a few reports [4-6]indicate that intact cells have the capacity to transfer mannosyl or N-acetylglucosaminyl residues from GDP-Man or UDP-GlcNAc to endogenous glycolipid and glycoprotein acceptors. This finding raises the possibility that the enzymatic machinery necessary for the lipid-linked pathway may be associated not only with the internal membranes of the cells but also at the outer surface of these cells. In addition, as ectoenzymes are directly accessible from the outside of the cell, the study of the dolichol pathway with intact cells offers the possibility to investigate the dolichol

cycle without modifying the membranous environment of the enzymatic system which is not the case for closed microsomal vesicles or detergent-treated membranes.

In this work, taking care to avoid utilization of labelled precursors by intracellular enzymes as already described for other ectoglycosyltransferases [7,8], we show that whole rat-spleen lymphocytes are capable of synthesizing Dol-*P*-[¹⁴C]Man and Dol-*PP*-[¹⁴C]-Man-oligosaccharides. We study the fate of Dol-*PP*oligosaccharides and particularly their degradation pathway. The results allow us to propose a scheme for the catabolism of lipid-linked oligosaccharides.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

All reagents were of analytical grade. All sugars were of the D-configuration. GDP-[¹⁴C]Man (166 Ci/mol) and UDP-[¹⁴C]GlcNAc (300 Ci/mol) were obtained from the Radiochemical Centre (Amersham, Great Britain). GDP-Man, UDP-GlcNAc, mannose 1-phosphate, D-mannose, D-N-acetylglucosamine, AMP, Bacitracin, *Escherichia coli* alkaline phospha-

Abbreviations. GDP-Man, guanosine diphosphomannose; UDP-GlcNAc, uridine diphospho-N-acetylglucosamine; Dol-P-Man, dolichyl monophosphate mannose; Dol-PP-oligosaccharide, dolichol-diphosphate-oligosaccharide.

Enzymes. Alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1); endo-N-acetyl- β -D-glucosaminidase H (EC 3.2.1.-).

tase (66 U/mg protein) were purchased from Sigma (St Louis, U.S.A.). Endo-*N*-acetyl- β -D-glucosaminidase H from *Streptomyces griseus*, 30 U/mg, was obtained from Miles Laboratories (Kankakee, U.S.A.). Tunicamycin was a generous gift from Dr W. F. J. Cuthbertson, Glaxo Research Ltd (Stoke Poges, Great Britain). The dolichol derivatives from pig liver used as markers were prepared in Professor F. Hemming's laboratory (Nottingham, Great Britain).

Preparation of Cells and Homogenate

Spleen lymphocytes were prepared from six-weekold Wistar rats as already described [9]. Homogenates were prepared from lymphocyte suspensions (6×10^8 cells/ml) in a cooled Potter-Elvejhem apparatus (3×10 strokes at 1250 rev./min).

Standard Assay

The incubation medium contained 0.1 M sodium cacodylate pH 7.4, 0.154 M NaCl, 5 mM MgCl₂, 2 mM MnCl₂, 5 mM AMP, 6 μ M GDP-Man and 6 μ M UDP-GlcNAc. Unlabelled mannose (1 mM) was added when GDP-[¹⁴C]Man was used (150 counts $\times \min^{-1} \times \text{pmol}^{-1}$) and unlabelled *N*-acetylglucosamine (1 mM) was added when UDP-[¹⁴C]GlcNAc was used (250 counts $\times \min^{-1} \times \text{pmol}^{-1}$). Incubation was at 30 °C, with 6×10^7 cells in a final volume of 100 μ l.

Sequential Lipid Extraction

The reaction was stopped by diluting to 0.4 ml (4 mM MgCl₂ with 1 mg of carrier immunoglobulin G) and the solution was mixed with 0.8 ml of distilled methanol and 1.2 ml of chloroform [10]. After centrifugation the sequential lipid extraction was achieved according to the method of Oliver and Hemming [11] modified as follows. The lower phase was removed and the protein and aqueous layers were extracted twice more with 1 ml of theoretical lower phase [12]. The lower phases were combined with the initial chloroform/methanol extract and washed three times with 2 ml of theoretical upper phase [12]. The washed extracts were called the CM fractions. The protein and aqueous layers were then mixed, centrifuged, and the pellet was washed twice with 2 ml of theoretical upper phase. The aqueous supernatants were pooled and saved. The pellets were washed further by 5 ml of the cacodylate/NaCl buffer and then by 5 ml of distilled water. After drying, the pellets were extracted three times with chloroform/methanol/water (10:40:3, by vol.) and the supernatants were combined to give the CMW fractions. The residual protein pellets were collected and washed on a glass fibre filter (Whatman

GF/C) with 5% trichloroacetic acid and then with ethanol. The radioactivity of each fraction was determined after drying by counting in scintillation liquid.

Characterization of the CM and CMW Fractions

Chromatography of the fractions was achieved on DEAE-cellulose (acetate form; 0.6×6 cm column) using the following stepwise elution: 20 ml of chloroform/methanol (2:1, by vol.), 20 ml of methanol, 30 ml of 10 mM ammonium acetate in chloroform/ methanol (2:1, by vol.), 30 ml of 50 mM ammonium acetate in chloroform/methanol (2:1, by vol.) and 30 ml of 10 mM ammonium acetate in chloroform/ methanol/water (10:10:3, by vol.) according to a modified procedure from Barr and Hemming [13] (F. Hemming, personal communication). Thin-layer chromatography was performed according Oliver and Hemming [11] on precoated plates of silical gel (E. Merck, Darmstadt, Federal Republic of Germany) using the following solvent mixture: (A) chloroform/ methanol/water (60:25:4, by vol.) or on precoated cellulose plates (E. Merck, Darmstadt, Federal Republic of Germany) using the following solvent system: (B) ethyl acetate/butanol/acetic acid/water (6:8:5:8, by vol.).

Mild acid and alkaline treatments were carried out with either 0.01 M HCl at 100 °C for 15 min or 0.1 M NaOH at 37 °C for 10 min as described by Richards and Hemming [14].

Characterization of Labelled Materials Released in the Aqueous Phases

The aqueous supernatants saved from washings were dried under nitrogen and chromatographed on a Sephadex G-25 column $(1 \times 65 \text{ cm})$ in 0.1 M acetic acid. The radioactive products eluted from the column were characterized by their behaviour [15] on paper chromatography in the following solvent: pyridine/ ethyl acetate/acetic acid/water (5:5:1:3, by vol.) [16] and by their mobilities on paper electrophoresis in the following buffer: sodium citrate 0.005 M, citric acid 0.015 M pH 3.5 [17].

Enzymatic Digestion of Phospho-Oligosaccharides

Alkaline phosphatase digestion of labelled oligosaccharidic material eluted from the Sephadex G-25 column was conducted at 37 °C, for 16 h, in 75 mM Tris/HCl buffer pH 8.8 containing 12.5 mM MgCl₂ using 10 U of *E. coli* alkaline phosphatase. Dephosphorylation of the material was monitored by the change in electrophoretic mobility in the above described buffer [17]. The [¹⁴C]GlcNAc-labelled oligosaccharidic material eluted from the Sephadex G-25 column was submitted to endo- β -N-acetyl-D-glucos-

R. Cacan, B. Hoflack, and A. Verbert

aminidase H for 16 h at 37 °C in 50 mM sodium acetate pH 5, using 0.002 units of enzyme. Hydrolysis was followed by the appearance of $[^{14}C]GlcNAc-1-P$ separated by paper chromatography in the solvent system described above [15].

RESULTS AND DISCUSSION

Synthesis of Lipid-Intermediates by Whole Lymphocytes

In our previous studies on ectoglycosyltransferases [7-9] we pointed out that the measurement of the ecto-enzymatic glycosylation of the plasma membrane acceptors from nucleotide-sugar, requires both the reduction of the formation and entry of free radioactive sugar into the cell to a negligible level. For incubations with whole lymphocytes this can be achieved by the addition of nucleoside-monophosphates and an excess of unlabelled sugar [7, 8]. In the case of mannosyl transferases and N-acetylglucosaminyltransferases we determined that the AMP concentration has to be raised to 5 mM to inhibit the degradation of GDP-Man and UDP-GlcNAc without affecting the transferase activity. In addition, a 1000-fold excess of unlabelled mannose or N-acetylglucosamine was sufficient to reduce the entry of labelled sugars into the cell to less than 0.1% of the extracellular radioactive monosaccharides. Under these conditions, addition of GDP-[14C]Man and divalent metal ions to whole lymphocytes results in the incorporation of [14C]Man into glycolipids extractible either by chloroform/ methanol (2:1, by vol.) or by chloroform/methanol/ water (10:10:3, by vol.) and into proteins. On a DEAE-cellulose column, these labelled lipids of the CM and CMW extracts are eluted with 10 mM ammonium acetate in chloroform/methanol (2:1, by vol.) and with 10 mM ammonium acetate in chloroform/methanol/water (10:10:3, by vol.) respectively. These labelled materials migrate in solvent A with an $R_{\rm F}$ value of 0.3 for the CM extract and stay at the origin for the CMW extract. In solvent B, the R_F values are 0.7 and 0.55 for the CM and CMW extracts respectively. These data are in good agreement with those of Oliver and Hemming [11] for dolichol derivatives from pig liver microsomes that were used as markers. These properties together with their lability to mild acid treatment and their stability to mild alkaline treatment indicate that the labelled products are Dol-P-[14C]Man in the CM fraction and are Dol-PP-[¹⁴C]Man-oligosaccharides in the CMW fraction.

As Dol-PP-oligosaccharide synthesis requires the presence of Dol-PP-(GlcNAc)₂ as a precursor, we studied the effect of added UDP-GlcNAc to obtain an optimal Dol-PP-oligosaccharide level. Fig. 1 shows that Dol-PP-oligosaccharide synthesis is increased threefold when UDP-GlcNAc is added to the incuba-



Fig. 1. Effect of the UDP-GlcNAc concentration on the transfer of $[^{14}C]$ Man from GDP- $[^{14}C]$ Man into lipid and protein acceptors. Incubations were performed for 20 min in the conditions for the standard assay with 6 μ M GDP- $[^{14}C]$ Man and increasing amount of unlabelled UDP-GlcNAc. Transfer of radioactive mannose was measured into Dol-P-Man (\bullet), Dol-PP-oligosaccharides (\blacksquare — \blacksquare) and proteins (\bigcirc — \bigcirc)

tion medium up to 10 µM. This enhancement is not accompanied by an increase of the glycosylation of protein of the same order suggesting that protein acceptors are limiting, and that consequently Dol-PPoligosaccharides are synthesized in excess. Kinetic chase experiments were performed to check whether this excess Dol-PP-oligosaccharides was accumulated or was continuously renewed (Fig. 2). When a hundredfold excess of unlabelled GDP-Man was added after 10 min of the reaction, the radioactivity of Dol-P-Man dramatically decreased within 1 min but the radioactivity of the Dol-PP-oligosaccharidic material continued to increase slightly for about 1 min and then declined. Although 50% of the labelled oligosaccharide was chased from Dol-PP-oligosaccharides it has to be noted that a very small proportion is transferred to protein, as expected due to the limiting amount of protein acceptors. To examine the fate of the chased Dol-PP-oligosaccharides we studied the material released in the incubation medium.

Isolation and Characterization of Labelled Material Recovered in the Aqueous Phase

The material released during the course of the incubation was recovered in the various aqueous phases of the extraction procedure. Fig. 3 shows the Sephadex G-25 gel filtration analysis of such aqueous phases obtained after incubation either with GDP-[¹⁴C]Man (Fig. 3A) or with UDP-[¹⁴C]GlcNAc (Fig. 3B). In - 85 -



Fig. 2. Kinetics of incorporation of $[{}^{14}C]$ Man from GDP- $[{}^{14}C]$ Man into lipid and protein acceptors and chase experiments. Kinetics were carried out as described in the standard assay with 6 μ M GDP- $[{}^{14}C]$ Man and 6 μ M unlabelled UDP-GlcNAc. Transfer of radioactive mannose was measured into Dol-P-Man (\bullet _____), Dol-PPoligosaccharides (\blacksquare _____) and proteins (\circ _____). Arrow indicates new addition of 60 nmol of unlabelled GDP-Man after 10 min and the kinetics of the chase experiment were followed on Dol-P-Man (\bullet _____), Dol-PP-oligosaccharides (\blacksquare _____) and proteins (\circ _____)

both cases, material containing [14C]GlcNAc or ¹⁴C]Man is eluted at the same volume as oligosaccharides released after mild acid hydrolysis of Dol-PP-oligosaccharides (Fig. 3C) and well separated from precursors and precursor degradation products. These products were submitted to paper electrophoresis in pH 3.5 buffer: they are resolved into two peaks (Fig. 4A), one migrating with neutral sugars as do the oligosaccharides released from Dol-PP-oligosaccharides by mild acid hydrolysis (Fig.4B), the second migrating towards the anode. This latter was proved to be a phosphorylated compound by its susceptibility to alkaline phosphatase which converts this acidic compound into a neutral product (Fig.4C). These phosphorylated oligosaccharides are similar to those described by Hsu et al. [18] although these authors did not observe neutral oligosaccharides as they used DEAE-cellulose in the first isolation steps. Oliver et al. [19] and Harrison [20] have also shown that an oligosaccharide synthesized by pig liver microsomes could be extracted by water after lipid extraction but these authors did not envisage lipid intermediates in the formation of the water-extractible oligosaccharide.

Referring to the chase experiments, it appears that the total loss of radioactivity 20 min after the chase is entirely recovered as neutral and phosphorylated oligosaccharides released in the aqueous phase. In addition, using tunicamycin to inhibit the formation of Dol-*PP*-oligosaccharide (Fig. 5), it appears that the Ectoglycosyltransferases and Dolichol Pathway



Fig. 3. Gel filtration chromatography of the water-soluble material released during the course of the incubation. Incubations were performed for 20 min in the standard conditions. After incubation, lipid and protein acceptors were extracted as described under Materials and Methods. Aqueous phases were submitted to Sephadex G-25 gel filtration analysis in 0.1 M acetic acid; column: 1×65 cm; flow rate: 5 ml/h; volume of each fraction: 1 ml. (A) Profile obtained when incubation was performed with GDP-[¹⁴C]Man; (B) profile obtained when incubation was performed with the oligosaccharides released after mild acid hydrolysis of Dol-*PP*-[*Man*-¹⁴C] oligosaccharides

concomitant appearance of neutral and phosphorylated oligosaccharide is blocked, suggesting that both products are generated from Dol-*PP*-oligosaccharides.

Kinetic Study of the Formation of Phosphorylated and Neutral Oligosaccharides

The kinetic study reported in Fig. 6 shows that the release of neutral and phosphorylated oligosaccharides is not a minor event in the utilization of exogenous R. Cacan, B. Hoflack, and A. Verbert



Fig. 4. Electrophoretic behaviour of the oligosaccharidic material released during the course of the incubation. After purification on Sephadex G-25 column, the oligosaccharidic material released by the cells during the course of the incubation with GDP-[¹⁴C]Man was submitted to paper electrophoresis in the citrate buffer pH 3.5, 16 V/cm during 4 h. After electrophoresis 1×5 -cm paper strips were cut along the migration path and the radioactivity measured. Electrophoretic profiles were obtained before (A) or after (C) digestion with alkaline phosphatase during 16 h at 37 °C in the Tris/HCl/MgCl₂ buffer 8.8. (A) The migration of the oligosaccharides



Fig. 5. Effect of tunicamycin concentration on the transfer of $[^{14}C]$ -Man from GDP- $[^{14}C]$ Man into lipid and protein acceptors, and on the release of oligosaccharides and phospho-oligosaccharides. Incubations were performed for 20 min in the standard conditions with 6 μ M GDP- $[^{14}C]$ Man and 6 μ M unlabelled UDP-GlcNAc. Transfer of radioactive mannose was measured into Dol-P-Man (\bigcirc), Dol-PP-oligosaccharides (\blacksquare) and proteins (\bigcirc). The amount of [Man- ^{14}C]oligosaccharides and phospho-oligosaccharides release during the incubation time was determined (\triangle — \triangle) for each point

GDP-Man and UDP-GlcNAc. It should be noted that even when the level of Dol-*P*-Man, Dol-*PP*-oligosaccharides and glycosylated proteins reach a plateau, the formation of neutral and phosphorylated oligosaccharides continues. This indicates that this pathway



Fig. 6. Kinetics of the incorporation of $[{}^{14}C]$ Man from GDP- $[{}^{14}C]$ -Man into lipid and protein acceptors and of the release of oligosaccharides and phospho-oligosaccharides. Kinetics were carried out in the standard conditions with 6 μ M GDP- $[{}^{14}C]$ Man and 6 μ M unlabelled UDP-GlcNAc. Transfer of radioactive mannose was measured into Dol-P-Man (\bullet), Dol-PP-oligosaccharides (\blacksquare \blacksquare) and proteins (\bigcirc \bigcirc). The amount of [Man-{}^{14}C] oligosaccharides and phospho-[Man-{}^{14}C] oligosaccharides release was determined for each time (\triangle \frown \triangle)

could be a metabolic diversion when Dol-*PP*-oligosaccharides are no longer used for protein glycosylation.

Effect of Bacitracin on the Release of Phospho and Neutral Oligosaccharides

There is evidence that bacitracin, a polypeptide antibiotic produced by Bacillus licheniformis, forms a complex with undecaprenyl pyrophosphate and divalent cations preventing dephosphorylation and regeneration of the undecaprenyl monophosphate [21]. Since it has been shown that bacitracin interferes with lipid-intermediate metabolism in eucaryotic cell [22,23] we tested whether bacitracin would have any effect on the enzymatic degradation of the Dol-PPoligosaccharide. For this investigation, the Dol-PPoligosaccharide synthesis was allowed to proceed up to the plateau value (around 30 min), then the cells were homogenized to release intracellular degrading enzyme as shown by the dramatic loss of Dol-PPoligosaccharide observed 15 min later (Fig. 7) although Dol-P-Man and protein stayed at the same level. This decrease corresponds to a hydrolysis of Dol-PPoligosaccharides which releases phosphorylated and neutral oligosaccharides as shown in Fig.8. Fig.7 and 8 indicate that when increasing amounts of bacitracin are added at the moment of homogenization, the synthesized Dol-PP-oligosaccharides are less hydrolysed and simultaneously less phosphorylated and





Fig. 7. Effect of bacitracin on the degradation of Dol-PP-[Man-¹⁴C] oligosaccharide. Incubations were performed in the standard conditions with $6 \mu M$ GDP-[¹⁴C]Man and $6 \mu M$ unlabelled UDP-GlcNAc. Transfer of radioactive mannose was measured into Dol-PP-oligosaccharides (**1**). At 30 min cells were homogenized (arrow) and the homogenate was further incubated for 15 min without (b) or with bacitracin 1 mM (c); 5 mM (d); 10 mM (e) and 20 mM (f) then the remaining Dol-PP-[Man-¹⁴C] oligosaccharides were measured. (a) Control without homogenization



Fig. 8. Effect of bacitracin on the degradation of Dol-PP-[Man-¹⁴C]oligosaccharides and on the release of [Man-¹⁴C]oligosaccharides and phospho-oligosaccharides. Incubations were performed in the standard conditions with 6 μ M GDP-[¹⁴C]Man and 6 μ M unlabelled UDP-GlcNAc. After 30 min, cells were homogenized and homogenate was incubated 15 min more with increasing concentrations of bacitracin. For each concentration the remaining Dol-*PP*-[Man-¹⁴C] oligosaccharides (A) and the released [Man-¹⁴C] oligosaccharides and phospho-[Man-¹⁴C] oligosaccharides (B) were measured

neutral oligosaccharides are released. These data indicate that bacitracin inhibits the enzymatic splitting of Dol-*PP*-oligosaccharides into phospho-oligosaccharides.



Fig.9. Susceptibility of $[{}^{14}C]GlcNAc$ oligosaccharides and phospho-oligosaccharides to endo-N-Acetyl- β -D-glucosaminidase H. After purification of $[{}^{14}C]GlcNAc$ oligosaccharides and phospho-oligosaccharides on Sephadex G-25, the material released by the cells during the course of the incubations with UDP- $[{}^{14}C]GlcNAc$ was submitted to paper chromatography in the following solvent: pyridine/ethyl acetate/acetic acid/water (5:5:1:3, by vol.) during 16 h; before (A) or after (B) incubation with endo-N-acetyl- β -D-glucosaminidase H for 16 h at 37 °C in a sodium acetate buffer pH 5. GlcNAc and GlcNAc-1-P were used as markers

Enzymatic Cleavage of Phosphorylated and Neutral Oligosaccharides by Endo-N-acetyl- β -D-glucosaminidase H

Since it has been shown that phosphorylated and neutral oligosaccharides come from Dol-PP-oligosaccharide hydrolysis, it can be postulated that their structure is of the oligomannosidic type possessing either a di-N-acetylchitobiose unit or a phospho-di-*N*-acetylchitobiose unit at the reducing end. To check this possibility we used specific cleavage of the di-Nacetylchitobiose unit with endo-N-acetyl- β -D-glucosaminidase H. Overnight treatment of the [14C]Glc-NAc-labelled phosphorylated and neutral oligosaccharides converted 45% of the radioactivity into $[^{14}C]$ GlcNAc-1-P and $[^{14}C]$ GlcNAc as revealed by paper chromatography (Fig.9). This shows that at least part of the material released from Dol-PP-oligosaccharide is susceptible to endo-N-acetyl- β -D-glucosaminidase and that the release of GlcNAc-1-P and GlcNAc by this enzyme is in agreement with the postulated structure.

Conclusions

Under conditions where the utilization of labelled precursors by intracellular enzymes is avoided, whole lymphocytes are capable of synthesizing Dol-P-Man, Dol-PP-oligosaccharides and of transferring part of it to endogenous protein acceptors. Since rat-spleen lymphocytes are resting cells, the amount of endogenous acceptors is low and limiting, and thus an enhanced level of Dol-PP-oligosaccharides, obtained by adding UDP-GlcNAc together with GDP-Man,

R. Cacan, B. Hoflack, and A. Verbert

is not followed by a subsequent increased glycosylation of protein. This model gave us the possibility of examining the catabolic pathway of Dol-*PP*-oligosaccharides. The first step of this pathway would be the enzymatic formation of phosphorylated-oligosaccharides due to the cleavage of the phosphodiester bond, leaving a dolichyl monophosphate directly available for reutilization in the dolichyl cycle. This cleavage is inhibited by bacitracin which would form a complex with the Dol-*PP*-oligosaccharide in the same manner as it binds undecaprenyl pyrophosphate [21].

Since we have shown that phosphorylated oligosaccharides are suitable substrates for both alkaline phosphatase and endo-N-acetyl- β -D-glucosaminidase H, it may be considered that, in vivo, the second step of the catabolic pathway of the intracellular pool of Dol-PP-oligosaccharides could be either dephosphorylation and/or hydrolysis by endo-*N*-acetyl- β -D-glucosaminidase. This would lead finally to a neutral oligomannoside possessing one N-acetylglucosaminyl residue at the reducing end. Recent work of Pierce et al. [24] demonstrates the cytosolic location of endo-Nacetyl- β -D-glucosaminidase acting on the oligomannosidic type glycoproteins in rat liver, and a similar cytosolic location of the enzyme has been shown in rat spleen lymphocytes (R. Pierce, personal communication). Thus, the role of the cytosolic endo-N-acetyl- β -D-glucosaminidase in the degradation of intracellular glycoproteins as suggested by Pierce et al. [24] could be extended to the catabolic pathway of Dol-PP-oligosaccharides. If this pathway really occurs in vivo, urinary oligosaccharides of the oligomannosidic type which are secreted by patients with a lysosomal enzyme deficiency such as mannosidosis [25] could originate not only from glycoprotein catabolism [26] but also from the Dol-PP-oligosaccharide catabolism.

This research was supported in part by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique (Laboratoire Associé number 217: Relation structure-fonction des constituants membranaires) and from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Contrat de recherche libre 78-1-194-2). We are very thankful to the Director of this laboratory, Professor J. Montreuil, for his constant interest in the progress of this work and for providing research facilities. We are very indepted to Professor F. Hemming (Nottingham, Great Britain) for his help in preparing dolichol derivatives and for his fruitful discussions. We thank Dr W. F. J. Cuthbertson from Glaxo Research Ltd for his generous gift of tunicamycin. B.H. received a fellowship from the Fondation pour la Recherche Médicale Française.

REFERENCES

- 1. Parodi, A. J. & Leloir, L. F. (1979) Biochim. Biophys. Acta, 559, 1-37.
- Idoyaga-Vargas, V. & Carminatti, H. (1977) Mol. Cell. Biochem. 16, 171-176.
- Czichi, U. & Lennarz, W. J. (1977) J. Biol. Chem. 252, 7901-7904.
- Arnold, D., Hommel, E. & Risse, H. J. (1976) Mol. Cell. Biochem. 11, 137-145.
- Struck, D. K. & Lennarz, W. J. (1976) J. Biol. Chem. 251, 2511-2519.
- 6. Patt, L. & Grimes, W. (1976) Biochim. Biophys. Acta, 444, 97-107.
- Verbert, A., Cacan, R. & Montreuil, J. (1976) Eur. J. Biochem. 70, 49-53.
- Hoflack, B., Cacan, R. & Verbert, A. (1978) Eur. J. Biochem. 88, 1-6.
- 9. Cacan, R., Verbert, A. & Montreuil, J. (1976) FEBS Lett. 63, 102-106.
- 10. Ronin, C. & Bouchilloux, S. (1976) Biochim. Biophys. Acta; 428, 445-455.
- 11. Oliver, G. J. A. & Hemming, F. W. (1975) Biochem. J. 152, 191-199.
- Behrens, N. H., Carminatti, H., Staneloni, R. J., Leloir, L. F. & Cantarella, A. I. (1973) Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 70, 3390-3394.
- Barr, R. M. & Hemming, F. W. (1972) Biochem. J. 126, 1203-1208.
- 14. Richards, J. B. & Hemming, F. W. (1972) Biochem. J. 130, 77-93.
- 15. Spik, G., Six, P. & Montreuil, J. (1979) Biochim. Biophys. Acta, 584, 203-215.
- Fischer, F. G. & Nebel, H. G. (1955) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 302, 10-18.
- Davidson, J. N. & Smellie, R. M. S. (1952) Biochem. J. 52, 594.
 Hsu, A. F., Baynes, J. W. & Heath, E. C. (1974) Proc. Natl
- Acad. Sci. U.S.A. 71, 2391–2395.
- Oliver, G. J. A., Harrison, J. & Hemming, F. W. (1975) Eur. J. Biochem. 58, 223-229.
- 20. Harrison, J. (1976) Ph. D. Thesis, University of Nottingham, U.K.
- Stone, K. J. & Strominger, J. L. (1967) Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 68, 3223-3227.
- Chen, W. W. & Lennarz, W. J. (1976) J. Biol. Chem. 251, 7802-7809.
- 23. Herscovics, A., Bugge, B. & Jeanloz, R. W. (1977) FEBS Lett. 82, 215-218.
- Pierce, R. J., Spik, G. & Montreuil, J. (1979) Biochem. J. 180, 673-676.
- Strecker, G., Fournet, B., Bouquelet, S., Dhondt, J. L. & Farriaux, J. P. (1976) *Biochimie*, 58, 579-586.
- 26. Montreuil, J. (1975) Pure Appl. Chem. 42, 431-477.

R. Cacan, B. Hoflack, and A. Verbert, Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et Techniques de Lille I, Boite Postale 36, F-59650 Villeneuve-d'Ascq, France

II - DEMONSTRATION DE LA PRESENCE D'ECTOGLYCOSYLTRANSFERASES À LA SURFACE DES LYMPHOCYTES SPLENIQUES DE RAT

Au cours des expériences précédentes, nous avons utilisé des conditions d'incubation évitant l'utilisation des sucres libres marqués par les enzymes intracellulaires. Pour pouvoir conclure avec certitude à la présence sur la membrane plasmique d'activités enzymatiques impliquées dans le cycle des dolichols (mannosyl-, N-acétylglucosaminyltransférases, oligosacharidyltransférase), une objection majeure doit être soulevée : la participation des activités enzymatiques intracellulaires dévoilées par le faible pourcentage de cellules cassées que contiennent nos préparations cellulaires (inférieur à 10 p. cent par mesure de l'exclusion du bleu trypan).

La première voie d'approche consiste à comparer le taux de synthèse des différents intermédiaires polypréniques ainsi que les produits qui en dérivent, dans des préparations de cellules dites entières et dans des homogénats comme l'ont proposé STRUCK et LENNARZ (312) dans le cas des mannosyltransférases de cellules d'oviducte de Poule. Comme les cellules "intactes", les homogénats sont capables de synthétiser les différents dérivés des intermédiaires lipidiques (Man-P-Dol, (GlcNAc) - P-P-Dol, oligosaccharides-P-P-Dol). Les dolichol-pyrophosphateoligosaccharides sont soit transférés sur les protéines endogènes soit dégradés en phosphooligosaccharides. Cependant, une telle technique n'est pas applicable dans le cas du lymphocyte. En effet, une quantité non négligeable de précurseur endogène est libéréelors de l'homogénéisation : le taux de synthèse apparent des homogénats est plus faible que le taux de synthèse des cellules "entières" bien que la quantité d'enzyme libérée soit plus importante. D'autre part, les cinétiques effectuées en double marquage montrent que la radioactivité spécifique des ([¹⁴C]Man, [³H]GlcNAc) oligosaccharides-P-P-Dol extraits des homogénats est variable au cours du temps, contrairement à celle du même produit synthétisé par des cellules entières. La libération d'UDP-N-acétylglucosamine endogène et la formation de dolichol-phosphate-mannose endogène, lors de l'homogénéisation, permettent d'expliquer cette dilution isotopique. Il apparait donc que les conditions classiques de marquage couramment employées par les différents auteurs (voir la revue de PIERCE et al. -313-) ne permettent pas la comparaison des taux de synthèse d'homogénats et de cellules entières. Des techniques de marquage externes sont donc nécessaires (marquage par le borohydrure tritié de l'extrémité réductrice de l'oligosaccharide libéré par hydrolyse acide douce du dolichol-pyrophosphate-oligosaccharide).
De plus, les oligosaccharides-P-P-Dol synthétisés dans les deux systèmes sont qualitativement différents. Les enzymes de l'homogénat peuvent utiliser l'UDP-glucose endogène pour glucosyler le dolicholpyrophosphate-oligosaccharide. Par contre, dans le cas de cellules entières, sa synthèse est en parfait accord avec la nature des glycosylnucléotides ajoutés dans le milieu d'incubation. L'état de glucosylation du dolichol-pyrophosphate-oligosaccharide peut, comme nous le verrons par la suite, influer sur sa destinée.

Ces différences fondamentales de taux et de qualité de synthèse du dolichol-pyrophosphate-oligosaccharide ainsi que celles retrouvées pour ses métabolites (phosphooligosaccharides, protéines néoglycosylées) nous permettent d'affirmer que les synthèses opérées par des cellules entières et des homogénats sont différentes et par voie de conséquence, de conclure en l'existence à la surface du lymphocyte, d'un système de glycosylation particulier responsable de la synthèse d'un oligosaccharide lié à un dolichol et de son utilisation dans un processus de transfert sur des accepteurs protéiques endogènes ou de dégradation en phosphooligosaccharides.

··· · · · · ·

Metabolism of Lipid-Linked Oligosaccharide Intermediates in Rat Spleen Lymphocytes

Evidence for Ectoglycosyltransferase Activities

Bernard HOFLACK, René CACAN, and André VERBERT Laboratoire de Chimie Biologique et Laboratoire Associé au CNRS n° 217. Université des Sciences et Techniques de Lille, Villeneuve d'Ascq

(Received April 5/July 23, 1980)

Double-labelling experiments show that intact lymphocytes as well as lymphocyte homogenates can utilize GDP- $[^{14}C]$ mannose and UDP- $N-[^{3}H]$ acetylglucosamine to synthesize lipid-linked oligosaccharide intermediates. However, the intermediates formed are quantitatively and qualitatively different in the two systems. The amount of dolichyl diphosphate oligosaccharides synthesized in both cases was calculated by using external labelling by sodium boro[³H]hydride reduction of the glycan moiety obtained after mild acid treatment of [14C]mannose-labelled dolichyl diphosphate oligosaccharides. This showed that, due to the liberation of intracellular enzymes, a larger amount of dolichyl diphosphate oligosaccharides was synthesized by homogenate. However, this higher glycosyltransferase activity was not detected by the direct measurement of incorporation of labelled GDP-[¹⁴C]mannose and UDP-N-[³H]acetylglucosamine, due to isotopic dilution caused by both endogenous soluble UDP-N-acetylglucosamine and membrane-bound dolichyl phosphate mannose accumulated during the homogenization process. In addition, endogenous UDP-glucose allowed the formation, by homogenate, of glucosylated dolichyl diphosphate oligosaccharides which were not observed with intact cells unless exogenous UDP-glucose was added. These striking differences between the lipid intermediates synthesized by homogenate or by intact cells exclude the possibility that intracellular glycosyltransferases could account for the glycosyltransferase activities observed with whole lymphocyte suspensions. This allows us to conclude that ectoglycosyltransferases involved in the dolichol cycle are present at the outer surface of lymphocytes.

Ectoenzymes are directly accessible from the outside of the cell [1]. The study of glycosyltransferase activities with intact cells offers the possibility of investigating glycoconjugate metabolism without modifying the membranous environment of the enzymatic system, which is not the case for closed microsomal vesicles or detergent-treated membranes. Assignment of glycosyltransferase activities to ectoenzymes by using whole cell suspensions necessitates the avoidance of the utilization of labelled precursors by intracellular glycosyltransferases [2-4]. Taking this into account we demonstrated that whole rat spleen lymphocytes exhibit ectogalactosyl transferase [5,6], ectosialyltransferase [7,8] and ectofucosyltransferase activities [9].

Mannose-containing lipids have been detected by incubating whole cells with labelled GDP-Man [10-12]. In a previous report [13], we utilized lymphocyte suspensions to study the fate of oligosaccharide-lipid intermediates. In this paper, we observe marked differences in the lipid-intermediate metabolism between whole lymphocytes and homogenate. These facts allow us to exclude the possibility that intracellular glycosyltransferases released from the small percentage of broken cells inevitably present in whole cell suspensions could account for the activities recovered with whole lymphocytes.

Abbreviations. GDP-Man, guanosine diphosphate D-mannose; UDP-GlcNAc, uridine diphosphate N-acetyl-D-glucosamine; UDP-Glc, uridine diphosphate D-glucose; DolP-Man, dolichyl monophosphate D-mannose; DolP-Glc, dolichyl monophosphate D-gluçose; DolPP-oligosaccharide, dolichyl diphosphate oligosaccharide; DolPP-[Man-¹⁴C, GlcNAc-³H]oligosaccharide, dolichyl diphosphate oligosaccharide whose N-acetylglucosaminyl residues are ³H-labelled and whose mannose residues are ¹⁴C-labelled.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

All reagents were of analytical grade. All sugars were of the D-configuration. GDP-[¹⁴C]Man (146 Ci/ mol) was obtained from the Radiochemical Centre (Amersham, UK). UDP-[³H]GlcNAc (6.6 Ci/mmol) and UDP-[³H]Glc (3.26 Ci/mmol) were obtained from New England Nuclear Corp. (Boston, USA). Potassium boro[³H]hydride (20 Ci/mmol) was obtained from C.E.A. (Saclay, France). GDP-Man, UDP-GlcNAc, UDP-Glc, D-mannose, *N*-acetyl-D-glucosamine, D-glucose, AMP, were purchased from Sigma (St Louis, USA). The dolichol derivatives from pig liver used as markers were prepared in Professor F. Hemming's Laboratory (Nottingham, UK).

Preparation of Cells and Homogenate

Spleen lymphocytes were prepared from six-weekold Wistar rats as already described [5]. Homogenates were prepared from lymphocyte suspensions (6×10^8 cells/ml) in a ice-cooled Potter-Elvehjem apparatus (3×10 strokes at 1250 rev./min).

Standard Assay

The incubation medium contained 0.1 M sodium cacodylate pH 7.4, 0.154 M NaCl, 5 mM MgCl₂, 2 mM MnCl₂, 5 mM AMP, 6 μ M GDP-Man, 6 μ M UDP-GlcNAc, 1 mM mannose and 1 mM *N*-acetylglucosamine. GDP-[¹⁴C]Man and UDP-[³H]GlcNAc were used at specific radioactivities of 185 dis. × min⁻¹ × pmol⁻¹ and 2500 dis. × min⁻¹ × pmol⁻¹ respectively. Unlabelled glucose (1 mM) was added when 6 μ M UDP-[³H]Glc was used (specific radioactivity: 1650 dis. × min⁻¹ × pmol⁻¹. Incubations were at 30 °C with 6 × 10⁷ cells in a final volume of 100 μ l.

Recovery of Radioactive Products

The reaction was stopped by diluting to 0.4 ml (4 mM MgCl₂ with 1 mg of carrier immunoglobulin G) and the further addition of 0.8 ml of distilled methanol and 1.2 ml of chloroform. Labelled lipid intermediates and glycoproteins were extracted by the multiple extraction procedure of Oliver and Hemming [14] modified as previously described [13]. The labelled phospho-oligosaccharides and neutral oligosaccharides released in the aqueous phase as previously demonstrated [13] were separated from precursors and precursor degradation products by chromatography on a Sephadex G-25 column $(1 \times 65 \text{ cm})$ in 0.1 M acetic acid. The protein pellet was dissolved in concentrated formic acid by heating to 100 °C for 5 min. Counting was carried out in scintillation medium and a quenching correction was made by external ratio standardization.

Ectoglycosyltransferases and the Dolichol Pathway

Characterization of Labelled Materials

Identification of labelled lipid intermediates included their elution profiles from a column of DEAEcellulose, their mobilities on thin-layer chromatograms, and their lability to mild treatment with acid (0.01 M HCl, 100 °C, 15 min) [15] as detailed elsewhere [13]. After mild acid treatment of Dol*PP*-oligosaccharides, the size of the resulting labelled oligosaccharides was analyzed by gel filtration on Biogel P-4 (200-400 mesh); Bio-Rad (1 × 100 cm column) eluted with 0.1 M acetic acid. Mannose-rich oligosaccharides isolated from the urine of patients with mannosidosis [16] used as markers, were a generous gift from Dr G. Strecker (Villeneuve d'Ascq, France).

Reduction of Oligosaccharides with Potassium Boro[³H]hydride

Labelled Dol*PP*-oligosaccharides were purified on a DEAE-cellulose column, desalted on a Sephadex LH-20 column in chloroform/methanol/water (10:10 :3; by vol.) and oligosaccharide moieties were liberated by mild acid hydrolysis. After partition by the method of Folch et al. [17], the oligosaccharide-containing aqueous phase was dried and the reduction was performed with potassium boro[³H]hydride as described by Turco et al. [18].

RESULTS AND DISCUSSION

Kinetics of Incorporation of [¹⁴C]Mannose and N-[³H]Acetylglucosamine into Endogenous Acceptors of Whole Lymphocytes

Inhibition of glycosyl-nucleotide pyrophosphatase and phosphatase with 5 mM AMP reduces the formation of free labelled sugars from labelled precursors by degradation. Furthermore, the entry into the cell and the possible utilization of the labelled sugars which could be eventually formed is completely abolished by adding a 1000-fold excess of unlabelled mannose (1 mM) and N-acetylglucosamine (1 mM). Under these conditions, whole lymphocyte suspensions were capable of utilizing GDP-[14C]Man and UDP-[³H]GlcNAc to synthesize DolP-[¹⁴C]Man and $DolPP-([^{3}H]GlcNAc)_{2}$ (Fig. 1A) and DolPP-[Man-14C, GlcNAc-3H]oligosaccharides (Fig. 1 B). These doubly labelled DolPP-oligosaccharides were either transferred onto protein acceptors (Fig. 1C) or degraded into phospho-oligosaccharides and oligosaccharides (Fig.1D) as previously demonstrated [10]. It has to be noted that the formation of DolP-Man is very rapid compared to the formation of DolPP-(GlcNAc)₂. Both incorporation kinetics exhibit rather irregular shapes which are often encountered when lipid intermediates are involved as has been already reported [19,20]. They may correspond

B. Hoflack, R. Cacan, and A. Verbert



Fig. 1. Kinetics of incorporation of $[{}^{14}C]$ mannose and N- $[{}^{3}H]$ acetylglucosamine into endogenous acceptors of whole lymphocytes. Incubations were performed as described in the standard assay with 6 μ M GDP- $[{}^{14}C]$ Man and 6 μ M N- $[{}^{3}H]$ acetylglucosamine. Transfer of radioactive mannose (O—O) and of radioactive N-acetylglucosamine (O—O) was measured into dolichyl monophosphate mannose and dolichyl diphosphate chitobiose (A), dolichyl diphosphate oligosaccharides (B), proteins (C). The amount of radioactive phospho and neutral oligosaccharides released was determined for each time (D). (A----A) Indicates the ratio of $[{}^{14}C]$ mannose to N- $[{}^{3}H]$ acetylglucosamine

to the different availability of various endogenous pools of dolichyl phosphate to form either DolP-Man or DolPP-(GlcNAc)₂. Since these two products are donors for the synthesis of the same DolPP-oligosaccharide the incorporation of $[^{14}C]Man$ and $[^{3}H]Glc$ -NAc in the lipid-linked oligosaccharide (Fig. 1B) followed the same kinetics with a constant ¹⁴C/³H ratio of around 0.37, i.e. a molar ratio of around five mannoses per N-acetylglucosamine. The oligosaccharidic moiety, obtained by mild acid hydrolysis and analyzed by gel filtration on Biogel P-4 using various mannose-rich oligosaccharides as standards, was eluted slightly before the oligosaccharide containing ten monosaccharides as shown in Fig.2. Taking its chromatographic behavior and ¹⁴C/³H ratio together, the oligosaccharidic moiety was in good agreement with the molar composition of around ten mannoses for two N-acetylglucosamines which is commonly assumed for DolPP-oligosaccharide [21,22]. Based



Fig. 2. Gel filtration chromatography of N-[³H]acetylglucosaminelabelled oligosaccharides obtained after mild acid hydrolysis of the N-[³H]acetylglucosamine-labelled dolichyl diphosphate oligosaccharides synthesized by whole lymphocytes. After mild acid hydrolysis of the DolPP-[GlcNAc-³H] oligosaccharides obtained after 20 min incubation in the standard conditions, the N-[³H]acetylglucosamine-labelled oligosaccharides were submitted to Biogel P₄ filtration analysis in 0.1 M acetic acid; column 1 × 100 cm; flow rate: 5 ml/h; volume of each fraction 1 ml, together with the mannoserich oligosaccharides M₅, M₇, M₈, M₉ containing one N-acetylglucosaminyl residue for 5, 7, 8 and 9 mannosyl residues respectively

on the radioactivity incorporated into proteins it is notable that the molar ratio was of five mannosyl for around two N-acetylglucosaminyl residues, which suggests that processing of the oligosaccharide had occurred. In addition, the phospho and neutral oligosaccharides kept the same ${}^{14}C/{}^{3}H$ ratio they had when linked to dolichol, confirming the splitting of the phosphodiester bond as the first step in the degradation pathway proposed for Dol*PP*-oligosaccharide [13].

Among the various causes of errors in the detection of ectoenzyme activity using incubations with whole cells, one of the most difficult to avoid is the presence of a small percentage of broken cells which could be responsible for all the observed transfer activity. To take into account the inevitable presence of broken cells, we compared the activity of whole cells to homogenate.

Kinetics of Incorporation of [¹⁴C]Mannose and N-[³H]Acetylglucosamine into Endogenous Acceptors by Homogenate

Fig. 3 shows the double labelling kinetic experiments performed by incubating GDP-[¹⁴C]Man and UDP-[³H]GlcNAc with lymphocyte homogenate in the same conditions as for Fig. 1. The striking difference is that the ${}^{14}C/{}^{3}H$ ratio was not constant with the incubation time for all the oligosaccharide-containing materials, i.e. Dol*PP*-oligosaccharide (Fig. 3 B), glyco-

Ectoglycosyltransferases and the Dolichol Pathway



Fig. 3. Kinetics of incorporation of $[{}^{14}C]$ mannose and N- $[{}^{3}H]$ acetylglucosamine into endogenous acceptors of lymphocyte homogenate. Incubations were performed as described in the standard assay with 6 μ M GDP- $[{}^{14}C]$ Man and 6 μ M UDP- $[{}^{3}H]$ GlcNAc. Transfer of radioactive mannose (O——O) and of radioactive N-acetylglucosamine (•——••) was measured into dolichyl monophosphate mannose and dolichyl diphosphate chitobiose (A), dolichyl diphosphate oligosaccharides (B), proteins (C). The amount of radioactive phospho and neutral oligosaccharides released was determined for each time (D). (•—•••) Indicates the ratio of $[{}^{14}C]$ mannose to $N-[{}^{3}H]$ acetylglucosamine

proteins (Fig. 3C) and phospho and neutral oligosaccharides (Fig. 3D). To check if the variation of the $^{14}C/^{3}H$ ratio with time was due to a change in the size of the glycan moiety of the lipid-linked oligosaccharide, the oligosaccharides obtained by mild acid hydrolysis were cochromatographed on Biogel P-4 with those synthesized by whole cells. Fig. 4 shows the oligosaccharide synthesized by homogenate (at 2.5 min, Fig. 4A; at 15 min, Fig. 4B) were roughly of the same size as those synthesized by whole cells. In no case was the number of mannosyl residues for two N-acetylglucosaminyl residues calculated on the $^{14}C/$ ³H ratio in agreement with the chromatographic behavior of the glycan, thus sugggesting an isotopic dilution. More interesting is the fact that oligosaccharides formed by homogenate appeared heterogenous (Fig. 4B) probably due to additional sugars transferred from endogenous precursors. In addition, when $6 \mu M$ UDP-[³H]Glc is added to the standard assay, the size distribution of oligosaccharides syn-



Fig. 4. Gel filtration analysis of the labelled oligosaccharides obtained after mild acid hydrolysis of labelled dolichyl diphosphate oligosaccharides synthesized by whole lymphocytes and homogenates. After mild acid hydrolysis of the labelled dolichyl diphosphate oligosaccharides obtained after incubation in the standard conditions with whole lymphocytes and homogenates, the labelled oligosaccharides were submitted to Biogel P4 filtration analysis in 0.1 M acetic acid; column 1×100 cm; flow rate: 5 ml/h; volume of each fraction 1 ml. (A) Cochromatography of [14C]mannose-labelled oligosaccharides synthesized during 2.5 min by homogenate (Owith N-[3H]acetylglucosamine-labelled oligosaccharides synthesized during 20 min by whole lymphocytes (--•). (B) Cochromatography of [14C]mannose-labelled oligosaccharides syn--O) with N-[³H]acethesized during 15 min by homogenate (Otylglucosamine-labelled oligosaccharides synthesized during 20 min by whole lymphocytes (-----). (C) Chromatography of doubly labelled oligosaccharides synthesized during 20 min by whole lymphocytes, $(\bullet - \bullet)$ [³H]glucose label, $(\circ - \circ)$ [¹⁴C]mannose label

B. Hoflack, R. Cacan, and A. Verbert

thesized by whole cells showed the same heterogeneity as for homogenate. This suggests that the Dol*PP*oligosaccharides synthesized by homogenate possessed additional unlabelled glucose units transferred from endogenous Dol*P*-Glc as already shown for other cells [19, 23-25].

External Labelling of Oligosaccharide

Due to isotopic dilution the specific radioactivity of Dol*PP*-oligosaccharides synthesized by homogenate was lower than the specific radioactivity of Dol-*PP*-oligosaccharide formed by the equivalent amount of whole cells (Fig. 3 B, 1 B). Since potassium boro-[³H]hydride reacts stoichiometrically with the reducing end of the oligosaccharide generated by mild acid hydrolysis, tritium incorporation provides a measure of the molar concentration of the [¹⁴C]mannoselabelled oligosaccharide synthesized thus giving an evaluation of the isotopic dilution caused by homogenate. The [³H]glucosaminitol/[¹⁴C]mannose ratio was fourfold to sixfold higher for the oligosaccharide synthesized by homogenate.

Preincubation Experiments

We previously demonstrated in the case of sialyltransferase [8] that homogenates contain amounts of glycosyl-nucleotides which are capable of diluting the labelled precursors added for the detection of glycosyltransferase activity. In contrast to incubation with whole cells which require exogenous precursors to synthesize lipid intermediates, homogenates are able to utilize their endogenous pool of precursors. This can be visualized by preincubation experiments in which labelled precursors are added after different incubation times and incorporation of labelled sugars is then allowed to proceed for a constant 15-min period (Fig. 5). As expected, the radioactivity incorporated on DolPP-oligosaccharides by whole cells was constant whatever the preincubation time, and the ${}^{14}C/{}^{3}H$ ratio stayed at the value of 0.4. When homogenates were used, two phenomena were evident: the [¹⁴C]mannose radioactivity incorporated into the DolPPoligosaccharide was lower than for whole cells but was constant with various preincubation times; second, the $N-[^{3}H]$ acetylglucosamine radioactivity was also lower than for whole cells but increased with the length of the preincubation period. This indicates that during the course of preincubation the endogenous pool of UDP-GlcNAc is utilized, leaving less endogenous UDP-GlcNAc available for the isotopic dilution. Since we observed that DolP-Man formation is very rapid (Fig.1A) and effective near 0°C (results not shown) the endogenous GDP-Man is thus utilized during the homogenization step exhausting the endogenous pool. A pool of endogenous DolP-



Man is formed and is responsible for the constant isotopic dilution observed for all the preincubation times. Consequently the method we developed [8] to take into account the interference of endogenous precursor released by broken cells in the detection of ectoglycosyltransferases on whole cells is not applicable. In the present case isotopic dilution was caused not only by soluble glycosyl-nucleotides but also by membrane-bound lipid intermediates such as Dol*P*-Man.

Conclusions

The experiments presented above show that whole lymphocyte suspensions and homogenate (i.e. broken cells) synthesize quantitatively and qualitatively different labelled lipid-linked oligosaccharides. The data allow us to propose the following explanation. Whole cells possess at their outer surfaces both the ectoglycosyltransferase activities involved in the dolichol cycle, and the dolichyl-phosphate acceptors. Consequently, exogenous labelled precursors are utilized without any isotopic dilution. In homogenate, intracellular glyco-

syl-nucleotides (GDP-Man, UDP-GlcNAc and UDP-Glc) are released but due to the persisting activity of mannosyltransferase at 0°C, during homogenization the endogenous GDP-Man is immediately exhausted to form an endogenous pool of DolP-Man. Thus, in homogenates the presence of both endogenous soluble UDP-GlcNAc and membrane-bound DolP-Man led to the detection of lipid intermediates with a much lower specific radioactivity but in a larger amount than with whole cells, as demonstrated by the boro-³Hhydride external labelling experiment. In addition, the presence of endogenous UDP-Glc allowed the formation by homogenate of glucosylated DolPPoligosaccharide which were not observed with intact cells if no UDP-Glc was added. These marked differences between the lipid intermediates synthesized by intact cells or by homogenate exclude the possibility that intracellular glycosyltransferases could account for the incorporation data observed with the former. We therefore conclude that ectoglycosyltransferase activities involved in the dolichol cycle are present at the outer surface of lymphocytes. Together with previous results [6,8,9], it appears that rat spleen lymphocytes possess as ectoenzymes the glycosyltransferases required for the synthesis of the asparagine-linked glycan moieties of glycoproteins. The question arises whether this ectoenzymatic system might function in vivo.

In addition, the results illustrate that when dealing with microsomal membranes it should be kept in mind that endogenous precursors formed during the preparation steps may modify the composition and the specific radioactivity of lipid-intermediates synthesized *in vitro*.

This research was supported in part by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique (Laboratoire Associé number 217: Relation structure-fonction des constituants membranaires), from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (contrat de Recherche libre 78-1-194-2), and from the Commissariat à l'Energie Atomique. We are very thankful to the Director of this Laboratory, Professor J. Montreuil, for his constant interest in the progress of this work and for providing research facilities. We are very indebted to Professor F. Hemming (Nottingham, Great Britain) for his help in preparing dolichyl derivatives and for his fruiful discussions. We thank Dr G. Strecker (Villeneuve d'Ascq, France) for his generous gift of mannose-rich oligosaccharides used as standards. B.H. received a fellowship from the Fondation pour la Recherche Médicale Française.

REFERENCES

- De Pierre, J. W. & Karnovsky, M. L. (1973) J. Cell. Biol. 56, 275-303.
- 2. Keenan, T. W. & Morré, D. J. (1975) FEBS Lett. 55, 8-13.
- 3. Shur, B. D. & Roth, S. (1975) Biochim. Biophys. Acta, 415, 473-512.
- 4. Deppert, W. & Walter, G. (1978) J. Supramol. Struct. 8, 19-37.
- 5. Cacan, R., Verbert, A. & Montreuil, J. (1976) FEBS Lett. 63, 102-106.
- Verbert, A., Cacan, R. & Montreuil, J. (1976) Eur. J. Biochem. 70, 49-53.
- Verbert, A., Cacan, R., Debeire, Ph. & Montreuil, J. (1977) FEBS Lett. 74, 234-238.
- Hoflack, B., Cacan, R., Montreuil, J. & Verbert, A. (1979) Biochim. Biophys. Acta, 568, 348-356.
- 9. Hoflack, B., Cacan, R. & Verbert, A. (1978) Eur. J. Biochem. 88, 1-6.
- Arnold, D., Hommel, E. & Risse, H. J. (1976) Mol. Cell. Biochem. 11, 137-145.
- 11. Struck, D. K. & Lennarz, W. J. (1976) J. Biol. Chem. 251, 2511-2519.
- 12. Patt, L. & Grimes, W. (1976) Biochim. Biophys. Acta, 444, 97-107.
- Cacan, R., Hoflack, B. & Verbert, A. (1980) Eur. J. Biochem. 106, 473-479.
- 14. Oliver, G. J. A. & Hemming, F. W. (1975) Biochem. J. 152, 191-199.
- 15. Richards, J. B. & Hemming, F. W. (1972) Biochem. J. 130, 77-93.
- Strecker, G., Fournet, B., Bouquelet, S., Montreuil, J., Dhondt, J. L. & Farriaux, J. P. (1976) Biochimie (Paris), 58, 579-586.
- Folch, J., Lees, M. & Sloane-Stanley, G. H. (1957) J. Biol. Chem. 226, 497 – 509.
- Turco, S. J., Stetson, B. & Robbins, P. W. (1977) Proc. Natl Acad. Sci. USA, 74, 4411-4414.
- 19. Robbins, P. W., Krag, S. S. & Liu, T. (1977) J. Biol. Chem. 252, 1780-1785.
- Oliver, G. J. A., Harrison, J. & Hemming, F. W. (1975) Eur. J. Biochem. 58, 223-229.
- 21. Waechter, C. J. & Lennarz, W. J. (1976) Annu. Rev. Biochem. 45, 95-112.
- Spiro, R. G., Spiro, M. J. & Bhoyroo, V. D. (1976) J. Biol. Chem. 251, 6409-6419.
- Behrens, N. H., Parodi, A. J. & Leloir, L. F. (1970) Proc. Natl Acad. Sci. USA, 66, 152-159.
- 24. Chen, W. W. & Lennarz, W. J. (1978) J. Biol. Chem. 253, 5774-5779.
- 25. Li, E., Tabas, I. & Kornfeld, S. (1978) J. Biol. Chem. 253, 7762-7770.

B. Hoflack, R. Cacan, and A. Verbert, Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et Techniques de Lille I. F-59655 Villeneuve-d'Ascq-Cedex, France

INFLUENCE DE LA GLUCOSYLATION SUR LA DESTINÉE DES DOLICHOL-PYROPHOSPHATE-OLIGOSACCHARIDES

Au cours de ces dernières années, un grand nombre de travaux ont fait ressortir l'importance de la glucosylation de l'oligosaccharide lié au dolichol dans la N-glycosylation des protéines. Cependant, la diversité des résultats obtenus n'a pas permis jusqu'à présent d'attribuer un rôle précis à la présence de résidus glucosyl sur l'oligosaccharide-P-P-Dol (voir la revue de HUBBARD et IVATT -314-). En effet, *in vivo*, l'oligosaccharidyltransférase utilise comme substrat préférentiel l'intermédiaire lipidique glucosylé de type Glc₃Man₉GlcNAc₂. Par contre, dans les systèmes *in vitro*, sa spécificité semble beaucoup moins stricte puisque des oligosaccharides glucosylés ou non, ainsi que des courts chaînons saccharidiques, sont transférés sur les accepteurs protéiques endogènes.

Nos travaux précédents ont montré que des activités enzymatiques associées au cycle des dolichols sont présentes sur les membranes plasmiques du lymphocyte. En outre, mise en présence de glycosylnucléotides marqués (GDP-mannose, UDP-N-acétylglucosamine), elles synthétisent une seule population de dolichol-pyrophosphateoligosaccharide dont la nature de la partie saccharidique est en parfait accord avec les précurseurs ajoutés dans le milieu réactionnel, contrairement à ce qui est observé avec les glycosyltransférases des membranes internes. Les lymphocytes entiers, utilisés comme modèle expérimental, nous offrent l'opportunité de contrôler la qualité de l'oligosaccharide-P-P-Dol synthétisé. Il était donc intéressant d'étudier la glucosylation de l'intermédiaire lipidique dans un tel système et de visualiser son influence sur la destinée des dolichol-pyrophosphateoligosaccharides, en particulier sur leur dégradation en phosphooligosaccharides.

Ces travaux montrent que lorsque les lymphocytes entiers sont mis en présence d'UDP-N-acétylglucosamine, de GDP-mannose et d'UDP-glucose tritié, la radioactivité incorporée est retrouvée au niveau du dolicholphosphate-glucose, des dolichol-pyrophosphate-oligosaccharides, des glycoprotéines nouvellement synthétisées et des phosphooligosaccharides. Cependant, le marquage des phosphooligosaccharides par le glucose est faible et le taux de dégradation des oligosaccharides-P-P-Dol est différent s'il est calculé par incorporation de glucose ou par incorporation de mannose. Cette observation nous permet d'envisager deux hypothèses ; la première : les dolichol - pyrophosphate-oligosaccharides glucosylés ne sont pas ou peu dégradés en phosphooligosaccharides, ou la seconde : les phosphooligosaccharides sont rapidement déglucosylés par des α -glucosidases. L'emploi de paranitrophényl- α -D-glucoside qui non seulement inhibe les α -glucosidases mais aussi favorise dans notre système, la formation d'une seule population de dolichol-pyrophosphateoligosaccharides glucosylés, nous a permis de conclure à la validité de la première hypothèse.

Ces résultats apportent donc des arguments nouveaux quant au rôle de la glucosylation dans la N-glycosylation des protéines. L'enzyme hydrolysant les dolichol-pyrophosphate-oligosaccharides ne peut utiliser comme substrat ceux qui ont déjà été glucosylés. Cet enzyme semble donc être un enzyme-clef dans la régulation de la N-glycosylation des protéines et les résidus glucosyl n'ont qu'un rôle de protection des dolichol-pyrophosphate-oligosaccharides : ou bien, ils sont glucosylés, ne sont donc pas dégradés en phosphooligosaccharides, ils sont alors maintenus à une concentration suffisamment élevée et par conséquent,l'oligosaccharide est plus facilement transféré en bloc sur la protéine ; ou bien ils ne sont pas glucosylés, et sont donc rapidement dégradés en phosphooligosaccharides.

- 98 -

Dolichol Pathway in Lymphocytes from Rat Spleen

Influence of the Glucosylation on the Cleavage of Dolichyl Diphosphate Oligosaccharides into Phosphooligosaccharides

Bernard HOFLACK, René CACAN, and André VERBERT

Laboratoire de Chimie Biologique et Laboratoire Associé au Centre National de la Recherche Scientifique Université des Sciences et Techniques de Lille, Villeneuve d'Ascq

(Received February 17, 1981)

Incubation of rat-spleen lymphocytes with UDP-glucose together with GDP-mannose and UDP-*N*-acetylglucosamine leads to the formation of glucosylated lipid intermediates characterized as dolichyl phosphate glucose and dolichyl diphosphate oligosaccharides. This latter can be either transferred onto endogenous protein acceptors or cleaved into phosphooligosaccharides. The striking fact is that phosphooligosaccharide populations contain far less glucosylated products than the dolichyl diphosphate oligosaccharide ones from which they are derived. Two hypotheses have been investigated: either a rapid action of glucosidases on the liberated phosphooligosaccharides or a preferential splitting of the non-glucosylated population of dolichyl diphosphate oligosaccharides. Addition of *p*-nitrophenyl- α -D-glucoside inhibits glucosidase activities and allows the production of a major population of dolichyl diphosphate oligosaccharides containing three glucose residues. Using these conditions, it is shown that the amount of phosphooligosaccharides generated from the splitting of dolichyl diphosphate oligosaccharides is greatly decreased and that the major part of these remaining phosphooligosaccharides from further degradation into phosphooligosaccharides.

Since the early work of Leloir and co-workers [1, 2] documenting the involvement of glucosyl derivatives of dolichol in glycoprotein biosynthesis, more recent studies have shown that glucose-containing dolichol-linked oligosaccharides are synthesized by tissue slices [3] or generated by microsomal preparations [4-6]. Structural studies [7, 8] have confirmed the presence of glucosyl residues in addition to Nacetylglucosaminyl and mannosyl residues in dolichol diphosphate oligosaccharides. Although mannose-labelled oligosaccharides presumably not containing glucose are transferred to protein, it has been proved that the presence of glucose enhanced the rate of this transfer [9]. This work has been recently complemented by Turco and Robbins [10] and Staneloni et al. [11] who show that among the various derivatives containing one, two or three glucose residues, the (Glc)₃ (Man)₉(GlcNAc)₂ oligosaccharide is transferred at the highest rate. In previous studies, using whole lymphocyte suspensions in which the metabolism of lipid-linked intermediates is observed [12], we demonstrated that beside being transferred, dolichol diphosphate oligosaccharides may be cleaved into phosphooligosaccharides [13] by the action of a phosphodiesterase. In this paper, we study the influence of the addition of glucosyl units to dolichyl diphosphate oligosaccharides on their degradation into phosphooligosaccharides.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

All reagents were of analytical grade. GDP-[¹⁴C]Man (108 Ci/mol), UDP-[³H]Glc (3.1 Ci/mmol) were obtained from the Radiochemical Centre (Amersham, England). GDP-Man, UDP-GlcNAc, UDP-Glc, D-mannose, D-glucose, AMP, *Escherichia coli* alkaline phosphatase (66 U/mg protein) were purchased from Sigma (St Louis, USA). *P*-Nitrophenyl- α -D-glucoside, *p*-nitrophenyl- β -D-glucoside, methyl- α -glucoside were obtained from Koch-Light Laboratories. Glucosylceramide purified from the spleen of a patient with a Gaucher's disease, was a gift from Dr. G. Strecker (Villeneuve d'Ascq, France).

Preparation of Cells

Spleen lymphocytes were prepared from six-week-old Wistar rats as previously described [14].

Standard Assay

The incubation medium contained 0.1 M sodium cacodylate pH 7.4, 0.154 M NaCl, 5 mM MgCl₂, 2 mM MnCl₂, 5 mM AMP, 6 μ M UDP-GlcNAc, 6 μ M GDP-Man, 6 μ M UDP-Glc, 1 mM mannose and 1 mM glucose. GDP-[¹⁴C]Man and UDP-[³H]Glc were used at specific radioactivities of 185 disintegrations $\times \min^{-1} \times pmol^{-1}$ and 2775 disintegrations $\times \min^{-1} \times pmol^{-1}$. Incubations were at 30 C with 10⁸ cells in a final volume of 100 μ l during 20 min.



Abbreviations. GDP-Man, guanosine diphosphate D-mannose; UDP-GlcNAc, uridine diphosphate N-acetyl-D-glucosamine; UDP-Glc, uridine diphosphate D-glucose; Dol PP-oligosaccharide, dolichyl diphosphate oligosaccharide.

Enzyme. Alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1).

Recovery of Labelled Products

The reaction was stopped by diluting to 0.4 ml (4 mM MgCl, with 1 mg of carrier immunoglobulin G) and the further addition of 0.8 ml of distilled methanol and 1.2 ml of chloroform. Labelled lipid intermediates and glycoproteins were extracted by the multiple extraction procedure of Oliver and Hemming [15] modified as previously described [13] leading to the obtention of a chloroform/methanol extract containing dolichyl phosphate sugar, a chloroform/methanol/water extract containing dolichyl diphosphate oligosaccharides and a residual pellet. This protein pellet was dissolved in concentrated formic acid by heating to 100°C for 5 min before counting. The labelled phosphooligosaccharides and neutral oligosaccharides released in the aqueous phase as previously demonstrated [13] were separated from precursors and precursor degradation products by chromatography on Sephadex G-25 column (1 cm \times 65 cm) in 0.1 M acetic acid. Counting was carried out in scintillation medium and a quenching correction was made by external ratio standardization.

Characterization of Labelled Materials

Identification of labelled lipid intermediates included the elution profiles from a column of DEAE-cellulose, their mobilities on thin-layer chromatograms and their lability to mild treatment with acid (0.01 M HCl 100 °C, 15 min) [16], as described elsewhere [13].

Gel Filtration Chromatography

After mild acid treatment of Dol*PP*-oligosaccharides, and alkaline phosphatase digestion of labelled phosphooligosaccharides eluted from the Sephadex G-25 column [13], the size of the resulting labelled oligosaccharides was analyzed by gel filtration on Biogel P-4 (200-400 mesh), Bio-Rad (1 cm × 100 cm column) eluted with 0.1 M acetic acid. The oligosaccharide containing three glucose residues, (Glc)₃(Man)₉(GlcNAc)₂, and the glucose-free oligosaccharide, (Man)₉(GlcNAc)₂, used as markers, were a generous gift from Dr R. Schwartz (Gießen, FRG).

RESULTS

Incorporation of Glucosyl Residues into Lipid Intermediates and Their Derivatives by Whole Lymphocytes from Rat Spleen

In previous studies [12, 13], we demonstrated that whole lymphocyte suspensions from rat spleen are able to utilize GDP-Man and UDP-GlcNAc to synthesize lipid intermediates leading to dolichyl diphosphate oligosaccharides which are either incorporated into endogenous protein acceptors, or cleaved into phosphooligosaccharides. Fig. 1 shows that when UDP-[³H]Glc was added to the standard assay, the radioactivity was recovered into the chloroform/methanol extract, the chloroform/methanol/water extract, the aqueous phase and the residual protein pellet. Analysis of the chloroform/methanol extract on a DEAE-cellulose column indicated that it contained two labelled products: a neutral product (80 % of the labelling) which was identified as glucosylceramide by thin-layer chromatography as described by Scher et al. [17] using an authentic glucosylceramide as marker, and a product which was eluted from the column by 10 mM ammonium acetate in



Fig. 1. Effect of concentration of UDP-[${}^{3}H$]glucose on the transfer of [${}^{3}H$]glucose from UDP-[${}^{3}H$]glucose into lipid and endogenous protein acceptors and on the release of oligosaccharides and phosphooligosaccharides. Incubations were performed with 6 μ M unlabeled UDP-GlcNAc, 6 μ M unlabeled GDP-Man and increasing concentrations of UDP-[${}^{3}H$]glucose was measured into the chloroform/methanol extract (\bullet — \bullet), the chloroform/methanol/water extract (\bullet — \bullet), the residual protein pellet (\bigcirc — \odot) and into the oligosaccharides and phosphooligosaccharides, released in the aqueous phase (\triangle — \bullet \triangle)

chloroform/methanol (2:1, by vol.) and which behaved as a dolichyl phosphate glucose on thin-layer chromatography using the following solvent: chloroform/methanol/water (60:25:4, by vol.) as described by Behrens [18]. The ³H-labelled product of the chloroform/methanol/water extract was identified as a Dol*PP*-[*Glc*-³H]oligosaccharide by its susceptibility to mild acid hydrolysis, by its chromatographic behavior on DEAE-cellulose since it was eluted by 10 mM ammonium acetate in chloroform/methanol/water (1:1:0.3, by vol.) as an authentic Dol*PP*-[*Man*-¹⁴C]oligosaccharide used as marker. In the aqueous phase obtained during the extraction, the oligosaccharidic material was separated from precursors and their degradation products by passing through a Sephadex G-25 column and was characterized as phosphooligosaccharides as previously described [13].

Thus, addition of UDP-Glc to the incubation medium led to the formation of glucose-containing DolPPoligosaccharides and to the further glucosylation of protein acceptors together with the formation of glucosylated phosphooligosaccharides. However, as pointed out on Fig. 1, the amount of glucosyl residues bound to phosphooligosaccharides did not vary whatever the UDP-Glc concentration, contrary to the observations for the other glucose-labelled products. Moreover, after twenty minutes of incubation in the standard conditions (6 µM UDP-GlcNAc, 6 µM GDP-Man, 6 µM UDP-Glc), the quantity of phosphooligosaccharides relative to the amount of DolPP-oligosaccharides is very different when based on mannose incorporation as opposed to the glucose incorporation. The ratio of: phosphooligosaccharides/DolPP-oligosaccharides was about one when mannose labelling was used, but was about 0.25 when glucose labelling was used. Thus, as it has been shown that phosphooligosaccharides are generated from DolPP-oligosaccharides [13], this raises the question as to why phosphooligosaccharides contain a relatively smaller amount of glucose than DolPP-oligosaccharides.



Fig. 2. Gel filtration analysis of the glycan moieties of dolichyl diphosphate oligosaccharides and of phosphooligosaccharides synthesized with or without UDP-glucose. Incubations were performed as described in the standard assay with 6 μ M UDP-GlcNAc, 6 μ M GDP-[¹⁴C]Man and without (A, C) or with (B, D) 6 μ M UDP-[³H]Glc. After mild acid hydrolysis of the labelled Dol PP-oligosaccharides, the resulting oligosaccharides are submitted to Biogel P-4 analysis (A, B) in 0.1 M acetic acid. Column 1 × 100 cm; flow rate: 5 ml/h; volume of each fraction 750 μ l. Oligosaccharides and phosphooligosaccharides released in the aqueous phase were separated from precursors and their degradation products by passing through a Sephadex G-25 column. After treatment by alkaline phosphatase, the resulting oligosaccharides (C, D) were submitted to Biogel P-4 analysis a described above. Standards used as markers are: G₀: (Man)₉(GlcNAc)₂ oligosaccharide; G₃: (Glc)₃(Man)₉(GlcNAc)₂ oligosaccharide; G₃: (Glc)₃(Man)₃(Glc)₃(Man)₃(Man)₃(Glc)₃(Man)₃(Man)₃(Man)₃(Man)₃(Man)₃(Man)₃(Man)₃(Man)₃(Man)₃(Man)₃(Man)₃(Man)₃(Man)₃(Man)₃(M

Comparison of the Size Distribution of Oligosaccharides Obtained from Glucosylated DolPP-Oligosaccharides and Glucosylated Phosphooligosaccharides

Incubation of whole lymphocytes with 6 µM GDP- $[^{14}C]$ Man and $6 \mu M$ UDP-GlcNAc led to the formation of DolPP-oligosaccharides containing an oligosaccharidic moiety which was co-eluted from a Biogel P-4 column with an authentic (Man)₉(GlcNAc)₂ oligosaccharide used as marker (Fig. 2A). When the same incubation was performed in the presence of UDP-[3H]Glc, a new population of oligosaccharides was formed which contains three glucosyl residues as indicated its behavior on Biogel P-4 column, using an authentic (Glc)₃(Man)₉(GlcNAc)₂ as marker (Fig. 2B). Fig. 2C, D show the size distribution of the oligosaccharidic moiety of the phosphooligosaccharides obtained in the two previous incubation conditions without (Fig. 2C) or with UDP-[³H]Glc (Fig. 2D). Although the presence of UDP-Glc in the incubation medium led to the formation of glucosylated DolPPoligosaccharides, the large majority of the released phos-



Fig. 3. Kinetics of the release of $[{}^{3}H]$ glucose from $[{}^{3}H]$ glucose-containing oligosaccharides and from $[{}^{3}H]$ glucose-containing phosphooligosaccharides. Incubations were performed as described under Materials and Methods using UDP- $[{}^{3}H]$ Glc as labelled precursor. Oligosaccharides obtained by mild acid treatment of DolPP-oligosaccharides and purified phosphooligosaccharides were reincubated during various times with lymphocytes as described in the standard assay but without percursors. At the end of the incubation, the released $[{}^{3}H]$ glucose was separated from the remaining oligosaccharides by paper chromatography on Whatman 3 in the following solvent: pyridine/ethyl acetate/acetic acid/water (5:5:1:3, by vol.). (0----0) $[{}^{3}H]$ glucose released from phosphooligosaccharides;

phooligosaccharides did not contain glucose. Consequently, as phosphooligosaccharides are generated from DolPP-oligosaccharides [13], the origin of the major unglucosylated phosphooligosaccharide population may correspond either to a rapid action of eventual glucosidases on glucosylated phosphooligosaccharides or to a preferential splitting of the non-glucosylated population of DolPP-oligosaccharides by the phosphodiesterase.

Occurrence of a Glucosidase Activity towards Glucosylated Oligosaccharides

To assay the presence of glucosidase activities on the oligosaccharide moiety of DolPP-oligosaccharides and phosphooligosaccharides, glucose-containing oligosaccharides derived from DolPP-oligosaccharides after mild hydrolysis and glucose-containing phosphooligosaccharides were obtained by incubating whole cells in the standard assay. These oligosaccharides were further incubated with whole cells and the release of [³H]glucose was monitored by paper chromatography in the following solvent: pyridine/ethyl acetate/acetic acid/water (5:5:1:3, by vol.) in which residual oligosaccharides stay near the origin. Fig. 3 shows that in both cases, glucosidases were able to cleave off more than 50% of the bound glucosyl residues. Analysis of the resulting oligosaccharides shows that the oligosaccharides containing three glucose residues are converted to oligosaccharides containing one glucose residue as shown in Fig. 4A, B after 10 min and 20 min of incubation respectively, the chromatographic profile of the starting material being as represented in Fig. 2B. Concerning phosphooligosaccharides, Fig. 4C, D show that the minor phosphooligosaccharide containing three glucose residues completely disappeared and that the amount of the phosphooligosaccharides containing one glucose residue decreased, being converted into non-glucosylated populations. It should be noted that, in both cases (phosphooligosaccharides and oligosaccharides obtained from mild acid hydrolysis of DolPPoligosaccharides) non-glucose-containing oligomannosides are



Fig. 4. Effect of glucosidase activities on the size distribution of the glucose-containing glycan moieties of dolichyl diphosphate oligosaccharides and of phosphooligosaccharides. Oligosaccharides (A, B) and phosphooligosaccharides (C, D) are obtained as described in Materials and Methods. They were reincubated with lymphocytes for 10 min (A, C) and 20 min (B, D) as described in the standard assay but without precursors. The control (no reincubation) is shown in Fig. 2B, D. Analysis on Biogel P-4 was achieved as indicated in the legend to Fig. 2. (O - O) [¹⁴C]Mannose label; ($\bullet - \bullet$) [³H]glucose label. Standards used as markers are: G₀: (Man)₉(GlcNAc)₂ oligosaccharide; G₃: (Glc)₃(Man)₉(GlcNAc)₂ oligosaccharide

concomitantly processed into lower-molecular-weight oligosaccharidic moieties suggesting mannosidase activities.

Thus, the possibility of the action of a glucosidase on the phosphooligosaccharides containing three glucose residues may not be ruled out. To explain the absence of glucosylated phosphooligosaccharides, two possibilities may be considered: either the phosphooligosaccharides are generated from glucosylated DolPP-oligosaccharides and the action of glucosidases is immediate, or the glucosylated DolPP-oligosaccharides are protected from the action of the phosphodiesterase and no glucosylated phosphooligosaccharides may be generated. Discrimination between these two hypotheses was achieved by inhibiting the action of glucosidases.

Effect of Inhibitors of Glucosidases on the Cleavage of DolPP-Oligosaccharides into Phosphooligosaccharides

Various compounds, methyl- α -glucoside, *p*-nitrophenyl- β -D-glucoside, *p*-nitrophenyl- α -D-glucoside currently used to inhibit glucosidases were assayed. As has been shown elsewhere [19, 20], *p*-nitrophenyl- α -D-glucoside appears a good inhibitor in our conditions: the release of [³H]glucose from glucosylated oligosaccharides as described in Fig. 3, is inhibited to more than 85% in the presence of 30 mM *p*-nitrophenyl- α -D-glucoside after 45 min incubation time. Fig. 5 shows the size distribution pattern of the oligosaccharidic moiety of Dol*PP*-oligosaccharides synthesized without (Fig. 5A) or with 15 mM and 30 mM *p*-nitrophenyl- α -D-glucoside (Fig. 5C, E respectively). For each incubation, the oligosaccharidic moiety of the corresponding amount of phosphooligosaccharides released

during the incubation were examined (Fig. 5B, D, F). First, it has to be noted that when increasing amounts of p-nitrophenyl- α -D-glucoside were added to the incubation medium, the size distribution of the glycan moiety obtained from DolPPoligosaccharides was affected leading to the formation of a major product whose glycan moiety was a (Glc)₃(Man)₉(GlcNAc)₂ oligosaccharide. Concomitantly with the increase of fully glucosylated DolPP-oligosaccharides, one can observe a decrease (around 60%) of the total amount of phosphooligosaccharides indicating that the phosphodiesterase activity was affected by the glucosylation of its substrate. In addition, although the substrates of phosphodiesterase became more and more glucosylated in the presence of pnitrophenyl-a-D-glucoside (Fig. 5A, C, E), the released phosphooligosaccharides did not follow this evolution. The decrease of the total amount of phosphooligosaccharides was mainly due to the decrease of the non-glucosylated population in the DolPP-oligosaccharides. These data support the fact that the non-glucosylated DolPP-oligosaccharides are preferentially cleaved into phosphooligosaccharides.

Conclusions

The experiments described above show that the incubation of whole lymphocytes from rat spleen with UDP-GlcNAc, GDP-Man, UDP-Glc leads to the formation of glucosylated lipid intermediates such as Dol*P*-Glc and Dol*PP*-oligosaccharides. The fate of the glucosylated Dol*PP*-oligosaccharides may be either their transfer onto endogenous protein acceptor or their degradation in water-soluble phosphooligo-



Fig. 5. Effect of concentration of p-nitrophenyl- α -D-glucoside on the size distribution of the glycan moieties of dolichyl diphosphate oligosaccharides and phosphooligosaccharides. Lymphocytes were incubated as described in the standard assay with increasing amount of p-nitrophenyl- α -D-glucoside : control (A, B), 15 mM (C, D) and 30 mM (E, F) p-nitrophenyl- α -D-glucoside. After incubation, oligosaccharides (A, C, E) were obtained by mild acid treatment of Dol PP-oligosaccharides and the corresponding phosphooligosaccharides (B, D, F) were analysed on Biogel P-4 as indicated in the legend of Fig. 2. (O—O) [1⁴C]Mannose label; (O—O) [3H]glucose label. Standards used as markers are: G₀: (Man)₉(GlcNAc)₂ oligosaccharide; G₃: (Glc)₃(Man)₉(GlcNAc)₂ oligosaccharide

saccharides. The striking result is that the phosphooligosaccharide populations contain far less glucosylated product than the Dol*PP*-oligosaccharide ones from which they are derived. Using *p*-nitrophenyl- α -D-glucoside, it was possible to obtain lipid intermediates with a major population of glucosylated Dol*PP*-oligosaccharides. Even in these conditions, the most abundant phosphooligosaccharide population did not contain glucose. As the glucosidase activities are inhibited in the presence of *p*-nitrophenyl- α -D-glucoside, the origin of these non-glucosylated phosphooligosaccharides may not be glucosylated phosphooligosaccharides which would have been later deglucosylated, but they must be accumulated from the minor pool of non-glucosylated Dol*PP*-oligosaccharides. This strongly suggests that there is a preferential splitting of the phosphodiester bond when Dol*PP*-oligosaccharides are not glucosylated. It has been demonstrated that the glucosecontaining DolPP-oligosaccharides were the preferential substrate in the reaction involving transfer 'en bloc'. Thus, it appears that the glucosylation step of DolPP-oligosaccharides is a key point for their fate: either they are glucosylated and thus protected from degradation, remain bound to membranes and can be efficiently transferred to proteins; or they are not glucosylated and they are readily converted in a phosphooligosaccharide which is the beginning of their catabolism pathway as soluble oligosaccharidic material.

This research was supported in part by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique (Laboratoire Associé number 217: Relation structure-fonction des constituants membranaires), from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Contrat de Recherche libre 78-1-194-2). We are very thankful to the Director of this Laboratory,

- 103 -

Professor J. Montreuil, for his constant interest in the progress of this work and for providing research facilities. We are very indebted to Professor F. Hemming for his helpful discussions. We thank very much Dr R. Schwartz (Gießen, FRG) for his generous gift of glucosylated oligosaccharides used as standards and Dr G. Strecker (Villeneuve d'Ascq, France) for kindly providing glucosylceramide.

REFERENCES

- 1. Behrens, N. N. & Leloir, L. F. (1970) Proc. Natl Acad. Sci. USA, 66, 153-159.
- Behrens, N. H., Parodi, A. J. & Leloir, L. F. (1971) Proc. Natl Acad. Sci. USA, 68, 2857-2860.
- Spiro, M. J., Spiro, R. G. & Bhoyroo, V. D. (1976) J. Biol. Chem. 251, 6420-6425.
- Robbins, P. W., Krag, S. S. & Liu, T. (1977) J. Biol. Chem. 252, 1780 1785.
- Herscovics, A., Bugge, B. & Jeanloz, R. W. (1977) J. Biol. Chem. 252, 2271-2277.
- 6. Chen, W. W. & Lennarz, W. J. (1978) J. Biol. Chem. 253, 5774-5779.

- 7. Li, E. & Korneld, S. (1979) J. Biol. Chem. 254, 2754-2758.
- Liu, T., Stetson, B., Turco, S. J., Hubbard, S. C. & Robbins, P. W. (1979) J. Biol. Chem. 254, 4554-4559.
- Turco, S. J., Stetson, B. & Robbins, P. W. (1977) Proc. Natl Acad. Sci. USA, 74, 4411-4414.
- 10. Turco, S. J. & Robbins, P. W. (1979) J. Biol. Chem. 254, 4560-4567.
- 11. Staneloni, R. J., Ugalde, R. A. & Leloir, L. F. (1980) Eur. J. Biochem. 105, 275-278.
- 12. Hoflack, B., Cacan, R. & Verbert, A. (1980) Eur. J. Biochem. 112, 81-86.
- 13. Cacan, R., Hoflack, B. & Verbert, A. (1980) Eur. J. Biochem. 106, 473-479.
- 14. Cacan, R., Verbert, A. & Montreuil, J. (1976) FEBS Lett. 63, 102-106.
- 15. Oliver, G. J. A. & Hemming, F. W. (1975) Biochem. J. 152, 191-199.
- 16. Richards, J. B. & Hemming, F. W. (1972) Biochem. J. 130, 77-93.
- 17. Scher, M. G., Jochen, A. & Waechter, C. J. (1977) Biochemistry, 16, 5037-5044.
- 18. Behrens, N. H. & Tabora, E. (1978) Methods Enzymol. 50, 402-435.
- 19. Scher, M. G. & Waechter, C. J. (1979) J. Biol. Chem. 254, 2630 2637
- 20. Grinna, L. S. & Robbins, P. W. (1979) J. Biol. Chem. 254, 8814-8818.

B. Hoflack, R. Cacan, and A. Verbert, Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et Techniques de Lille I, F-59655 Villeneuve d'Ascq, Cedex, France

TRANSFERT ET DÉGRADATION DES DOLICHOL-PYROPHOSPHATE-OLIGOSACCHARIDES À LA SURFACE DU LYMPHOCYTE

Dans le paragraphe précédent, nous proposons que l' "enzymeclef" de la régulation de la glycosylation des protéines est celui intervenant dans la dégradation des dolichol-pyrophosphate-oligosaccharides. Cependant, la confirmation de cette hypothèse nécessite la comparaison des taux de transfert et de dégradation de dolichol-pyrophosphate-oligosaccharides déterminés ainsi que la caractérisation des produits formés (partie glycannique des phosphooligosaccharides et des glycoprotéines). Les résultats précédemment obtenus en utilisant des préparations de lymphocytes entiers, ont montré qu'il était possible, dans des conditions particulières d'incubation, d'obtenir une population définie de dolichol-pyrophosphateoligosaccharides donneurs. Par exemple, mises en présence d'UDP-N-acétylqlucosamine et de GDP-mannose, les ectoqlycosyltransférases des lymphocytes synthétisent une population unique d'oligosaccharides-P-P-Dol dont le glycanne contient deux N-acétylglucosamines et neuf mannoses. En présence de GDP-mannose, d'UDP-N-acétylglucosamine, d'UDP-glucose et de paranitrophényl-a-D-glucose, le dérivé isoprénique majeur obtenu possède un glycanne de type Glc, Man GlcNAc,.

Les problèmes rencontrés dans ce genre d'investigation sont d'ordre technique et résident dans l'obtention de l'oligosaccharide lié de façon covalente à la protéine. Différentes voies d'approche peuvent être utilisées mais la méthode idéale doit répondre aux critères suivants :

- elle doit être quantitative ;

- elle ne doit pas modifier la structure du glycanne lié à la protéine ;

- elle doit nous permettre d'effectuer des comparaisons faciles de taille des différents oligosaccharides obtenus.

L'hydrolyse pronasique exhaustive ne répond pas au dernier critère puisque cette méthode ne permet d'obtenir que des glycopeptides. Les β -endo-N-acétylglucosaminidases (H ou CII) semblent trop spécifiques et d'autre part, leur action qui peut ne pas être totale, modifie la taille du glycanne puisque ces enzymes coupent la liaison entre les deux résidus de N-acétylglucosamine situés au point d'attache. Une méthode de choix s'est révélée dans l'hydrazinolyse qui libère spécifiquement tout motif oligosaccharidique lié N-glycosidiquement à la protéine. Une simple réacétylation permet l'obtention du glycanne d'origine.

I - SYNTHESE DE N, N'-DIACETYLCHITOBIOSYLPROTEINES ET LEUR MANNOSYLATION

Cette suite d'expériences décrit le métabolisme de la N-acétylglucosamine à la surface du lymphocyte lorsque l'UDP-N-acétylglucosamine est utilisé comme seul précurseur.

L'observation majeure qui est faite dans ce système d'incubation est qu'en dépit du très faible taux de synthèse des dolichol-pyrophosphateoligosaccharides, une incorporation non négligeable de N-acétylglucosamine est mesurée sur les glycoprotéines. Cette glycosylation nécessite néanmoins la participation des intermédiaires polypréniques puisqu'elle est inhibée par la tunicamycine. L'analyse des glycoprotéines nouvellement synthétisées montre que les motifs glycanniques transférés sont simples : N-acétylglucosamine et N,N'-diacétylchitobiose. Dans notre système, l'oligosaccharidyltransférase ne montre pas de spécificité stricte vis-à-vis de l'oligosaccharide lié au dolichol.

Des cinétiques de marquage, suivies d'expériences de chasse révèlent que le dolichol-pyrophosphate-chitobiose peut être engagé dans la même voie métabolique que celle décrite précédemment pour le dolicholpyrophosphate-oligosaccharide. En effet, la dégradation de cet intermédiaire semble être sa destinée majeure. Il apparait donc que la phosphodiestérase que nous avons mis en évidence, régule non seulement le transfert de l'oligosaccharide sur la protéine mais encore la synthèse des oligosaccharides-P-P-Dol matures. La synthèse de chitobiosylprotéines pose naturellement le problème de la signification d'un tel transfert. D'autres auteurs (CHEN et LENNARZ -315-, HARFORD et WAECHTER -316-) ont conclu qu'il ne reflète qu'un manque de spécificité de l'oligosaccharidyltransférase. Dans notre système, nous avons pu montrer le branchement de mannose sur des chitobiosylprotéines préalablement synthétisées. En effet, après incubation en présence de GDP-mannose, les glycannes obtenus après hydrazinolyse sont retenus sur une colonne de Concanavaline-A. Par contre, en absence de GDP-mannose, ceux-ci ne sont pas retenus sur une telle colonne. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'il existerait une seconde voie annexe de biosynthèse des N-glycosylprotéines. Ces études réalisées *in vitro* soulèvent un autre problème : celui de la signification physiologique de cette nouvelle voie de synthèse.

Dolichol-Dependent Synthesis of Chitobiosyl Proteins and Their Further Mannosylation

A Second Route for Glycosylation of Proteins in Rat-Spleen Lymphocytes?

Bernard HOFLACK, Philippe DEBEIRE, René CACAN, Jean MONTREUIL, and André VERBERT

Laboratoire de Chimie Biologique et Laboratoire Associé au Centre National de la Recherche Scientifique no. 217, Université des Sciences et Techniques de Lille, Villeneuve d'Ascq

(Received September 29, 1981/January 29, 1982)

Incubation of whole lymphocytes with UDP-*N*-acetyl [³H]glucosamine used as the only precursor leads to the formation of dolichyl diphosphate [³H]chitobiose, Dol*PP*-(GlcNAc)₂, and dolichyl diphosphate *N*-acetyl-[³H]glucosamine, Dol*PP*-GlcNAc. Although very few dolichyl diphosphate oligosaccharides are formed, a high level of radioactivity is recovered with proteins and has been characterized, using hydrazinolysis procedure, as [³H]chitobiosyl and *N*-acetyl[³H]glucosaminyl units. Addition of tunicamycin inhibits, to the same extent, both the synthesis of Dol*PP*-(GlcNAc)₁₋₂ and the incorporation of the *N*-acetyl[³H] glucosaminyl residues onto proteins, indicating that these carbohydrate units are transferred onto proteins acceptors from their dolichol derivatives. Chase experiments have indicated that, in fact, the Dol*PP*-(GlcNAc)₁₋₂ were utilized in two ways: either their transfer onto proteins or their degradation into water-soluble saccharidic material. Moreover, the transfer reaction appears to be a slow process compared to the degradation since the radioactivity chased from the Dol*PP*-(GlcNAc)₁₋₂ is not recovered on proteins. This fact allows to show that part of the [³H]chitobiose previously bound to proteins is further converted into oligomannosidic glycans in the presence of GDP-mannose. This direct mannosylation of chitobiosyl-proteins may represent a second route for the *N*-glycosylation of proteins.

It is now well established that polyprenol-linked oligosaccharides containing glucose, mannose and N-acetylglucosamine are involved in the N-glycosylation of proteins [1]. In this process, a dolichyl diphosphate chitobiose is converted into a mannosylated oligosaccharide lipid, then glucosylated and transferred *en bloc* onto protein acceptors. Besides this major metabolic pathway, a few authors have demonstrated that short saccharidic units such as N-acetylglucosamine [2], chitobiose [3-5] and β -mannosyl-chitobiose [5-7] can be transferred onto proteins. Attempts to mannosylate enzymatically *in vitro* protein-linked chitobiose have been unsuccessful [3-5] calling into question the physiological significance of such transfers.

As previously described [8], cell-surface glycosyltransferases involved in the dolichol pathway have been characterized in rat-spleen lymphocytes. Directly accessible from the outside of the cell, the utilization of the intracellular pool of precursors by these enzymes is prevented so that the quality of neosynthesized products can be easily controlled according to the nucleotide sugars added. In this study, incubating whole lymphocytes with labelled UDP-GlcNAc but without GDP-Man, we investigated the fate of the synthesized DolPP-(GlcNAc)₁₋₂: either transferred to proteins or degraded into water-soluble saccharidic material. By the hydrazinolysis procedure which specifically cleaves off the glycan moieties of all types of N-glycosylproteins, we observed that N-acetylglucosaminyl and chitobiosyl residues are transferred to proteins from their dolichol intermediates. We demonstrated they can be further elongated in the presence of GDP-mannose to give oligomannosidic glycans. The results suggest that this metabolic pathway may represent a second route for the *N*-glycosylation of proteins.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

All reagents were of analytical grade. UDP-[³H]GlcNAc was obtained from New England Nuclear Corp. (Boston, USA). GDP-Man, UDP-GlcNAc, *N*-acetyl-D-glucosamine, AMP, *Escherichia coli* alkaline phosphatase (66 U/mg protein), were purchased from Sigma (St Louis, USA), chitobiose from Pharmindustrie (Villeneuve La Garenne, France). Tunicamycin was a generous gift from Dr. W. F. J. Cuthbertson (Glaxo Research Ltd, Stoke Poges, Great Britain). Concanavalin A covalently bound to Sepharose 4B (concanavalin-A – Sepharose) was purchased from Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Sweden).

Preparation of Cells

Spleen lymphocytes were prepared from six-week-old Wistar rats as previously described [9].

Standard Assay

The incubation medium contained 0.1 M sodium cacodylate pH 7.4, 0.154 M NaCl, 5 mM MgCl₂, 2 mM MnCl₂, 5 mM AMP, 6 μ M UDP-GlcNAc and 1 mM N-acetylglucosamine. UDP-[³H]GlcNAc was used at a specific radioactivity of 2775 disintegrations × min⁻¹ × pmol⁻¹. Incubations were at 30 °C with 10⁸ cells in a final volume of 100 μ l during 20 min.

Abbreviations. UDP-GlcNAc, uridine diphosphate N-acetyl-D-glucosamine; GDP-Man, guanosine diphosphate D-mannose; DolPP-GlcNAc, dolichyl diphosphate N-acetylglucosamine; DolPP-(GlcNAc)₂, dolichyl diphosphate chitobiose.

Sequential Lipid Extraction

After incubation, labelled lipid intermediates were extracted as previously described [8] leading to the obtention of a chloroform/methanol extract, a chloroform/methanol/ water extract and a residual protein pellet. In addition, this procedure gave an aqueous phase containing precursors, precursor degradation products and the water-soluble material released by the degradation of lipid intermediates as previously demonstrated [10]. Counting was carried out in scintillation medium and a quenching correction was made by external ratio standardization.

Characterization of Labelled Products

Identification of labelled lipid intermediates included the elution profiles from a column of DEAE-cellulose, their mobilities on thin-layer chromatograms and their lability to mild treatment with acid (0.01 M HCl, 100 °C, 15 min), as described elsewhere [10].

The release of chitobiosyl phosphate coming from the degradation of DolPP-(GlcNAc)₂ has been characterized as follows: aqueous phases were dried under vacuum and submitted to alkaline phosphatase (5 units); the residual material was desalted on Dowex 50X8 (H⁺ form) and Dowex 1X8 (HCOO⁻ form) on which the remaining UDP-GlcNAc was retained. The neutral fraction was submitted to paper chromatography in solvent A: butanol/pyridine/water (6:4:3, by vol.), using N-acetylglucosamine and chitobiose as standards. The radioactivity recovered as chitobiose reflects only the splitting of DolPP-(GlcNAc)₂.

Hydrazinolysis of Labelled Glycoproteins

Hydrazinolysis of glycoproteins was achieved according to Bayard and Montreuil [11]: The anhydrous residual protein pellet was dissolved in 0.5 ml of anhydrous hydrazine and heated at 105 °C for 20 h. Hydrazine was then removed by evaporation under nitrogen and drying overnight under vacuum. Under these conditions, all the radioactivity was solubilized, quantitatively recovered as oligosaccharidic material.

Analysis of the Glycans Released by Hydrazinolysis

After hydrazinolysis, the size of the obtained N-deacetylated glycans was analyzed by gel filtration on Bio-Gel P-2 (Bio-Rad, 200-400 mesh, column 1×50 cm), eluted with 0.1 M acetic acid. The obtained glycans of high molecular weight were quantitatively re-N-acetylated with acetic anhydride [12] to be further analyzed on a Bio-Gel P-4 (200-400 mesh, column 1×90 cm) eluted with 0.1 M acetic acid. The (Man)₉(GlcNAc)₂ oligosaccharide used as a marker as previously described [13], was a generous gift from Dr R. Schwarz. The low molecular weight materials obtained after gel filtration on Bio-Gel P-2 were re-N-acetylated as described above and reduced with potassium borohydride. The resulting material was submitted to paper chromatography in solvent B: pyridine/ethyl acetate/acetic acid/water (5:5:1:3, by vol.). Chitobiositol and N-acetylglucosaminitol used as standards were obtained by reduction with potassium borohydride of chitobiose and N-acetylglucosamine respectively

When concanavalin-A-Sepharose affinity chromatography was used, the hydrazinolysate was loaded on a column (total volume: 0.5 ml) of concanavalin-A-Sepharose equili-



Fig. 1. Kinetic of incorporation of N-acetyl[³H]glucosamine into endogenous acceptors of lymphocytes. Incubations were performed as indicated under Materials and Methods. After the extraction procedure, the transfer of radioactive N-acetylglucosamine was measured into dolichyl diphosphate N-acetylglucosamine and dolichyl diphosphate chitobiose (O----O), into dolichyl diphosphate oligosaccharides (Δ ---- Δ) and proteins (\bullet --- \bullet). The presence of phosphorylated and neutral oligosaccharides due to the splitting of dolichyl diphosphate oligosaccharides was checked at each time point (Δ ---- Δ)

brated with 0.01 M Tris/HCl pH 7.5 containing 0.1 M NaCl, at room temperature, as described by Ogata et al. [14]. The column was washed with 2 ml of the above buffer, and the radioactivity of the non-retained material determined. After further washing of the column (2 ml) the radioactivity of the retained material was determined by counting the total gel.

RESULTS

Transfer of [³H]GlcNAc from UDP-[³H]GlcNAc onto Endogenous Acceptors in Lymphocytes

In previous studies [8, 10, 13], we demonstrated that incubations of lymphocytes with UDP-GlcNAc and GDP-Man lead to the synthesis of lipid-linked oligosaccharides which are either transferred onto endogenous protein acceptors or cleaved into phospho-oligosaccharides. Fig.1 shows the incorporation of [3H]GlcNAc into lipid intermediates, phosphooligosaccharides and proteins when UDP-[³H]GlcNAc is used as the only precursor. The major part of the radioactivity is recovered in the chloroform/methanol extract and has been characterized as DolPP-(GlcNAc)₂ and DolPP-GlcNAc as follows: after mild acid treatment of the lipid derivatives, the glycan moieties were identified by paper chromatography in solvent A as chitobiose and N-acetylglucosamine (80% and 20% respectively) (see Fig. 3A). It has to be noted that under these incubation conditions, very little of the dolichyl diphosphate oligosaccharides and phosphooligosaccharides from which they derived are detected in the chloroform/methanol/water extract and the aqueous phase respectively. The striking fact is that, despite of the low level of dolichyl diphosphate oligosaccharides, a considerable transfer of labelled N-acetylglucosaminyl residues is observed onto proteins. These latter are effectively bound to proteins since they are not removed by acid-treatment (5% trichloroacetic acid, 90 °C, 15 min) [15].

When incubations were performed in the presence of tunicamycin $(1 \ \mu g/ml)$ the radioactivity recovered into the chloroform/methanol extract was greatly reduced (95% in-

hibition) and the incorporation onto protein was affected at the same extent suggesting that the transfer on proteins depends on the formation of DolPP-(GlcNAc)₁₋₂.

Size Distribution

and Identification of Oligosaccharide Obtained from Glycoproteins by Hydrazinolysis

After incubation of lymphocytes with 6 µM UDP-[³H]-GlcNAc and lipid intermediate extraction, the residual protein pellet is submitted to hydrazinolysis. It has been checked that a quantitative recovery of the N-linked glycan moieties is obtained in the conditions described under Materials and Methods. The size distribution of the resulting glycan fraction is analyzed by gel filtration on Bio-Gel P-2. As depicted in Fig. 2, two populations can be distinguished: a minor one is eluted at the exclusion volume of the column and a major low molecular weight population is eluted with the total volume. After re-N-acetylation, the higher molecular weight glycan coelutes on Bio-Gel P-4 with a (Man)₉(GlcNAc)₂ oligosaccharide used as internal marker (not shown). After re-N-acetylation and reduction, the low molecular weight material is submitted to paper chromatography in solvent B: these compounds have the same chromatographic behavior as chitobiositol and N-acetylglucosaminitol used as markers (Fig. 3B) and represent around 80% and 20% of the low molecular weight material, respectively. In addition, it has to be noted that the higher molecular weight material is retained on concanavalin-A-Sepharose column although the low molecular weight compounds are not. This property will be used further (see Table 1) to distinguish between these two populations. The results show that short carbohydrate units such as chitobiose and N-acetylglucosamine may be transferred onto endogenous protein acceptors from dolichol derivatives. This transfer has already been described by other authors in various systems [3, 5].

Fate of $DolPP-(GlcNAc)_{1-2}$

Lymphocytes were incubated first with UDP-[³H]GlcNAc, then the labelled precursor was chased with a large excess or unlabelled UDP-GlcNAc (1 mM). It is observed (Fig.4) that just after the chase, the radioactivity of the chloroform/ methanol extract rapidly decreases: 90% of the labelled sugars are chased from DolPP-(GlcNAc)₁₋₂. However, this label is recovered neither in the chloroform/methanol/water extract nor on the proteins whose incorporation level remains constant whatever the incubation time after the chase. As we previously observed that dolichyl diphosphate oligosaccharides could be degraded into phospho-oligosaccharides and oligosaccharides, we investigated this possibility for DolPP-(GlcNAc)₂. This has been achieved by the measurement of phosphochitobiose and chitobiose in the aqueous phase as described under Materials and Methods. In fact, Fig. 4 shows that the radioactivity chased from the chloroform/ methanol extract is recovered in the aqueous phase indicating a high degradation process if compared to the transfer reaction. This explains why the labelling of proteins is not increased through the chase experiment.

Elongation of Chitobiosyl Proteins in vitro in the Presence of GDP-Mannose

The formation of chitobiosyl- or N-acetylglucosaminyl proteins raises the question as to whether they can be further



Fig. 2. Gel filtration chromatography of glycans removed from proteins by hydrazinolysis. The incubations were performed for 20 min in the standard conditions. After extraction of lipid intermediates, the protein pellet was dried and submitted to hydrazinolysis (see Materials and Methods). The removed glycans were chromatographed on a Bio-Gel P-2 column $(1 \times 50 \text{ cm})$ using 0.1 M acetic acid as solvent: flow rate 6 ml/h, volume of each fraction 0.75 ml



Fig. 3. Paper chromatography analysis of the carbohydrate moieties released from lipid intermediates extracted by chloroform/methanol and of the low molecular weight glycans removed from proteins. The labelled sugars were removed from the chloroform/methanol extract by mild acid treatment as described under Materials and Methods. The released material was submitted to paper chromatography on Whatman 3 in solvent A, using chitobiose and N-acetylglucosamine as markers (A). After hydrazinolysis, the low molecular weight labelled sugars eluted with the total volume of the Bio-Gel P-2 column, were pooled, reacetylated and reduced as described under Materials and Methods. This material was chromatographed on Whatman 3 in solvent B using authentic chitobiositol and N-acetylglucosaminitol as markers (B). After chromatography, 1×5 -cm paper strips were cut along the migration path and counted



Fig. 4. Kinetics of incorporation of $[{}^{3}H]GlcNAc$ from UDP- $[{}^{3}H]GlcNAc$ into lipid and protein acceptors and chase experiments. Kinetic studies were carried out in the standard conditions. Transfer of $[{}^{3}H]GlcNAc$ into DolPP-(GlcNAc)₁₋₂ (O—O), dolichyl diphosphate oligosaccharides (Δ — Δ), and the protein pellet (Δ — Δ). The release in the aqueous phase of the $[{}^{3}H]$ chitobiose coming from the degradation of lipid intermediates was measured as described under Materials and Methods (\bullet — \bullet). The arrow indicates the addition of 100 nmol of unlabelled UDP-GlcNAc after 10 min of incubation. The kinetics of the chase experiment were followed on DolPP-(GlcNAc)₁₋₂ (O—O), dolichyl diphosphate oligosaccharides (Δ —— \bullet) and the released chitobiose (\bullet —— \bullet)

elongated to form oligomannosidyl proteins. To investigate this hypothesis, one has to distinguish the mannosylation process via dolichyl diphosphate oligosaccharides from an eventual direct mannosylation of chitobiosyl proteins. This has been achieved by the following experiment: in a first step, ³H]GlcNAc-labelled chitobiosyl proteins are synthesized by incubating lymphocytes with 6 µM UDP-[³H]GlcNAc for 20 min, then a chase experiment with 1 mM UDP-GlcNAc is performed as described above. In these conditions, the radioactivity bound to protein remains constant indicating that no more [³H]GlcNAc residues are transferred to proteins. After the chase is completed (10 min), unlabelled GDP-Man is added together with tunicamycin at a concentration (5 μ g/ml) which completely abolish the synthesis of new DolPP-GlcNAc and further derivatives. Thus, if new [3H]GlcNAc-labelled oligomannoside linked to the proteins are detected, they reflect the elongation of the previously formed chitobiosyl proteins. The results of such an experiment are presented in Table 1 where the formation of [3H]GlcNAc-labelled oligomannoside on proteins is detected by the retention of the glycan moieties released by hydrazinolysis on concanavalin-A-Sepharose column. The control experiments achieved without GDP-Man reveal that the repartition of the two populations is kept constant as expected for a simple chase experiment. When GDP-Man is added, the amount of material retained on concanavalin-A-Sepharose is twice as much. This later material analysed on Bio-Gel P-4 coelutes with a typical (Man)₉(GlcNAc)₂ oligosaccharide. This indicates that part of the chitobiosyl units, has been converted, in the presence of GDP-Man into oligomannosidic structures. This result suggests an other possibility for the formation Table 1. Elongation of $[{}^{3}H]$ chitobiosyl proteins in the presence of GDP-mannose

Incubations were carried out with UDP-[³H]GlcNAc in the standard conditions. After 20 min of incubation, an excess of unlabelled UDP-GlcNAc was added (final concentration: 1 mM). After 10 min of chase, lymphocytes were incubated for 15 min with tunicamycin (5 μ g/ml) and with or without 20 μ M GDP-Man. After extraction of lipid intermediates, proteins were submitted to hydrazinolysis as described under Materials and Methods. The resulting glycan fractions were analysed by concanavalin-A – Sepharose (ConA-Sepharose) chromatography

Step	[³ H]GlcNAc- labelled glycans retained on ConA- Sepharose	[³ H]GlcNAc- labelled glycans not retained on ConA- Sepharose	Total: 1 + 2, [³ H]GlcNAc incorporated into proteins
	1	2	counts/min
Before addition of GDP-Man	1043	16457	17500
15 min incubation with GDP-Man	2046	15419	17465
15 min incubation without GDP-Man	1109	16644	17753

of oligomannosidic type *N*-glycoproteins: the direct mannosylation of the chitobiosyl residues previously transferred to proteins.

DISCUSSION AND CONCLUSION

We have previously demonstrated [8,13] that incubation of whole lymphocytes from rat-spleen with the required precursors led to the formation of the lipid intermediates involved in the N-glycosylation of proteins and we have shown that the exogenous labelled glycosyl-nucleotides were utilized without any isotopic dilution with the cellular pool. In the experiments described above, lymphocytes were incubated with UDP-[³H]GlcNAc as the only precursor and the radioactivity was incorporated mainly into the DolPP-(GlcNAc)₁₋₂ which are further utilized either to be transferred onto protein acceptors or to be degraded as it has been previously observed for the fate of dolichyl diphosphate oligosaccharides [10]. To determine what was really transferred onto proteins in these incubation conditions, we used hydrazinolysis procedure to cleave off the entire saccharidic mojeties and to perform further size determinations and characterizations. We demonstrated that most of the [³H]GlcNAc transferred onto proteins were recovered as chitobiose and N-acetylglucosamine units, in the same proportion (around 80% and 20% respectively) as the one observed for the donors DolPP-(GlcNAc)₂ and DolPP-GlcNAc. In this connection, as the proportion of oligomannoside, chitobiose and glucosamine linked to proteins reflects the proportion of the same saccharidic moieties in the lipid donors, our observations may simply reflect the lack of a strict specificity of the oligosaccharide transferase for the chain length of the dolichol-bound saccharidic substrate as it has been observed by other investigators in different systems [3, 4, 16].

As the $[{}^{3}H]$ GlcNAc labelling on proteins was markedly inhibited when incubations were performed in the presence of tunicamycin, it is suggested that the transfer of chitobiosyl and glucosaminyl units onto proteins was dolichol-dependent.

It has to be noted that addition of an excess of unlabelled UDP-GlcNAc after a 10-min synthesis in the presence of UDP-[³H]GlcNAc led to a rapid chase of the DolPP-(Glc- $NAc)_{1-2}$ although the amount of [³H]GlcNAc incorporated onto proteins did not vary. This indicates that the transfer on proteins is a slow process compared to the turn-over of DolPP-(GlcNAc)₁₋₂, the major fate of these latter being, in these conditions, their cleavage into phospho-chitobiose as already observed for dolichyl diphosphate oligosaccharides [10]. Moreover, interesting is the fact that when GDPmannose is added after the chase was completed, part of the radioactive chitobiosyl units previously branched on the proteins was mannosylated to be converted to oligomannosidic-type glycan moieties. Thus, these results obtained in vitro with rat-spleen lymphocytes, indicate that direct mannosylation of chitobiosyl proteins may occur and may represent a second route for the N-glycosylation of proteins. Although our data are in good agreement with previous studies from several authors [3-6] who have shown that short carbohydrate chains could be transferred onto protein acceptors from their lipid intermediates, no further elongation of the asparagine-linked chitobiose had so far been observed. It has to be mentioned that even when incubations were performed in the presence of both UDP-GlcNAc and GDP-Man (conditions in which high levels of dolichyl diphosphate oligomannoside are formed [8, 10]) part of the glycan moieties linked to proteins consist nevertheless of chitobiosyl units (unpublished results). This suggests again that both pathways may occur in vitro. Thus, it cannot be excluded that the second route of glycosylation we observed with rat-spleen lymphocytes may be of physiological significance leading either to different carbohydrate moieties or to the glycosylation of different sites of the protein.

This research was supported in part by the Centre National de la Recherche Scientifique (Laboratoire Associé number 217: Relation structure-fonction des constituants membranaires) and from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (CRL 81-2015). We thank Dr W. F. J. Cuthbertson from Glaxo Research Ltd for his generous gift of tunicamycin, and Dr R. Schwarz (Gießen, FRG) for kindly providing oligomannosidic markers.

REFERENCES

- 1. Parodi, A. J. & Leloir, L. F. (1979) Biochim. Biophys. Acta, 559, 1-37.
- 2. Khalkhali, Z. & Marshall, R. D. (1975) Biochem. J. 146, 299-307.
- 3. Chen, W. W. & Lennarz, W. J. (1977) J. Biol. Chem. 252, 3473-3479.
- Harford, J. B. & Waechter, C. J. (1979) Arch. Biochem. Biophys. 197, 424-435.
- 5. Lehle, L. & Tanner, W. (1978) Eur. J. Biochem. 83. 563-570.
- 6. Nakayama, K., Araki, Y. & Ito, E. (1976) FEBS Lett. 72, 287-290.
- 7. Chen, W. W. & Lennarz, W. J. (1976) J. Biol. Chem. 251, 7802-7809.
- Hoflack, B., Cacan, R. & Verbert, A. (1980) Eur. J. Biochem. 112, 81-86.
- 9. Cacan, R., Verbert, A. & Montreuil, J. (1976) FEBS Lett. 63, 102-106.
- 10. Cacan, R., Hoflack, B. & Verbert, A. (1980) Eur. J. Biochem. 106, 473-479.
- 11. Bayard, B. & Montreuil, J. (1974) Colloq. Int. Cent. Natl Rech. Sci. 221, 209-218.
- 12. Reading, C., Penhoet, E. & Ballou, C. (1978) J. Biol. Chem. 253, 5600-5612.
- 13. Hoflack, B., Cacan, R. & Verbert, A. (1981) Eur. J. Biochem. 117, 285-290.
- 14. Ogata, S. I., Muramatsu, T. & Kobata, A. (1975) J. Biochem. (Tokyo) 78, 687-696.
- Godelaine, D., Beaufay, H. & Wibo, M. (1977) Proc. Natl Acad. Sci. USA, 74, 1095-1099.
- 16. Sharma, S. B., Lehle, L. & Tanner, W. (1981) Eur. J. Biochem. 116, 101-108.

B. Hoflack, P. Debeire, R. Cacan, J. Montreuil, and A. Verbert, Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et Techniques de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

II - TRANSFERT ET DEGRADATION DE DOLICHOL-PYROPHOSPHATE-OLIGOSACCHARIDES GLUCOSYLES OU NON

Dans la première partie de ce chapitre, nous avons montré la destinée de courts chaînons saccharidiques liés à des intermédiaires lipidiques et synthétisés par les lymphocytes entiers dans un milieu réactionnel simple ne renfermant qu'un glycosylnucléotide précurseur : l'UDP-N-acétylglucosamine. Dans ce second volet, nous étudierons la synthèse et le métabolisme des différents dérivés polypréniques dans des systèmes d'incubation plus complexes. Dans le premier milieu réactionnel, les lymphocytes intacts incubés en présence de GDP-[¹⁴C] mannose et d'UDP-N-acétylglucosamine synthétisent une seule population de dolichol-pyrophosphate-oligosaccharides dont le glycanne est de type ManoGlcNAco. Le second milieu réactionnel contient, outre l'UDP-Nacétylglucosamine et le GDP-[¹⁴C] mannose, de l'UDP-glucose et du paranitrophényl-a-D-glucoside. Ce dernier comme nous l'avons vu précédemment, permet non seulement d'inhiber les glucosidases impliquées dans la maturation des glycannes nouvellement branchés sur les protéines, mais encore d'obtenir une population très enrichie en Glc₃Man₉GlcNAc₂-P-P-Dol. Ces différents milieux d'incubation sont détaillés dans le troisième article présenté.

Après incubation 20 min. à 30°C et extraction séquentielle des différents produits, les dérivés oligosaccharidiques sont obtenus par hydrolyse acide douce des oligosaccharides-P-P-Dol, par déphosphorylation des phosphooligosaccharides au moyen de la phosphatase alcaline et par hydrazinolyse des glycoprotéines suivie de réacétylation. Après désalage des différentes fractions oligosaccharidiques obtenues, celles-ci sont analysées par chromatographie de couche mince (voir appendice technique). Les profils densitométriques de l'autoradiographie de la plaque sont présentés dans la Figure 24 p. 114.

- 113 -



SENS DE MIGRATION

FIGURE 24 : Profils densitométriques de l'autoradiogramme obtenu après chromatographie sur couche mince des oligosaccharides obtenus à partir des oligosaccharides -P-P-Dol (A1, B1) des phosphooligosaccharides (A2, B2) et des glycoprotéines (A3, B3). Dans la série A, le milieu d'incubation renferme de l'UDP-N-acétylglucosamine et du GDP-mannose ; dans la série B, il contient en plus de ces derniers, de l'UDPglucose et du paranitrophényl-a-D-glucoside.

811S GCG

- 114 -

Les résultats obtenus montrent que le glycanne des dolicholpyrophosphate-oligosaccharides possède une composition en accord avec la nature des glycosylnucléotides utilisés dans le milieu d'incubation : dans le premier système contenant de l'UDP-N-acétylglucosamine et du GDP-mannose, le glycanne des dolichol-pyrophosphate-oligosaccharides est composé de neuf résidus de mannose et de deux N-acétylglucosamines (panneau A₁). Le dérivé isoprénique obtenu en grande quantité lorsque l'UDP-glucose et le paranitrophényl- α -D-glucoside sont ajoutés au milieu réactionnel précédent, possède un oligosaccharide à trois glucoses, neuf mannoses et deux N-acétylglucosamines (Glc₃Man₉GlcNAc₂) comme indiqué dans le panneau B₁. Il faut remarquer que les dolichol - pyrophosphate-oligosaccharides glucosylés sont beaucoup moins dégradés que ceux non glucosylés : les phosphooligosaccharides glucosylés ne représentent que 25 p. cent de la population totale (panneau B₂).

Les panneaux A_3 et B_3 montrent la répartition des populations d'oligosaccharides liés aux protéines. Lorsque l'intermédiaire est le $Man_9GlcNAc_2$ -P-P-Dol, la migration du glycanne majeur lié aux protéines est analogue à celle d'un oligosaccharide témoin de composition $Man_9GlcNAc_2$ (panneau A_3). La présence de populations de poids moléculaire plus faible montrent qu'une maturation des néoglycoprotéines est possible, faisant intervenir vraisemblablement des mannosidases. La nature des populations de glycannes transférés sur les protéines lorsque le milieu d'incubation complet est utilisé (UDP-GlcNAc, GDP-Man, UDP-Glc, paranitrophényl- α -D-glucoside) figure dans le panneau B_3 . Les résultats obtenus

dans ce cas montrent que les oligosaccharides glucosylés ou non peuvent être transférés sur des accepteurs protéiques endogènes à partir des dérivés polypréniques correspondants. L'emploi de paranitrophényl-α-Dglucoside exclue l'action rapide de glucosidases sur les oligosaccharides glucosylés (Glc₃Man₉GlcNAc₂). Les glycannes non glucosylés ne peuvent donc avoir été transférés qu'à partir de l'intermédiaire lipidique non glucosylé (Man₉GlcNAc₂-P-P-Dol). Ceux-ci peuvent être aussi dégradés par des mannosidases, en composés de poids moléculaire plus faible.

- 115 -

Il apparait donc que, dans le cas du lymphocyte, l'oligosaccharidyltransférase n'a pas de spécificité stricte vis-à-vis de la nature de l'oligosaccharide des dérivés polypréniques. Elle permet le transfert sur les accepteurs protéiques endogènes d'oligosaccharides glucosylés (Glc₃Man₉GlcNAc₂), d'oligosaccharides non glucosylés (Man₉GlcNAc₂) mais aussi, comme nous l'avons montré précédemment, de motifs oligosaccharidiques plus courts comme le N,N'-diacétylchitobiose. DISCUSSION

Les recherches que nous avons effectuées sur la synthèse et le métabolisme des intermédiaires lipidiques en utilisant comme modèle le lymphocyte splénique de Rat, nous ont permis de dégager les points suivants :

- Il existe sur la membrane plasmique du lymphocyte des ectoglycosyltransférases permettant la synthèse et l'utilisation d'oligosaccharides liés à des intermédiaires lipidiques.

- La mannosylation de chitobiosylprotéines obtenues par transfert de N,N'-diacétylchitobiose à partir du dolichol-pyrophosphatechitobiose, pourrait offrir à la cellule une deuxième voie métabolique de N-glycosylation des protéines qui n'exigerait pas la synthèse complète d'un dolichol-pyrophosphate-oligosaccharide.

- Un enzyme capable d'hydrolyser la liaison pyrophosphate des intermédiaires lipidiques dont le glycanne n'est pas glucosylé constituerait l'"enzyme-clef" de la régulation de la N-glycosylation des protéines. La glucosylation aurait donc un rôle de protection des dolichol-pyrophosphate-oligosaccharides.

1°) Le premier objectif que nous nous étions fixé, était d'examiner si la biosynthèse d'un glycanne lié N-glycosidiquement à la protéine pouvait s'effectuer à la surface de la cellule. La mise en évidence d'ectoglycosyltransférases utilisant comme substrat les intermédiaires lipidiques de type dolichol constitue un premier argument pour la confirmation de cette hypothèse. Nous avons mené cette étude sur des cellules entières en tenant compte des causes d'erreurs suivantes :

a - L'hydrolyse du précurseur par les pyrophosphatases aboutissant à la libération de sucre libre radioactif qui peut rentrer dans la cellule et après réactivation, être utilisé par les glycosyltransférases intracellulaires. La radioactivité liée aux accepteurs endogènes n'est donc pas dans ce cas, à associer à un phénomène de

- 117 -

surface. Ce point a été résolu en inhibant les pyrophosphatases et en ajoutant dans les milieux réactionnels les sucres froids correspondants.

b - La présence dans les préparations cellulaires d'un faible pourcentage de cellules cassées libérant à la fois des activités glycosyltransférasiques intracellulaires et des précurseurs endogènes (glycosylnucléotides, Man-P-Dol). La comparaison des métabolismes des cellules intactes et d'homogénats ainsi que l'emploi de techniques de marquage externe par le borohydrure de potassium des produits synthétisés dans les deux systèmes, nous ont permis d'exclure cette éventualité.

La méthodologie que nous avons employée, nous a donc permis de conclure que les lymphocytes spléniques de Rat expriment à leur surface des activités glycosyltransférasiques (N-acétylglucosaminyl- et mannosyltransférases) capables de synthétiser à partir du GDP-mannose et de l'UDP-N-acétylglucosamine, différents intermédiaires lipidiques : Man-P-Dol, GlcNAc-P-P-Dol, (GlcNAc)₂-P-P-Dol et oligosaccharides-P-P-Dol. Une estimation de la taille de la partie glycannique du dolichol-pyrophosphate-oligosaccharide réalisée par des techniques de double marquage (UDP-[³H] GlcNAc, GDP-[¹⁴C] Man) et par des méthodes chromatographiques (gel filtration, chromatographie de couche mince), a pu être effectuée : l'oligosaccharide lié au dolichol et synthétisé par les ectoglycosyltransférases est de type Man₉GlcNAc₂. Le dolichol-pyrophosphate-oligosaccharride est utilisé comme substrat par l'ectooligosaccharidyltransférase pour glycosyler des accepteurs protéiques endogènes de la membrane plasmique. Il peut être dégradé par un enzyme qui libère des phosphooligosaccharides.

L'existence d'ectomannosyl- et d'ecto-N-acétylglucosaminyltransférases a déjà été décrite dans la littérature, mais aucun de ces travaux ne tient compte de la totalité des causes d'erreursmentionnées précédemment. En effet, ARNOLD *et al.* (317) ne contrôlent que la dégradation du précurseur dans le cas d'hépatocytes foetaux. Si WEISER (318) pour les cellules intestinales, PATT et GRIMES (319) pour les fibroblastes de Souris 3T3, STRUCK et LENNARZ (320) pour les cellules d'oviducte de Poule tiennent compte de l'hydrolyse du précurseur et de la libération

- 118 -

d'enzymes intracellulaires, aucun n'envisage la possibilité d'une libération de glycosylnucléotides endogènes. Quant aux travaux de McLEAN et BOSMANN (321) sur les chlamydomonas, aucun contrôle n'a été effectué. Nos travaux confirment les conclusions, peut-être un peu hâtives, de ces différents auteurs utilisant, comme nous, des cellules intactes. Ils démontrent l'existence d'ectomannosyl- et d'ecto-N-acétylglucosaminyltransférases constituant le cycle des dolichols ainsi que la présence d'une ectooligosaccharidyltransférase à la surface du lymphocyte splénique de Rat.

Si les surfaces cellulaires possédent des activités glycosyltransférasiques impliquées dans le cycle des dolichols et des dolichol - phosphates, la N-glycosylation des protéines peut donc s'effectuer sur la membrane plasmique. Les travaux réalisés antérieurement au Laboratoire, ont montré que la surface des lymphocytes exprime aussi des activités ectogalactosyltransférasiques (VERBERT *et al.* -322-), ectofucosyltransférasiques (HOFLACK *et al.* 323) et ectosialyltransférasiques (VERBERT *et al.* -324-, CACAN *et al.* -325-, HOFLACK *et al.* -326-).

La démonstration de l'existence sur la membrane plasmique des enzymes de maturation des glycannes ainsi que les N-acétylglucosaminyltransférases I et II nous permettrait de conclure que toute la machinerie enzymatique nécessaire à la synthèse d'un glycanne de type oligomannosidique, hybride ou N-acétyllactosaminique, est présente à la surface de la cellule. La biosynthèse de tels glycannes serait donc possible.

Cependant le problème de la signification physiologique de ces ectoglycosyltransférases reste entier : ces activités enzymatiques sont-elles simplement les témoins du métabolisme intracellulaire des glycosyltransférases qui parviendraient à la surface de la cellule par le processus du "membrane flow" et du recyclage des vésicules émises par les différents compartiments cellulaires (reticulum endoplasmique rugueux, lisse et appareil de Golgi) ou alors sont-elles vraiment impliquées dans les phénomènes cellulaires complexes comme la reconnaissance d'autres cellules comme l'a suggeré ROSEMAN (OPPENHEIMER et al. -327-) ou de glycoprotéines informationnelles, ou comme la synthèse en surface de glycoprotéines spécifiques. Dans le cas de cette dernière hypothèse, leur mode de fonctionnement in vivo reste encore à découvrir. En effet, les milieux extracellulaires ne renferment pas de glycosylnucléotides précurseurs contrairement aux milieux d'incubation que nous utilisons et le site actif des ectoglycosyltransférases est orienté vers le milieu extracellulaire. Une observation doit néanmoins être faite. Vis-à-vis du cytosol contenant les glycosylnucléotides, les glycosyltransférases des membranes plasmiques ont leur site catalytique orienté de la même manière que les glycosyltransférases des membranes internes : la membrane plasmique sépare le milieu extracellulaire du cytosol, les ectoglycosyltransférases intégrées dans cette membrane ont leur site actif dirigé vers le milieu extracellulaire ; la membrane du reticulum endoplasmique ou du Golgi sépare le cytosol de l'espace intracisternal et les glycosyltransférases intégrées dans ces membranes ont leur site actif orienté vers le milieu intracisternal. Un mécanisme analoque de transport des glycosylnucléotides à travers les membranes et de fonctionnement pourrait être envisagé pour les ectoglycosyltransférases et les glycosyltransférases intracellulaires. Par la mise en jeu des ectoglycosyltransférases, la cellule pourrait répondre rapidement aux attaques du milieu extérieur et maintenir un environnement membranaire constant ou, sous l'impulsion de stimuli, synthétiser rapidement des glycoprotéines membranaires spécifiques.

Si nous ne pouvons encore répondre à ces différentes questions que pose la cellule, il ne reste pas moins vrai qu'in vitro, les glycosyltransférases de la membrane plasmique représentent un excellent modèle d'étude pour explorer le mode de fonctionnement et le métabolisme d'enzymes intégrés dans une membrane biologique : leur site actif est directement accessible contrairement aux enzymes de préparations microsomiales qui, pour atteindre les conditions de fonctionnement maximal, exigent l'emploi d'agents déstabilisant l'architecture membranaire comme les détergents. D'autre part, ces ectoglycosyltransférases montrent une dépendance totale vis-à-vis des glycosylnucléotides ajoutés au milieu d'incubation. Synthétisant des produits parfaitement définis dont la composition est en accord total avec les glycosylnucléotides du milieu réactionnel, elles sont de précieux outils pour explorer les mécanismes de la N-glycosylation des protéines.

2°) En utilisant l'hydrazinolyse comme technique d'obtention des glycannes liés N-glycosidiquement à la protéine, nous avons pu aborder les problèmes de la spécificité *in vitto* du transfert d'oligosaccharides sur les accepteurs protéiques endogènes.

Incubées dans un milieu réactionnel simple ne contenant que l'UDP-GlcNAc comme précurseur, les ecto-N-acétylglucosaminyltransférases du lymphocyte splénique élaborent un intermédiaire lipidique majeur qui a été identifié au dolichol-pyrophosphate-chitobiose. La caractérisation du glycanne lié de façon covalente aux protéines montre que, dans ces conditions, des chitobiosylprotéines sont synthétisées à partir de cet intermédiaire lipidique. Nous plaçant dans des conditions où est totalement exclue la synthèse d'oligosaccharides-P-P-Dol à partir des (GlcNAc)₂-P-P-Dol préexistants, nous avons montré que des résidus mannosyl peuvent être directement transférés à partir du GDP-mannose (et/ou du dolichol-phosphate-mannose) sur les chitobiosylprotéines nouvellement synthétisées pour former des manno-chitobiosylprotéines. Cette observation, faite *in vitro*, nous a permis de poser comme hypothèse, l'existence d'une seconde voie de synthèse des N-glycosylprotéines.

Les résultats que nous avons obtenus, sont en accord avec les travaux de certains auteurs qui ont montré le transfert sur des accepteurs protéiques endogènes de courts chaînons saccharidiques comme la N-acétylglucosamine (KHALKALI et MARSHALL -328-), le di-N-acétylchitobiose (CHEN et LENNARZ -329-, HARFORD et WAECHTER -330-, LEHLE et TANNER -331-) ou come le β Man-(GlcNAc)₂ (CHEN et LENNARZ -332-). Cependant, nos résultats divergent en ce qui concerne la mannosylation de ces petites unités

- 121 -

saccharidiques présentes sur les protéines. En effet, celle-ci n'a pu être observée par CHEN et LENNARZ (333) et HARFORD et WAECHTER (334). Nous ne pouvons, hélas, apporter d'explications à ces résultats contradictoires si ce n'est la diversité du matériel utilisé comme source enzymatique : cellules entières dans notre cas, poudre acétonique de membranes microsomiales d'oviducte de Poule et microsomes préparés à partir de la substance blanche du cerveau dans le cas des études précédemment citées. Il faut néanmoins souligner que le transfert direct d'autres résidus glycosyl sur des accepteurs glycoprotéiques endogènes a été mis en évidence : RONIN et CASETI (335) ont en effet démontré, en utilisant comme source enzymatique des microsomes de glandes thyroidiennes que du glucose peut être directement incorporé à partir de l'UDP-glucose sur les protéines, dans des conditions où la synthèse des dolicholpyrophosphate-oligosaccharides glucosylés est inhibée.

Ces travaux soulèvent naturellement le problème de la signification physiologique de tels transferts. Ces résultats obtenus in vitro, sont-ils simplement les conséquences du manque de spécificité de l'oligosaccharidyltransférase vis-à-vis de la structure de l'oligosaccharide porté par le dolichol et des mannosyltransférases à l'égard de l'intermédiaire lipidique accepteur ou représentent-ils réellement une seconde voie de glycosylation des protéines ? Cette dernière hypothèse constituerait une voie de synthèse de glycoprotéines particulières ou serait le relai du cycle des dolichols dans le cas où la cellule ne peut synthétiser de dolichol-pyrophosphate-oligosaccharides matures. Cette seconde voie métabolique permettrait la confection d'un glycanne mature à partir des chitobiosylprotéines présentes.

3°) L'étude du métabolisme des intermédiaires lipidiques à la surface de la cellule a montré qu'un produit soluble composé de N-acétylglucosamine et de mannose apparait au cours de l'incubation dans le milieu réactionnel. Son poids moléculaire est analogue à celui des oligosaccharides liés aux dolichols. Il possède un résidu de phosphate estérifiant le carbone 1 de la N-acétylglucosamine interne puisque la β -endo-N-acétylglucosaminidase H libère à partir de ce produit de la N-acétylglucosamine-1-phosphate. De plus, ce composé possède comme précurseur le dolichol-pyrophosphateoligosaccharide : sa synthèse est inhibée par la tunicamycine et la bacitracine. Ces différents caractéristiques démontrent qu'une activité enzymatique peut hydrolyser la liaison pyrophosphate du dolichol-pyrophosphate-oligosaccharide pour libérer un oligosaccharide-phosphate et un dolichol-phosphate qui pourra, par la suite, être réutilisé. Ce processus de dégradation n'a jamais été décrit jusqu'à présent. Cet enzyme possède un large spectre d'action puisqu'il est capable d'utiliser comme substrat aussi bien le $(GlcNAc)_2$ -P-P-Dol que le Man₉GlcNAc₂-P-P-Dol. Grâce à l'emploi d'un inhibiteur des α -glucosidases du lymphocyte, nous avons pu montrer que l'oligosaccharide-P-P-Dol glucosylé est très faiblement dégradé par cet enzyme, contrairement à ce qui est observé avec le même intermédiaire lipidique non glucosylé. Il apparait donc que les dérivés polypréniques peuvent être engagés dans deux voies métaboliques :

1 - le transfert de l'oligosaccharide sur la protéine.

2 - la dégradation en phosphooligosaccharides solubles.

Ces deux voies métaboliques semblent très étroitement associées et il était très attrayant d'étudier l'influence de la dégradation des intermédiaires lipidiques sur le transfert de motifs oligosaccharidiques sur les protéines, ou en d'autres termes, d'étudier la spécificité du transfert catalysé par l'oligosaccharidyltransférase. Pour cela, nous avons étudié la répartition des oligosaccharides transférés sur les protéines endogènes : le glycanne transféré peut être la N-acétylglucosamine, le N,N'-diacétylchitobiose, des glycannes de type Man_oGlcNAc₂ ou Glc₃Man₉GlcNAc₂ suivant les conditions d'incubation utilisées. Il est remarquable de noter que la répartition des glycannes des glycoprotéines est le reflet exact des populations de dolichol-pyrophosphate-oligosaccharides présents. L'oligosaccharidyltransférase, étudiée dans notre système, ne montre donc pas de spécificité stricte à l'égard de l'oligosaccharide lié au dolichol. Une observation analogue a été faite par RONIN et al. (336) dans un système microsomial thyroidien et par SHARMA et al. (337) dans le cas de l'oligosaccharidyltransférase purifiée de la Levure.

Ces différents résultats nous ont permis d'établir l' hypothèse que le transfert de l'oligosaccharide sur la protéine n'est pas à relier à la spécificité de l'oligosaccharidyltransférase mais à la spécificité de la phosphodiestérase pour l'oligosaccharide lié au dolichol. En effet, ou bien le dolichol-pyrophosphate-oligosaccharide est glucosylé, il n'est donc pas dégradé en phosphooligosaccharides, sa concentration au niveau de la membrane est maintenue élevée, l'oligosaccharide peut donc être transféré efficacement sur la protéine. Ou bien, il n'est pas glucosylé, il est alors dégradé par la phosphodiestérase. Cet enzyme agit donc en régulant le taux intracellulaire de dolichol-pyrophosphate-oligosaccharide glucosylé mature (le précurseur) et par conséquent la N-glycosylation des protéines. Cette hypothèse est illustrée dans la Figure 25 (p.125).

Si nous revenons maintenant sur les travaux réalisés par les différents auteurs, examinant l'influence de la glucosylation du dolicholpyrophosphate-oligosaccharide sur le transfert d'oligosaccharides sur les accepteurs protéiques endogènes, les résultats qui, au premier abord, semblent contradictoires, peuvent être interprétés de façon plus cohérente si l'action de la phosphodiestérase sur les intermédiaires lipidiques est prise en considération. En effet, l'influence de la glucosylation est visualisée par la formation du produit final de réaction, c'est-à-dire la glycoprotéine, et dans ce cas l'apparition d'une glycoprotéine glucosylée est interprétée uniquement en terme de spécificité d'oligosaccharidyltransférase. Les études réalisées in vivo par marquage métabolique apportent un argument de poids à notre démonstration. Dans les fibroblastes d'embryons de Poulet, HUBBARD et ROBBINS (338) ne mettent en évidence qu'une population de dolichol-pyrophosphate-oligosaccharidesdont le glycanne est de type Glc₃Man₉GlcNAc₂. Ce phénomène est confirmé dans le cas de synthèse anormale d'oligosaccharides-P-P-Dol : REARICK et al. (339), dans les cellules ovariennes d'Hamster chinois, déficientes dans la synthèse dolichol-phosphate-mannose, caractérisent le Glc_Man_GlcNAc_-P-P-Dol. TROWBRIDGE et HYMAN (340) font la même observation pour les cellules de classe E-Thy-1 négatif de lymphome où l'intermédiaire lipidique unique est caractérisé comme le Glc₃Man₅ GlcNAc₂-P-P-Dol (CHAPMAN et al. -341-). Il apparait donc que seuls, les


BUS

-125-

intermédiaires lipidiques glucosylés, pouvant contenir un nombre variable de résidus de mannose, sont stables in vivo, et dans toutes les études citées précédemment, l'oligosaccharide transféré sur la protéine est l'oligosaccharide glucosylé.

Un certain nombre de travaux ont été effectués en ajoutant des dolichol-pyrophosphate-oligosaccharides exogènes, glucosylés ou non, à des préparations de membranes microsomiales. TURCO et al. (342), MURPHY et SPIRO (343) ainsi que TRIMBLE et al. (344) ont montré en mesurant la radioactivité liée aux protéines que l'oligosaccharide le plus efficacement transféré est l'oligosaccharide glucosylé de type $Glc_{3}Man_{q}GlcNAc_{2}$. STANELONI et al. (345), en visualisant la disparition du Glc₃-Man_aGlcNAc₂-P-P-Dol, ont déduit que celui-ci est plus efficacement transféré sur les protéines endogènes. Cependant, aucun de ces auteurs n'utilise une méthode d'étude permettant la prise en considération d'une dégradation éventuelle des intermédiaires lipidiques. Travaillant avec de très faibles quantités de substrat exogène marqué, la phosphodiestérase peut donc très rapidement dégrader les dolichol-pyrophosphate-oligosaccharides non glucosylés et alors, le seul substrat utilisable par l'oligosaccharidyltransférase est le Glc₃Man₉GlcNAc₂-P-P-Dol qui reste stable. Ces résultats ne doivent donc pas être interprétés en terme de spécificité de l'oligosaccharidyltransférase vis-à-vis d'un substrat donné mais plutôt en terme de spécificité de phosphodiestérase.

Le manque de spécificité de l'oligosaccharidyltransférase peut être observée *in vitto*, lorsque des préparations de membranes sont incubées en présence de glycosylnucléotides utilisés comme précurseurs. Comme nous l'avons vu dans le deuxième point de cette discussion, l'oligosaccharidyltransférase transfère sur un accepteur protéique de courts chaînons saccharidiques ou des glycannes plus complets comme le Man₉GlcNAc₂. Lorsque l'UDP-Glc est ajouté à des préparations microsomiales de fibroblastes, ROBBINS *et al*. (346) ont montré que les glycopeptides obtenus par traitement pronasique des glycoprotéines nouvellement synthétisées, montrent la même répartition que les oligosaccharides liés aux dolichols.

- 126 -

Par ailleurs, RONIN *et al.* (347) n'observent pas de modification du transfert d'un oligosaccharide qu'il soit glucosylé ou non. Dans notre système, nous faisons la même observation. Dans les systèmes d'incubation *in vitto*, les dolichol - pyrophosphate-oligosaccharides semblent être synthétisés en très large excès par rapport à la quantité d'accepteurs endogènes protéiques à glycosyler. La phosphodiestérase ne peut hydrolyser la totalité des oligosaccharides-P-P-Dol qui sont constamment renouvelés. L'oligosaccharidyltransférase peut donc alors utiliser n'importe quel intermédiaire lipidique mis à sa disposition. Pour conclure, la spécificité de l'oligosaccharide-P-P-Dol, a été étudiée dans des préparations d'enzyme purifié à partir de microsomes de Levure : SHARMA *et al.* (348) ont démontré que l'oligosaccharidyltransférase a la même affinité pour le (GlcNAc)₂-P-P-Dol que pour le Glc₃Man₉GlcNAc₂-P-P-Dol.

La phosphodiestérase que nous avons mise en évidence, peut être considérée comme l'"enzyme-clef" de la glycosylation des protéines. Elle peut hydrolyser la liaison pyrophosphate d'intermédiaires lipidiques comme le (GlcNAc)₂-P-P-Dol ou le Man₉GlcNAc₂-P-P-Dol. Bien que son efficacité n'ait pas encore été testée pour des dolichol - pyrophosphateoligosaccharides contenant un nombre variable de résidus mannosyl, il apparait que cet enzyme régule la synthèse de l'oligosaccharide-P-P-Dol mature et de ses précurseurs. Le Glc₃Man₉GlcNAc₂-P-P-Dol, très faiblement dégradé par la phosphodiestérase peut alors être transféré sur l'accepteur protéique. La régulation de la glycosylation des protéines met donc en jeu l'action combinée des glucosyltransférases et de la phosphodiestérase.

La glucosylation de l'oligosaccharide-P-P-Dol reste donc l'évènement important dans la destinée des intermédiaires lipidiques et peut toujours être considérée comme le signal du transfert de l'oligosaccharide sur la protéine. Mais ce "message" ne s'adresse pas à l'oligosaccharidyltransférase, il a pour cible la phosphodiestérase.

RESUME ET CONCLUSIONS

Les recherches effectuées au cours de ces dernières années dans le domaine des glycoprotéines ont fait ressortir l'importance de la copule glucidique dans de nombreux phénomènes biologiques aussi divers que la régulation de la durée de vie des glycoprotéines sériques, l'infection virale des cellules, le transport des enzymes lysosomiaux, la reconnaissance et l'adhésion des cellules. Les observations ont suscité le concept du glycanne porteur d'un signal de reconnaissance et ont placé la glycosylation au premier rang des modifications coet post-traductionnelles des protéines.

Les études que nous avons menées sur la biosynthèse des Nglycosylprotéines en utilisant comme modèle le lymphocyte splénique de Rat, nous ont permis de dégager les points suivants :

1 - En utilisant des méthodes évitant l'expression des glycosyltransférases intracellulaires et en comparant les activités glycosyltransférasiques portées par les membranes endoplasmiques et par les membranes plasmiques, nous avons démontré que le lymphocyte exprime à sa surface des activités glycosyltransférasiques utilisant comme intermédiaires des lipides de type dolichol. Ces ectoglycosyltransférases greffent sur le dolichol-phosphate, de la N-acétylglucosamine, du mannose, et du glucose et élaborent un dolichol-pyrophosphate-oligosaccharide. L'oligosaccharide synthétisé sur l'intermédiaire lipidique est ensuite transféré en bloc sur les accepteurs protéiques de la membrane plasmique. Des activités glycosyltransférasiques du reticulum endoplasmique rugueux pourraient donc atteindre cette dernière par le mouvement du "membrane flow" et s'exprimer à la surface de la cellule.

2 - Grâce au modèle des ectoglycosyltransférases, nous avons précisé quelques mécanismes de la N-glycosylation des protéines. Nous avons notamment pu mettre en évidence la dégradation du dolichol-pyrophosphate-oligosaccharide en phosphooligosaccharide qui peut être ensuite métabolisé par la cellule. Cette dégradation ne s'effectue que si le dolichol-pyrophosphate-oligosaccharide n'est pas encore glucosylé. Cette

- 128 -

réaction que nous avons découverte, est spécifique des motifs oligosaccharidiques non glucosylés et apparait comme une étape-clef de la Nglycosylation des protéines en régulant le taux du seul intermédiaire lipidique stable : le dolichol-pyrophosphate-oligosaccharide glucosylé. Celui-ci, maintenu à une concentration suffisamment élevée, peut être alors plus facilement utilisé comme substrat par l'oligosaccharidyltransférase qui, comme il a été montré *in vivo* greffe sur la protéine un oligosaccharide glucosylé.

3 - Contrairement à ce que nous avons pu observer pour la réaction de dégradation des dolichol-diphosphate-oligosaccharides, l'oligosaccharidyltransférase du lymphocyte ne montre pas de spécificité stricte pour le motif glycannique porté par le dolichol-pyrophosphate. En effet, cet enzyme peut transférer sur des accepteurs endogènes aussi bien des oligosaccharides glucosylés ou non, que de courts chaînons saccharidiques, comme la N-acétylglucosamine et le chitobiose à partir des intermédiaires lipidiques correspondants. En outre, utilisant des conditions où la synthèse du dolichol-pyrophosphate-oligosaccharide est totalement inhibée, nous avons montré que les chitobiosylprotéines ainsi formées pouvaient être allongées par l'intermédiaire du GDP-mannose et/ou du dolichol-phosphate-mannose, en structures de type oligomannosidique. Si cette voie métabolique pouvait être retrouvée *in vivo*, elle représenterait, à côté de la voie classique, une seconde route de N-glycosylation des protéines.

- 129 -

APPENDICE TECHNIQUE

Ce chapitre rappellera brièvement les techniques que nous avons utilisées et qui ne sont pas détaillées dans les articles précédents.

I - LES LYMPHOCYTES SPLENIQUES DE RAT

A - PREPARATION

Les lymphocytes sont préparés à partir de rate de rats Wistar agés de 6 semaines environ. Les différentes opérations sont effectuées à 4°C. Dans un premier temps, la rate est dilacérée dans le tampon Cacodylate/NaCl pH 7,4 (Cacodylate 0,1 M ; NaCl 0,154 M). Après filtration sur gaze, la suspension est centrifugée à 500 g pendant 5 min. Le culot cellulaire est repris dans un tampon d'hémolyse (NH_4 Cl 0,154 M ; KHCO₃ 0,01 M ; EDTA 1 mM) contenant 10 p. cent de sérum de Veau foetal, afin d'éliminer les hématies contaminant la préparation. Après centrifugation à 500 g pendant 5 min, les lymphocytes sont repris dans le tampon Cacodylate/NaCl et filtrés sur gaze. Une centrifugation à 500 g pendant 5 min permet d'obtenir un culot de lymphocytes qui est repris par un volume adéquat de même tampon pour obtenir la concentration cellulaire désirée.

B - NUMERATION ET VIABILITE CELLULAIRE

Les lymphocytes sont comptés grâce à la cellule à numération de Malassez. La mesure de la viabilité cellulaire est réalisée par le test au bleu trypan : les cellules sont mises en suspension dans le tampon Cacodylate/NaCl contenant du bleu trypan (concentration finale $0,02 \ \%_{\circ}, p/v$). Le pourcentage de cellules colorées indique le pourcentage de cellules non viables. En général, nos suspensions cellulaires contiennent moins de 10 p. cent de cellules colorées. Toute préparation ne correspondant pas à cette norme, n'est pas utilisée pour la suite des expériences d'incorporation. L'incubation des lymphocytes à 30°C pendant 30 min ne modifie pas la viabilité cellulaire.

C - <u>CONTRÔLE DE L'INTEGRITE DES LYMPHOCYTES PAR MICROSCOPIE</u> ELECTRONIQUE *

L'intégrité des lymphocytes a été contrôlée à différentes étapes de la préparation.

Les culots de lymphocytes sont fixés pendant une heure par la glutaralhédyde à 2,5 % dans un tampon cacodylate 0,06 M pH 7,4. Après lavage dans le même tampon, les pièces sont fixées pendant 1,5 h à 4°C par le tétroxyde d'osmium (solution à 1 % dans le même tampon). Après lavage dans le tampon Cacodylate 0,1 M, NaCl 0,154 M pH 7,4 les culots sont imprégnés dans des solutions aqueuses d'acétone : 50 % (V/V) 2 fois 5 min ; 70 % (V/V) 2 fois 8 min ; 90 % (V/V) 2 fois 15 min, puis acétone pure 2 fois 30 min. Après imprégnation pendant 1,5 heuresdans une solution d'araldite dans l'acétone, les culots sont inclus dans l'araldite pure, coupés et contrastés par l'acétate d'uranyl en solution alcoolique et par les sels de plomb.

La planche 1 (p.132) montre les images obtenues. Avant l'étape d'hémolyse, la population est très hétérogène, on distingue des globules rouges, des plaquettes, des macrophages et des leucocytes. Après hémolyse, le culot contient 95 % de lymphocytes dont la morphologie est bien conservée et dont la membrane plasmique n'est pas lésée.

* Les différents contrôles effectués en microscopie électronique ont été réalisés par M. Bernard LASALLE que nous remércions.

- 131 -



PLANCHE 1 : Observation au microscope électronique de la préparation de lymphocytes : a, avant hémolyse (x 5000) ; b, après hémolyse (x 6000) ; c, lymphocyte (x 12000) ; d, aspect de la membrane lymphocytaire (x 32000).

II - EXTRACTION SEQUENTIELLE DES INTERMEDIAIRES LIPIDIQUES

Les méthodes classiques d'extraction des intermédiaires lipidiques ne conviennent pas au cas des lymphocytes et nous avons du adapter une méthode particulière, pour extraire quantitativement les dérivés polypréniques de nos cellules. Les différentes étapes de la méthode sont décrites dans la Figure 26 p. 134.

Cette méthode de préparation nous permet d'obtenir :

1 - Une phase chloroforme/méthanol contenant les intermédiaires
lipidiques de type dolichol contenant un ou deux résidus glycosyl :
Man-P-Dol, Glc-P-Dol, (GlcNAc) 1-2-P-P-Dol ;

2 - Une phase aqueuse renfermant les glycosylnucléotides marqués, leurs produits de dégradation (sucre-1-phosphate, sucre) et les produits de dégradation des intermédiaires lipidiques (phosphooligosaccharides) ;

3 - Une phase chloroforme/méthanol/eau qui permet l'extraction des dolichol-pyrophosphate-oligosaccharides ;

 4 - Un résidu protéique renfermant les protéines nouvellement glycosylées.

III - CARACTERISATION DES PRODUITS OBTENUS DANS LES PHASES ORGANIQUES

Différents tests permettent de caractériser les produits extraits par la phase chloroforme/méthanol et la phase chloroforme/méthanol/eau :

- 1 comportement chromatographique des intermédiaires lipidiques sur couche mince ;
- 2 comportement sur colonne de DEAE-cellulose ;
- 3 les traitements doux par les acides et les bases.

- 133 -



-134-

A - CARACTERISATION PAR CHROMATOGRAPHIE DE COUCHE MINCE

Après extraction, les dérivés polypréniques sont analysés par chromatographie de couche mince sur gel de silice (Kieselgel G -Merck) dans un système solvant couramment utilisé par les différents auteurs et constitué du mélange chloroforme/méthanol/eau dans les rapports 60 : 25 : 4 (v/v). Après chromatographie, des bandes de 0,5 cm x 2 cm sont découpées le long du trajet de migration et leur radioactivité est déterminée en scintillation liquide. Ce test chromatographique permet de visualiser l'homogénéité de chaque fraction organique obtenue. Les résultats sont rassemblés dans la Figure 27 p. 136.

Les dérivés polypréniques glycosylés montrent des migrations analogues à celles retrouvées par les différents auteurs utilisant ce système solvant (voir la revue de BEHRENS et TABORA -349-).

Cependant, les oligosaccharides-P-P-Dol ne migrent pas dans ce système solvant, nous les avons donc analysés par chromatographie de couche mince sur cellulose (Merck) dans le système solvant acétate d'éthyle/butanol/acide acétique/eau (6 : 8 : 5 : 8, v/v). Après migration, la radioactivité est déterminée comme précédemment. Le résultat obtenu est présenté dans la Figure 28 p. 136. Les oligosaccharides-P-P-Dol obtenus après marquage soit à l'UDP- $\begin{bmatrix} 14 \\ C \end{bmatrix}$ GlcNAc, soit au GDP- $\begin{bmatrix} 14 \\ C \end{bmatrix}$ Man, migrent dans ce système solvant avec un Rf identique de l'ordre de 0,5.

B - <u>COMPORTEMENT CHROMATOGRAPHIQUE DES INTERMEDIAIRES LIPIDIQUES</u> SUR COLONNE D'ECHANGE D'IONS (DEAE-cellulose)

La DEAE-cellulose permet de caractériser les groupements phosphates ou pyrophosphates des dérivés polypréniques.

- 135 -



FIGURE 27 : Comportement chromatographique des intermédiaires lipidiques sur plaque de couche mince de silice dans le système solvant Chloroforme/méthanol/eau (60 : 25 : 4, v/v)

- A : phase chloroforme/méthanol, précurseur utilisé GDP-[¹⁴C]Man B : phase chloroforme/méthanol, précurseur utilisé UDP-[¹⁴C]GlcNAc
- C : phase chloroforme/méthanol, précurseur utilisé UDP-[³H] Glc
- D : phase chloroforme/méthanol/eau, précurseur utilisé ou GDP-[14C] Man ou UDP-[14C] GLCNAC ou UDP-[14C] GLC.



FIGURE 28 : Comportement chromatographique des dolichol-pyrophosphateoligosaccharides sur plaque de couche mince de cellulose dans le système solvant acétate d'éthyle/n-butanol/acide acétique/eau (6 : 8 : 5 : 8, v/v).

-136-

Dans un premier temps, la DEAE-cellulose (Whatman DE-52) est mise sous forme acétate en la laissant une nuit dans l'acide acétique glacial. Puis, celle-ci est rincée abondamment sur filtre Büchner par du méthanol puis par le mélange chloroforme/méthanol (2 : 1, v/v). Elle est ensuite remise en suspension dans ce même solvant et des colonnes de 0,5 ml sont montées dans des pipettes Pasteur. L'échantillon (environ 5000 c.p.m.) est déposé au sommet de la colonne. L'élution est réalisée par passages successifs de 20 ml des différents solvants (voir légende de la Figure 29 p.138). Les fractions obtenues sont séchées sous azote et leur radioactivité est déterminée par comptage en scintillation liquide. Les corrections de "quenching" sont effectuées par la méthode du standard externe. Les résultats obtenus sont présentés dans les Figures 29 (p.138) et 30 (p. 139).

Les profils d'élution des différents composés contenus dans les phases chloroforme/méthanol (Figure 29) montrent que le dolicholphosphate-mannose et le dolichol-phosphate-glucose sont élués par le solvant chloroforme/méthanol (2 : 1, v/v) contenant 10 mM en acétate d'ammonium. Lorsque l'UDP-glucose est utilisé comme précurseur radioactif, la phase chloroforme/méthanol contient en outre un composé non retenu par ce type d'échangeur d'ions qui a été identifié au glucosylcéramide. Enfin, le marquage par l'UDP- $\begin{bmatrix} ^{14}C \end{bmatrix}$ N-acétylglucosamine visualise la formation de composés possédant deux groupements phosphates puisqu'ils sont élués par le mélange chloroforme/méthanol (2 : 1 v/v) contenant de plus hautes concentrations d'acétate d'ammonium (50 mM).

Les dolichol-pyrophosphate-oligosaccharides extraits par le solvant chloroforme/méthanol/eau (10 : 10 : 3, v/v) sont élués de la colonne de DEAE-cellulose par le même solvant contenant 10 mM en acétate d'ammonium (Figure 30 p. 139). Un phénomène autre que l'échange d'ions semble intervenir : la solubilité de cet intermédiaire lipidique dans les différents solvants utilisés.

- 137 -



- FIGURE 29 : Profils d'élution obtenus au cours de la chromatographie des phases chloroforme/méthanol sur DEAE-cellulose. Les précurseurs radioactifs utilisés sont le GDP-[¹⁴C] mannose (A), l'UDP-[¹⁴C] N-acétylglucosamine (B), l'UDP-[¹⁴C]glucose (C). Les différents produits sont élués par passages successifs de 20 ml des solvants suivants :
 - a : chloroforme/méthanol (2 : 1, v/v)
 - b : méthanol
 - c : chloroforme/méthanol (2 : 1, v/v) contenant de l'acétate d'ammonium (concentration finale 10 mM)

605

- d : chloroforme/méthanol (2 : 1, v/v) contenant de l'acétate d'ammonium (concentration finale 50 mM)
- e : chloroforme/méthanol/eau (10 : 10 : 3, v/v) 10 mM en acétate d'ammonium.



FIGURE 30 : Chromatographie sur DEAE-cellulose des composés contenus dans les phases chloroforme/méthanol/eau (10 : 10 : 3, v/v) obtenues après incubation des lymphocytes en présence de GDP-[¹⁴C] mannose et d'UDP-[³H]N-acétylglucosamine (A) ou d'UDP-[³H]glucose (B).

Les différents solvants d'élution utilisés (a, b, c, d, e) sont identiques à ceux décrits dans la Figure 29.

BUS

C - TRAITEMENTS MENAGES PAR LES ACIDES ET LES BASES

Ils sont caractéristiques de la chaîne polyisoprénique α -saturée de type dolichol.

1) Hydrolyse acide douce : L'échantillon (5000 c.p.m. environ) est séché sous azote puis repris dans 0,5 ml de méthanol. Après addition de 0,5 ml d'une solution d'HCl 0,02 M dans l'eau, le mélange est porté sous reflux à 100°C pendant 15 min. Puis une neutralisation est effectuée par addition de 0,5 ml d'une solution de NaOH 0,02 M dans le méthanol. Un déphasage est réalisé par addition de 1,5 ml de chloroforme. Après agitation et centrifugation, les phases supérieures aqueuses (contenant les mono- et oligosaccharides) et les phases inférieures organiques sont séchées et comptées en scintillation liquide. Quelque soit le produit de départ envisagé, Man-P-Dol, (GlcNAC)₁₋₂-P-P-Dol, Glc-P-Dol, oligosaccharides-P-P-Dol, plus de 95 p. cent de la radioactivité est retrouvée dans la phase supérieure aqueuse.

2) Traitement alcalin ménagé : Une procédure analogue est suivie : l'échantillon séché est repris dans le chloroforme/méthanol (1/4) contenant du NaOH 0,1 M et est maintenu à 37°C pendant 15 min. Après neutralisation par le formiate d'éthyle, un système biphasique est reconstitué par addition d'eau et de chloroforme. Les deux phases obtenues sont séchées et comptées en scintillation liquide. Tous les intermédiaires lipidiques cités précédemment sont résistants à ce traitement puisque toute la radioactivité est retrouvée dans la phase inférieure organique.

IV - CARACTERISATION DES GLYCANNES DES GLYCOPROTEINES NEOSYNTHETISEES

La libération quantitative des glycannes liés N-glycosidiquement à la protéine est obtenue par action de l'hydrazine sur le culot protéique délipidé.

Après extraction des intermédiaires lipidiques par la méthode précédemment décrite, le culot est lavé abondamment par le mélange chloroforme/méthanol/eau (10 : 10 : 3, v/v) puis par le méthanol. Il est séché une nuit sous dessicateur à P_2O_5 à 50°C. Le culot protéique est solubilisé dans 0,5 ml d'hydrazine anhydre et le mélange est porté à 105°C pendant 20 heures. L'hydrazine est ensuite évaporée sous azote et le résidu rincé plusieurs fois par 2 ml de toluène qui sont évaporés sous azote. Le résidu sec est ensuite abandonné 24 heures sous dessicateur à H_2SO_4 pour éliminer les dernières traces d'hydrazine. Le résidu, repris dans 1 ml d'acide acétique 0,1 M,est désalé sur une colonne de Biogel P-2 (1 x 40 cm). L'élution s'effectue dans l'acide acétique 0,1 M au débit de 7 ml/h. Les fractions renfermant le matériel radioactif sont rassemblées, évaporées sous pression réduite.

Le résidu sec est repris dans 1 ml d'une solution de bicarbonate de sodium saturé, la réacétylation des glycannes est effectuée par additions successives d'anhydride acétique. La fraction glycannique est soit analysée par chromatographie de tamisage moléculaire sur colonne de Biogel P-4 (1 x 90 cm) soit désalée sur Biogel P-2 comme décrit précédemment avant d'être déposée sur une plaque de silice (Kieselgel-Merck). La chromatographie de couche mince est alors développée dans le système solvant éthanol/butanol/pyridine/acide acétique/eau (100 : 10 : 10 : 3 : 30, v/v). L'autoradiographie du chromatogramme de couche mince est réalisé suivant la méthode décrite par LASKEY (350).

V - MARQUAGE EXTERNE PAR LE BOROHYDRURE DE POTASSIUM DES OLIGOSACCHARIDES-P-P-DOL

Les $[{}^{14}C]$.Man-oligosaccharides-P-P-Dol obtenus à partir de cellules intactes et d'homogénats sont d'abord purifiés par chromatographie d'échange d'ions sur DEAE-cellulose et désalés sur LH-20 en utilisant comme solvant le chloroforme/méthanol/eau (10 : 10 : 3, v/v). Ils sont alors soumis à l'hydrolyse acide douce par l'HCl comme décrit précédemment.

Les oligosaccharides sont repris par 400 μ l de tampon Borate de sodium 0,1 mM pH 11,4 contenant du B $\begin{bmatrix} 3_H \end{bmatrix}_4 K$ (concentration finale : 10 μ M, radioactivité spécifique : 11 000 d.p.m/pM). Le mélange est laissé 20 heures à température ambiante, puis l'excès de borohydrure de potassium est détruit par addition de quelques gouttes d'acide acétique. De la Dowex 50 x 8 (forme H^+) est ajoutée au mélange, le surnageant est ensuite séché. Le résidu est lavé plusieurs fois par du méthanol qui est évaporé sous azote.

L'échantillon est ensuite repris dans l'acide acétique 0,1 M et est désalé sur colonne de Biogel P-2 (1 x 50 cm) en utilisant comme tampon d'élution l'acide acétique 0,1 M. Les fractions contenant les oligosaccharides sont rassemblées et séchées sous pression réduite. Le résidu est soumis à une électrophorèse sur papier pendant 4 heures à 400 volts en utilisant comme tampon le mélange pyridine/acide acétique/ eau (15 : 50 : 1935 v/v). Les oligosaccharides sont ensuite élués et leur radioactivité est déterminée par comptage en scintillation liquide. Les corrections de quenching sont effectuées par la méthode du standard externe.

BIBLIOGRAPHIE

	Références	Pages
ALI I.U., MAUTNER V., LANZA R., HYNES R.O. Cell, 11 (1977) 115-	252	66
ARNOLD D., HOMMEL E., RISSE H.J. Biochem. Biophys. Res. Commun., 54 (1973) 100-107	277 317	70 118
ARNOLD D., HOMMEL E., RISSE H.J. Mol. Cell. Biochem., 11 (1976) 137-147	278	70
ASHFORD D., DESAI N.N., ALLEN A.K., NEUBERGER A., O'NEILL M.A., SELVENDRAN R.R. Biochem. J., 201 (1982) 199-208	53	15
ASHWELL G., MORELL A. 1978, in Glycoconjugates Vol. II, HOROWITZ M. et PIGMAN W. (Ed. Académic Press, New-York, London, 231-234	16 s),	7
ATKINSON P.H., HAKIMI J. 1980 in Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans, LENNARZ W.J. (Ed.), Plenum Press, New-York, 191-228	249	66
AUBERT J.P., BISERTE G., LOUCHEUX-LEFEBVRE M.H. Arch. Biochem. Biophys., 175 (1976) 410-418	141	34
AUBERT J.P., CHIROUTRE M., KERCKAERT J.P., HELBECQUE N., LOUCHEUX-LEFEBVRE M.H. Biochem. Biophys. Res. Commun., 104 (1982) 1550-1557	143	34
BAEZINGER J., KORNFELD S. J. Biol. Chem., 249 (1974) 7260-7269	61	17
BARTLES J.R., FRAZIER W.A. J. Biol. Chem., 255 (1980) 30-38	32	9
BAYARD B., KERCKAERT J.P. Eur. J. Biochem., 113 (1981) 405-414	66	18
BEELEY J.F. Biochem. Biophys. Res. Commun., 76 (1977) 1051-1055	140	34
BEHRENS N.H., TABORA E. 1978, in Methods in Enzymology, Vol. L, GINSBURG V. (Ed.) Academic Press, New-York, 402-435	74 83 349	23 24 135
BENNETT G., LEBLOND C.P. Histochem. J., 9 (1977) 393-417	246	64
BENNETT G., LEBLOND C.P., HADDAD A. J. Cell. Biol., 60 (1974) 258-284	244	64

	Références	Pages
BERGERON J.J.M., EVANS W.H., GESCHWIND I.I. J. Cell. Biol., 59 (1973) 771-776	269	68
BEYER T.A., PRIEELS J.P., HILL R.L. 1979, in Glycoconjugate Research, Proceedings of the IVth International Symposium on Glycoconjugates, Vol. II, GREGORY J.D. et JEANLOZ R.W. (Eds), Academic Press, New-York, 641-643	192	46
BEYER T.A., REARICK J.I., PAULSON J.C., PRIEELS J.P.,	199	48
SADLER J.E., HILL R.L.	200	47
J. BIOL. Chem., 254 (1979) 12531-12541	217	54
BLOBEL G., DOBBERSTEIN B. J. Cell. Biol., 67 (1975) 835-851	144	34
BOSMANN H.B. Biochim. Biophys. Acta, 339 (1974) 438-441	296	71
BOSMANN H.B., BIEBER G.F., BROWN A.E., CASE K.R., GEISTEN D.M., KLIMMERER T.W., LIONE A. Nature, 246 (1973) 487-489	272	70
BOSMANN H.B., MCLEAN R.J. Biochem. Biophys. Res. Commun., 67 (1975) 323	280 306	70 78
BUTLER W.T. 1978, in the Glycoconjugates, Vol. II, HOROWITZ M., PIGMAN W. (Eds), Academic Press, New-York, 79-85	52	15
CACAN R., VERBERT A., HOFLACK B., MONTREUIL J. FEBS-Lett., 81 (1977) 53-56	325	119
CARSON D.D., LENNARZ W.J. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 76 (1979) 5709-5713	209	50
CEBULA T.A., ROTH S. 1976, in Biogenesis and Turnover of Membrane Macromolecules, COOK T.S. (Ed.), Raven Press, New-York, 235	300	73
CECCARINI C., ATKINSON P.H. Biochim. Biophys. Acta, 500 (1977) 197-207	260	67
CHAPMAN A., LI E., KORNFELD S.	88	26
J. Biol. Chem., 254 (1979) 10243-10249	98	28
CHAPMAN A., TROWBRIDGE I.S., HYMAN R., KORNFELD S.	97	28
Cell, 17 (1979) 509-515	180	42
	341	124

	Références	Pages
CHEN W.W., LENNARZ W.J. J. Biol. Chem., 251 (1976) 7802-7809	118 332	32 121
CHEN W.W., LENNARZ W.J. J. Biol. Chem., 252 (1977) 3473-3479	117 315 329 333	32 107 121 122
CHOI M.G., HYNES R.O. J. Biol. Chem., 254 (1979) 12050-12055	153	38
CHOU P.Y., FASMAN G.D. Biochemistry, 13 (1974) 211-245 J. Mol. Biol., 115 (1977) 135-175	142	35
CODINGTON J.F., LINSLEY K.B., JEANLOZ R.W., IRIMURA T., OSAWA S. Carbohydr. Res., 40 (1975) 171-182	42	14
COMAN D.R. Cancer Res., 20 (1960) 1202-1209	265	68
CONCHIE J., STRACHAN I. Carbohydr. Res., 63 (1978) 193-213	58	14
CZICHI U., LENNARZ W.J. J. Biol. Chem., 252 (1977) 7901-7904	145	36
DAHR W., UHLENBRUCK G., GUNSON H.H., Van Der HART J. Vox Sang., 28 (1975) 249-252	41	14
DATTA P. Biochemistry, 13 (1974) 3987-3991	293	69
DEBEIRE Ph., HOFLACK B., CACAN R., VERBERT A., MONTREUIL J. Biochimie, 59 (1977) 473-476	220	56
EBERT W., ROELCKE D., WEICKER H. Eur. J. Biochem., 53 (1975) 505-515	15	7
ELBEIN A.D. Ann. Rev. Plant. Physiol., 30 (1979) 239-272	85 228	26 59
ELTING J.J., CHEN W.W., LENNARZ W.J. J. Biol. Chem., 255 (1980) 2325-2331	158	38
EVANS W.M. Nature, 250 (1974) 391-395	205	50
FEIZI T. TIBS, 6 (1981) 333-335	263	68

	Références	Pages
FINNE J. Biochim. Biophys. Acta, 412 (1975) 317-325	44	14
FINNE J., KRUSIUS T., MARGOLIS R.K., MARGOLIS R.U. J. Biol. Chem., 254 (1979) 10295-10300	50	15
FLEISCHER B. J. Cell Biol., 89 (1981) 246-255	184	44
FLICKINGER C.J. Exp. Cell Res., 96 (1975) 189-201	245	64
FOURNET B., MONTREUIL J., STRECKER G., DORLAND L., HAVERKAMP J., VLIEGENTHART J.P.K., BINETTE J.P., SCHMID K. Biochemistry, 17 (1978) 5206-5214	62	17
FRANCOIS-GERARD C.H., BROCTEUR J., ANDRE A., GERDAY C., PIERCE-CRETEL A., MONTREUIL J., SPIK G. Blood transfusion and Immunohaematology, Tome XXIII n° 5 (1980) 579-588	63a	17
FRANKE W.W., MORRE D.J., DEUMLING B., CHEETHAM R.D., KARTENBECK J., JARASCH E.D., ZENTGRAF H.W. Z. Naturforsch, 26b (1971) 1030-1039	234	61
FRAZIER W., GLASER L. Ann. Rev. Biochem., 48 (1979) 491-523	28	9
GERSHMAN H., ROBBINS P. J. Biol. Chem., 256 (1981) 7774-7780	90	28
GIBSON R., KORNFELD S., SCHLESINGER S. TIBS, 5 (1980) 290-293	8	6
GIBSON R., KORNFELD S., SCHLESINGER S. J. Biol. Chem., 256 (1981) 452-462	7	6
GIBSON R., SCHLESINGER S., KORNFELD S. J. Biol. Chem., 254 (1979) 3600-3607	6	6
GLABE C.G., HANOVER J.A., LENNARZ W.J. J. Biol. Chem., 255 (1980) 9236-9242	150	36
GLICK M.C., BUCK C.A. Biochemistry, 12 (1973) 85-90 .	254	67
GODELAINE D., SPIRO M.J., SPIRO R.G. J. Biol. Chem., 256 (1981) 10161-10168	114 157	32 38
GOUGH D.P., HEMMING F.W. Biochem. J., 118 (1970) 163-166	. 77 208	24 50

	Références	Pages
	161	39
J. Biol. Chem., 254 (1979) 8814-8818	161	39
0. 5101. Onom, 201 (1979) 0011 0010		
HADDAD A., SMITH H.D., HERSCOVICS A., NADLER N.J.,	243	64
LEBLOND C.P.		
J. Cell Biol., 49 (19/1) 856-882		
HAKIMI J., ATKINSON P.H.	262	67
Biochemistry, 19 (1980) 5619-5624		
	67	10
HAKOMORI S.I.	67	18
AIII. REV. BIOCHEM., 50 (1981) 755-764	1.00	20
HANOVER J.A., LENNARZ W.J.	103	29
Arch. Biochem. Biophys., 211 (1981) 1-19	140	30
	110	30
L. Biol. Chem., 257 (1982) 2787-2794	111	31
HARFORD J.B., WAECHTER C.J.	120	32
Arch. Biochem. Biophys., 197 (1979) 424-435	316	107
	330	121
	554	122
HARPAZ N., SCHACHTER H.	177	42
J. Biol. Chem., 255 (1980) 4885-4893	186	44
HAPDAZ N SCHACHTER H	192	11
J. Biol. Chem., 255 (1980) 4894-4902	102	44
HEMMING F.W.	81	24
Butterworths and University Park Press, London, Vol 4, 39-97		
HENKART P., HUMPHREYS S., HUMPHREYS T.	33	9
Biochemistry, 12 (1974) 3045-3050		
HERSCOVICS A., WARREN C.D., JEANLOZ R.W., WEDGWOOD J.F.	72a	21
LIU I.Y., STROMINGER J.L.		21
FEBS-Lett., 45 (1974) 312-317		
HEPZOC V	225	60
TIBS, 6 (1981) 319-322	233	02
HOFLACK B., CACAN R., MONTREUIL J., VERBERT A.	285	70
Blochim. Blophys. Acta, 568 (1979) 348-356	311	79
	520	119
HOFLACK B., CACAN R., VERBERT A.	286	70
Eur. J. Biochem., 88 (1978) 1-6	323	119
HUBBARD S.C., IVATT R.T	3	2
Ann. Rev. Biochem., 50 (1981) 555-583	112	30
	314	97

상품은 전화 및 전화 관련이 있는 것 같은 것 같은 것이다. 가지 않는 것 같이 있다.	Références	Pages
HUBBARD S. C ROBBINS P.W.	113 128	32 33
J Biol Chem. 254 (1979) 4568-4576	156	38
U. BIOI. CHEM., 204 (1979) 4500 1570	165	39
	338	124
	550	
HUBBARD S.C., ROBBINS P.W.	79	24
J. Biol. Chem., 255 (1980) 11782-11793		
HUGHES R.C., SANFORD B., JEANLOZ R.W.	237	62
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 69 (1972) 942-945		
HUGHES R.C.	1	1
1976, in Membrane Glycoproteins. A review of Structure and	14	7
Function, HUGHES R.C. (Ed.), Butterworth, London	27	9
	47	13
HYNES R.O.	250	66
Cell, 1 (1974) 147-156		
	10	0
JANCIK J.M., SCHAUER R., ANDRES K.H., VON DURING M.	19	8
Cell. Tiss. Res., 186 (1978) 209-226		
TENCEN THE COMPEDACE T C	93	28
JENSEN J.W., SCHUIZDACH J.S.	55	20
J. BIOI. CHEM., 258 (1981) 12899-12905		
KAHN P. SHIN S.	251	66
J. Cell. Biol., 82 (1979) 1-9		
KANG M.S., SPENCER J.P., ELBEIN A.	89	28
J. Biol. Chem., 253 (1978) 8860-8866	229	59
KAPLAN A., ACHORD D.T., SLY W.S.	24	8
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74 (1977) 2026-2030		
KAWASAKI T., ASHWELL G.	17	8
J. Biol. Chem., 251 (1976) 5292-5299		
그는 동안에 집에 가지 않는 것이 가지 않는 것이 같이 많이 많이 많이 많다.	20	0
KAWASAKI T., ASHWELL G.	20	8
J. Biol. Chem., 252 (1977) 6536-6543		
	297	71
EEDAN T.W., MORRE D.J. EEDC Lott $55 (1075) 9 - 13$	307	78
FEBS-Lecc., 55 (1975) 6-15	507	
KEMP R.B.	30	9
Nature, 218 (1968) 1255-1256		
KHALKHALI Z., MARSHALL R.D.	328	121
Biochem. J., 146 (1975) 299-307		
KIELY M., MacKNIGHT G.S., SCHIMKE R.	146	36
T Biol Chem $251 (1976) 5490 - 5495$		

	Références	Pages
KORNFELD S., GREGORY W., CHAPMAN A. J. Biol. Chem., 254 (1979) 11649-11654	91 115 130	28 32 33
KORNFELD R., KORNFELD S. Ann. Rev. Biochem., 45 (1976) 217-237	37	12
KORNFELD R., KORNFELD S. 1980, in Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans, LENNARZ W.J. (Ed.), Academic Press, New-York, 1-34	38	12
KORNFELD S., LI E., TABAS I. J. Biol. Chem., 253 (1978) 7771-7778	129 154	33 38
KUHLENSCHMIDT M.S., SCHMELL E., SLIFE C.W., KUHLENSCHMIDT T., SIEBER F., LEE Y.C., ROSEMAN S. J. Biol. Chem., 257 (1982) 3157-3164	35	11
LAMONT J.T., GAMMON M.T., ISSELBACHER K.J. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74 (1977) 1086-1090	287	70
LASKEY R.A., MILLS A.D. Eur. J. Biochem., 56 (1975) 335-341	350	141
LEHLE L. Eur. J. Biochem., 109 (1980) 589-601	126	32
LEHLE L., TANNER W. Eur. J. Biochem., 83 (1978) 563-570	331	121
LENNARZ W.J. Science, 188 (1975) 986-991	299	71
LI E., KORNFELD S. J. Biol. Chem., 253 (1978) 6426-6431	174	42
LI E., KORNFELD S. J. Biol. Chem., 254 (1979) 1600-1605	57 169	14 40
LI E., TABAS I., KORNFELD S. J. Biol. Chem., 253 (1978) 7762-7770	78 99	24 28
LINGAPPA V.R., LINGAPPA J.R., PRASAD R., EBNER K.E., BLOBEL G. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75 (1978) 2338-2342	. 149	36
LIU T., STETSON B., TURCO S.J., HUBBARD S.C., ROBBINS P.W. J. Biol. Chem., 254 (1979) 4554-4559	100	28
LLOYD C.W., COOK G.M.W. J. Cell. Sci., 15 (1974) 575-581	303	73

	Références	Pages
LOH Y.P., GAINER M. FEBS-Lett., 96 (1978) 269-272	9	7
LONGMORE G.D., SCHACHTER H. Carbohydr. Res., 100 (1982) 365-392	189 214	44 53
MacCLOSKEY M.A., TROY F.A. Biochemistry, 19 (1980) 2056-2060	106	29
MacCLOSKEY M.A., TROY F.A. Biochemistry, 19 (1980) 2061-2066	107	29
MacLEAN R.J., BOSMANN H.B. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 72 (1975) 310-313	279 321	70 119
MARKWELL M.A., PAULSON J.C. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77 (1980) 5693-5697	26	8
MENDICINO J., CHANDRASEKARAN E.V., ANUMULA K.R., DAVILA M. Biochemistry, 20 (1981) 967-976	179	42
MICHAEL J.M., KORNFELD S. Arch. Biochem. Biophys., 199 (1980) 249-258	163	39
MOOKERJEA S., COLE D.E.C., CHOW A. FEBS-Lett., 23 (1972) 257-261	219	56
MONTREUIL J. Adv. Carbohyd. Chem. Biochem., 37 (1980) 157-223	39	12
MONTREUIL J. 1982, in Comprehensive Biochemistry, Vol. 19B NEUBERGER A., VAN DEENEN L.L.M. (Eds), Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, Oxford, New-York	2 40 56 69 195 204	1 12 16 20 46 50
MORGAN H.R., BOSMANN H.B. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 146 (1974) 1146-1151	273	70
MORRE D.J., KARTENBECK J., FRANKE W.W. Biochim. Biophys. Acta, 559 (1979) 71-152	230 232	60 61
MÜLLER W.E.G., ARENDES J., KURELEC B., ZAHN R.K., MULLER I. J. Biol. Chem., 252 (1977) 3836-3842	34	9

	Références	Pages
MURAMATSU T., ATKINSON P.H., NATHENSON S.G., CECCARINI C. J. Mol. Biol., 80 (1973) 781-787	255	67
MURAMATSU T., OGATA T., KOIDE N. Biochim. Biophys. Acta, 444 (1976) 53-58	259	67
MURPHY L.A., SPIRO R.	95	28
J. Biol. Chem., 256 (1981) 7487-7494	122	32
	132	33
	343	126
NARASIMHAN S., STANLEY P., SCHACHTER H.	175	42
J. Biol. Chem., 252 (1977) 3926-3933	185	44
NARASIMHAN S., TSAI D., SCHACHTER H. Fed. Proc., 40 (1981) 1597	212	53
NEUFELD E.F. 1981, in Lysosomes and Lysosomal Storage Diseases, CALLAHAM N., LOWDEN J.A. (Eds), Raven Press, New-York, 115-130	22	8
NEUFELD E.F., ASHWELL G. 1980, in Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans, LENNARZ W.J. (Ed.), Plenum Press, New-York, 241-266	23	8
NEUTRA M., LEBLOND C.P. J. Cell. Biol., 30 (1966) 119-136	241	64
NILSON O.S., DE TOMAS M.E., PETERSON E., BERGMAN A., DALLNER G., HEMMING F.W. Eur. J. Biochem., 89 (1978) 619-628	109	30
OATES M.D., ROSBOTTOM A.C., SCHRAGER J. Carbohydr. Res., 34 (1974) 115-137	46	14
OLDEN K., PRATT P.M., JAWORSK C., YAMADA K.M. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 76 (1979) 791-795	12	7
OLDEN K., PRATT P.M., YAMADA K.M. Cell, 13 (1978) 461-473	11	7
OPHEIM D.J., TOUSTER O. J. Biol. Chem., 253 (1978) 1017-1023	166	39
OPPENHEIMER C.L., ECKHARD A.E., HILL R.L.	176	42
J. Biol. Chem., 256 (1981) 11477-11482	187	44
ODENUETMED C D EDIDIN M ODD C H DOCEMAN C	21	0
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 63 (1969) 1365-1402	327	120
······································	527	120
OPPENHEIMER L., HILL R. J. Biol. Chem., 256 (1981) 799-804	178	42

	Références	Pages
PALAMARCZYK G., LEHLE L., MANKOWSKI T., CHOJNAKI T., TANNER W. Eur. J. Biochem., 105 (1980) 517-523	86	26
PARODI A.J. J. Biol. Chem., 254 (1979) 10051-10060	155	38
PARODI A.J., BEHRENS N.H., LELOIR L.F., CARMINATTI H. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 69 (1972) 3268-3272	73	23
PARODI A.J., LELOIR L.F. Biochim. Biophys. Acta, 559 (1979) 1-37	4 72 75 82 94	2 21 23 24 28
PARODI A.J., MARTIN-BARIENTOS J. Biochim. Biophys. Acta, 500 (1979) 80-88	283	70
PATT L.M., GRIMES W.J. J. Biol. Chem., 249 (1974) 4157-4165	274 294 319	70 69 118
PATT L.M., GRIMES W.J. Biochim. Biophys. Acta, 444 (1976) 97-105	281 304	70 78
PATT L.M., Van NEST G.A., GRIMES W.J. Cancer Res., 35 (1975) 438-443	275	70
PAULSON J.C., PRIEELS J.P., GLASGOW L.R., HILL R.L. J. Biol. Chem., 253 (1978) 5617-5624	191	46
PAULSON J.C., REARICK J.I., HILL R.L. J. Biol. Chem., 252 (1977) 2363-2371	194	46
PELLETIER G. J. Cell. Biol., 62 (1974) 185-197	242	64
PIERCE M., TURLEY I.A., ROTH S. Intern. Rev. Gyt., 65 (1980) 1-47	102 267 288 290 301 308 313	29 68 69 69 73 78 89
PIERCE-CRETEL A., PAMBLANCO M., STRECKER G., MONTREUIL J SPIK G.	J. 43	14
EUL, J. BIOCDEM, 114 (1981) 169-178		

•

	Références	Pages
PLESS D.D., LENNARZ W.J. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74 (1977) 134-138	139	34
POLLACK R.E., BURGER M.M. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 62 (1969) 1074-1079	264	68
PORTER C.W., BERNACKI R.J. Nature, 256 (1975) 648-650	289	69
PRIEELS J.P., PIZZO S.V., GLASGOW L.R., PAULSON J.C., HILL R.L Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75 (1978) 2215-2221	. 21	8
RAO A.K., MEDICINO J. Biochemistry, 17 (1978) 5632-5638	215	53
RAUVALA H., FINNE J. FEBS-Lett., 97 (1979) 1-8	68	19
DENDICY T T CURDINAL & KODNEELD C	116	22
J. Biol. Chem., 256 (1981) 6255-6261	339	124
ROBBINS P.W., HUBBARD S.C., TURCO S.J., WIRTH D.F. Cell, 12 (1977) 893-900	152	38
POBBINS P. W., KRAGS S., LIU T.	121	32
J. Biol. Chem., 252 (1977) 1780-1785	346	126
PODEN I	49	13
1980, in Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans LENNARZ W.J. (Ed.) Plenum Press, New-York, 267-371	55	16
RODEN L. HOROWITZ H. I.	48	13
1978, in the Glycoconjugates, HOROWITZ M., PIGMAN W. (Eds), Academic Press, New-York, 3-72	54	16
RONIN C., CASETI C. Biochim. Biophys. Acta, 674 (1981) 58-64	335	122
DONTH C. CACEMI C. DOUCHILLOUY S	136	33
Riochim Biophys Acta 674 (1981) 48-57	221	56
BIOCHIIM. BIOPHYS. ACCA, 014 (1901) 40-51	336	123
	347	12.7
RONIN C., GRANIER C., CASETI C., BOUCHILLOUX S., Van RIETSCHOTEN J.	138	33
Eur. J. Biochem., 118 (1981) 159-164		
ROSEMAN S	201	49
Chem. Phys. Lipids., 5 (1970) 270-277		

.

	Références	Pages
ROTH S., MacGUIRE E.J., ROSEMAN S. J. Cell. Biol., 51 (1971) 536-541	302	73
ROTHMANN J.E., KATZ F.N., LODISH H.F. Cell, 15 (1978) 1447-1454	248	64
ROTHMAN J.E., LODISH H.F.	147	36
Nature, 269 (1977) 775-780	247	64
RUPPAR C.A., COOK G.H. Biochem. J., 201 (1982) 377-385	261	67
RUPPAR C.A., RIP J.W., CHAUDHARY N., CARROLL K.K. J. Biol. Chem., 257 (1982) 3090-3094	101	29
SANDERS E.J., SINGAL P.K. Exp. Cell. Res., 93 (1975) 219-224	271	68
SASAK W., De LUCA L.M. FEBS-Lett., 114 (1980) 313-318	84	24
SASAKI T., ROBBINS P.M. 1974, in Biology and Chemistry of Eucaryotic cell surface, LEE E.Y.C., SMITH E.E. (Eds), Academic Press, New-York	292	69
SELA B., LIS A., SACHS L. J. Biol. Chem., 247 (1972) 7575-7590	207	50
SCHACHTER H.	105	29
1978, in the Glycoconjugates, Vol. II, HOROWITZ M.,	170	41
PIGMAN W. (Eds), Academic Press, New-York, 87-181	198	48
	202	49
	203	50
	218	54
SCHACHTER H.	5	2
1981, in Lysosomes and Lysosomal Storage Diseases,	172	41
CALLAHAN W., LOWDEN J.A. (Eds), Raven Press, New-York, 73-93	197	46
	211	53
SCHACHTER H., ROSEMAN S.	70	20
1980, in the Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans.	171	41
LENNARZ W.J. (Ed.), Plenum Press, New-York, 85-160	183	41
	190	14
	196	40
	222	56
SCHMELL E., SLIFE C.W., KUHLENSCHMID M.S., ROSEMAN S. J. Biol. Chem., 257 (1982) 3171-3176	29	9

	Références	Pages
SCHMID K., BINETTE J.P., DORLAND L., VLIEGENTHART J.F.G., FOURNET B., MONTREUIL J. Biochim. Biophys. Acta, 581 (1979) 356-359	63	17
SCHWARZ R.T., DATEMA R. 1982, in Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, (sous presse)	226	56
SCHWARZ R.T., DATEMA R. TIBS, 5 (1980) 65-67	225	56
SCHWARZ R.T., ROHRSCHNEIDER J.M., SCHMIDT M.F.G. J. Virol., 19 (1976) 782-791	10	7
SCHWARZ R.T., SCHMIDT M.F.G., DATEMA R. Biochem. Soc. Trans., 7 (1979) 322-326	223	56
SHARMA C.B., LEHLE L., TANNER W. Eur. J. Biochem., 116 (1981) 101-108	127 137 337 348	32 33 123 127
SHUR B.D., ROTH S. Biochim. Biophys. Acta, 415 (1975) 475-512	291	69.
SNIDER M.D., SULTZMAN L.A., ROBBINS P.W. Cell, 21 (1980) 385-392	108	29
SPENCER J.P., ELBEIN A.D. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77 (1980) 2524-2527	92	28
SPIK G., BAYARD S., FOURNET B., STRECKER G., BOUQUELET S., MONTREUIL J. FEBS-Lett., 50 (1974) 296-299	59	17
SPIK G., SIX P., MONTREUIL J. Biochim. Biophys. Acta, 584 (1979) 203-214	206 309	50 78
SPIK G., STRECKER G., FOURNET B., BOUQUELET S., MONTREUIL J., DORLAND L., Van HALBEEK H., VLIEGENTHART J.F.G. Eur. J. Biochem., 121 (1982) 413-419	60	17
SPIRO R.G. J. Biol. Chem., 242 (1967) 4813-4823	51	15
SPIRO R.G. Adv. Prot. Chem., 27 (1973) 349-467	36	12
SPIRO R.G., SPIRO M.J., BHOYROO V.D. J. Biol. Chem., 254 (1979) 7659-7667	80 160	24 38

	Références	Pages
SPIRO R.G., SPIRO M.J., BHOYROO V.D. J. Biol. Chem., 254 (1979) 7668-7674	135	33
STAHL P.D., RODMAN J.S., MILLER M.J., SCHLESINGER P.H. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75 (1978) 1399-1403	25	8
STANELONI R.J., LELOIR L.F. TIBS, 4 (1979) 65-67	76	23
STANELONI R.J., UGALDE R.A., LELOIR L.F. Eur. J. Biochem., 105 (1980) 275-278	96 123	28 32
	345	126
STANLEY P. 1980, in the Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans, LENNARZ W.J. (Ed.), Plenum Press, New-York, 161-190	173	41
STOCKER M.G.P., RUBIN H. Nature, 215 (1967) 171-173	266	68
STOCKERT R.J., MORELL A., SCHEINBERG I.H. Science, 197 (1977) 667-668	18	8
STRUCK D.K., LENNARZ W.J. J. Biol. Chem., 251 (1976) 2511-2519	282 320	70 118
STRUCK D.K., LENNARZ W.J. J. Biol. Chem., 252 (1977) 1007-1013	305 312	78 89
STRUCK D.K., LENNARZ W.J. 1980, in the Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans, LENNARZ W.J. (Ed.), Plenum Press, New-York, 35-83	87 131 224	26 33 56
STURGESS J., MOSCARELLO M., SCHACHTER H. 1978, in Current Topics in Membranes and Transport, Vol. 11, BRONNER F., KLEINZELLER A. (Eds), Academic Press, New-York, London, 15-105	71 104	21 29
TABAS I., KORNFELD S. J. Biol. Chem., 253 (1978) 7779-7786	181	44
TABAS I., KORNFELD S. J. Biol. Chem., 254 (1979) 11655-11663	167	39
TABAS I., SCHLESINGER S., KORNFELD S. J. Biol. Chem., 253 (1978) 716-722	151	38
TAKATSUKI A., KOHNO K., TAMURA G.	227	57

	Références	Pages
TRIMBLE R.B., BYRD J.C., MALEY F. J. Biol. Chem., 255 (1980) 11892-11895	125 133	32 33
	344	126
TROWBRIDGE I.S., HYMAN R. Cell, 17 (1979) 503-508	340	124
TULSIAMI D.R.P., OPHEIM D.J., TOUSTER O. J. Biol. Chem., 252 (1977) 3227-3233	168	39
TURCO S.J., STETSON B., ROBBINS P.W. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74 (1977) 4411-4414	124 342	32 126
TWETO J., DOYLE D. J. Biol. Chem., 251 (1976) 872-882	236	62
UGALDE R.A., STANELONI R.J., LELOIR L.F. Biochem. Biophys. Res. Comm., 91 (1979) 1174-1181	162	39
UGALDE R.A., STANELONI R.J., LELOIR L.F. Eur. J. Biochem., 113 (1980) 97-103	159	38
VAN BEEK W.P., GLIMELIUS B., NILSON K., EMMELOT P. Cancer Lett., 5 (1978) 311-317	257	67
VAN BEEK W.P., SMETS L.A., EMMELOT P. Cancer Res., 33 (1973) 2913-2922	256	67
VAN DEN EIJNDEN D.H., EVANS N.A., CODINGTON J.F., REINHOLD V., SILBER C., JEANLOZ R.W. J. Biol. Chem., 254 (1979) 12153-12159	45	14
VAN DEN EIJNDEN D.H., JOZIASSE D.H., DORLAND L., VAN HALBEEK H VLIEGENTHART J.F.G., SCHMID K. Biochem. Biophys. Res. Comm., 92 (1980) 839-845	I., 216	54
VAN DEN EIJNDEN D.H., SCHIPHORST W.E. 1979, in the Proceedings of the fifth International Symposium on Glycoconjuguates, SCHAUER R., BOER P., BUDDECKE E., KRAMER M.F., VLIEGENTHART J.F.G., WIEGAND H. (Eds), Georg Thieme Publisher, Stuttgart, 250-251	193	46
VERBERT A., CACAN R., DEBEIRE Ph., MONTREUIL J. FEBS-Lett., 74 (1977) 234-238	324	119
VERBERT A., CACAN R., MONTREUIL J.	284	70
Eur. J. Blochem., /O (1976) 49-53	322	119
WAECHTER H., LENNARZ W.J.	119	32
	Références	Pages
---	------------	----------
WAKSMAN A., HUBERT P., CREMEL G., RENDON A., BURGUN C. Biochim. Biophys. Acta, 604 (1980) 249-296	231 233	60 61
WARREN R., DOYLE D. J. Biol. Chem., 256 (1981) 1346-1355	238	62
WARREN L., FUHRER J.P., BUCK C.A. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 69 (1972) 1838-1842	258	67
WEBB G.C., ROTH S. J. Cell. Biol., 63 (1974) 796-801	295	71
WEDGWOOD J.F., STROMINGER J.L. J. Biol. Chem. 255 (1980) 1120-1123	210	50
WEISER M.M. J. Biol. Chem., 248 (1973) 2536-2542	276 298	70 71
WEISER M.M. J. Biol. Chem., 248 (1973) 2543-2548	318	118
WHUR P., HERSCOVICS A., LEBLOND C.P. J. Cell. Biol., 43 (1969) 289-311	240	64
WILSON J.R., WILLIAMS D., SCHACHTER H. Biochem. Biophys. Res. Comm., 72 (1976) 909-916	188 213	44 53
WINQVIST L., ERICKSSON L., DALLNER G., ERSSON B. Biochem. Biophys. Res. Comm., 68 (1976) 1020-1026	270	68
WINZLER R.J. 1970, in Blood and Tissue Antigens, AMINOFF D. (Ed.) Academic Press, New-York, London, 117-126	13	7
YAMADA K.M., WESTON J.A. Cell, 5 (1975) 75-81	239	62
YAMADA K.M., YAMADA S.S., PASTAN I. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 73 (1976) 1217-1221	253	66
YAMASHITA K., TACHIBANA Y., KOBATA A. J. Biol. Chem., 253 (1978) 3862-3869	65	18
YOSHIMA H., TAKASAKI S., KOBATA A. J. Biol. Chem., 255 (1980) 10793-10804	64	17
YUNGHANS W.N., MORRE D.J. Cytobiologie, 17 (1978) 212-231	268	68

MOTS-CLEFS

Dolichol, glycosyltransférases, intermédiaires lipidiques, lymphocytes, N-glycosylation, N-glycosylprotéines.

004947886

RÉSUMÉ

Au cours de ces dernières années, les nombreuses observations faisant ressortir l'importance de la copule glucidique des N-glycosylprotéines dans des phénomènes biologiques très divers, ont amené le concept du glycanne porteur d'un signal de reconnaissance et ont placé la glycosylation au premier rang des modifications post-traductionnelles des protéines. Il est actuellement admis que, dans le réticulum endoplasmique rugueux, un oligosaccharide précurseur constitué de N-acétylglucosamine, de mannose et de glucose est d'abord synthétisé sur un lipide (le dolichol) pour être ensuite transféré en bloc sur la protéine. Sa maturation, dans l'appareil de Golgi, donnera ensuite naissance à une grande diversité de glycannes.

Des activités glycosyltransférasiques responsables de la synthèse de constituants (dolichol-phosphate-mannose, dolichol-phosphate-glucose) impliqués dans l'élaboration du dolichol-pyrophosphate-oligosaccharide ainsi que dans son utilisation dans un processus de N-glycosylation ont pu être caractérisées chez le lymphocyte splénique de Rat aussi bien à l'intérieur de la cellule que sur la membrane plasmique (ectoenzymes). Grâce au modèle des ectoglycosyltransférases certains mécanismes de la N-glycosylation ont pu être précisés. Notamment, un processus de dégradation enzymatique du dolichol-pyrophosphate-oligosaccharide non glucosylé a pu être décrit pour la première fois. En modulant le taux du seul intermédiaire lipidique stable (le dolichol-pyrophosphate-oligosaccharide glucosylé), il constituerait l'étape-clef dans la régulation de la N-glycosylation des protéines.

De plus, il a pu être montré que, in vitto, des oligosaccharides non matures comme le chitobiose peuvent être directement transférés à partir de l'intermédiaire lipidique correspondant, sur des protéines et que les chitobiosylprotéines ainsi formées peuvent être mannosylées par l'intermédiaire du GDP-mannose et/cu du dolichol-phosphate-mannose. Cette voie métabolique représenterait, à côté de la voie classique, une seconde route de N-glycosylation des protéines.