

N° d'ordre : 493

50376
1990
121

70452

50376
1990
121

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN BIOCHIMIE

Spécialité Sciences de la Vie et de la Santé

par

Michel BELARD



**ORIGINE ET DESTINEE DES
PHOSPHO-OLIGOSACCHARIDES LIBERES LORS
DE LA N-GLYCOSYLATION :
CARACTERISATION D'UNE OLIGOSACCHARIDYL-
DIPHOSPHO-DOLICHOL PYROPHOSPHATASE CHEZ
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE***



030 030034 6

Soutenu le 9 Février 1990 devant la Commission d'Examen

Président et Rapporteur :
Rapporteur :
Examineurs :

Pr. J. MONTREUIL
Pr. C. RONIN
Pr. R. SCHWARZ
Pr. A. VERBERT

ABREVIATIONS

ADP	: Adénosine diphosphate
AMP	: Adénosine monophosphate
AMPC	: Adénosine monophosphate cyclique
Asn	: L-Asparagine
ATP	: Adénosine triphosphate
CCCP	: Carbonylcyanure de m-chlorophényl hydrazone
CDP	: Cytidine diphosphate
CHO	: Chinese Hamster Ovary
CMW	: Chloroforme/méthanol/eau (10:10:3, V/V/V)
CTP	: Cytidine triphosphate
DIDS	: Acide 4,4'-diisothiocyanostilbène-2,2'-disulphonique
Dol	: Dolichol
d.p.m.	: désintégration par minute
Fuc	: L-Fucose
Gal	: D-Galactose
GalNAc	: N-acétylgalactosamine
GDP	: Guanosine diphosphate
GDP-Man	: Guanosine diphosphate mannose
Glc	: D-glucose
GlcNAc	: N-acétylglucosamine
GlcNAc-PP-Dol	: N-acétylglucosaminyl pyrophosphoryl Dolichol
Glc-P-Dol	: Glucosyl-phosphoryl-dolichol
GMP	: Guanosine monophosphate
GTP	: Guanosine triphosphate
Man	: D-mannose
Man-P-Dol	: mannosyl-phosphoryl-dolichol
NeuAc	: Acide N-acétylneuraminique
PMSF	: Phénylméthane-sulfonyl fluorure
Ser	: L-Sérine
Thr	: L-Thréonine
UDP	: Uridine diphosphate
UDP-Glc	: Uridine diphosphate glucose
UDP-GlcNAc	: Uridine diphosphate N-acétylglucosamine
UMP	: Uridine monophosphate
UTP	: Uridine triphosphate
Xyl	: D-Xylose

Ce travail a été réalisé sous la direction de Monsieur le Professeur André VERBERT dans le Laboratoire de Chimie Biologique (Directeur : Monsieur le Professeur Jean MONTREUIL) de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois (Unité Mixte de Recherche du C.N.R.S. n° 111 : Relations structure-fonction des constituants membranaires).

à Monique,

à ma Mère,

à Leïla et Sandra

A André et René,

André, à un moment où je me sentais isolé tu m'as accueilli avec gentillesse dans ton équipe. Tu m'as guidé sur les chemins tortueux des dolichols en me faisant bénéficier de ton expérience. A chaque fois que tu me posais la question : "Quoi de neuf sur le front de la recherche ?", je n'y voyais pas le regard de l'inquisiteur mais celui du chercheur qui a soif de découvrir.

René, comme beaucoup avant moi, j'ai toujours trouvé auprès de toi, une grande disponibilité et un profond enthousiasme à faire partager tes connaissances et ta bonne humeur. Tu m'as fait découvrir la joie du travail en équipe et ton expérience de l'analyse et de la critique des résultats.

A Monsieur le Professeur MONTREUIL,

En me formant puis en m'accueillant dans votre Laboratoire, vous m'avez donné la chance inestimable de découvrir la Vie avec l'oeil du Biochimiste. Je voudrais vous exprimer ma profonde gratitude pour m'avoir fourni les moyens de réaliser ces recherches et pour l'honneur que vous me faites de présider cette thèse.

A Madame le Professeur Catherine RONIN,

Les travaux que vous avez effectués dans le domaine de la N-glycosylation des protéines montrent l'intérêt que vous portez à ce sujet. Je ressens avec fierté l'honneur que vous me faites de bien vouloir accepter de juger cette thèse.

A Monsieur le Professeur Ralph SCHWARZ,

La régulation de la N-glycosylation des protéines vous intéresse tout particulièrement, vos travaux sur l'effet *in vitro* des inhibiteurs des glycosyltransférases le prouvent. Je suis heureux et honoré que vous ayez accepté de juger cette thèse.

—

J'adresse également mes remerciements à tous ceux qui, à divers titres, m'ont permis de mener à bien ce travail, et tout particulièrement à :

Myriam Coniez, pour sa précieuse assistance technique et sa haute compétence ;

Bernard Hoflack, pour ses conseils éclairés ;

Anne Lepers, pour l'amitié qu'elle m'a témoigné dans ce travail d'équipe.

INTRODUCTION	p. 1
GENERALITES	p. 4
<u>CHAPITRE I : BREVES DONNEES SUR LA STRUCTURE DES GLYCOPROTEINES</u>	p. 4
I - LES O-GLYCOSYLPROTEINES	p. 4
II - LES N-GLYCOSYLPROTEINES	p. 6
III - COMPARAISON MAMMIFERE/LEVURE DES STRUCTURES OLIGOMAN- NOSIDIQUES	p. 8
<u>CHAPITRE II : LES INTERMEDIAIRES LIPIDIQUES DANS LA BIOSYNTHESE DES N-GLYCOPROTEINES</u>	p. 10
I - STRUCTURE DU DOLICHOL ET DE SES DERIVES	p. 10
II - REPARTITION	p. 11
III - CONFORMATION ET PROPRIETES PHYSIQUES	p. 11
IV - BIOSYNTHESE DU PHOSPHO-DOLICHOL	p. 13
V - UTILISATION DES RESERVES EN DOLICHOL	p. 15
VI - DEGRADATION DU DOLICHOL	p. 16
VII - CYCLE DES DOLICHOLS	p. 19
A - INTRODUCTION	p. 19
B - FORMATION DU GlcNAc ₁ -PP-Dol	p. 20
1 - La réaction enzymatique	p. 20
2 - Rôle de l'accepteur	p. 21
3 - Topologie de cette synthèse	p. 22
C - FORMATION DU GlcNAc ₂ -PP-Dol	p. 25
1 - La réaction enzymatique	p. 25
2 - Topologie de cette synthèse	p. 25
3 - Discussion	p. 26

D - FORMATION DU $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$	p. 27
1 - Synthèse de $\text{Man}_1\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$	p. 27
2 - Synthèse de $\text{Man}_2\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$	p. 27
3 - Synthèse de $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$	p. 29
4 - Synthèse de $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$	p. 29
5 - Topologie de ces synthèses	p. 31
6 - Discussion	p. 31
E - SYNTHÈSE DE Man-P-Dol	p. 33
1 - La réaction enzymatique	p. 33
2 - Topologie de cette synthèse	p. 34
3 - Structure de l'enzyme	p. 35
4 - Importance du Man-P-Dol	p. 35
F - FORMATION DU $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$	p. 37
G - SYNTHÈSE DE Glc-P-Dol	p. 38
H - FORMATION DU $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$	p. 41
I - TRANSFERT "EN BLOC" SUR LA PROTEINE	p. 43
1 - Introduction	p. 43
2 - Substrats de l'oligosaccharidyl transférase	p. 44
a) La protéine	p. 44
b) L'oligosaccharide-PP-Dol	p. 47
c) Mécanisme chimique de la réaction de transfert	p. 49
d) Topologie de la glycosylation des protéines	p. 52
e) Propriétés de l'oligosaccharidyl transférase	p. 53
J - RESUME SCHEMATIQUE DE LA BIOSYNTHESE DES INTERMEDIAIRES LIPIDIQUES ET DE LA GLYCOSYLATION DES PROTEINES	p. 57

VIII - REGULATION METABOLIQUE DU CYCLE DES DOLICHOLS	p. 58
A - DISPONIBILITE EN PHOSPHO-DOLICHOL	p. 58
B - TENEUR ET REACTIVITE DES ENZYMES	p. 60
1 - Au cours du cycle cellulaire	p. 60
2 - Au cours du développement	p. 60
3 - Au cours de la différenciation cellulaire	p. 61
C - EFFET ANNEXE DU GDP-Man	p. 62
D - EFFET DE STRESS PHYSIQUES ET CHIMIQUES	p. 63
E - TENEUR EN GLUCOSE DU MILIEU EXTRACELLULAIRE	p. 63
F - CONTROLE HORMONAL	p. 65
G - EXISTENCE D'UNE OLIGOSACCHARIDYL-PYROPHOSPHORYL-DOLICHOL PYROPHOSPHATASE	p. 66
H - CONCLUSION	p. 67

TRAVAUX PERSONNELS p. 68

CHAPITRE I : MISE EN EVIDENCE DE LA DEGRADATION DES OLIGOSACCHARIDE-PP-Do1 CHEZ LA LEVURE p. 69

I - CHOIX DU MODELE EXPERIMENTAL	p. 69
II - MISE EN EVIDENCE DE PHOSPHO-OLIGOSACCHARIDES LIBERES AU COURS DE LA SYNTHESE <i>IN VITRO</i> DES INTERMEDIAIRES LIPIDIQUES DU CYCLE DES DOLICHOLS CHEZ LA LEVURE	p. 71
A - PREPARATION DES MEMBRANES MICROSOMALES DE LEVURE	p. 71
B - ETUDE CINETIQUE DE L'INCORPORATION <i>IN VITRO</i> DE GDP-[¹⁴ C] MANNOSE DANS LES MEMBRANES DE LEVURE	p. 71
C - ANALYSE DES PRODUITS LIBERES DANS LA PHASE AQUEUSE	p. 73
III - DISCUSSION	p. 74

**CHAPITRE II : CARACTERISATION D'UNE ACTIVITE OLIGOSACCHARIDE-
PYROPHOSPHO-DOLICHOL PYROPHOSPHATASE CHEZ LA LEVURE**

p. 76

**I - MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE DE SEPARATION DE
L'OLIGOSACCHARIDE-PP-DOL DU MATERIEL OLIGOSACCHARIDIQUE
LIBERE LORS DE LA COUPURE DE LA LIAISON PYROPHOSPHATE**

p. 76

**A - SOLUBILISATION DE L'OLIGOSACCHARIDE-PP-DOL PAR DIVERS
DETERGENTS**

p. 76

**B - APPLICATION D'UNE METHODE DE PARTAGE DE PHASES AU
TRITON X-114**

p. 77

C - DISCUSSION

p. 79

ARTICLE 1

p. 80

**II - ETUDE DE DIFFERENTS PARAMETRES ENZYMATIQUES DE
L'OLIGOSACCHARIDE-PYROPHOSPHORYL-DOLICHOL PYROPHOSPHA-
TASE DE LEVURE**

p. 89

A - INFLUENCE DU pH

p. 89

1 - Sur l'activité enzymatique

p. 89

2 - Sur la stabilité de l'enzyme

p. 91

B - INFLUENCE DE LA TEMPERATURE

p. 93

1 - Sur l'activité enzymatique

p. 93

2 - Sur la stabilité de l'enzyme

p. 93

3 - Sur le bilan des produits formés

p. 94

C - INFLUENCE DE DIFFERENTS CATIONS

p. 98

D - INFLUENCE DE DIFFERENTS ANIONS

p. 100

1 - Effet du chlorure de sodium

p. 100

2 - Effet du fluorure de potassium

p. 100

3 - Effet du phosphate et du pyrophosphate

p. 101

4 - Effet du méthylène diphosphonate

p. 103

E - ETUDE DE LA SPECIFICITE ENZYMATIQUE VIS-A-VIS DU SUBSTRAT	p.105
1 - Influence de la concentration en substrat	p.105
2 - Spécificité vis-à-vis du glycanne	p.106
a) Etude de l'hydrolyse de GlcNAc ₁₋₂ -PP-Dol	p.106
b) Etude de l'hydrolyse des oligosaccharide-PP-Dol en présence de concanavoline A	p.108
3 - Spécificité vis-à-vis du dolichol	p.110
III - ASPECTS MEMBRANAIRE DE L'OLIGOSACCHARIDYL-PYROPHOSPHORYL-DOLICHOL PYROPHOSPHATASE	p.112
A - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN ENZYME SUR LA VITESSE D'HYDROLYSE DU SUBSTRAT	p.112
B - EFFET DE LA CONCENTRATION ET DE LA NATURE DES DETERGENTS SUR L'ACTIVITE PYROPHOSPHATASIQUE DES MEMBRANES DE LEVURE	p.112
C - TOPOLOGIE MEMBRANAIRE DE CETTE PYROPHOSPHATASE	p.114
D - ETUDE DE LA BALANCE HYDROPHILE/HYDROPHOBE DE CETTE PYROPHOSPHATASE	p.119
1 - Fractionnement séquentiel au Triton X-114	p.119
2 - Chromatographie de partage de phases à contre-courant	p.121
<u>CHAPITRE III : DESTINEES DU MATERIEL OLIGOSACCHARIDIQUE LIBERE DE LA LEVURE AU SPLENOCYTE</u>	p.123
I - ETUDE DE L'HYDROLYSE <i>IN VITRO</i> DE PHOSPHO-OLIGOSACCHARIDES PAR DES MEMBRANES DE LEVURE	p.123
II - VOIES DE DEGRADATION DES OLIGOSACCHARIDE-PP-Dol DANS DES CELLULES DE MAMMIFERES	p.127
ARTICLE 2	p.128
Résultats complémentaires à l'article 2	p.136

CONCLUSIONS	p.137
PERSPECTIVES	p.141
APPENDICE TECHNIQUE	p.143
I - PREPARATION DES SPLENCYTES DE SOURIS ET PERMEABILISATION	p.143
II - EXTRACTION SEQUENTIELLE DES INTERMEDIAIRES LIPIDIQUES	p.143
III - CARACTERISATION DES PRODUITS OBTENUS DANS LA PHASE CMW	p.144
A - COMPORTEMENT CHROMATOGRAPHIQUE DES INTERMEDIAIRES LIPIDIQUES SUR COLONNE D'ECHANGE D'IONS (DEAE-CELLULOSE)	p.144
B - TRAITEMENTS MENAGES PAR LES ACIDES ET LES BASES	p.145
1 - Hydrolyse acide douce	p.145
2 - Hydrolyse alcaline douce	p.145
IV - CARACTERISATION DES PRODUITS OBTENUS DANS LES PHASES AQUEUSES PAR HPLC	p.145

INTRODUCTION

Souvent les chimères occupèrent une position importante dans l'esprit humain. Les centaures (Homme/Cheval) sont des êtres fabuleux changeant de forme et appartenant à la mythologie grecque. Les sirènes (Femme/Poisson) furent jusqu'au 19ème siècle placées si haut dans l'échelle des valeurs pour qu'une loi anglaise proclame : "toute sirène trouvée dans les eaux britanniques appartient à la Couronne". Assurément à notre époque les glycoconjugués (sucre/protéine, sucre/lipide et lipide/sucre/protéine) sont des composés "hybrides" tout aussi importants.

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. 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. 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. Actuellement, il est démontré que dans le réticulum endoplasmique rugueux un oligosaccharide est transféré en bloc à partir d'un intermédiaire lipidique sur la protéine en voie de synthèse et qu'il subit une maturation dans l'appareil de Golgi.

Cependant, la complexité inhérente aux mammifères et aux oiseaux limite l'approche expérimentale. Dans cette dernière décade de nombreuses recherches ont révélé l'intérêt du modèle levure qui offre une approche génétique directe et une manipulation aisée. Il est alors possible d'isoler des mutants, de cloner les gènes et de les détruire pour déterminer leur caractère essentiel. Qui plus est, les levures ont été utilisées comme hôtes pour l'expression de gènes hétérologues car elles possèdent de nombreuses voies métaboliques communes aux eucaryotes supérieurs. Aussi, la levure est un bon modèle pour étudier la glycosylation des protéines et sa régulation.

Il est maintenant admis que la biosynthèse des oligosaccharides liés N-glycosidiquement aux protéines s'effectue en trois étapes :

- 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 pour donner naissance aux différents types de structure glycanne.

La régulation de la biosynthèse de la partie glycanne des glycoprotéines peut être envisagée pour chacune de ces trois étapes. De nombreux résultats obtenus au Laboratoire ont démontré que le produit final du cycle des dolichols, un oligosaccharide-pyrophospho-dolichol, peut s'engager soit dans la voie de la N-glycosylation, soit dans une voie de dégradation dont l'"enzyme-clef" serait une pyrophosphatase spécifique.

Nos travaux ont pour objectifs de caractériser cette "pyrophosphatase", d'en étudier les paramètres enzymatiques et de l'isoler à partir de la levure ; tout en faisant le lien avec les connaissances que l'on peut avoir avec le système mammifère.

Avant de décrire le résultat de nos recherches, nous ferons le point des connaissances actuelles concernant les intermédiaires lipidiques impliqués dans la biosynthèse des N-glycoprotéines.

Nos recherches ont fait l'objet des publications suivantes :

- 1 - M. BELARD, R. CACAN et A. VERBERT
Characterization of an oligosaccharide-pyrophosphodolichol
pyrophosphatase activity in yeast
Biochem. J. (1988) 255 : 235-242.
- 2 - R. CACAN, A. LEPERS, M. BELARD et A. VERBERT
Catabolic pathway of oligosaccharide-diphospho-dolichol,
subcellular sites of the degradation of the oligomannoside
moiety.
Eur. J. Biochem. (1989) 185 : 173-179.

GENERALITES

CHAPITRE I :

BREVES DONNEES SUR LA STRUCTURE DES GLYCOPROTEINES

Les glycoprotéines forment avec les glycolipides une très vaste classe de constituants appelés *glycoconjugués* qui résultent de l'association d'une copule glucidique ou *glycane* avec une protéine ou un lipide. Nous nous limiterons à la description des glycannes des glycoprotéines en soulignant les similitudes et les différences existantes entre les levures et les eucaryotes supérieurs.

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

On distingue :

- . les O-glycosylprotéines, liées par une liaison O-glycosidique à des acides aminés hydroxylés (sérine, thréonine, hydroxylysine et hydroxyproline)
- . les N-glycosylprotéines, liées par une liaison N-glycosidique à de l'asparagine.

I - LES O-GLYCOSYLPROTEINES

Cette classe de glycoprotéines peut être divisée en différents sous-groupes en tenant compte de la nature du monosaccharide et de l'hydroxyamino-acide intervenant dans la liaison glycane-protéine.

Le monosaccharide peut être :

la **N-acétylgalactosamine**, liée à la sérine ou à la thréonine. Quelques exemples de ce type sont donnés dans la figure 1. Il est important de noter que jamais le mannose n'est rencontré dans la copule glucidique, ce qui les différencie des N-glycoprotéines. C'est dans ce groupe que se rencontrent les mucines.

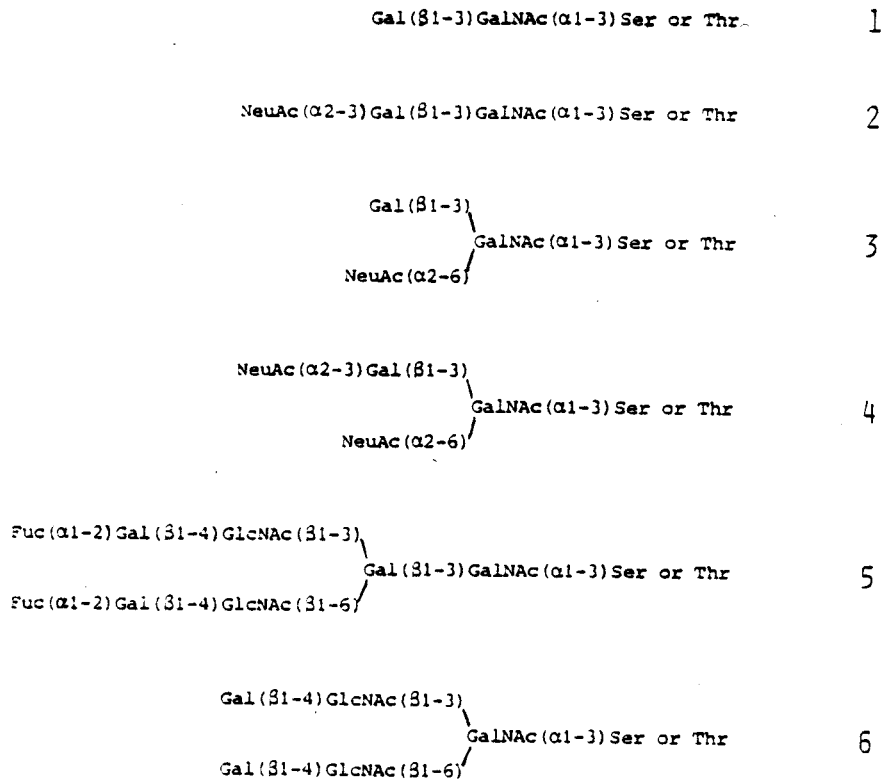


Fig. 1 : Quelques exemples de structures de glycannes liés O-glycosidiquement à la protéine : 1-glycoprotéine "anti-gel" des poissons antarctiques, IgA sérique humaine; 2-glycophorine humaine, groupe sanguin de type N; 3-mucines submaxillaires; 4-glycophorine humaine et gonadotrophine (sous-unité β); 5-groupe sanguin de type H du porc; 6-mucines bronchiales de malades atteints de mucovisidose (d'après Montreuil [4]).

le xylose, lié à la sérine ou à la thréonine. Un exemple de structure primaire du seryl-chondroïtine-4-sulfate est représenté par la figure 2.

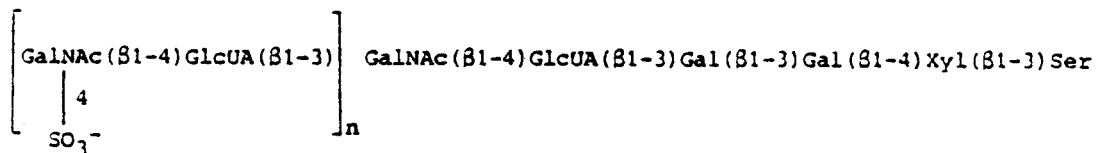


Fig. 2 : Structure du seryl-chondroïtine-4-sulfate.

le mannose, lié à la sérine ou à la thréonine. Un exemple de structure de ce type est donné par l'agglutinine des cellules haploïdes *a* de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (figure 3).

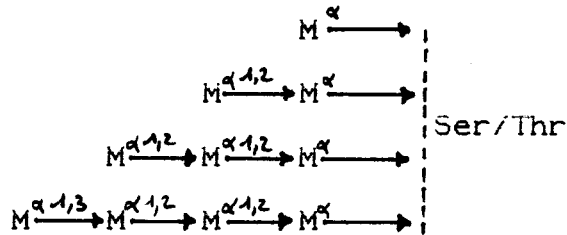


Fig. 3 : Structures d'oligosaccharides liés o-glycosydiquement dans la levure.

la N-acétylglucosamine, liée à la sérine dans les glycoprotéines périphériques de la membrane nucléaire (Torres et Hart [21]) du réticulum endoplasmique (Abeijon et Hirschberg [3] et de l'appareil de Golgi (Capasso et *al.* [4])).

le galactose, lié à l'hydroxylysine dans le collagène des mammifères.

le L-arabinose, lié à l'hydroxyproline dans les parois cellulaires des végétaux supérieurs.

II - LES N-GLYCOSYLPROTEINES

Aux exceptions près des chaînons glucose-asparagine et N-acétylgalactosamine-asparagine mis en évidence dans la glycoprotéine majeure de l'enveloppe d'une archéobactérie halophile (Wieland et *al.* [2a]) et dans un glycopeptide de la membrane basale des glomérules de Rat (Shibata et *al.* [3a]), la seule liaison de type N-glycosidique dans les glycoprotéines et protéoglycannes implique la N-acétylglucosamine et l'asparagine conduisant à la formation d'une glycosylamine (figure 4).

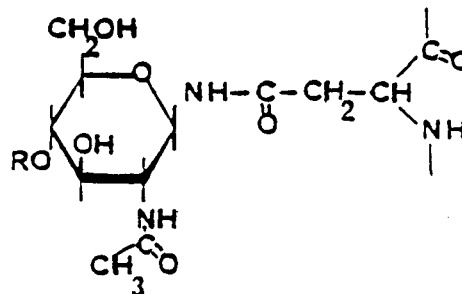


Fig. 4 : Liaison N-glycosidique .

III - COMPARAISON MAMMIFERE/LEVURE DES STRUCTURES OLIGOMANNOSIDIQUES

La classe des composés de type oligomannosidique n'est pas si homogène que l'on veut bien le dire. En effet, bien qu'ils soient constitués de mannose et de N-acétylglucosamine, le glycanne peut varier de 5 à 9 résidus de mannose (figure 6).

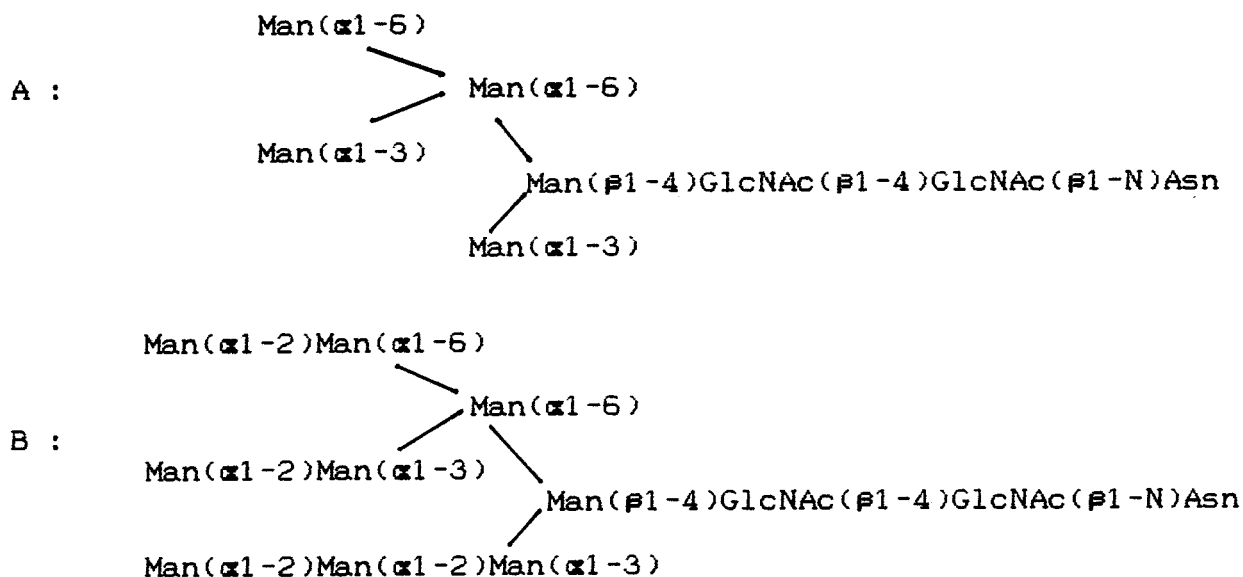


Fig. 6 : Exemples de structures de glycanes de type oligomannosidique :

A : Glycopeptide GP-V de l'ovalbumine (Conchie et Strachan [6])

B : Glycopeptide B-1 de cellules de Hamster chinois (Li et Kornfeld [7])

Chez la levure le noyau pentasaccharidique modifié peut, d'une part contenir jusqu'à 15 résidus de mannose, et d'autre part être substitué ou non par un mannane polyantenné ("outer region", constitué de 50 à 150 résidus de mannose) dont une branche contient du mannosylphosphate (figure 7).

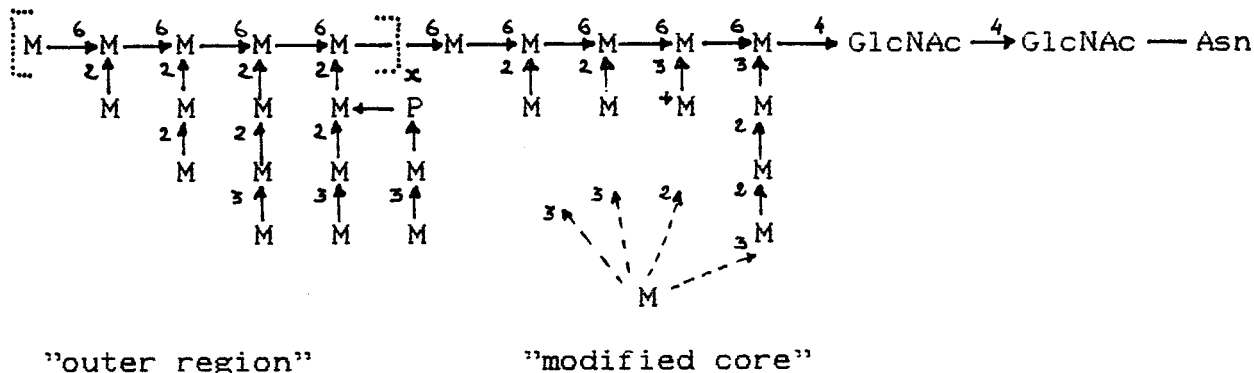


Fig. 7 : Modèle de structure de glycanne de mannoprotéines de levure (Ballou et al. [8]).

D'une part la découverte d'une structure $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ dans l'invertase de levure par Byrd *et al.* [9] est intéressante dans la mesure où l'absence d'un résidu de mannose lié en α -1,2 sur le mannose*1 de la branche médiane du "noyau" peut être le signal déclenchant l'élongation du glycanne (Trimble et Atkinson [10]). Une α -mannosidase spécifique de ce résidu de mannose a été identifiée puis purifiée par Jelinek-Kelly et Herscovics [11, 12] dans les membranes du reticulum endoplasmique de levure.

D'autre part, l'isolement de mutants de levure déficients en glucosidases qui éliminent les résidus de glucose du "noyau" primitif $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ lié aux protéines (Esmon *et al.* [13]) a permis de démontrer que la présence de ces résidus de glucose ne bloque chez la levure ni l'élagage du mannose de la branche médiane ni la formation du mannane polyantenné (Tsai *et al.* [14]).

La biosynthèse et le rôle fonctionnel de ce mannane polyantenné ne sont pas encore bien connus pour le moment.

CHAPITRE II :
LES INTERMÉDIAIRES LIPIDIQUES DANS LA BIOSYNTHESE
DES N-GLYCOPROTEINES

I - STRUCTURE DU DOLICHOL ET DE SES DERIVES

Le dolichol (en grec *dolichos* = long) est une famille de lipides polyisopréniques possédant 14 à 22 unités d'isoprène, pour la plupart dans une configuration *cis*, avec un résidu α sous forme saturée (Fig. 8). Du point de vue stéréochimique on distingue les configurations R ("Rectus" = sens des aiguilles d'une montre) et S ("Sinister" = sens inverse) pour la position des substituants de l'atome de carbone assymétrique du résidu- α (Fig. 9).

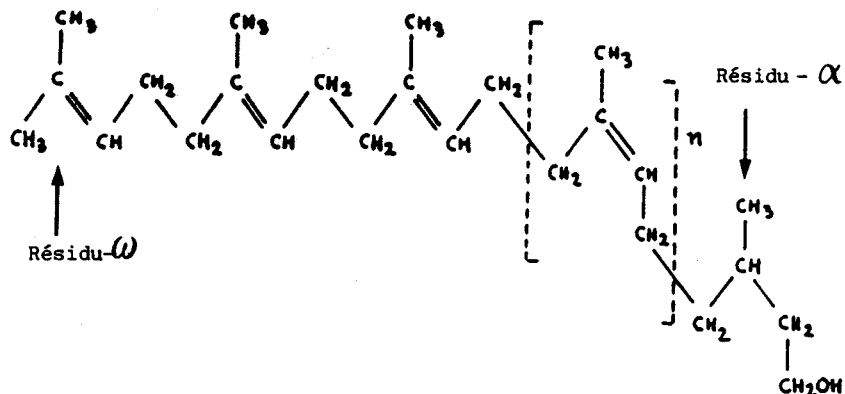


Fig. 8 : Structure du dolichol
La molécule est constituée d'un résidu isoprène- ω suivi par deux résidus isoprènes en configuration *trans*, un nombre *n* variable de résidus isoprènes en configuration *cis* (entre 13 et 17 chez les eucaryotes supérieurs) et un résidu isoprène- α saturé.

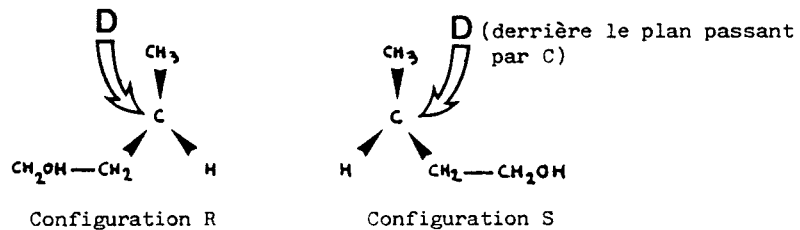


Fig. 9 : Configurations des substituants de l'atome de carbone assymétrique du résidu- α du dolichol.

R = "rectus", S = "sinister"
Le substituant D correspond au reste de la chaîne isoprénique du dolichol.

Ces substances, identifiées en 1960 par Pennnock, Hemming et Morton [15], peuvent être sous la forme d'un alcool libre, phosphorylé ou estérifié par un acide gras (Hemming [16, 17], Dallner et Hemming [18], Rip et al. [19]).

Des polyprénols complètement insaturés (formes α -insaturées) existent en faibles quantités (<1% de tout le dolichol) dans les cellules normales de mammifères et dans les plantes monocotylédones où la proportion dolichols/polyprénols α -insaturés est 1:1. Alors que dans les cellules mutantes F2A8 de cellules d'ovaire de Hamster chinois (CHO) il y a 100 fois plus de polyprénols α -insaturés que de dolichol avec pour conséquence une N-glycosylation des protéines 7 fois plus faible (Stoll et al. [20, 21]).

II - REPARTITION

La répartition des dolichols est spécifique de l'espèce. Les dérivés majeurs chez le Rat sont ceux qui ont 18 à 19 résidus isoprènes, alors que chez l'Homme ce sont ceux qui ont 19 à 20 résidus (Tavares et al. [22], Tollbom et Dallner [23]) et chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* 14 à 18 résidus d'isoprène.

Dans les cellules normales des eucaryotes la quantité totale de dolichol et de ses dérivés est assez faible (3-10 μ g/g, poids frais) dont environ 1 μ g/g est représenté par le phospho-dolichol (P-Dol) et le pyrophospho-dolichol (PP-Dol) ; le reste est représenté par les formes libres ou estérifiées par des acides gras.

La répartition subcellulaire des dolichols est large : la membrane interne de la mitochondrie des hépatocytes du Rat en contient très peu (0,1 μ g/mg de protéine), la membrane externe un peu plus (0,3 μ g/mg de protéine) comme les microsomes et les noyaux ; la membrane plasmique, les vésicules de l'appareil de Golgi et les lysosomes en contiennent nettement plus (4,5 μ g/mg de protéine). On ne comprend pas encore la signification métabolique ou physiologique de cette distribution particulière.

III - CONFORMATION ET PROPRIETES PHYSIQUES

A l'heure actuelle les informations dont on dispose à propos de la conformation du dolichol proviennent principalement des études effectuées sur des modèles de membranes artificielles en supposant que les résultats obtenus puissent être

extrapolés aux membranes biologiques. Les expériences démontrent que le dolichol et ses analogues de structure exercent une influence considérable sur l'organisation et l'environnement des phospholipides (Lai et Schutzbach [24], Valtersson et al. [25], Gruner [26], de Ropp et Troy [27], de Ropp et al. [28], van Duijn et al. [29]).

Les composés polyisopréniques semblent augmenter la fluidité des doubles couches de phospholipides, déstabiliser les membranes lipidiques, faciliter la formation de micelles inversées à l'intérieur de la membrane et augmenter la perméabilité (Monti et al. [30]). Ces effets peuvent être avantageux dans les processus de glycosylation des protéines et de transport lors de la sécrétion cellulaire. Le mouvement transmembranaire des intermédiaires lipidiques, de leur site d'assemblage sur la face cytoplasmique du reticulum endoplasmique vers la face luminale interne, peut être facilité par l'effet déstabilisant de ces polyprénols (Hanover et Lennarz [31], Hirschberg et Snider [32], Krag [33]).

Certaines expériences (de Ropp [34] et Mc Closkey [35]) font penser que le dolichol est inséré entre les deux moitiés de la double couche de phospholipides, c'est-à-dire entre les molécules d'acides gras. Or Struck et Lennarz en 1980 [36] ont supposé que, sous sa forme linéaire, le dolichol-19 (19 résidus d'isoprène) a une longueur de 100 Å; ce qui fut vérifié par Murgolo et al. en 1986 [37] dans une première étude sur le dolichol de foie de Porc en solution dans du tétrachlorure de carbone. Comment une molécule aussi longue pourrait-elle s'intégrer dans l'épaisseur de 50 à 70 Å des membranes biologiques ?

Les travaux récents de Murgolo et al. en 1989 [38], par diffraction des rayons X indiquent que le dolichol-19 en solution dans l'alcool isopenténique présente une partie centrale hélicoïdale flanquée de deux bras diamétralement opposés et que la fluidité de la solution augmente avec la concentration en dolichol.

Il est regrettable que la diffraction des rayons X ne puisse être utilisée pour examiner la conformation du dolichol dans des membranes artificielles ou biologiques. Cette technique permettrait ainsi de mieux comprendre la topologie des intermédiaires lipidiques.

Dans le cas du P-Dol les études de van Duijn et al. [39, 40] mettent en évidence l'orientation du groupement phosphate vers les faces externes aqueuses des membranes ainsi que celle du résidu - α terminal du polyisoprène parallèle aux chaînes d'acides gras de la membrane; d'autre part la déstabilisation des membranes peut faciliter le transport des sucres. Des études de topologie des membranes effectuées par Keller et al. en 1986 [41] en employant la latence de la polyisoprénol-phosphate phosphatase du foie de Rat démontrent que cet enzyme est orienté vers le cytoplasme.

IV - BIOSYNTHESE DU PHOSPHO-DOLICHOL

La biosynthèse du dolichol est identique aux étapes initiales de la biosynthèse du cholestérol et de l'ubiquinone commençant par l'acétyl-CoA (Fig. 10), elle s'en distingue ensuite par des additions séquentielles de 13 à 15 résidus de *cis*-iso-pentenylpyrophosphate (IPP) sur le *trans-trans*-farnesylpyrophosphate (FPP) pour aboutir au polyisoprénol-pyrophosphate.

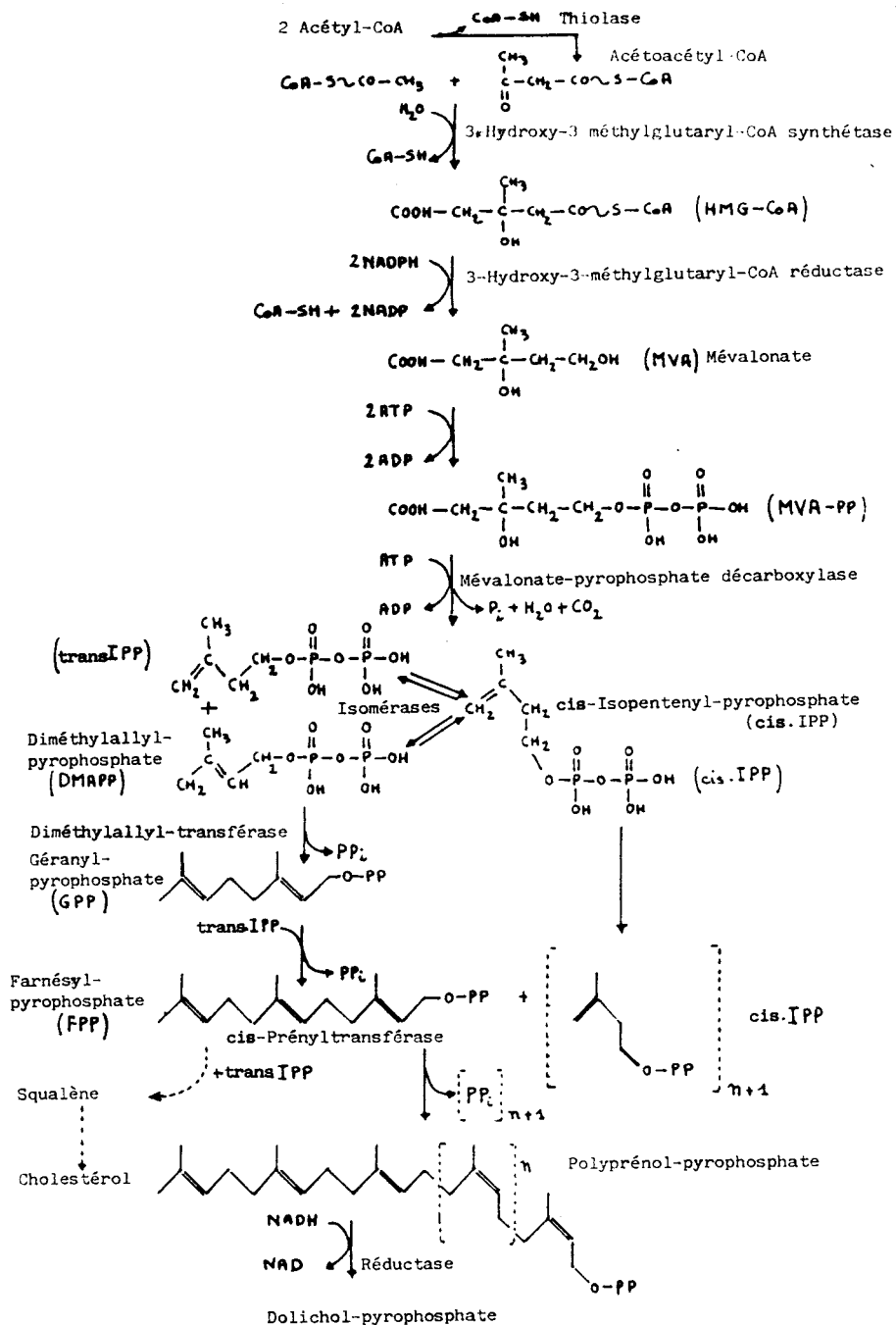
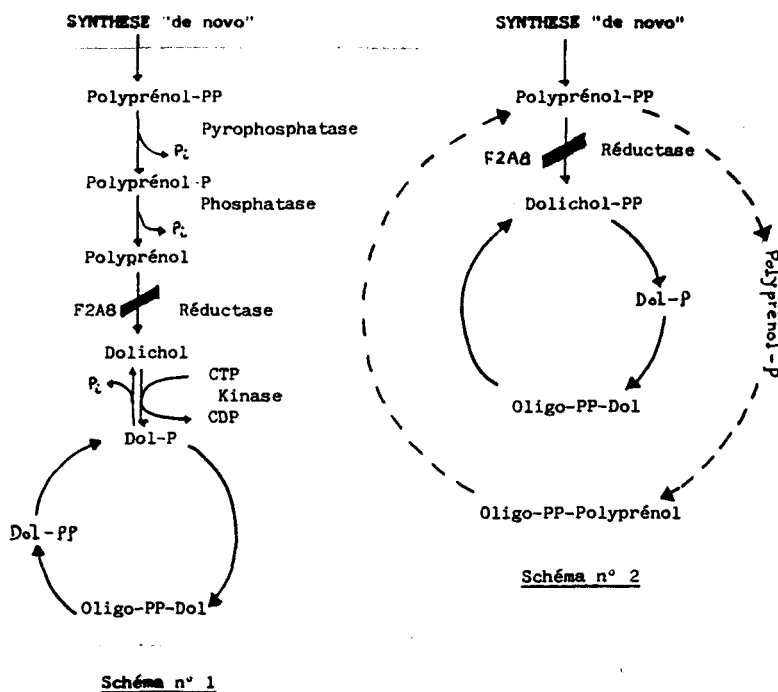


Fig. 10 : Réactions de biosynthèse du dolichol

La séquence et le mécanisme par lequel l'intermédiaire α -insaturé est converti en phospho-dolichol ne sont pas encore connu.

Selon Stoll, Rosenwald et Krag [42] l'étape de réduction se place selon deux schémas :



Une souche mutante (F2A8) de cellules d'ovaire de hamster chinois (CHO) utilise le polyprényl à la place du dolichol pour effectuer ses réactions de N-glycosylation dépendantes des intermédiaires lipidiques.

Dans le schéma n°1 le produit final de la synthèse "de novo" est le dolichol et le P-Dol provient de l'action d'une dolichol-kinase (Allen et al. [43]). Cependant, la quantité de polyprényl phosphorylé et glycosylé est approximativement la même dans les cellules F2A8 que dans les cellules sauvages, alors que les mutantes accumulent 10 fois plus de polyprényl. Une plus grande quantité de polyprényl phosphaté et/ou glycosylé était attendue, d'autant plus que dans les cellules F2A8 l'activité dolichol kinase est normale.

Dans le schéma n°2 le produit final de la synthèse "de novo" est le pyrophospho-polyprényl. Certaines expériences de chasse après marquage à l'aide d'hépatocytes isolés (Ekström et al. [44]) et de coupes de foie de Rat (Keller [45]) sont en accord avec cette possibilité. Le pyrophospho-polyprényl n'est pas réduit en pyrophospho-dolichol par la réductase dans les cellules F2A8, mais il serait utilisé à vitesse réduite par la dolichylpyrophosphate phosphatase, par les divers enzymes du cycle des dolichols et par l'oligosaccharidyl transférase.

Etant donné que cette hydrolase du foie de Rat n'est pas présente dans les microsomes, il ne semble pas que cette activité associée à une kinase puisse être en relation avec la production de phospho-dolichol. Cette fonction pourrait être remplie par une phospholipase A microsomale décrite par Tollbom dans le même article mais avec une activité spécifique 90 fois plus faible que l'estérase lysosomale. De plus la sensibilité à la trypsine de cette lipase démontre qu'elle est localisée sur la face cytoplasmique des microsomes.

Néanmoins il n'est pas impossible qu'une estérase spécifique des dérivés du dolichol puisse exister et fournir le substrat nécessaire à une dolichol-kinase. En effet, Rossignol *et al.* [50] ont mis en évidence dans des embryons d'oursin en phase de croissance une kinase CTP-dépendante qui contribue en grande partie au maintien de la teneur en phospho-dolichol. Il faut noter que l'augmentation d'activité de cette kinase entraîne une augmentation de la N-glycosylation des protéines.

Au contraire, dans le foie de Rat adulte l'utilisation des réserves en esters de dolichol semble une voie mineure par rapport à la biosynthèse *de novo* du phospho-dolichol (Astrand *et al.* [51]).

Rien ne permet à l'heure actuelle de savoir si la biosynthèse l'emporte toujours dans tous les types cellulaires ainsi que dans tous les états physiologiques.

Les sites de biosynthèse du dolichol sont situés principalement au niveau du réticulum endoplasmique (Adair et Keller [52], Wong et Lennarz [53], Ekström *et al.* [54]) et, pour une plus faible part, dans les peroxisomes (Appelkvist [55], Appelkvist et Dallner [56]).

Tous les tissus sont capables de synthétiser du dolichol, certains assez rapidement comme les reins, la rate et le foie. Cependant, à cause de leur volume important, les muscles fabriquent la moitié de tout le dolichol corporel (Elmberger *et al.* [57]).

VI - DEGRADATION DU DOLICHOL

La dégradation du dolichol est un domaine difficile à étudier, en effet le marquage du dolichol par incorporation *in vivo* d'acétate ou de mévalonate radioactifs fournit environ 500 fois plus de cholestérol que de dolichol marqué. Seuls les travaux de Sagami et Lennarz [58] utilisant des cellules de *Drosophile* incapables de synthétiser du cholestérol mettent en évidence une teneur constante du total de tous les intermédiaires lipidiques au cours de leurs expériences de chasse de longue durée.

Ce fait semble indiquer l'absence de voie catabolique majeure pour la partie polyisoprénique.

Les connaissances assez limitées sur le catabolisme du dolichol (Rip et Carroll [59], Keenan et al. [60], Connelly et Keller [61]) permettent de dire que chez le Rat le dolichol apparaît sous forme inchangée dans les faeces et en quantité supérieure à celle présente dans l'alimentation. Aucun catabolite, comme le dioxyde de carbone ou d'autres fragments, ne peuvent être détectés dans l'air expiré, les faeces ou l'urine.

Actuellement on ne peut savoir si des enzymes impliqués dans la dégradation du dolichol existent dans les tissus ou non.

Le dolichol synthétisé dans le foie est transporté en faible quantité dans le sang (0,03 μ g/ml) associé à la fraction des lipoprotéines de haute densité, puis se retrouve ensuite à l'état de traces dans l'urine et en quantité non négligeable dans les faeces via la bile (Elmberger et Engfeldt [62]). Mais l'excrétion du dolichol dans la bile est bien loin d'être suffisante pour prendre en compte le renouvellement du dolichol, ce qui pose la question : existe-t'il des voies méconnues du catabolisme du dolichol ?

Le dolichol et ses dérivés sont des lipides qui sont connus depuis environ 30 ans mais les connaissances sur leur rôle structural dans les membranes et leurs fonctions sont relativement limitées par rapport aux autres lipides. L'intérêt porté au domaine des glycoprotéines et les résultats obtenus dans l'étude de leur biosynthèse ont nettement révélé le rôle joué par le phospho-dolichol. Un point reste cependant obscur, il s'agit du catabolisme de ces composés à faible renouvellement ("turn over").

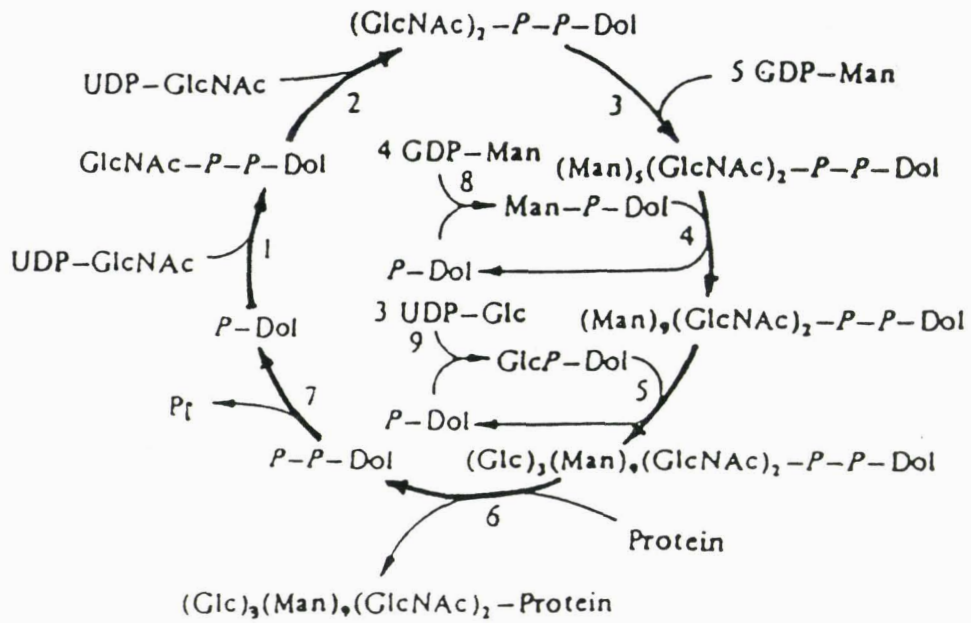


Fig. 12 : Les différentes étapes du cycle des dolichols.

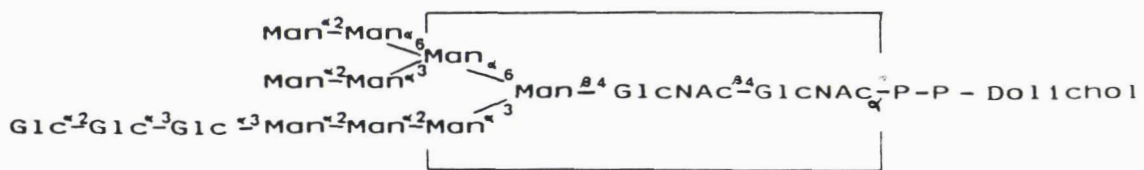


Fig. 12a: oligosaccharide-pyrophospho-Dolichol : $G_3M_9Gn_2$

(d'après Li et al. [65] et Ronin et al. [65a])

VII - CYCLE DES DOLICHOLS

A - INTRODUCTION

La synthèse de l'oligosaccharide-pyrophospho-dolichol s'effectue en cinq étapes :

- * la première comprend l'addition d'un résidu de N-acétylglucosamine-1-phosphate sur le phospho-dolichol à partir de l'UDP-GlcNAc avec libération d'UMP pour aboutir à la formation de GlcNAc₁-PP-Dol (réaction 1 de la Fig. 12)
- * la seconde consiste en l'addition d'un deuxième résidu de N-acétylglucosamine à partir de l'UDP-GlcNAc avec libération d'UDP pour aboutir au GlcNAc₂-PP-Dol (réaction 2).
- * puis cinq résidus de mannose sont successivement ajoutés à partir du GDP-Man permettant ainsi l'élaboration du Man₅GlcNAc₂-PP-Dol (réaction 3).
- * la quatrième étape consiste en l'addition de quatre résidus de mannose provenant du Man-P-Dol pour donner la structure Man₉GlcNAc₂-PP-Dol (réaction 4).
- * enfin, la dernière étape voit l'addition de trois résidus de glucose à partir de Glc-P-Dol pour donner naissance à l'oligosaccharide-pyrophospho-dolichol complet : le Glc₃Man₉GlcNAc₂-PP-Dol (réaction 5) dont la structure est donnée dans la figure 12a.

La séquence des événements est résumée dans la figure 12 ci-contre.

L'ensemble de cette séquence de réactions est appelé le **cycle des dolichols** (Parodi et Leloir [63], Robbins *et al.* [64], Li *et al.* [65]). Les réactions principales de ce cycle sont à peu près identiques dans toutes les cellules eucaryotes ; tout au moins c'est le cas des champignons aux mammifères en passant par la levure (Lehle [66], Lehle *et al.* [67]).

Alors qu'il est établi avec certitude que la glycosylation des protéines se déroule dans le réticulum endoplasmique rugueux (Bergman et Kuehl [68], Roberts *et al.* [69], Ronnett et Lane [70], Katz *et al.* [71], Hanover et Lennarz [72]) certains détails de l'assemblage de l'oligosaccharide-pyrophospho-dolichol et de l'architecture transmembranaire de son site d'assemblage sont encore méconnus.

B - FORMATION DU GlcNAc₄-PP-Dol

1 - La réaction enzymatique



La première étape de l'assemblage de l'oligosaccharide-pyrophospho-dolichol est l'addition de GlcNAc-1-P provenant de l'UDP-GlcNAc sur le P-Dol (Molnar et al. [73]). Cette réaction de transfert est inhibée par un analogue structural de l'UDP-GlcNAc : la tunicamycine (Kuo et Lampen [74] ; Lehle et Tanner [75]).

L'enzyme impliqué, la GlcNAc-1-P-transférase, est une protéine liée à la membrane du réticulum endoplasmique (Ravoet et al. [76]). Elle a été solubilisée à partir du tissu aortique (Heifetz et Elbein [77]), du foie de Rat (Arakawa et Mookerjea [78]) et de l'oviducte de Poule (Keller et al. [79]).

Cependant, sa purification a longtemps été retardée par sa grande instabilité, excepté l'enzyme provenant d'*Acanthamoeba castellanii* qui est stable pendant plusieurs mois à 4°C (Villemez et Carlo [80]). L'enzyme de l'aorte de Porc est rendu soluble par le Nonidet et dans une moindre mesure par le Triton. Ces détergents, quand ils sont ajoutés au mélange d'incubation contenant des membranes de levure, inhibent le transfert (Palamarczyk et al. [81]). Cette inhibition peut être due à la perte après solubilisation du phospho-dolichol endogène ; en effet, l'addition de phospho-dolichol exogène réactive partiellement l'enzyme et ceci de manière spécifique, puisque les phospho-polyprénols α -insaturés ne peuvent donner la même réactivation.

La GlcNAc-1-P-transférase des préparations microsomales provenant de divers tissus est activable par du Man-P-Dol et celle du tissu aortique de Porc est activable par un facteur thermorésistant qui est séparé de l'enzyme au cours de la purification (Kaushal et Elbein [82]). La nature précise de ce facteur est actuellement encore inconnue.

On peut donc penser que l'activité et la stabilité de cette GlcNAc-1-P-transférase dépendent de la concentration en lipide accepteur dans son proche environnement ainsi que d'autres phospholipides.

L'utilisation d'un mélange composé de phosphatidyl-glycérol, de glycérol, de P-Dol et d'UDP-GlcNAc a permis à Shailubhai et al. [83] de caractériser l'enzyme dans les glandes mammaires. L'activité est portée par deux protéines (50 kDa et 46 kDa) provenant d'un même précurseur (70 kDa) partiellement protéolysé malgré la présence d'inhibiteurs de protéase ajoutés dans le protocole de purification.

En 1988 une nouvelle stratégie a été mise au point par Lehrman et al. [84] pour amplifier et identifier le gène de la GlcNAc-1-P-transférase dans des cellules d'ovaire de hamster chinois (CHO). Cette stratégie utilise la propriété de la tunicamycine d'inhiber cette activité *in vivo* et *in vitro*. La résistance à cet antibiotique *in vivo* a été associée à une augmentation du nombre de copies du gène présumé de la GlcNAc-1-P transférase (Rine et al. [85]).

Criscuolo et Krag [86] avaient montré qu'à long terme des cellules CHO cultivées en présence de concentrations croissantes en tunicamycine produisent des souches résistantes possédant une forte activité en GlcNAc-1-P-transférase. L'amplification du gène correspondant était soupçonnée mais n'avait pas été démontrée directement (Waldman et al. [87]). Auparavant le même phénomène avait été constaté chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Rine et al. [88], Barnes et al. [89]), Lehrman [90], utilisant un fragment cloné du gène ALG-7 de la levure, qui code pour la GlcNAc-1-P transférase, a identifié par transfert par capillarité ("Southern Blotting") et amplifié un fragment du gène (6,6-kilobases) dans l'ADN des cellules CHO. Les résultats obtenus soulignent qu'une séquence de 24 résidus d'acides aminés est conservée à 92 % de la levure au hamster. Ceci suggère que la séquence protéique ainsi déterminée peut être importante pour le fonctionnement de l'enzyme. Du fait du caractère hydrophobe de cette séquence on peut penser que celle-ci peut s'associer au P-Dol ou à d'autres composés membranaires communs à la levure et au hamster.

C'est un peu ce qui a été récemment mis en évidence par Albright et al. [91] dans trois enzymes, les produits des gènes ALG1, ALG7, et DPM1, qui catalysent le transfert de monosaccharides de leurs glycosynucléotides sur des dérivés phospho-dolichols. La séquence commune du peptide conservé est Leu - Phe - Val - Xaa - Phe - Xaa - Xaa - Ile - Pro - Phe - Xaa - Phe - Tyr. Ce peptide de structure en hélice- α peut être impliqué dans un mécanisme de reconnaissance du dolichol, et les protéines correspondantes pourraient être assimilées à des transporteurs ; ce fait est intéressant étant donné la topographie de la glycosylation dans le RER.

2 - Rôle de l'accepteur

Quelle peut être l'importance de l'accepteur ?

A côté du rôle de transporteur de sucre à travers la membrane joué par le phospho-dolichol (question traitée plus loin, voir synthèse Man-P-Dol et Glc-P-Dol), il est important de déterminer si la partie isoprénique du P-Dol exerce une fonction spécifique.

Plusieurs études (Adair et Robertson [92], Chojnacki et al [93], Löw et al. [94]) ont démontré que les isomères optiquement actifs du dolichol (Fig. 9), les formes R et S

(configurations "rectus" et "sinister") possèdent des capacités différentes comme accepteurs de sucre. La forme S (au niveau du C-3) semble être seule utilisée dans la biosynthèse des oligosaccharides.

Le fait que les dolichols synthétisés par les mammifères et les oiseaux ont la même configuration stéréochimique de type S amène le concept que le résidu - α saturé exerce une fonction importante préservée au cours de l'évolution.

Palamarczyk *et al.* [95] ont étudié la capacité de divers composés isopréniques à servir d'accepteurs dans des réactions de transfert catalysées par des enzymes de levure. Ainsi pour la protéine ALG7 ils ont trouvé un K_m pour le P-Dol de $31 \mu M$. Ce K_m atteint $117 \mu M$ quand la chaîne isoprénique passe de 100 à 55 atomes de carbone et un dérivé isoprénique avec seulement 35 atomes de carbone est le plus faible accepteur.

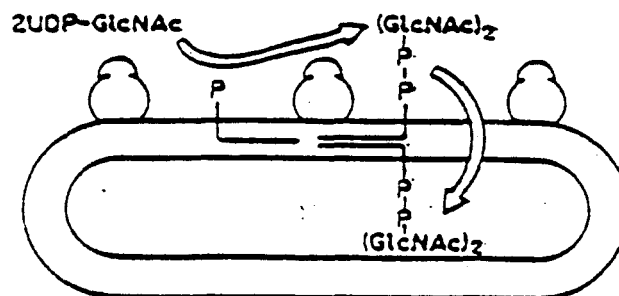
Un travail récent de Löw *et al.* [96, 97] montre que les valeurs de K_m (0,5 à $10 \mu M$), de différentes transférases (mannosyl-, glucosyl-, glucosaminyl-) ayant le P-Dol comme accepteur, augmentent quand le nombre de résidus isoprènes passe de 8 à 24.

Mais du point de vue physiologique les grandes différences d'affinité des transférases pour ces P-Dol n'ont pas une importance décisive, puisque la teneur en P-Dol des membranes microsomiales dépasse ces valeurs de K_m . Etant donné que les valeurs de V_m obtenues sont approximativement les mêmes pour des P-Dol de longueurs différentes ; le concept que la partie polyprénique des dolichols peut réguler la glycosylation est donc peu fondé.

3 -Topologie de cette synthèse

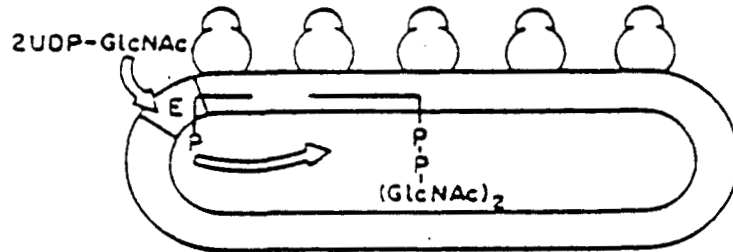
Si quelques caractéristiques de l'enzyme solubilisé sont connues, l'aspect topologique de la réaction au niveau de la membrane du RER est encore controversé. En effet, deux modèles sont proposés par Hanover et Lennarz [98].

Dans le premier (A) la synthèse se déroule sur la face cytoplasmique puis le produit formé se retrouve dans la lumière.



Modèle A : Synthèse face cytoplasmique et translocation du GlcNAc₂-P-P-Dol (d'après Hanover et Lennarz [98])

Dans le second (B) il s'agirait d'une réaction de transfert vectoriel dans lequel la réaction s'accompagne du transport de N-acétylglucosamine vers la lumière du RER.



Modèle B : Transfert vectoriel et synthèse de $\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ (d'après Hanover et Lennarz [98])

Dans ces deux modèles, le transport de l'UDP-GlcNAc à travers la membrane du RER n'a pas lieu d'exister, ce glycosyl-nucléotide étant donneur sur la face cytoplasmique.

Par contre Perez et Hirschberg [99] ont montré l'existence d'un transporteur spécifique d'UDP-GlcNAc dans le RER de foie de Rat.

Ce transport dépend de la température, il est saturable et inactivé par le traitement du réticulum endoplasmique par une protéase. Les premières études suggèrent que l'entrée de l'UDP-GlcNAc dans le RER se fait par un antiport. Il est couplé avec la sortie d'UMP par un mécanisme d'échange équimolaire UDP-GlcNAc/UMP et le transfert des résidus de GlcNAc-1-P sur le DOL-P s'effectue à l'intérieur du RER (Fig. 13).

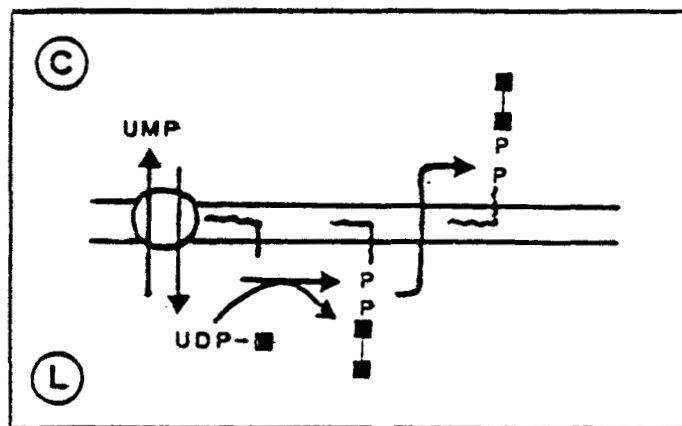


Fig. 13 : Transport d'UDP-GlcNAc et synthèse luminale de $\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$
Symboles : ■ : GlcNAc; C : Cytoplasme; L : Lumière
~ : Dolichol

Etant donné que les deux modèles proposés par Hanover et Lennarz ainsi que celui de Perez et Hirschberg ne font pas la distinction entre le transfert du premier résidu de N-acétylglucosamine et le transfert du second, et que pour une grande part les démonstrations sont fondées sur la topologie d'un seul produit (le GlcNAC₂-PP-Dol), cette question de topologie sera traitée dans la partie synthèse de GlcNAC₂-PP-Dol.

La question de la topologie de la réaction est loin d'être résolue ; en effet aucune expérience n'a démontré la localisation du P-Dol sur une face ou sur l'autre du RER. Les seules expériences relatives à cette question sont celles de Adair et Cafmeyer [100] qui suggèrent que le site actif de la dolichol-kinase et le groupement hydroxyle du dolichol sont exposés vers la face cytoplasmique des membranes microsomales. Un travail récent de M.J. Spiro et R.G. Spiro [101], utilisant un réactif qui ne pénètre pas au travers des membranes (4,4'-diisothio-cyano-2,2'-stilbenedisulfonate ou DIDS) connu comme inhibiteur des transporteurs d'anions dans les hématies et du passage du glucose-6-phosphate à travers les membranes du réticulum endoplasmique de foie, montrent que le DIDS ne réagit pas avec les protéines de la translocation des glycosyl-nucléotides, mais plutôt avec les sites orientés vers la face cytoplasmique permettant la fixation des anions par les glycosyltransférases dont la Glc-NAC-1-P transférase.

Ce résultat est donc en accord avec une orientation cytoplasmique de l'enzyme, il est confirmé par la sensibilité aux protéases des vésicules fermées du réticulum endoplasmique. Cette dernière approche expérimentale est fondée sur la supposition que s'il se produit une inactivation de l'enzyme, le site actif est alors situé sur la face cytoplasmique.

C - FORMATION DU GlcNAc₂-PP-Dol

1 - La réaction enzymatique



La seconde étape de l'assemblage de l'oligosaccharide-pyrophospho-dolichol consiste en l'addition de N-acétylglucosamine provenant d'une deuxième molécule d'UDP-GlcNAc sur le GlcNAc₁-PP-Dol déjà formé. Cette seconde étape est peu décrite dans les revues générales (Hubbard et Ivatt [102], Elbein [103], Struck et Lennarz [104]). Elle se distingue de la première étape par le fait que l'enzyme n'est pas inhibé par la tunicamycine (Lehle et Tanner [105]).

2 - Topologie de cette synthèse

Le mouvement transmembranaire du produit obtenu par cette réaction (GlcNAc₂-PP-Dol) a été étudié par Hanover et Lennarz [106, 107] et par Snider et al. [108]. Snider, traitant à la pronase des vésicules fermées du réticulum endoplasmique, a obtenu l'inactivation d'un certain nombre d'enzymes de la synthèse des intermédiaires lipidiques, entre autre : la synthèse du Man-P-Dol, Glc-P-Dol et GlcNAc₂-PP-Dol. Ce résultat suggère qu'une partie de l'oligosaccharide-pyrophospho-dolichol est assemblée sur la face cytoplasmique des membranes microsomales.

Bien que cette expérimentation démontre que certains domaines protéiques de ces enzymes sont situés sur la face cytoplasmique, une autre explication a été proposée par Snider lui-même. Il est possible que les sites actifs de ces enzymes soient situés sur la face luminale et que la perte d'activité par protéolyse soit celle des transporteurs qui permettent la traversée des membranes aux glycosyl-nucléotides, ou encore que ces enzymes soient transmembranaires et que la protéolyse de la partie cytoplasmique ait un effet négatif sur la conformation du site actif situé sur la face luminale.

Hanover et Lennarz [109] se sont davantage intéressés à la localisation du produit de la réaction : le GlcNAc₂-PP-Dol et ont utilisé une autre technique. Il est connu que la galactosyltransférase peut servir de sonde pour localiser le GlcNAc₂-PP-Dol. Quand celui-ci est incorporé à des liposomes unilamellaires sans détergent, la galactosyl-transférase ne forme que la moitié du Gal-GlcNAc₂-PP-Dol formé en présence d'UDP-Gal avec un système complet. Ce qui indique que le GlcNAc₂-PP-Dol a été incorporé dans la membrane artificielle de façon symétrique et que la galactosyltransférase peut agir sur cet accepteur glycolipidique dans la double couche de

phospholipides. Quand cette même sonde est appliquée à du RER d'oviducte de Poule préalablement incubé en présence d'UDP-GlcNAc marqué afin d'obtenir des GlcNAc₂-PP-Dol marqués ; ceux-ci ne sont pas accessibles à l'enzyme, sauf en présence de détergent à une concentration provoquant l'ouverture des vésicules. Ces résultats suggèrent que le GlcNAc₂-PP-Dol formé n'est pas exposé sur la face cytoplasmique du RER.

Mais comme le souligne Lennarz [110] il n'est pas exclu que le GlcNAc₂-PP-Dol (peut-être associé avec l'enzyme) ne soit enfoui dans la double couche de la membrane.

Dans un travail récent, Sagami et Lennarz [111] ne détectent qu'une quantité inférieure à 5 % de GlcNAc₁-PP-Dol et GlcNAc₂-PP-Dol par rapport à la somme de tous les intermédiaires lipidiques après marquage au mévalonate [¹⁴C] chez des cellules de Drosophile ; alors que le Man-P-Dol et le Glc-P-Dol sont présents à des concentrations nettement plus élevées. Ces résultats suggèrent que les premiers intermédiaires lipidiques (GlcNAc₁-PP-Dol et GlcNAc₂-PP-Dol) ne peuvent s'accumuler parce que le flux des premières étapes est trop rapide et qu'ainsi ces composés n'ont aucune chance d'être disponibles pour le transfert sur les protéines.

3 - Discussion

Le bilan de ces travaux donne donc matière à de nombreuses discussions et pose quelques questions.

Ainsi l'étude topologique des protéines membranaires grâce à l'effet des protéases sur l'activité des enzymes dans des vésicules microsomales scellées semble significative quand le résultat est négatif, c'est-à-dire quand il y a disparition de cette activité seulement après addition d'un détergent à une concentration telle qu'il y ait ouverture des vésicules.

Que dire de l'utilisation de la galactosyl-transférase de Vache utilisée comme sonde pour étudier la topologie membranaire de l'enzyme participant à la formation de GlcNAc₂-PP-Dol ?

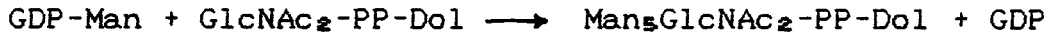
Cette sonde ne peut qu'indiquer l'orientation cytoplasmique du produit et non de l'enzyme. De plus le produit peut très bien être synthétisé sur la face luminale puis se retrouver sur la face cytoplasmique sous la forme d'un complexe avec un transporteur ou avec l'enzyme de la réaction suivante du cycle des dolichols, donc sans être accessible à la sonde.

Ainsi, au vu de tous ces résultats, il n'existe pas de preuve vraiment convaincante quant à la topologie des deux premières N-acétylglucosaminyl-transférases intervenant dans le cycle des dolichols.



Fig. A: oligosaccharide - pyrophospho - Dolichol : M₅Gn₂

D - FORMATION DU $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$



La troisième étape de la biosynthèse des intermédiaires lipidiques est un ensemble de transferts de 5 résidus de mannose directement du GDP-Man sur le $\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ pour donner l'oligosaccharide-PP-Dol dont la structure est illustrée par la figure A ci-contre.

1 - Synthèse de $\text{Man}_1\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$

La première réaction de cette 3ème étape est catalysée par une β 1-4 mannosyltransférase (mannosyltransférase I) qui produit le $\text{Man}_1\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$. L'enzyme a été partiellement purifié par Heifetz [112] Kaushal et Elbein [113, 114] à partir d'aorte de Porc et de cellules de Soja et par Sharma et al. [115] à partir de la levure. Cet enzyme est fortement inhibé par divers nucléotides à guanosine (GDP, GMP) sans que l'on puisse relier cette inhibition à une fonction de régulation.

Il faut remarquer que le précurseur utilisé est le GDP- α Man et que la liaison osidique formée dans le $\text{Man}_1\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ est de type β ; donc on peut supposer que dans le mécanisme de catalyse il se produit une inversion d'anométrie.

Les cellules de levure portant la mutation alg 1-1 sont incapables de transférer le premier mannose sur le $\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ à une température non permissive de 36°C (Huffaker et Robbins [116]) ; mais leurs membranes sont capables d'effectuer l'étape suivante, c'est-à-dire de convertir *in vitro* le $\text{Man}_1\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ en $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ en présence de GDP-Man.

Ce défaut a été identifié comme étant une déficience en β -1,4-mannosyltransférase. En effet, le gène cloné par complémentarité du phénotype température-sensible de la mutation alg 1-1, ALG1, et exprimé dans *Escherichia coli* rend capable le lysat bactérien d'allonger le $\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ en $\text{Man}_1\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ (Couto et al. [117]). Un antisérum dirigé vers la protéine ALG1 indique que cette protéine est intégrée aux membranes du RER et orientée vers la face cytoplasmique (C.F. Albright et P. Orlean, résultats non publiés).

2 - Synthèse de $\text{Man}_2\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$

La seconde réaction de cette troisième étape est le transfert d'un second résidu de mannose sur le $\text{Man}_1\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$, catalysé par une α 1-3 mannosyltransférase (mannosyltransférase II) ; en se fondant sur les résultats de Chapman et al. [118] et Vijay et al. [119] qui démontrèrent que l'assemblage des

oligosaccharides se déroule selon un ordre séquentiel. Cette addition de ce premier résidu peut être bloquée en présence de bacitracine, un peptide cyclique, comme l'ont montré Chen et Lennarz [120] avec des membranes d'oviducte de Poule, sans que l'on puisse affirmer que cette inhibition soit bien spécifique de cette étape.

Ici se pose le problème d'anomérisation de la liaison. Partant d'une configuration α , il faudrait deux réactions successives pour revenir à une configuration α . N'existerait-il pas une étape inconnue entre le GDP-Man et l'intermédiaire lipidique ?

Jensen et Schutzbach [121, 122] ont purifié partiellement cet enzyme des microsomes de foie de Lapin, sa spécificité d'action est relativement large puisque les structures $\text{Man}(\beta-1,4)\text{GlcNAc}(\beta-1,4)\text{GlcNAc}(\beta 1)\text{-PP-Dol}$ et $\text{Man}(\beta-1,6)\text{Man}(\beta-1,4)\text{GlcNAc}(\beta-1,4)\text{GlcNAc}(\beta 1)\text{-PP-Dol}$ peuvent toutes deux servir d'accepteurs.

La mannosyltransférase II semble inhibée par divers nucléotides à guanosine (GTP, GDP, GMP ou GDP-Glc) comme la mannosyltransférase I, mais cette activité n'est pas inhibée par l'amphotricine inhibiteur de la synthèse de Man-P-Dol ce qui confirme que la synthèse de la liaison α 1-3 entre les deux résidus de mannose est obtenue par transfert direct à partir du GDP-Man.

L'utilisation d'analogues structuraux du GDP-Man, comme le guanosine diphosphate ester de 4-deoxy-4-fluoro-D-mannose (GDP-4FMan), *in vitro* avec des membranes microsomiales de cellules embryonnaires de Poulet a permis à Mc Dowell et al. [123] de montrer que cet analogue de glycosyl-nucléotide bloque l'addition de mannose sur le $\text{Man}_1\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ mais n'interfère pas avec la formation de Man-P-Dol, de Glc-P-Dol et de $\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$. Par contre, le guanosine diphosphate ester de 4-deoxy-D-mannose (GDP-4dMan) est un substrat pour les mannosyltransférases qui catalysent le transfert des cinq premiers résidus de mannose sur le $\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$. De plus des cellules de rein de Hamster (BHK) traitées *in vivo* par du 4dMan fabriquent principalement du $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ en présence de mannose pour donner ensuite des structures glycoprotéiniques de type "oligomannosidique" depuis $\text{Glc}_1\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{-}$ à $\text{Man}_5\text{-GlcNAc}_2\text{-}$ très peu "maturées" (pouvant contenir du 4dMan). Il est intéressant de noter que ces deux analogues de mannose contenant des modifications en position C-4 peuvent avoir des effets aussi différents.

Probablement, la forte électronégativité de l'atome de fluor dans le GDP-4FMan est-elle responsable de cet effet inhibiteur, tandis que le GDP-4dMan peut être un substrat de substitution. Dans une étude sur les glycosyltransférases impliquées dans la biosynthèse des O-glycannes chez *Salmonella*, Shibaev en 1978 [124] avait trouvé que pour le GDP-Man les groupements hydroxyles 2, 3 et 6 du résidu D-mannose ne participent pas dans l'interaction avec les mannosyltransférases. Aussi il est possible que la position C-4 du mannose soit un déterminant important dans le mécanisme de reconnaissance enzyme-substrat pour les mannosyltransférases.

3 - Synthèse de $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$

La troisième réaction de cette troisième étape est le transfert de mannose sur le $\text{Man}_2\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ catalysé par une α 1-6 mannosyltransférase (mannosyltransférase III).

Huffaker et Robbins [125] ont sélectionné par suicide au mannose radioactif des mutants de levure *alg2* qui accumulent du $\text{Man}_1\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ et du $\text{Man}_2\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ et transfèrent directement ces oligosaccharides incomplets sur les protéines.

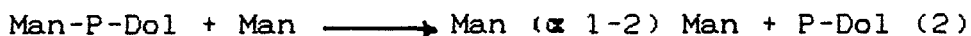
On peut donc envisager que l'activité de la mannosyltransférase III soit déficiente chez ces mutants ; mais l'analyse moléculaire de cette mutation est encore trop incomplète pour identifier exactement la lésion biochimique (Jackson et Robbins [126]).

4 - Synthèse de $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$

La quatrième réaction de cette troisième étape est le transfert de mannose sur le $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ catalysé par une ou deux α 1-2 mannosyltransférases agissant sur la branche en 4' (Fig.5) contenant le $\text{Man}(\alpha\text{-}1,3\text{-})\text{Man} \beta\text{-}$.

En 1977 Forsee *et al.* [127] et Chambers *et al.* [128] ont montré que le plus grand intermédiaire lipidique que l'on puisse obtenir en présence de GDP-Man et d'EDTA 10mM (condition qui inhibe la formation de Man-P-Dol) est une structure $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ et qu'en présence de Man-P-Dol exogène on obtient alors des oligosaccharides plus grands (c'est-à-dire contenant 8, 9 ou 10 résidus de sucre).

En 1976 Schutzbach et Verma [129] avaient montré que des microsomes de foie de Lapin catalysent la synthèse de $\text{Man}(\alpha\text{-}1\text{-}2)\text{Man}$ et de $\text{Man}(\alpha\text{-}1\text{-}3)\text{Man}$ quand ils sont incubés avec du GDP-Man et du mannose libre. Verma *et al.* [130] ont mis en évidence deux autres réactions possibles :



A l'époque ces auteurs suggéraient que l'enzyme catalysant la synthèse de la liaison α 1-2 peut reconnaître le mannose libre en tant que substrat artificiel (à haute concentration) et que son rôle physiologique réel est la synthèse d'intermédiaires lipidiques responsables de la glycosylation des protéines.

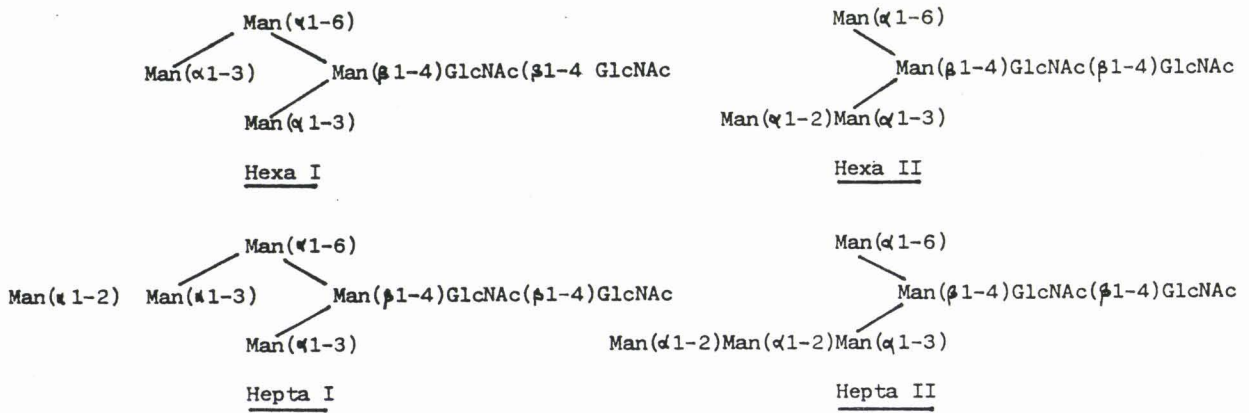


Fig. 14 : Structures des deux isomères d'hexasaccharide (Hexa-I et Hexa-II) et des deux isomères d'heptasaccharide (Hepta-I et Hepta-II) proposées par Vijay et Perdew [12].

5 - Topologie de ces synthèses

En 1984 Snider et Rogers [131] ont utilisé une lectine reconnaissant les oligomannosides (concanavaline A) en tant que sonde pour étudier la position des différents intermédiaires lipidiques.

Il apparaît que seuls les intermédiaires de $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ à $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ sont accessibles à la lectine dans les vésicules intactes et que les autres formes ne le sont qu'après perméabilisation par un détergent. Ces résultats ont amené ces auteurs à proposer un modèle dans lequel la formation de $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ se déroule sur la face cytoplasmique puis cet intermédiaire traverse ensuite la membrane pour y être complété sur la face luminale. Mais, selon Lennarz [132], il serait préférable de dire que les intermédiaires non accessibles directement par la lectine ne sont pas sur la face cytoplasmique.

Ces navettes ("flip-flop") à travers la membrane des intermédiaires lipidiques contenant une partie glycanique de masse moléculaire d'environ 1200 Da sont des faits difficiles à concevoir selon un mécanisme de transport passif.

L'énergie consommée pour effectuer ces navettes doit être importante.

Ainsi, Troy (communication personnelle donnée à Lennarz) a estimé que le mouvement d'un résidu de sucre attaché au dolichol phosphate d'un environnement aqueux vers un environnement hydrophobe d'une double couche, avec la rupture concomitante de quatre liaisons "hydrogène" entre les quatre groupements hydroxyles et l'eau, exigerait la dépense de 25 à 50 kcal/mole ou l'équivalent de 2,5 à 5 molécules d'ATP par passage. Le bilan de la dépense pour une structure comme $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ atteindrait 130 à 260 kcal/mole. Aussi, si de tels passages se produisent, soit l'oligosaccharide n'est pas directement exposé à l'environnement hydrophobe ou alors beaucoup d'énergie est dépensée pour accomplir un tel processus.

6 - Discussion

Les connaissances en biochimie acquises plus tard firent penser que l'addition des résidus de mannose sur l'oligosaccharide-pyrophospho-dolichol s'effectue dans un ordre privilégié, mais d'autres voies alternatives mineures sont également possibles. Ainsi Vijay et Perdew [133] ont identifié en 1980 deux isomères d'hexasaccharides et deux isomères d'heptasaccharides (Fig. 14 ci-contre) provenant d'incubations de membranes de glande mammaire de Vache en présence d'UDP-GlcNAc et de GDP-Man. Il apparaît dans ce travail que la voie majeure passe par la structure Hepta-II, identique à celle trouvée par Li et Kornfeld [134] dans les intermédiaires lipidiques des cellules CHO infectées par le virus de la Stomatite vésiculeuse.

En effet, Vijay et Perdeu ont montré qu'en ajoutant du P-Dol exogène à leur système d'incorporation *in vitro* la teneur ou structure Hepta I augmente fortement.

L'ordre d'action des différentes mannosyltransférases peut être profondément modifié. Ainsi Pan et Elbein [135] ont montré que des cellules de rein de Chien (MDCK), qui normalement forment du $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$, se mettent à fabriquer des intermédiaires lipidiques à $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ "inhabituel" en présence de mannosamine (Fig. 15).

Ces structures semblent différentes des oligosaccharides de composition équivalente habituellement rencontrés dans le cycle des dolichols. En effet, ces oligosaccharides sont sensibles à l'action de la β -endo-N-acétyl-glucosaminidase H, et l'analyse par méthylation indique qu'ils contiennent deux résidus de mannose liés en α -1,3-. Des expériences de chasse indiquent qu'une inhibition se produit dans la biosynthèse des intermédiaires lipidiques, peut-être au niveau des α 1-2 mannosyltransférases.

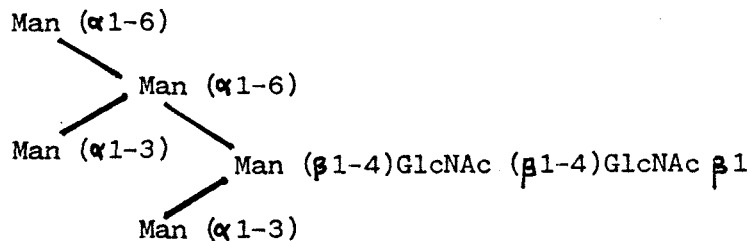


Fig. 15 : Structure de l'oligosaccharide des intermédiaires lipidiques obtenus par des cellules MDCK en présence de mannosamine selon Pan et Elbein [135].

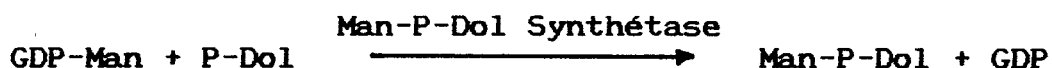
Une observation faite par ces auteurs semble d'un intérêt considérable : ces oligosaccharides PP-Dol ne sont pas allongés plus loin que $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ et sont malgré tout transférés sur les protéines pour être ensuite "maturés" en structures de type mixte (à la fois N-acétyllactosaminique et oligomannosidique).

Or en l'absence de mannosamine ces cellules n'élaborent pas de structures glycoprotéiniques mixtes.

Ces faits indiquent d'une part que la présence de glucose dans les intermédiaires lipidiques n'est pas une condition absolue du transfert de l'oligosaccharide sur les protéines. D'autre part, peut-être que la mannosamine inhibe également la mannosidase II de la maturation des glycoprotéines.

E - SYNTHÈSE DE Man-P-Dol

1 - La réaction enzymatique



Sachant que le résidu de mannose dans le GDP-Man est de configuration anomérique α et que celui-ci est le précurseur du mannose de configuration anomérique β dans le Man-P-Dol ; il faut donc envisager un mécanisme avec inversion de configuration lors du transfert (Herscovics *et al.* [136]). Le contrôle est simple : l'anomère α est stable après traitement par NaOH 0,1 M à 65 - 90°C pendant 30 min, tandis que l'anomère β est détruit dans ces conditions.

C'est une réaction de transfert catalysée par la Man-P-Dol synthétase (EC 2.4.1.83) des membranes du réticulum endoplasmique. Le produit obtenu, le Man-P-Dol, a été isolé par Evans et Hemming [137] et par Baynes *et al.* [138] ; sa structure a été confirmée par Warren et Jeanloz [139] en 1973. Cette synthèse est en général très rapide (< 1min) et atteint un plateau au bout de 2 à 5 min.

La réaction est inhibée par l'amphotricine, un lipopeptide produit par *Streptomyces canus*.

Le Km pour le P-Dol de cet enzyme est environ 1 μ M. Quand la longueur de la chaîne isoprénique passe de 100 à 35 atomes de carbone la vitesse est alors 10 fois plus faible et le changement du résidu α -saturé pour un résidu isoprène insaturé multiplie d'un facteur 10 le Km pour le P-Dol. On peut donc dire que cet enzyme reconnaît son substrat. C'est ce que pensent Albright *et al.* [140] comme nous l'avons vu précédemment à propos des protéines des gènes ALG7 et ALG1.

Le Man-P-Dol participe à la N-glycosylation des protéines en tant que donneur des quatre derniers résidus de mannose au cours de l'élaboration de l'intermédiaire lipidique final : le Glc₃Man₉GlcNAc₂-PP-Dol. Chez les champignons, le Man-P-Dol est aussi le donneur du premier résidu de mannose qui est lié O-glycosidiquement sur la sérine ou la thréonine des glycoprotéines (Babczinski et Tanner [141], Sharma *et al.* [142], Bretthauer et Wu [143], Bause et Lehle [144]).

La Man-P-Dol synthétase n'est pas localisée uniquement dans le réticulum endoplasmique, on la trouve également au niveau de la membrane mitochondriale externe des cellules de foie de Souris (Gasnier *et al.* [145]). Purifié après solubilisation par un détergent cet enzyme est activable et stabilisé par des phospholipides neutres, la lysophosphatidylcholine étant le meilleur activateur. Quand l'enzyme est intégré dans des

liposomes contenant de la sphingomyeline, son activité est fortement inhibée par du cholestérol. Cette inhibition peut s'expliquer par une diminution de la fluidité de l'environnement phospholipidique de l'enzyme, puisque les esters de cholestérol donnent l'effet inverse.

L'enzyme de levure a été purifié par Haselbeck et Tanner [146, 147], c'est une protéine membranaire de 30 kDa qui garde son activité en présence de détergents non ioniques. La perméabilisation préalable des membranes par un détergent permet son inhibition par le N-ethylmaleimide (réactif des groupements sulfhydryles) et par la trypsine. Ce résultat semble indiquer que l'enzyme se situe sur la face luminale ; ceci en contradiction avec Snider *et al.* [148] qui signalent que l'enzyme de foie de Rat est attaquée par la trypsine sans qu'il soit nécessaire d'ouvrir les membranes. La différence entre ces deux expériences réside dans le fait que Snider *et al.* ont utilisé une concentration en trypsine de 2mg/ml et incubé les membranes à 30°C, alors qu'Haselbeck utilise 14µg/ml de trypsine à 0°C. Or il est connu que la trypsine étant plus active à 30°C perméabilise les membranes (Feldman *et al.* [149], Hanover et Lennarz [150]).

2 - Topologie de cette synthèse

La topologie de la synthèse du Man-P-Dol est un problème intéressant puisque la synthèse et l'utilisation ultérieure de ce glycolipide se déroulent apparemment à des sites opposés de la membrane du réticulum endoplasmique. Dans les cellules de mammifères le GDP-Man semble être disponible seulement sur la face cytoplasmique, mais le transfert du mannose du Man-P-Dol sur l'oligosaccharide-pyrophosphoryl-dolichol se produit au niveau de la face luminale (Hirschberg et Snider [151], Lennarz [152]).

Des études utilisant divers phospho-dolichols et des vésicules artificielles constituées de phospholipides indiquent que le transfert du Man-P-Dol au travers de la double couche ne peut s'effectuer à une vitesse assez rapide pour satisfaire les besoins de la glycosylation des protéines (Mc Closkey et Troy [153]). Cette contradiction a amené Haselbeck et Tanner [154, 155] à utiliser la Man-P-Dol synthétase de levure pour étudier le transport du mannose. Des liposomes constitués de lécithine de soja, de P-Dol et chargés en GDP mis en présence de GDP-Man dans le milieu extérieur ne peuvent catalyser la formation de Man-P-Dol et le transport du GDP-Man vers l'intérieur avec sortie concomitante de GDP que si l'enzyme est inclus dans les liposomes. Un antisérum dirigé contre cet enzyme indique qu'il s'agit d'une protéine intégrée aux membranes du RER et localisée au niveau de la face cytoplasmique (C.F. Albright et P. Orlean, résultats non publiés).

3 - Structure de l'enzyme

Pour mieux comprendre la structure de la Man-P-Dol synthétase et établir la relation structure-fonction de cet enzyme, Orlean, Albright et Robbins [156] ont isolé son gène structural (DPM 1) en repérant, après complémentation avec une banque de gènes de levure, des colonies qui surexpriment l'activité Man-P-Dol synthétase. Le séquençage de l'ADN du gène DPM 1 révèle un cadre de lecture ouvert de 801 bases.

La masse moléculaire de 30 kDa de la protéine supposée est en accord parfait avec celle de l'enzyme purifié. Sa structure primaire, prédite selon la séquence nucléotidique, contient une séquence-signal N-terminale typique ainsi qu'une séquence C-terminale hydrophobe capable d'interagir avec la partie polyisoprénique du substrat dans la membrane.

Cette structure primaire supposée contient aussi un site possible de phosphorylation par la protéine kinase AMPc-dépendante. La séquence voisine de la serine₁₄₁ est Arg-Arg-Val-Ile-Ser₁₄₁-Ser. Il est admis que la séquence requise pour la phosphorylation est un résidu de serine ou de thréonine entouré de 2 ou 3 résidus hydrophobes et d'une paire de résidus basiques (Krebs et Beavo [157]).

4 - Importance du Man-P-Dol

Le clivage du gène DPM1 par insertion du gène LEU 2 de la levure montre que la Man-P-Dol synthétase est essentielle à la croissance. Cependant de nombreux résultats suggèrent que le rôle du Man-P-Dol dans la N-glycosylation n'est pas essentiel pour la viabilité des cellules. Les gènes de levure, ALG 7, ALG 1, et ALG 2, dont les produits sont impliqués dans la synthèse des premiers intermédiaires lipidiques jusqu'au Man₃GlcNAc₂-PP-Dol, sont essentiels pour la viabilité des cellules (Barnes et al. [158]). Tandis que les mutants des gènes ALG 3, ALG 5, ALG 6 et ALG 8, qui sont déficients dans la synthèse des intermédiaires lipidiques après Man₅GlcNAc₂-PP-Dol, poussent normalement (Huffaker et Robbins [159], Runge et al. [160, 161]).

Des observations identiques ont été faites avec des cellules de mammifères. Les cellules mutantes Thy-1-E du lymphome de Souris (Chapman et al. [162]) et les cellules mutantes B₄₂₁ de l'ovaire de Hamster chinois (Stoll et al. [163]), qui ne synthétisent pas de Man-P-Dol mais transfèrent l'oligosaccharide Glc₃Man₅GlcNAc₂ sur les protéines, sont parfaitement viables.

Le Man-P-Dol est aussi impliqué dans l'assemblage du glycosylphosphatidyl-inositol qui sert à certaines protéines pour "s'ancrer" dans la membrane des cellules de mammifères (Low et Saltiel [164]), de levures (Conzelmann et al. [165]) et de Trypanosome (Schwarz et al. [166]).

L'utilisation d'antibiotiques qui se complexent au P-Dol comme l'amphotricine et la tsushimycine dans des systèmes membranaires *in vitro* a permis de montrer qu'en bloquant l'incorporation du mannose dans le Man-P-Dol les intermédiaires lipidiques obtenus sont de type $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ (Kang et al. [167], Elbein [168], Banerjee [169]).

Ces résultats confirment donc que les cinq premiers résidus de mannose liés aux intermédiaires lipidiques proviennent d'un transfert direct à partir du GDP-Man.

F - FORMATION DU MAN₅GLCNAC₂-PP-Dol

La quatrième étape de la biosynthèse des intermédiaires lipidiques est un ensemble de transferts de 4 résidus de mannose du Man-P-Dol sur le Man₅GlcNAC₂-PP-Dol.

Ainsi les mutants alg 3 qui accumulent des Man₅GlcNAC₂-PP-Dol (Huffaker et Robbins [170]) peuvent être soit déficients en mannosyltransférase, soit bloqués dans la synthèse de Man-P-Dol ou encore bloqués dans le passage des Man₅GlcNAC₂-PP-Dol de la face cytoplasmique vers la face luminale. Il semble d'après Runge [171] que la première hypothèse soit la bonne, puisque les membranes de ces mutants synthétisent du Man-P-Dol et que l'intermédiaire lipidique incomplet permet le transfert de l'oligosaccharide sur les protéines, une réaction qui se déroule dans la lumière du RER.

On peut envisager qu'il existe au moins trois mannosyltransférases différentes au niveau de cette quatrième étape puisque trois types de liaisons osidiques sont élaborées : Man (α 1-3)Man, Man (α 1-6)Man et Man (α 1-2)Man.

Ainsi parmi cinq mutants de *Dictyostelium discoideum*, isolés par Knecht et al. [172] et déficients au niveau d'un déterminant antigénique commun (CA1) à toutes ces cellules, Freeze et al. [173] ont trouvé que deux de ces souches synthétisent un intermédiaire lipidique tronqué de type Man₆GlcNAC₂-PP-Dol (Fig. 16).

Il semble que ces deux souches soient déficientes d'au moins une transférase puisqu'elles synthétisent autant de Man-P-Dol que la souche sauvage.

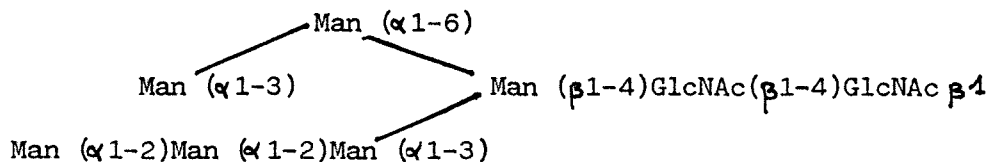
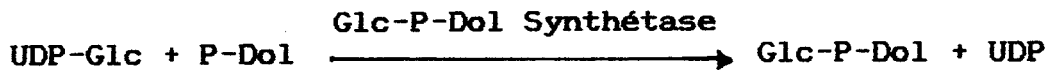


Fig. 16 : Structure de la partie glycanne de l'intermédiaire lipidique tronqué synthétisé par deux mutants (HL241 et HL243) de *Dictyostelium discoideum* d'après Freeze et al. [173].

G - SYNTHÈSE DE Glc-P-Dol



Behrens, Parodi et Leloir [174] ont établi que le glucosyl-phospho-dolichol (Glc-P-Dol) est un précurseur intermédiaire de la glycosylation des accepteurs endogènes dans les microsomes de foie.

Le transfert de résidus de glucose de l'UDP-Glc sur un composé soluble dans les solvants organiques par des protéines membranaires de levure est stimulée par l'addition de phospho-dolichol de foie selon Palamarczyk et Chojnacki [175]. Plusieurs substances ont été identifiées par Parodi [176] dans un tel système. L'une a été identifiée comme étant du Glc-P-Dol, l'autre est un stérylglycoside (tous deux solubles dans le mélange chloroforme-méthanol, 2:1, V/V) ; une autre semble être du Glc₃Man₉GlcNac₂-PP-Dol (soluble dans le mélange chloroforme-méthanol-eau, 10:10:3, V/V/V).

Un travail identique à celui de Parodi réalisé par Herscovics et al. [177] avec des microsomes de pancréas de Veau montre que le Glc-P-Dol est de configuration anomérique β comme le Man-P-Dol. Donc, il se produirait une inversion de configuration au cours du transfert du résidu de glucose.

L'étude de la Glc-P-Dol synthétase a longtemps été retardée par sa grande instabilité. Villemez et Carlo [178] ont pu étudier une forme soluble et relativement stable de cet enzyme à partir d'un extrait d'*Acanthamoeba castellanii*.

Gold et Green [179] ont réussi à purifier de façon importante l'enzyme des cellules MOPC-315 du plasmocytome de la Souris. Leur enzyme est stabilisé par addition d'EGTA 1mM et activable par des phospholipides contenant de la choline, sa masse moléculaire est estimée à 37 kDa.

Le fait que cette glucosyltransférase soit activée par divers phospholipides contenant de la choline n'est pas étonnant puisque Ravoet et al. [180] après fractionnement subcellulaire du foie de Rat ont montré que l'enzyme est une protéine intégrée aux membranes du réticulum endoplasmique et qu'elle est répartie de manière à peu près uniforme entre les portions lisses et les portions rugueuses.

D'une part, Huffaker et Robbins [181] en utilisant leur méthode de sélection par suicide au mannose [³H] ont sélectionné un mutant de levure (alg 5-1) déficient dans la glycosylation des protéines sur l'asparagine qui accumule des Man₉GlcNac₂-PP-Dol. La caractérisation biochimique de ce mutant a montré que l'alg 5-1 est bloqué dans la synthèse du Glc-P-Dol.

D'autre part un travail récent de Previato et al. [182] et Moraes, Bosh et Parodi [183] montre que le trypanosome *Leptomonas samueli* est déficient en Glc-P-Dol, l'intermédiaire lipidique synthétisé dans ce cas est le $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$. Celui-ci est ensuite transféré sur les protéines puis subit une maturation pour donner une nouvelle structure oligomannosidique "complexe" contenant du galactofuranose (Fig.17).

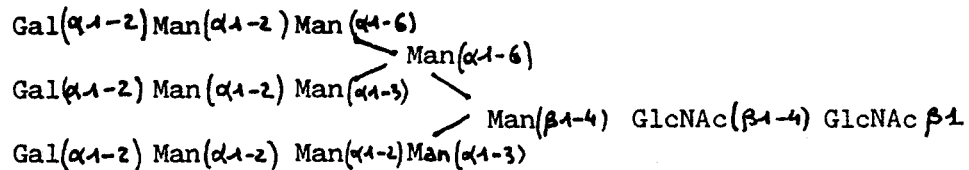


Fig. 17: Structure oligomannosidique "complexe" des glycoprotéines de *Leptomonas samueli*, d'après Previato et al. [182].

Il est fort probable que le donneur de galactofuranose soit l'UDP-Gal. D'une part ce glycosynucléotide a été trouvé dans le champignon *Penicillium charlesii*, où il est impliqué dans la synthèse d'un galactomannane.

Il faut signaler d'autre part qu'il est possible de fabriquer artificiellement des oligosaccharide-PP-Dol chimériques comme Hanover et Lennarz [184] en faisant agir la galactosyltransférase sur $\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$. De même, de Iannino et Dankert [185] en incubant dans un premier temps du phospho-dolichol de foie, de l'UDP-Gal et une préparation particulière d'*Acetobacter xylinum* pour préparer du Gal-P-Dol et dans un deuxième temps en faisant réagir ce dernier avec des microsomes de foie de Rat ont obtenu les structures $\text{Gal}_1\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ (composé I) et $\text{Gal}_1\text{Glc}_1\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ (composé II) (Fig.18). Dans ces structures les résidus de galactose apparaissent liés en $\alpha 1-3$ dans les mêmes positions que les résidus de glucose dans les composés physiologiques respectifs.

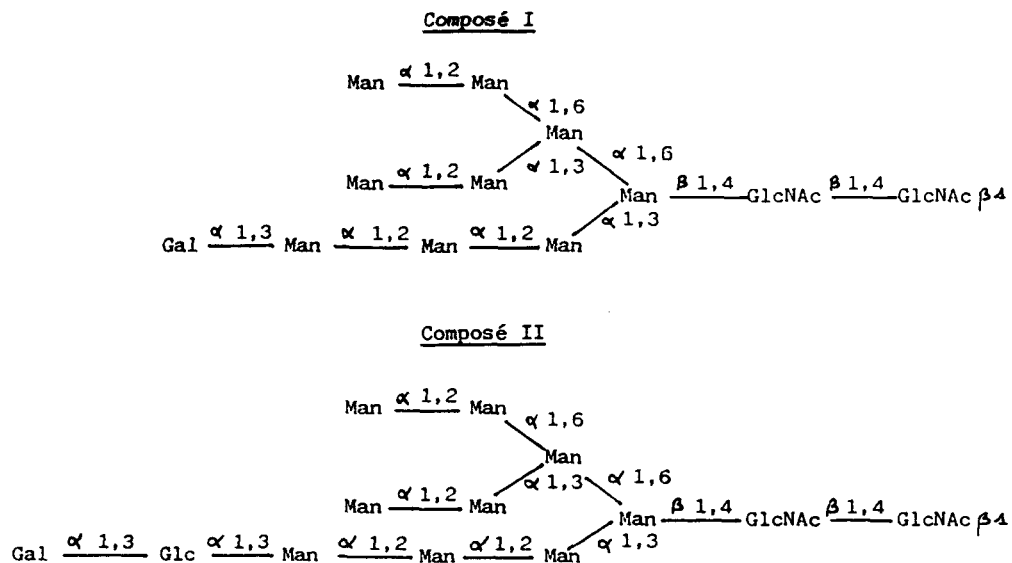


Fig. 18 : Structure des oligosaccharidyl-PP-Dol chimériques (I et II) proposées par de Iannino et Dankert [185].

Aucun composé Gal₁Glc₂Man₃GlcNac- n'est formé ; ceci suggère l'existence d'au moins deux Glc-P-Dol:oligosaccharide-PP-Dol glucosyltransférases, dont l'une est capable d'utiliser comme substrat le Gal-P-Dol à la place du Glc-P-Dol. Au cours de l'incubation du Gal-P-Dol avec les microsomes de foie de Rat le transfert "en bloc" des oligosaccharides chimériques sur les protéines se déroule normalement et seules les mannosidases endogènes sont capables d'agir sur ces structures.

Il est important de signaler que l'oligosaccharidyltransférase endogène n'a pas distingué un oligosaccharide chimérique d'une structure normalement glucosylée.

Il est également important de signaler que les dérivés polypréniques trouvés chez les algues et les végétaux supérieurs sont presque identiques au dolichol des mammifères.

Chez les végétaux supérieurs on trouve des N-glycoprotéines dont la biosynthèse des glycanes se déroule via le cycle des dolichols ; mais on trouve également des glycoprotéines contenant du glucose exclusivement. Ainsi le système le mieux connu concerne les premières étapes de la biosynthèse de la cellulose (Hopp et al. [186,187]). Dans ce système, des oligosaccharide-PP-Dol ayant des enchaînements de résidu de glucose liés en β 1-4 sont formés à partir d'UDP-Glc avec comme premier intermédiaire lipidique un Glc-PP-Dol. Torossian et Maclachlan [188] utilisant un système *in vitro* d'incorporation de GDP-Man, UDP-GlcNac et UDP-Glc dans des membranes de pois en germination, ont montré qu'en présence de phosphodolichol exogène à courte chaîne (ficaprenol à C₅₅) il se forme et s'accumule des Glc-PP-Dol et Man-PP-Dol. Si l'on peut penser que le Glc-PP-Dol peut servir d'initiateur à la synthèse de la cellulose, c'est la première fois que l'on décrit un Man-PP-Dol et la fonction de ce nouvel intermédiaire lipidique reste à déterminer.

H - FORMATION DU $\text{Glc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$

La cinquième et dernière étape de la biosynthèse des intermédiaires lipidiques est la glucosylation de la branche en α 1-3 des mannoses via le Glc-P-Dol . Deux résidus de glucose sont liés par des liaisons α 1-3, tandis que le résidu terminal de glucose est lié par une liaison α 1-2.

Trois mutants alg défectueux au niveau de la glucosylation ont été isolés par Runge et al. [189,190] chez la levure. Les mutants portant les mutations *alg5* ou *alg6* accumulent le $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$; les *alg5* sont déficients dans la synthèse du Glc-P-Dol , tandis que les *alg6* en synthétisent normalement mais sont probablement déficients au niveau de la première glucosyltransférase(I). Le mutant *alg8* ne peut pas ajouter le second résidu de glucose en α 1-3 sur le $\text{Glc}_1\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ qui s'accumule alors. L'oligosaccharide est ensuite transféré sur la protéine, puisque le traitement à l'endo- β -N-acétylglucosaminidase H de la fraction glycoprotéinique marquée *in vivo* par le $\text{Man} [^3\text{H}]$ libère deux oligosaccharides : l'un a une structure de type $\text{Glc}_1\text{Man}_3\text{GlcNAc}_1$, l'autre est son produit légèrement élagué de type $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_1$.

On peut penser que cette mutation *alg8* est due à une déficience en α 1-3glucosyltransférase II. En effet, en construisant le double mutant *alg8gls1*, pour lequel la mutation *gls1* correspond à une perte d'activité de la glucosidase I qui coupe les liaisons α 1-2 du glucose, Runge et Robbins ont constaté l'existence après traitement à la β -endoH des glycoprotéines d'un nouvel oligosaccharide de structure $\text{Glc}(\alpha$ 1-2) $\text{Glc}(\alpha$ 1-3) $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_1$. Ce nouveau composé est probablement produit par action de la glucosyltransférase III qui ajoute normalement du glucose en α 1-2 sur les intermédiaires lipidiques portant le glycanne $\text{Glc}(\alpha$ 1-3) $\text{Glc}(\alpha$ 1-3) $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$.

Il est intéressant de signaler également que dans des systèmes membranaires de thyroïde Murphy et Spiro [191] ont mis en évidence une inhibition sélective de cette glucosyltransférase III par des concentrations élevées en sel (NaCl 0,4M) avec accumulation de $\text{Glc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$. Rien ne permet encore d'expliquer cet effet *in vitro* du sel sur la glucosylation des intermédiaires lipidiques.

La topologie membranaire du dernier intermédiaire lipidique du cycle des dolichols est un problème qui a été abordé par Hanover et Lennarz en 1980 [192]. En utilisant comme sonde non pénétrante l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase H, cette enzyme n'agissant que si les microsomes ont été, au préalable, solubilisés par un détergent, ils ont montré l'orientation luminale de l'oligosaccharide-pyrophospho-dolichol complet.

En outre, Kornfeld et Kornfeld [193] ont montré que les glucosyltransférases ne sont pas sensibles à l'action des protéases sur des microsomes intacts, ce qui indique ainsi leur orientation luminale. En 1982 Snider et Robbins [194], utilisant la concanavaline A comme sonde non pénétrante, ont confirmé que le $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ est bien situé sur la face luminale du RER.

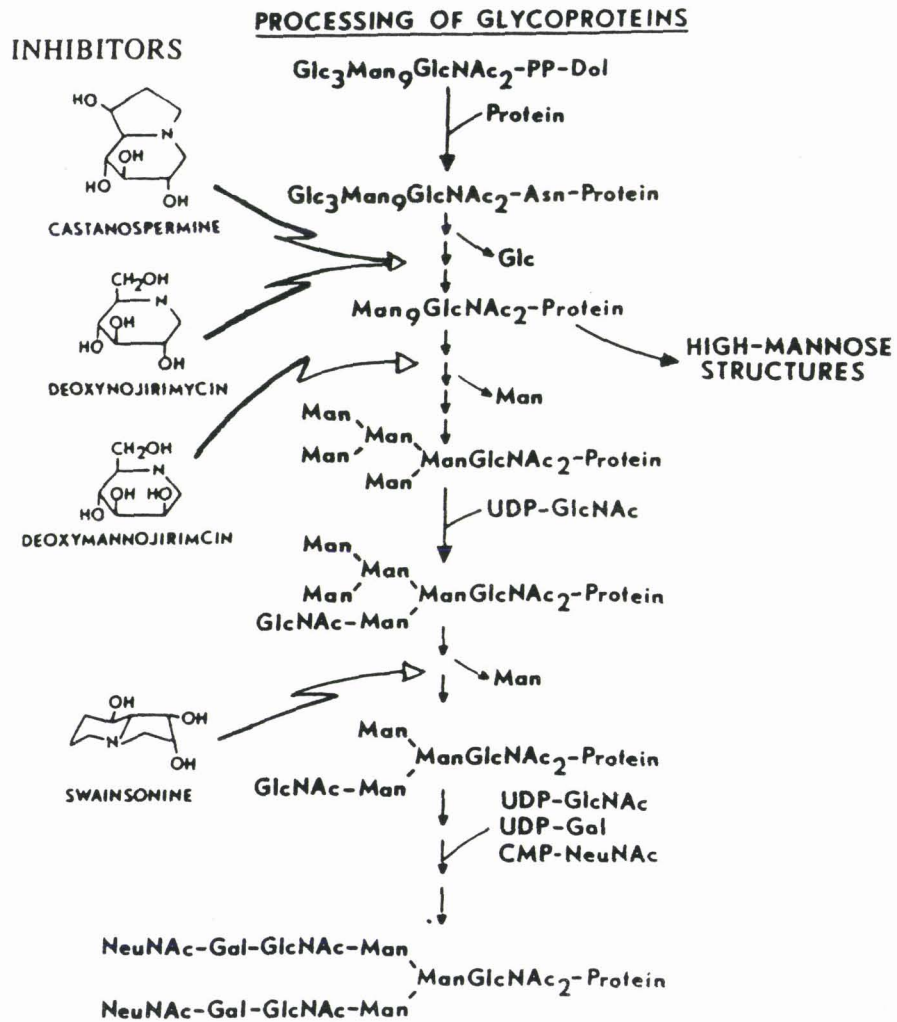
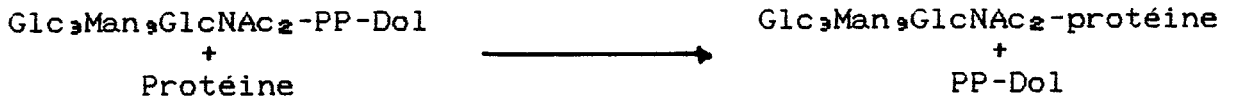


FIG. B Reactions involved in the processing of the oligosaccharide chain of asparagine-linked glycoproteins. After transfer of oligosaccharide to protein, the oligosaccharide is subjected to a number of processing reactions that lead to removal of all of the glucose and some of the mannose units to give rise to complex chains. (d'après Elbein [103]).

I - TRANSFERT "EN BLOC" SUR LA PROTEINE

1 - Introduction



La réaction la plus importante du cycle des intermédiaires lipidiques est le transfert en bloc du glycanne complet sur la protéine. Dans cette réaction enzymatique l'oligosaccharide $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ est transféré sur la chaîne latérale carboxyamido du résidu d'asparagine. L'oligosaccharide de type oligomannosidique peut ensuite subir une maturation, (Processing) c'est-à-dire un élagage associé à une reconstruction pour être transformé en structure de type différent (mixte ou N-acétyl-lactosaminique) selon le processus décrit dans la figure B ci-contre.

L'enzyme qui catalyse le transfert en bloc du glycanne est particulièrement intéressant pour plusieurs raisons :

Premièrement, dans la plupart des cas la réaction est cotranslationnelle, c'est-à-dire qu'elle se déroule en même temps que la chaîne polypeptidique s'allonge.

Deuxièmement, les substrats sont particuliers : l'un étant constitué d'une chaîne oligosaccharidique polaire attachée à un lipide extrêmement hydrophobe, il s'agit de l'oligosaccharide-PP-Dol ; l'autre étant la chaîne latérale d'un résidu d'acide aminé inclus dans une chaîne polypeptidique naissante.

Troisièmement, la réaction engage apparemment un groupement carboxyamido en tant que nucléophile et un Dol-PP en tant que groupement éliminé.

Quatrièmement, seules les séquences Asn-Xaa-Ser/Thr (appelées sequons) dans le polypeptide peuvent être glycosylées.

Sur la base de ces considérations, il semble nécessaire de passer en revue les propriétés et la spécificité de l'oligosaccharidyltransférase pour mieux comprendre la biosynthèse des glycoprotéines.

Ce sujet a fait l'objet de deux revues générales dont les auteurs sont Montreuil [195] et Kaplan, Welply et Lennarz [1961].

2 - Substrats de l'oligosaccharidyl transférase

a) La protéine

Les premières études relatives au site peptidique de reconnaissance sont celles qui ont démontré que la liaison entre l'oligosaccharide et la protéine est une liaison N-glycosidique sur un résidu d'asparagine, comme Montreuil et al [1971] ainsi que d'autres chercheurs l'ont mis en évidence (cf. revues générales de Spiro [1981] et Kornfeld [1991]).

En outre, l'examen de la séquence (ou "sequon") en acides aminés adjacents au résidu d'asparagine portant le glycanne a conduit Marshall ^{Neuberger en 1968 [1968]} en 1974 [2001] à proposer que la séquence -Asn-Xaa-Ser/Thr-, où Xaa est l'un des 20 acides aminés (sauf Pro), soit le code indiquant où le transfert doit avoir lieu.

En 1978, C. Ronin et al [200a, 200b] démontraient que l'oligosaccharidyl transférase de thyroïde de Porc peut glycosyler "in vitro" des petits peptides possédant la séquence -Asn-Ala-Thr- et que le transfert est d'autant plus efficace que la partie N-terminale est plus longue.

Une étude de Struck et Lennarz [201] en 1980 concernant la distribution des acides aminés pris individuellement dans la position Xaa de la séquence -Asn-Xaa-Ser/Thr- montre que Cys, Trp et Pro donnent un pourcentage presque nul (0,1 %) de glycosylation.

En 1981, C. Ronin et al. [201a] ont précisé plusieurs points concernant l'accepteur : le résidu d'asparagine ne peut être remplacé par un résidu de glutamine, de même le résidu de thréonine par l'homosérine; les résidus de proline ou de méthyl-alanine en position Xaa inhibent la glycosylation. Un travail récent de Roitsch et Lehle [202] montre que le résidu de proline, s'il est placé en position N-terminale avant le résidu Asn n'inhibe pas la glycosylation, alors que s'il est placé en position Xaa ou après le résidu Thr du côté C-terminal il y a inhibition. Ces résultats acquis avec des peptides accepteurs synthétiques utilisés dans des systèmes *in vitro* nécessitent pour être confirmés d'utiliser une autre technique applicable *in vivo*, comme la mutagenèse dirigée du site accepteur que Lehle a commencé à mettre en oeuvre.

Compte-tenu de ce que l'on sait sur l'influence de la proline il est étonnant qu'un résidu de proline ait été détecté en position Xaa près d'une asparagine glycosylée dans la séquence 21-23 de la ribonucléase de Cheval (Scheffer et Beintema [203]).

Cependant, le fait que très peu de séquences tripeptidiques adéquates sont glycosylées (7,5 % sur environ 2 000 séquons tripeptidiques de structure connues en 1980) semble indiquer que la séquence -Asn-Xaa-Ser/Thr est nécessaire, mais non suffisante, pour la glycosylation. Le vrai pourcentage est sans doute un peu plus élevé si l'on exclut les protéines cytoplasmiques, parce qu'elles n'ont jamais l'opportunité de réagir avec l'oligosaccharidyltransférase au cours de leur synthèse.

D'une part Aubert et al. [204] et Beeley [205] ont attiré l'attention sur l'importance d'une structure secondaire bien appropriée au niveau des sites accepteurs de la protéine. Ces études statistiques suggèrent que les sites accepteurs sont présents dans des coudes- β (β -turns). En effet, les peptides capables d'être glycosylés *in vitro* avec un bon rendement sont ceux qui adoptent cette structure privilégiée (Aubert et al. [206]) et cela d'autant plus que la structure est allongée (Bause et al. [207]). De plus la réalisation de sites potentiels de glycosylation sur des peptides exige la possibilité qu'une liaison hydrogène puisse s'établir entre le groupement β -amido de l'asparagine et le groupement hydroxyle de la thréonine (Bause et Legler [208], Bause [209]).

D'autre part de nombreux exemples montrent que des sites potentiels de glycosylation des protéines ne sont pas glycosylés *in vivo*. L'accessibilité de ces sites peut déterminer si la glycosylation se produira ou non (Pless et Lennarz [210], Kronquist et Lennarz [211]). Cependant, certains résultats obtenus avec l'ovalbumine suggèrent que d'autres facteurs peuvent intervenir. Ainsi l'ovalbumine isolée du blanc d'oeuf de Poule contient un seul glycanne sur l'Asn₂₉₉, mais n'est pas glycosylée sur le site suivant Asn₃₁₂, c'est-à-dire 19 résidus d'acides aminés plus loin. La glycosylation de ce second site peut s'observer *in vitro* seulement après réduction et alkylation de la protéine (Catterall et al. [212]). L'interprétation la plus simple de ces faits serait que le second site n'est pas glycosylé *in vivo* parce que, au cours de la traduction rapide, le polypeptide naissant adopte une conformation dans le voisinage du second site qui l'empêche de réagir avec l'oligosaccharidyltransférase (Glabe et al. [213]).

En accord avec cette idée, Sheares et Robbins [214] ont observé que l'ovalbumine synthétisée *in vivo* dans un système hétérologue (cellules de Souris infectées par le virus de l'Herpès simplex contenant un plasmide portant le gène de l'ovalbumine) n'est glycosylée que sur le premier site.

Ces résultats amènent la question suivante :

Quelle doit être la longueur minimale de la chaîne naissante avant que la glycosylation puisse se produire *in vivo* ?

Le modèle courant de structure du réticulum endoplasmique rugueux suggère qu'un minimum d'environ 60 résidus d'acides aminés est exigé pour que le sequon puisse sortir du ribosome et passer la double couche lipidique (Shapiro et al. [215], Sabbatini et al. [216]). Ce chiffre a été ramené à 45 par Glabe et al. [217] dont 30 résidus entre le ribosome et le sequon puis 15 résidus entre le sequon et l'extrémité N-terminale.

Un autre exemple qui montre que d'autres facteurs peuvent être déterminants dans la glycosylation nous vient des tentatives de conversion de RNase A (non glycosylée) en RNase B (glycosylée). *In vitro*, la RNase A native ne peut être glycosylée par un système membranaire (résultats personnels, DEA, Lille 1971), alors que sous forme dénaturée elle peut être convertie en RNase B (Catterall et al. [219]). Cependant, dans des coupes minces de tissu pancréatique, dans lequel seulement une petite fraction de la RNase nouvellement synthétisée est glycosylée (15 %), l'addition de P-Dol exogène provoque la glycosylation de plus de 90 % de la protéine. Dans ce cas, le facteur de contrôle semble être la quantité d'oligosaccharide-PP-Dol disponible après glycosylation du P-Dol dans le voisinage du second site de la protéine qui l'empêche de réagir avec l'oligosaccharidyltransférase .

b) l'oligosaccharide-PP-Dol

Il existe beaucoup moins d'information sur la spécificité de l'oligosaccharidyl transférase vis à vis du second substrat: l'oligosaccharide-pyrophosphoryl-dolichol. Les résultats des premières études sont souvent difficiles à interpréter parce que les oligosaccharide-PP-Dol endogènes peuvent entrer en compétition avec les substrats exogènes étudiés. Néanmoins, la conclusion d'ensemble de ces études (Waechter et Lennarz [220], Hubbard et Ivatt [221], Hoflack et al. [222]) est que l'oligosaccharide-PP-Dol complet, contenant les trois résidus de glucose, est un substrat plus efficace que ceux dépourvus de ces derniers (Turco et al. [223] ; Staneloni et al. [224]).

La glucosylation des intermédiaires lipidiques à partir de l'UDP-Glc passant par le Glc-P-Dol semble être une étape importante dans la glycosylation des protéines.

Ainsi, chez un mutant de levure (*mn1 mn2 mn9 gls1 dpg1*) l'absence de Glc-P-Dol réduit l'efficacité du transfert de l'oligosaccharide sur les protéines (Ballou et al. [225]), de même des membranes microsomales de levure (souche sauvage) incubées *in vitro* en présence de GDP-Man ne synthétisent des oligosaccharide-PP-Dol glucosylés que si la concentration en UDP-Glc atteint 50 μ M (Trimble et al. [226]) et la vitesse de la N-glycosylation est 25 fois plus rapide avec les espèces glucosylées par rapport au $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ (Trimble et al. [227]). De plus Murphy et Spiro [228] ont montré que des membranes microsomales de thyroïde glycosylent 10 fois plus vite les protéines en présence de $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ plutôt qu'en présence de la forme à deux résidus de glucose.

Les réactions enzymatiques qui déterminent la teneur en glucose des intermédiaires lipidiques peuvent donc avoir un pouvoir de régulation de la N-glycosylation des protéines. En effet, la privation en énergie, produite dans des coupes de thyroïde par incubation en présence d'un découplant des phosphorylations oxydatives le CCCP (carbonylcyanure de m-chlorophenyl hydrazone) ou d'inhibiteurs de la respiration (N_2 à 95% + CO_2 à 5%, antimycine A), amène une disparition du $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ et une accumulation de $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ avec une baisse concomitante de la N-glycosylation (Spiro et al. [229]).

Le même phénomène a été observé par Chapman et Calhoun [230] dans des cultures de cellules (CHO) avec accumulation de $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$. Dans ce cas la synthèse *in vitro* du $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ est normale, mais *in vivo* :

- soit le GDP-Man disponible est utilisé pour synthétiser préférentiellement le $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$, provoquant ainsi une réduction de la synthèse en Man-P-Dol et par là celle des $\text{Man}_6\text{-}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$,

- soit comme le proposent Snider et Rogers [231] le Man-P-Dol est synthétisé normalement sur la face cytoplasmique du RER, mais ne peut plus atteindre la face luminale.

Cependant, des oligosaccharide-PP-Dol à glycanes courts, y compris GlcNAC₂-PP-Dol, peuvent être transférés *in vitro* sur des accepteurs protéiques dans des systèmes membranaires d'oviducte de Poule (Chen et Lennarz [232]), de parasites d'insectes (Parodi et al. [233]), de levure (Sharma et al. [234]) et *in vivo* dans des lymphocytes (Hoflack et al. [235]). C'est ainsi que la chitobiosyl-protéine ainsi formée serait ensuite mannosylée. Selon Hoflack et al. [236] cette mannosylation directe des chitobiosyl-protéines peut représenter une seconde route pour la N-glycosylation des protéines.

En outre, des études *in vivo* utilisant des cellules CHO privées de glucose (Chapman et al. [237]) ainsi que des cellules mutantes (Thy-1-E) déficientes en Man-P-Dol synthétase (Kornfeld et al. [238]) indiquent que le transfert des oligosaccharide-PP-Dol incomplets contenant trois résidus de glucose (Glc₃Man₅GlcNAC₂-PP-Dol) peut se produire normalement. De même, les cellules de protozoaires ciliés (*Tetrahymena pyriformis*) bien que synthétisant *in vivo* du Man-P-Dol et du Glc-P-Dol, forment principalement du Glc₃Man₅GlcNAC₂-PP-Dol dont l'oligosaccharide est transféré sur les protéines (Yagodnik et al. [239]). Ce microorganisme apparaît dépourvu de la mannosyltransférase qui ajoute le 6ème résidu de mannose.

Il ne faut pas généraliser non plus sur le rôle du glucose en tant que signal pour le transfert des oligosaccharides des intermédiaires lipidiques sur les protéines. En effet, les principaux et les plus gros oligosaccharide-PP-Dol isolés de cellules de trypanosomes de différentes souches incubées *in vivo* avec du glucose apparaissent être dépourvus de résidus de glucose ; les oligosaccharides sont malgré tout transférés sur les protéines (Parodi et al. [240,241], Previato et al. [242]). La caractérisation biochimique des phénotypes observés dans ces trypanosomes révèle que d'une part ces protozoaires sont capables de synthétiser du Man-P-Dol, mais pas du Glc-P-Dol. D'autre part il semble que l'oligosaccharidyl transférase de trypanosome (Bosch et al. [243]), comme celle de la levure (Sharma et al. [244]) transfère les oligosaccharides de différentes tailles à égale vitesse. Ce transfert d'oligosaccharides non glucosylés (Man₇GlcNAC₂) a également été signalé chez des cellules F9 du tératome de Souris (Romero et Hercovics [245]).

Aussi, sur la base des études *in vivo* et *in vitro*, l'oligosaccharidyl transférase semble présenter une spécificité assez large vis à vis des intermédiaires lipidiques. Cependant, peu de choses sont connues sur la formation de complexes entre l'enzyme et ses deux substrats. Des études effectuées par Sharma et al. [246] sur l'oligosaccharidyl transférase de membranes de levure indiquent que la structure de l'oligosaccharide-pyrophosphoryl-dolichol affecte le Km apparent de l'enzyme vis à vis du peptide accepteur. Ainsi, le Km pour le peptide en présence du substrat "naturel", Glc₃Man₉GlcNAC₂-PP-Dol, est 10 fois plus faible que le Km obtenu quand un substrat "non naturel" GlcNAC₂-PP-Dol est ajouté.

c) Mécanisme chimique de la réaction de transfert

Normalement l'atome d'azote d'un groupement β -amido inclus dans un résidu Asn est faiblement nucléophile. Un modèle proposé par Bause [247] expliquant comment ce groupement peut acquérir des propriétés nucléophiles plus prononcées s'appuie sur des bases expérimentales obtenues à l'aide d'analogues structuraux du tripeptide -Asn-Xaa-Thr- dans lesquels Thr est remplacé par l'époxyethyl-glycocolle (Bause [248]). Cet analogue est un inhibiteur irréversible de l'oligosaccharidyl transférase, probablement parce qu'il forme une liaison covalente avec la protéine dans le voisinage du site actif. Dans ce modèle (Fig. 19) l'atome d'oxygène du groupement hydroxyle de Thr, réagissant avec un résidu basique (B) de la protéine, sert de donneur d'électron à l'un des atomes d'hydrogène du groupement β -amido. Ce qui augmente le pouvoir nucléophile de l'atome d'azote qui réagit avec le C₁ du premier résidu GlcNAc et libère le dolicholpyrophosphate. Cette inhibition ne peut s'effectuer qu'en présence d'oligosaccharide-pyrophosphoryl-dolichol.

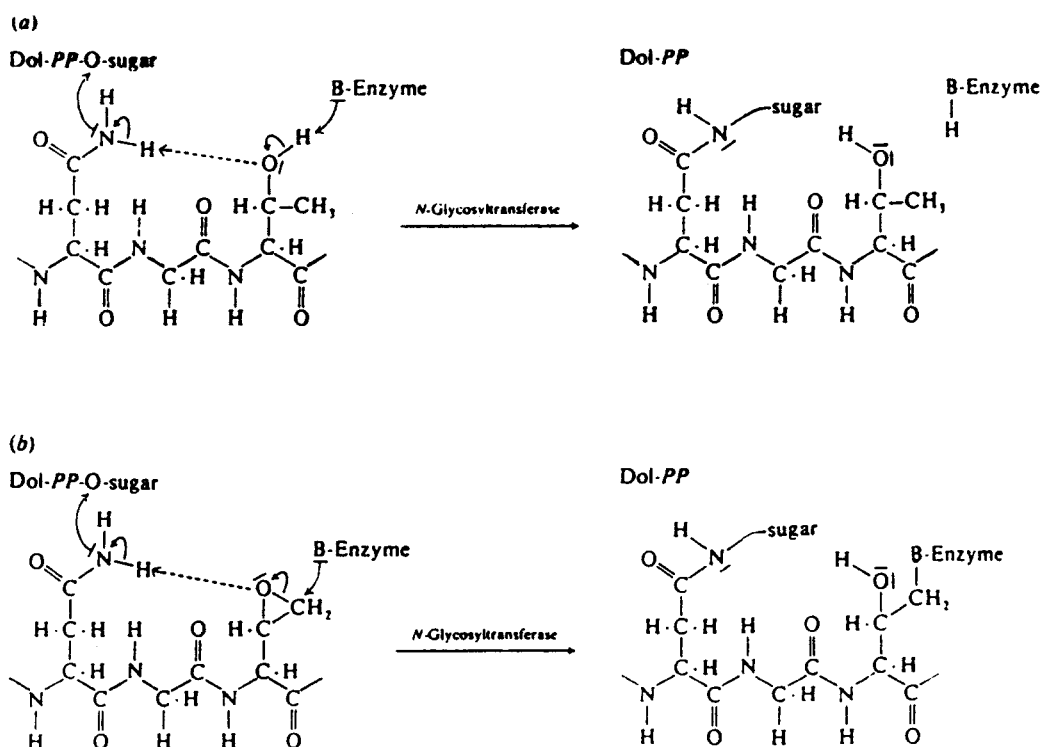


Fig. 19 : Modèles représentant les mécanismes de (a) la N-glycosylation, et (b) la réaction d'inactivation de l'oligosaccharidyl transférase (B-Enzyme) par un inhibiteur peptidique possédant un groupement époxyethyl (d'après Bause [248]).

La stéréochimie du carbone anomérique C₁ lors de la réaction du transfert "en bloc" de l'oligosaccharide est inversée puisque le premier résidu de GlcNAc passe de la configuration α à la configuration β (Waechter et Lennarz [249] ; Hubbard et Ivatt [250]). Ceci suggère que le transfert est une réaction SN 2, c'est-à-dire une substitution nucléophile bimoléculaire. Les résultats obtenus par Bause correspondent à ce type de mécanisme (Fig. 20).

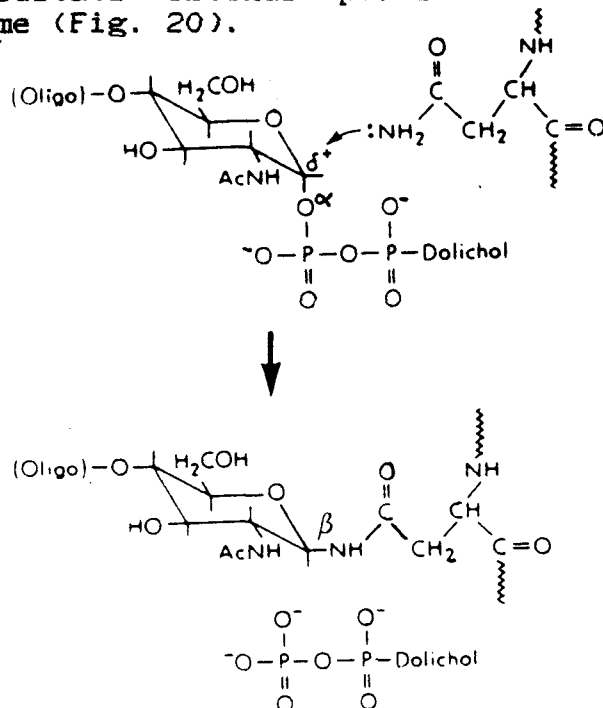


Fig. 20 : Schéma montrant le changement de configuration du carbone anomérique de la N-acétylglucosamine lors de l'attaque nucléophile de l'oligosaccharide-PP-Dol par le groupement amido de l'asparagine.

La confirmation a été apportée par Hortin et al. [251,252] et Rathod [253] qui ont montré que seul l'isomère thréo de la β -fluoroasparagine inhibe la N-glycosylation d'un système acellulaire dans lequel la glycosylation est couplée à la synthèse protéique. Parmi les deux modèles (Fig.21) de liaisons "hydrogène" entre les chaînes latérales de l'asparagine et de la thréonine, seul le second modèle (B), qui propose que le groupement amide soit donneur de proton pour l'atome d'oxygène du groupement hydroxyle, correspond à une augmentation du pouvoir nucléophile du groupement amide. Aussi l'addition d'un groupement attracteur d'électrons comme le fluor devrait favoriser par effet induit la glycosylation selon le premier modèle ou l'inhiber selon le second modèle. C'est donc le deuxième modèle qu'il faut retenir.

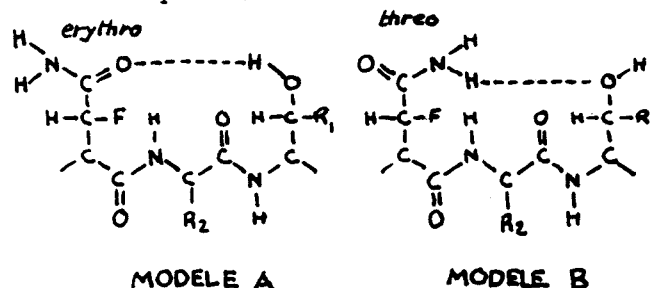


Fig. 21 : Modèles de liaisons hydrogène potentielles entre les chaînes latérales de la β -fluoroasparagine et de la sérine ou de la thréonine au niveau des sites de glycosylation, d'après Hortin et al. [251].

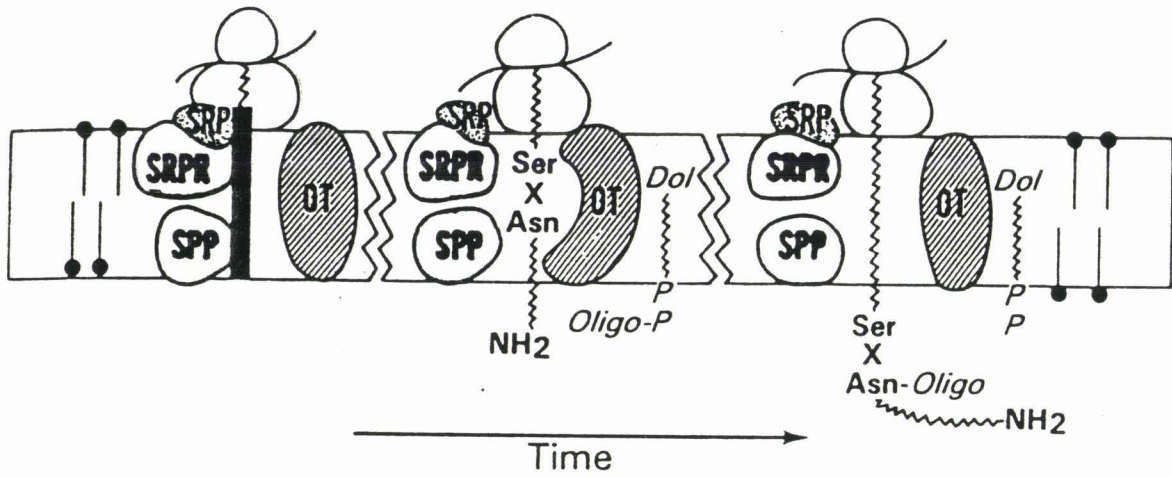


Fig. 22 : Modèle d'insertion et de fonctionnement de l'oligosaccharyl transférase selon Kaplan et al. [26].

- SRP : particule de reconnaissance du signal peptidique,
- SRPR : récepteur de la SRP,
- SPP : peptidase coupant la séquence signal,
- OT : oligosaccharyl transférase.

d) Topologie de la glycosylation des protéines

De nombreuses études *in vivo* et *in vitro* (voir la revue de Hanover et Lennarz [254]) ont démontré que la glycosylation des protéines nouvellement synthétisées se déroule dans le RER et que, dans la plupart des cas, il s'agit d'un processus cotraductionnel. Plusieurs faits indirects suggèrent que l'oligosaccharidyl transférase est située dans la membrane de telle façon que le transfert de l'oligosaccharide sur la chaîne protéique naissante se produise au niveau de la face lumineuse plutôt que sur la face cytoplasmique.

Premièrement, l'oligosaccharide-PP-Dol complet n'est pas accessible à la concanavaleine A dans des microsomes intacts (Snider et Rogers [255]) et les glycoprotéines nouvellement synthétisées ne sont pas hydrolysables par la trypsine ajoutée à des microsomes intacts (KOatz et al. [256], Lingappa et al. [257], Rothman et Lodish [258]).

Deuxièmement, nous avons vu précédemment qu'après l'incorporation du résidu Asn₂₉₉ à la chaîne naissante de l'ovalbumine, il faut au moins 32 résidus d'acides aminés liés avant le transfert "en bloc" de l'oligosaccharide sur ce résidu. Donc, il faut un nombre suffisant d'acides aminés pour que la chaîne protéique traverse la membrane et atteigne la face lumineuse (Glabe et al. [259]).

Troisièmement, quand des petits peptides accepteurs pénètrent librement dans les microsomes par leur caractère hydrophobe, la majorité des glycopeptides obtenus reste emprisonnée dans la lumière de ces vésicules (Welply et al. [260]).

Sur les bases de toutes ces découvertes, dont de nombreux points ont été développés par Kaplan, Welply et Lennarz [261], ces auteurs proposent un modèle membranaire (Fig. 22 ci-contre) qui inclut les composés participant à l'association de la chaîne polypeptidique naissante avec la membrane du RER ainsi que ceux participant à la glycosylation.

On trouve donc la particule de reconnaissance du signal (SRP) qui réagit avec un signal peptidique (SP), le récepteur de la particule de reconnaissance du signal (SRPR) situé sur la face cytoplasmique, la signal peptidase et, pour finir, l'oligosaccharidyl transférase (OT).

e) Propriétés de l'oligosaccharidyltransférase

En dépit des progrès réalisés pour comprendre le mécanisme de réaction de l'oligosaccharidyl transférase avec ses substrats, les tentatives de purification de l'enzyme sous forme actif afin d'en connaître les propriétés ont abouti à des succès limités ; surtout à cause de la fragilité de cet enzyme associé aux membranes après solubilisation par des détergents. En effet, les seules propriétés connues se résument à sa spécificité vis à vis des substrats (Waechter et Lennarz [262]) , son exigence en ions Mn^{2+} , son pH optimum (Das et Heath [263]), et son association avec la membrane (Kornfeld et Kornfeld [264]).

Une nouvelle approche a été mise au point par Welply et al. [265] utilisant un tripeptide -Asn-Xaa-Thr- modifié et photoréactif ($N\alpha$ -[3H]Ac-Asn-Lys($N\epsilon$ -p-azido-benzoyl)-Thr- NH_2 , Fig. 23) pour marquer après illumination le site actif de l'oligosaccharidyl transférase provenant du RER d'oviducte de Poule (Welply et al. [266]).

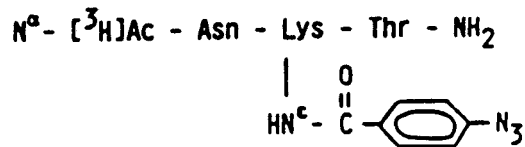


Fig. 23 : Structure du tripeptide azido photoactivable marqué au tritium.

Cette sonde marque spécifiquement en présence de l'ion Mn^{2+} une protéine de masse moléculaire apparente de 60 kDa analysée en électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodecylsulfate de sodium (PAGE-SDS). En chauffant à 60°C une préparation de membranes du RER l'activité enzymatique disparaît à la même vitesse que le marquage radioactif de la protéine de 60 kDa. D'autre part il semble que l'oligosaccharidyltransférase soit elle-même une N-glycoprotéine, puisque la protéine de 60 kDa est retenue par une colonne de concanavaleine A immobilisée et que cette protéine peut être déglycosylée par action de l'endo- β -N-acétylglucosaminidase H. Mais lors du couplage de la protéine avec la sonde peptidique acceptrice il se peut qu'en présence de l'ion Mn^{2+} et d'oligosaccharide-PP-Dol endogènes aux membranes il y ait glycosylation de la sonde et par conséquent glycosylation artificielle de l'enzyme.

Les résultats d'études cinétiques du photomarquage de l'oligosaccharidyl transférase sont en accord avec cette interprétation (Kaplan et Lennarz [267]).

Une autre sonde photosensible et plus performante a été mise au point par Welply et al. [268]. (Fig. 24).

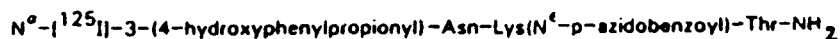
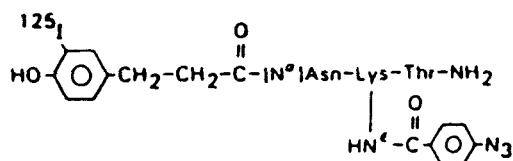


Fig. 24 : Structure du tripeptide azidophotoactivable marqué à l'iode.

L'utilisation de cette sonde a permis aux auteurs de montrer que l'enzyme est fortement ancré dans la membrane du RER. En effet, d'une part il faut un traitement à la soude et amener le pH à 10,8 ou utiliser un détergent à une concentration égale à 4 % pour solubiliser l'enzyme, mais malheureusement avec une perte très importante de l'activité enzymatique. D'autres résultats semblent indiquer qu'un environnement hydrophobe au niveau de la membrane est indispensable à l'activité de l'enzyme. D'autre part le traitement tryptique de vésicules intactes diminue de 70 % l'activité de l'enzyme sans nuire à son affinité pour la sonde.

Une première interprétation de ces résultats serait que l'enzyme contienne une seconde sous-unité partiellement exposée sur la face cytoplasmique de la membrane.

La seconde possibilité serait que la perte d'une toute petite portion de la protéine du côté cytoplasmique, indétectable en PAGE-SDS, affecte l'activité enzymatique.

Une troisième possibilité serait que la trypsine détruise suffisamment la membrane dans l'environnement de l'enzyme pour que son activité enzymatique en soit affectée.

Quoique cette étude ne puisse faire la distinction entre ces diverses possibilités, il faut souligner que ces résultats indiquent clairement que le domaine sur lequel se fixe l'accepteur tripeptidique est orienté vers la face luminale de la membrane.

Un travail récent de Kaplan et al. [269] utilisant la même sonde montre que cette dernière réagit avec une protéine membranaire de 57 kDa qui est ensuite glycosylée et convertie en une forme de 60 kDa. Mais la protéine de 57 kDa isolée par immunoprécipitation bien que réagissant encore avec la sonde est incapable de catalyser la glycosylation des peptides. On peut affirmer que la protéine de 60 kDa est glycosylée ; en effet, en épuisant les membranes en oligosaccharide-PP-Dol par addition de tripeptides compétitifs la forme 60 kDa disparaît pour la forme 57 kDa. En outre, la forme 60 kDa peut être convertie en forme 57 kDa par action de l'endo- β -Nacétylglucosaminidase H.

Les auteurs se sont également intéressés au phénomène de perte d'activité après solubilisation des microsomes. Il se pourrait que lors de cette solubilisation une seconde sous-unité soit perdue, celle qui catalyse la réaction de glycosylation. La protéine de 57 kDa qui réagit spécifiquement avec la sonde serait donc la sous-unité qui reconnaît le site -Asn-Xaa-Thr- de l'accepteur. En effet le prétraitement à la trypsine des vésicules intacts réduit de façon significative la capacité des microsomes à glycosyler les accepteurs tripeptidiques sans affecter le marquage avec la sonde de la protéine de 57 kDa. De plus, le photomarquage de cette protéine dans des vésicules intacts suivi du traitement à la trypsine ne diminue pas sa masse moléculaire, tandis que la capacité de glycosylation des accepteurs diminue.

Tous ces résultats suggèrent qu'il existe au moins deux protéines différentes, l'une qui reconnaît la séquence de glycosylation des protéines et l'autre qui réagit avec l'oligosaccharide-pyrophosphoryl-dolichol et catalyse la glycosylation.

La capacité de divers organismes à synthétiser des N-glycoprotéines, associée avec l'aspect universel des intermédiaires lipidiques utilisés dans la réaction de N-glycosylation, semble indiquer que l'oligosaccharidyl transférase n'a pas subi de modifications majeures au cours de l'évolution. En effet, Kaplan, Welply et Lennarz [270] ont montré que dans de nombreuses espèces examinées la protéine marquée par la sonde possède toujours une masse moléculaire apparente de 60 kDa, excepté chez la levure où elle est de 80 kDa. En outre les anticorps polyclonaux préparés contre la protéine d'oviducte de Poule réagissent avec les protéines marquées par la sonde provenant de divers tissus et organismes. Sur la base de ces observations il apparaît que la structure primaire de la sous-unité responsable de la reconnaissance du site de glycosylation a été relativement bien conservée au cours de l'évolution.

Récemment Geetha-Habib *et al.* [271] ont proposé un modèle membranaire (Fig.25) où la protéine (GSBP) qui reconnaît le site de glycosylation des polypeptides en cours de synthèse se trouve sur la face luminale et facilite l'interaction de ce site avec la sous-unité de l'oligosaccharidyl transférase (OT).

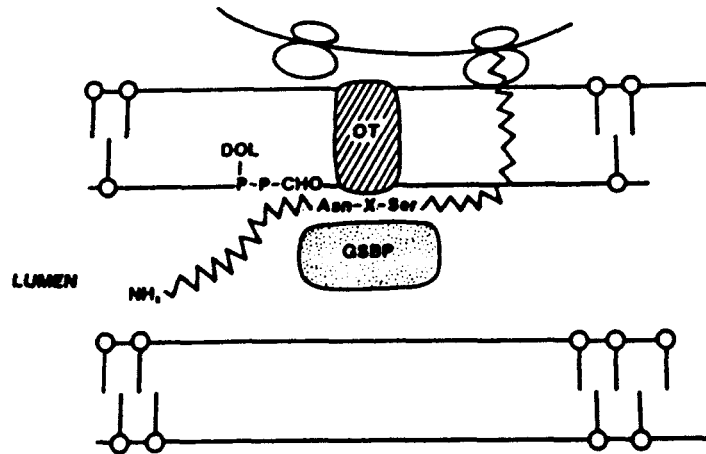


Fig. 25 : Modèle membranaire décrivant le rôle de la protéine de fixation du site de glycosylation dans le processus du transfert de l'oligosaccharide d'après Geetha-Habib *et al.* [271].

OT : oligosaccharidyltransférase,

GSBP : protéine de fixation du site de glycosylation.

Ces auteurs se sont alors intéressés au groupe des protéines luminales après la revue de Koch [272] parue en 1987. Ainsi trois protéines, la sous-unité β de la proline hydroxylase, la protéine disulfure isomérase (PDI) et la protéine fixant l'hormone thyroïdienne, ont aussi une masse moléculaire voisine de 55-60 kDa, et le clonage et le séquençage permettent de conclure que toutes trois ont de grandes similitudes de structure, d'immunoréactivité et de répartition subcellulaire avec la GSBP, (Edman *et al.* [273], Pihlajaniemi *et al.* [274], Cheng *et al.* [275]).

De plus la photosonde peptidique réagit avec la PDI purifiée de foie de Rat et la sous-unité β de la proline hydroxylase possède une activité PDI (Koivu *et al.* [276]). La similitude ne s'arrête pas là. En effet, l'hybridation croisée de clones d'ADNc de GSBP avec un clone d'ADNc de PDI donne 94 % d'homologie. Aussi, il ressort de ces considérations que GSBP et les autres protéines luminales étudiées seraient une seule et même molécule.

Ceci amène la question : comment une molécule protéique unique multifonctionnelle agit-elle dans les modifications co- et/ou post-traductionnelles des polypeptides synthétisés dans le réticulum endoplasmique ?

A part la protéine de fixation de l'hormone thyroïdienne, les trois autres activités impliquent la reconnaissance d'un site peptidique spécifique avant une modification covalente. C'est-à-dire, la reconnaissance appropriée d'un résidu prolyl, cystinyl ou asparaginyll doit se produire avant les processus d'hydroxylation, réduction ou de glycosylation respectivement. Il existe d'autres exemples de l'existence de protéines avec plusieurs sites actifs principalement dans les voies métaboliques comportant des réactions séquentielles.

J - RESUME SCHEMATIQUE DE LA BIOSYNTHESE DES INTERMEDIAIRES LIPIDIQUES ET DE LA GLYCOSYLATION DES PROTEINES.

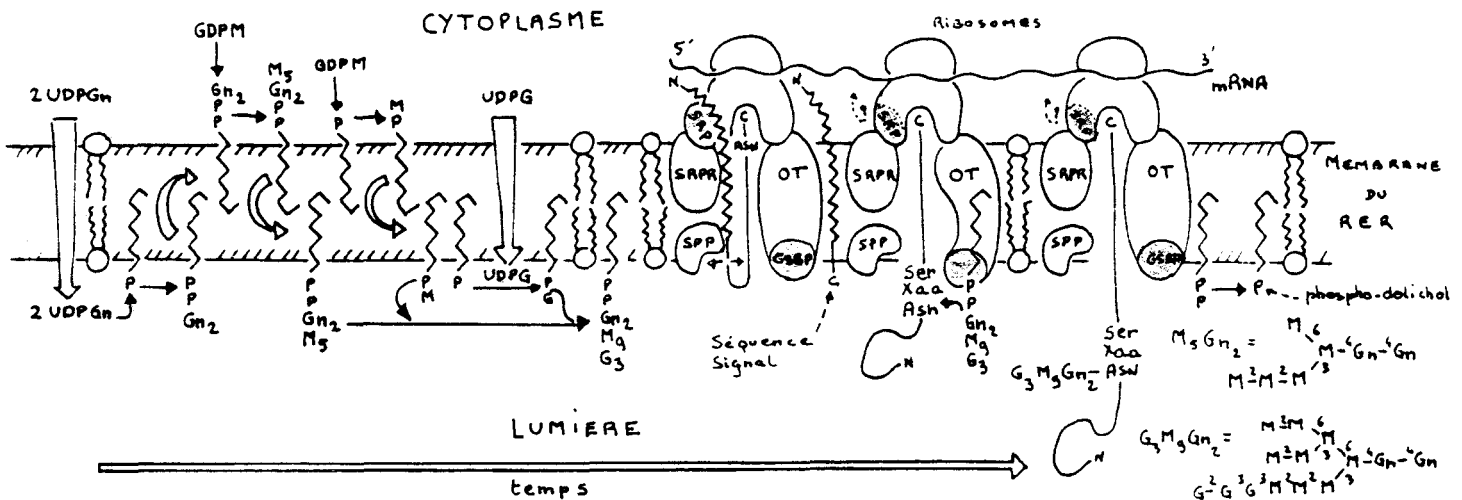


Fig. 26 : Schéma de la biosynthèse des intermédiaires lipidiques et de la glycosylation des protéines.

Ce schéma n'est qu'un "compromis" de ce qui a été décrit dans les généralités. Les flèches pleines représentent la progression des réactions de la gauche vers la droite. Les flèches creuses représentent les transports et les changements de localisation de certains composés. SRP = particule de reconnaissance de la séquence signal, SRPR = récepteur de la SRP, SPP = peptidase libérant la séquence signal, OT = oligosaccharidyltransférase, GSBP = protéine de reconnaissance des sites de glycosylation.

VIII - REGULATION METABOLIQUE DU CYCLE DES DOLICHOLS

Il existe peu d'informations concernant les mécanismes de régulation des réactions successives du cycle des dolichols.

On peut envisager plusieurs aspects à la régulation :

- . selon la disponibilité en phospho-dolichol,
- . selon la teneur et la réactivité des enzymes,
- . un effet annexe du GDP-Man dans certaines réactions,
- . un effet des stress physiques et chimiques,
- . selon la teneur en glucose du milieu extracellulaire,
- . selon un contrôle hormonal,
- . et enfin l'existence d'une oligosaccharide-pyrophosphoryl-dolichol pyrophosphatase.

A - DISPONIBILITE EN PHOSPHO-DOLICHOL

S'il est maintenant bien établi que le premier site de régulation de la biosynthèse du cholestérol se situe au niveau de l'hydroxy-méthyl-glutaryl-CoA réductase (Brown et Goldstein [277]) ; il semble que pour le dolichol il en soit de même. En effet cet enzyme est inhibé par la compactine (ou la mévinoline) et il apparaît qu'à la fois les biosynthèses du cholestérol et du dolichol sont touchées (Astrand et al. [278]). Mais les travaux de Keller [279,280] et d'Adair [281,282] permettent de penser que la régulation principale de la biosynthèse du dolichol se situe au niveau des dernières étapes, c'est-à-dire de la déphosphorylation partielle du PP-polyprénoyl et de la réduction du résidu- α (voir Fig.10).

Etant donné les faibles teneurs des tissus en dolichol (par exemple, 430 ng/mg protéine de foie de Rat et 60 μ g/mg protéine de glande pituitaire humaine, selon Eggens et al. [283]) et les teneurs encore plus faibles en phospho-dolichol (environ 10 % de tout le dolichol), celles-ci apparaissent comme un facteur limitant pour les réactions de synthèse des Man-P-Dol, Glc-P-Dol et oligosaccharide-PP-Dol.

Ainsi Carson et al. [284] ont obtenu un doublement de la N-glycosylation (sans changement dans la synthèse protéique) en ajoutant du phospho-dolichol exogène à des cultures de tissus d'oviducte de Poule et de pancréas de Boeuf. Inversement Stoll

et Krag [285] ont démontré que la souche mutante (F2A8) des cellules CHO incorpore 7 fois moins de mannose dans les glycoprotéines que la souche parentale, alors que sa teneur en enzymes du cycle des dolichols est normale. La souche F2A8 déficitaire en polyprénol réductase accumule du phospho-polyprénol qui remplace partiellement le phospho-dolichol dans les réactions de glycosylation.

Le phospho-dolichol n'est pas seulement le précurseur de la synthèse du Man-P-Dol et du Glc-P-Dol, il est également le point de départ du cycle des dolichols qui aboutit à la libération de pyrophospho-dolichol. Wedgwood et Strominger [286] ont mis en évidence dans des préparations de lymphocytes humains en culture une réaction de déphosphorylation partielle du PP-Dol qui permet le recyclage du P-Dol (Fig.11). Cette activité dolichol-pyrophosphatase a également été caractérisée par Kato et *al.* [287], Appelkvist et *al.* [288], Belocopitow et Boscoboinik [289] et Scher et Waechter [290].

Cette réaction peut être inhibée par la bacitracine, un peptide cyclique produit par *Bacillus licheniformis* qui inhibe la synthèse des parois bactériennes en formant un complexe ternaire avec le C₅₅-isoprényl-pyrophosphate et un ion métallique bivalent. Utilisée *in vitro* avec des membranes de cellules eucaryotes, la bacitracine bloque la formation de Man-P-Dol, GlcNAc₁-PP-Dol et GlcNAc₂-PP-Dol (Herscovics et *al.* [291], Reuvers et *al.* [292]). Seule l'inhibition du Man-P-Dol peut être annulée par addition de grandes quantités de P-Dol exogène. La dolichol-pyrophosphatase pourrait donc réguler la teneur en P-Dol indispensable aux réactions du cycle des dolichols.

A côté de cette activité pyrophosphatasique Wedgwood et Strominger [293] ont mis en évidence une activité phosphatasique agissant sur le phospho-dolichol comme sur les phospho-polyprénols α -insaturés.

Ces activités enzymatiques peuvent être une des clés de la régulation métabolique de la N-glycosylation car elles interviennent dans les réactions de biosynthèse et de recyclage du phospho-dolichol qui serait alors situé dans un carrefour métabolique.

On pourrait supposer que si les teneurs en enzymes cellulaires sont normales et que seul le substrat manque (P-Dol), en ajoutant du P-Dol exogène les activités enzymatiques deviendront normales. Or ce n'est pas toujours le cas. En effet, Harford et Waechter [294] signalent que les quantités de Man-P-Dol formées dans la substance blanche du cerveau du Porc n'atteignent pas celles des Porcelets malgré l'addition de P-Dol exogène. Il semble donc qu'il s'agisse d'un problème de teneur en enzyme des membranes.

B - TENEUR ET REACTIVITE DES ENZYMES

1 - Au cours du cycle cellulaire

Adair et Cafmeyer [295] ont effectué une approche expérimentale intéressante sur les réactions enzymatiques impliquant le phospho-dolichol au cours du cycle cellulaire des cellules de Souris L-1210 en culture. Il apparaît que le phospho-dolichol s'accumule du stade G_1 au stade G_2+M , sa teneur ne fait que doubler entre le début et la fin du cycle. D'une part le fait que la présence de mévalonate 50mM au cours de trois générations successives n'affecte pas la vitesse d'accumulation du phospho-dolichol au cours du cycle cellulaire, alors que dans les mêmes conditions la voie du cholestérol est nettement augmentée, indique que chez cette souche de cellules l'hydroxyméthylglutaryl-réductase ne contrôle pas la teneur en phospho-dolichol. D'autre part la dolichol-kinase, la cis-prényltransférase et la dolichol-pyrophosphatase présentent des variations en parfaite corrélation avec le cycle cellulaire, leurs activités augmentent depuis le stade G_1 jusqu'à un maximum au stade S, tandis que la dolichol-phosphatase demeure constante.

Ces résultats semblent en accord avec les modèles de régulation dans lesquels, soit la cis-prényltransférase, soit le couple dolichol kinase/phosphatase, (ou les deux) régulent la teneur en phospho-dolichol dans la cellule. Cette teneur peut être soit abaissée par action de la dolichol-phosphatase, soit augmentée par action de la dolichol-kinase quand les besoins de la cellule l'exigent. D'après Keller et al. [296] la dolichol phosphatase aurait son site actif situé sur la face cytoplasmique du réticulum endoplasmique lisse et de l'appareil de Golgi, ainsi son activité *in vivo* ne pourrait s'effectuer qu'en envisageant des translocations ("flip-flop") du substrat.

2 - Au cours du développement

Au cours du développement post-natal des muscles du squelette du Lapin, Clark et al. [297] ont montré que la Glc-P-Dol synthétase voit son activité divisée d'un facteur 5 ; tandis que l'incorporation de N-acétylglucosamine dans GlcNac₁-PP-Dol et GlcNac₂-PP-Dol ne change pas de façon significative. Dans un article récent Oda-Tamai et al. [298] ont montré que dans le foie de Rat les activités Man-P-Dol et Glc-P-Dol synthétases augmentent après la naissance puis se stabilisent deux semaines plus tard, alors que la synthèse de GlcNac₁-PP-Dol augmente puis revient à sa valeur de départ quatre semaines plus tard ainsi que la N-glycosylation des protéines en général. Les résultats semblent donc contradictoires selon le modèle cellulaire utilisé et trop peu nombreux pour pouvoir conclure.

3 - Au cours de la différenciation cellulaire

En plus des considérations ci-dessus plusieurs études ont démontré l'accroissement de la synthèse des intermédiaires lipidiques en réponse à des stimulations liées au développement.

Lucas et Coll. (Lucas et Levin [299], DeRosa et Lucas [300], Singh et Lucas [301], Hayes et Lucas [302]) ont effectué une série d'expériences pour étudier l'effet de l'induction par un oestrogène de la différenciation des cellules de l'oviducte de Poule immature sur la synthèse des intermédiaires lipidiques de la N-glycosylation des protéines. Leurs résultats montrent que la richesse de ce tissu en activités glycosyltransférases du cycle des dolichols augmente au cours de la différenciation, sauf en Man-P-Dol synthétase dont l'activité semble dépendre de la réserve du tissu en P-Dol disponible.

Dans plusieurs cas également l'augmentation de la N-glycosylation peut être attribuée à l'accroissement de la teneur en P-Dol des tissus, entre autre : la stimulation de la glande thyroïde par la thyrotropine, dans le foie de Rat après inflammation par injection sous-cutanée d'essence de térébentine, dans les cellules HeLa en présence de glucocorticoïdes.

La glande mammaire est un excellent modèle trouvé par Vijay et Oka [303] pour étudier la régulation de la biosynthèse des intermédiaires lipidiques au cours du développement. Ainsi avec le déclenchement de la grossesse le parenchyme mammaire prolifère. Après la lactation le tissu épithélial régresse et les cellules adipeuses dominent à nouveau. La mesure de l'activité de trois glycosyltransférases chez la Souris en présence de P-Dol exogène révèle qu'au maximum de la lactation la glucosyltransférase et la N-acétylglucosaminyl-1-phosphotransférase voient leurs activités spécifiques multipliées respectivement 7 et 4 fois alors que celle de la mannosyltransférase est seulement multipliée par 1,4 par rapport à la glande des animaux vierges. Ces activités spécifiques retournent ensuite à des valeurs normales un mois après la fin de la lactation ou diminuent après traitement des Souris en pleine lactation par la bromocriptine (2-bromo- α -ergocryptine methane sulfonate), une drogue qui bloque la libération de prolactine par la glande pituitaire. Parmi les trois enzymes, la mannosyltransférase semble moins diminuer que les autres. Ces observations impliquent que la prolactine joue un rôle important dans la régulation des glycosyltransférases de la glande mammaire.

La sonde de Welply permettant le photomarquage de l'oligosaccharidyltransférase a été utilisée dans deux études récentes sur la régulation cellulaire de la biosynthèse des glycoprotéines.

Dans la première étude effectuée par Dutt et al. [304] la stimulation par une hormone stéroïdienne de la biosynthèse des glycoprotéines dans l'utérus de Souris correspond à une légère

augmentation de la teneur en oligosaccharidyltransférase marquée par la photosonde peptidique.

Dans une seconde étude, Grant et al. [305] ont montré que la différenciation de cellules myoblastiques BC₃H₁ (déclenchée lors de l'élimination de mitogène du milieu de culture) est accompagnée par une augmentation d'un facteur 10 au niveau du photomarquage et au niveau de l'activité de l'oligosaccharidyltransférase. Paradoxalement, la biosynthèse des glycoprotéines diminue au cours de la différenciation de ces cellules BC₃H₁.

Ces études, qui en sont encore à leur premier stade, indiquent que le contrôle de l'expression de l'oligosaccharidyltransférase est complexe et nécessite d'autres investigations.

C - EFFET ANNEXE DU GDP-Man

En dehors du fait évident que les glycosyl-nucléotides sont les précurseurs dans la formation des intermédiaires lipidiques, un résultat troublant a été obtenu par Kean [306, 307] qui a montré que la synthèse de GlcNAc₁-PP-Dol et GlcNAc₂-PP-Dol est activée (10 à 15 fois) par une concentration 20 μM en GDP-Man dans un homogénat de rétine d'embryon de Poulet. Cet effet stimulant n'est pas spécifique à la rétine, il a été constaté avec le cerveau, le foie et le coeur. Cette stimulation est hautement spécifique du GDP-Man. Aucun autre glycosylnucléotide ou dérivé de la guanosine ne produit le même effet.

On peut supposer que le GDP-Man fournit du Man-P-Dol et que ce dernier serait responsable de cette stimulation. En effet, le Man-P-Dol exogène multiplie par 10 la valeur de V_m et par 2 la valeur du K_m, alors qu'il n'est pas un substrat de la réaction.

Un résultat totalement différent a été obtenu par C. Ronin et al. [307a] qui ont montré qu'une concentration 1 μM en GDP-Man dans un système *in vitro* de microsome de thyroïde de Porc provoque une inhibition très rapide de la synthèse de Glc-P-Dol et d'oligosaccharide-PP-Dol alors que la glycosylation des protéines est faiblement inhibée. Cette inhibition ne peut être attribuée à une compétition éventuelle vis-à-vis d'une réserve limitée en phospho-dolichol disponible, puisque l'UDP-Man qui n'est pas un donneur pour celui-ci produit le même effet.

Ces observations suggèrent que le Man-P-Dol peut participer non seulement en tant que substrat de l'α-mannosylation, mais aussi comme régulateur de la biosynthèse des intermédiaires lipidiques participant à la biosynthèse des glycoprotéines.

D - EFFET DE STRESS PHYSIQUES ET CHIMIQUES

Un résultat troublant a été obtenu par Caltabiano *et al.* [308] et Niewiarowska *et al.* [309] au cours d'un travail de recherche sur les protéines de choc thermique. Il faut rappeler que l'exposition des cellules procaryotes et eucaryotes à un choc thermique et à d'autres stress de l'environnement (arsenic, sels de métaux lourds, infection virales, privation en glucose, etc...) déclenche l'expression sélective et réversible de gènes spécifiques hautement conservés qui codent pour un petit nombre de protéines ayant des masses moléculaires de 22 à 110 kDa (voir revue de Schlesinger *et al.* [310]).

Il s'agit là d'un phénomène général de réponse des cellules aux agressions. Les auteurs cités précédemment ont alors constaté que chez les cellules A₃₇₅ d'un mélanome humain l'arsenic induit en même temps que la synthèse de protéines de stress une stimulation de l'incorporation du mannose dans un nouveau composé migrant en PAGE-SDS. D'autres expériences, dont certaines réalisées en présence de tunicamycine, et l'analyse de ce composé semblent indiquer qu'il s'agit de Glc₃Man₃GlcNAc₂-PP-Dol.

D'une part une explication possible serait que cet oligosaccharide-PP-Dol est peu utilisé et s'accumule dans les cellules stressées qui synthétisent moins de protéines acceptrices de glycanes. Cela ne semble pas être le cas puisque les auteurs signalent que la synthèse protéique n'est pas affectée par le stress.

D'autre part le blocage à plus de 90 % de la synthèse protéique par le cycloheximide ne produit pas d'augmentation de la teneur en intermédiaires lipidiques. Il s'agit donc d'une activation de la synthèse de ceux-ci plutôt que d'un blocage de leur utilisation.

La régulation de la N-glycosylation est assez sensible pour être affectée chez les cellules endothéliales en culture par l'absence de dioxyde de carbone. En effet, Banerjee [311] a montré que la privation en CO₂ provoque une diminution de la synthèse en protéines ainsi qu'une diminution du Km de la Man-P-Dol synthétase vis-à-vis du GDP-Man sans changement du Vm. Il est possible que d'autres enzymes du cycle des dolichols soient également modifiés mais ils n'ont pas été étudiés par cet auteur.

E - TENEUR EN GLUCOSE DU MILIEU EXTRACELLULAIRE

L'effet de la privation en glucose sur la qualité des intermédiaires lipidiques a été traité dans le chapitre sur la spécificité de l'oligosaccharidyltransférase au point de vue de

la relation substrat-produit. Mais, comme l'ont signalé Trimble, Maley et Tarentino [312], les membranes de levure en fin de fermentation produisent moins de $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ que les membranes de levure préparées au début de la fermentation dans un système *in vitro* même en présence de quantité saturante en UDP-Glc exogène. On peut donc penser qu'à la fin de la fermentation la teneur en glucose du milieu devenant très faible a eu pour conséquence une baisse de la teneur en glucosyltransférases des membranes. Inversement Chu et Maley [313] ont étudié l'effet du glucose sur la synthèse et la glycosylation de l'invertase de levure. Ils ont montré que l'absence de l'invertase dans la levure cultivée en présence de glucose n'est pas due à une diminution de la teneur en ARNm codant pour l'invertase, mais à un défaut de glycosylation de la protéine qui est alors rapidement dégradée par des protéases endogènes.

L'invertase n'est pas le seul exemple de l'effet protecteur des glycannes dans les glycoprotéines. Le mécanisme de cette inhibition de la glycosylation par le glucose n'est pas évident puisque ces auteurs signalent que ni la synthèse des oligosaccharide-PP-Dol ni le transfert sur les autres protéines acceptrices endogènes ne sont ralentis dans les cellules ayant poussé en présence de glucose.

Chapman et Calhoun [314] ont montré qu'*in vivo* des cellules CHO privées de glucose épuisent rapidement leur réserve en GDP-Man tandis que l'incorporation du mannose dans les intermédiaires lipidiques et dans les glycannes $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ liées aux protéines est augmentée.

Le traitement par des inhibiteurs de la synthèse protéique (puromycine ou cycloheximide) de ces cellules en l'absence de glucose provoque la synthèse normale de $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$; alors que le même traitement sur des cellules cultivées en présence de glucose inhibe la formation de cet intermédiaire lipidique.

Ce résultat semble assez étonnant ; cela suggère que les cellules privées en glucose ont perdu un facteur cytoplasmique responsable de l'arrêt de la synthèse des intermédiaires lipidiques dans les cellules traitées aux antibiotiques en présence de glucose. Il existe un facteur potentiel, proposé par Lennarz et Grant [315] en 1983 ; il s'agit du GTP dont la concentration augmente dans les fibroblastes de Souris traités à la cycloheximide en présence de glucose. L'effet d'inhibition de la synthèse des intermédiaires lipidiques peut être obtenu *in vitro* par du GTP. En 1981 Jensen et Schutzbach [316] avaient démontré que la mannosyltransférase II, responsable de l'addition d'un résidu de mannose en $\alpha 1-3$ sur l'intermédiaire $\text{Man}(\alpha 1-6)\text{-Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$, est inhibée à 50 % par une concentration $6 \mu\text{M}$ en GTP. Selon Chambers et Elbein [317] il est possible que la mannosyltransférase I le soit également. Mais d'autres études sont encore nécessaires pour préciser le site exact de cette inhibition.

On peut néanmoins envisager que les cellules ayant subi la privation en glucose ou la diminution du taux d'ATP économisent leur énergie en synthétisant et en transférant sur les protéines des glycanes $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ incomplets au lieu de $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$. Cela semble le cas avec plusieurs lignées cellulaires qui accumulent des structures glycaniques à $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ *in vivo* ou *in vitro* quand on les met en présence d'inhibiteurs comme l'EDTA (Chambers *et al.* [3181]), le fluoroglucose (Datema et Schwarz [3191]), l'amphotricine (Kang *et al.* [3201]) ou le CCCP qui abaisse le contenu intracellulaire en ATP (Datema et Schwarz [3211]).

L'effet de la privation en glucose sur un organisme n'est pas bien connu à l'heure actuelle. Puisque les formes glucosylées des structures $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ (dans les cellules Thy-1-E ; d'après Kornfeld *et al.* [3221]) peuvent être transférées puis maturées en chaînes oligosaccharidiques de type N-acetyl-lactosaminique, les cellules qui transfèrent des structures $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ apparaissent alors protégées des conséquences plus sévères qui pourraient se produire si la glycosylation des protéines était complètement abolie. Un tel cas physiologique existe, il s'agit du diabète sucré, où les tissus qui dépendent de l'insuline pour absorber le glucose (comme les muscles du squelette et le tissu adipeux) peuvent être privés de glucose en absence d'insuline.

F - CONTROLE HORMONAL

De nombreux travaux semblent indiquer que des signaux extracellulaires contribuent à la régulation de la N-glycosylation des protéines. Ainsi, Kousvelari *et al.* [3231] ont démontré que la stimulation du récepteur β -adrénergique des cellules acineuses des glandes parotides de Rat provoque une augmentation de la N-glycosylation due à une activation du transfert de N-acétylglucosamine-1-phosphate, du mannose et du glucose de leurs nucléotides respectifs sur le phospho-dolichol.

En outre un analogue β -adrénergique, l'isoproterenol, provoque une augmentation de l'activité Man-P-Dol synthétase.

La régulation métabolique de cette Man-P-Dol synthétase est peu connue. Selon Banerjee *et al.* [324,325] elle serait phosphorylée par une protéine kinase AMPc-dépendante. La démonstration de cette hypothèse a été obtenue par phosphorylation des membranes microsomales de cellules parotidiennes à l'aide de [γ - ^{32}P] ATP puis déphosphorylation par une phosphatase alcaline en suivant l'effet sur l'activité Man-P-Dol synthétase.

C'est à ce jour le seul cas de "régulation" proprement dite d'une activité enzymatique liée au cycle des dolichols.

G - EXISTENCE D'UNE OLIGOSACCHARIDE-PYROPHOSPHORYL-DOLICHOL PYROPHOSPHATASE

Par rapport à la volumineuse littérature décrivant les réactions séquentielles de synthèse des intermédiaires lipidiques, peu de travaux ont été consacrés à la dégradation des oligosaccharide-PP-Dol. Or la régulation de la glycosylation peut très bien être située au carrefour entre la glycosylation des protéines et la dégradation de l'intermédiaire lipidique final.

La libération de matériel oligosaccharidique au cours de la synthèse des glycoprotéines a été signalée par quelques chercheurs dans divers systèmes biologiques comprenant :

- des microsomes de myélome de Souris (Baynes *et al.* [326], Hsu *et al.* [327]),
- des splénocytes de Rat (Cacan *et al.* [328]),
- le foie de Rat (Richard *et al.* [329]),
- des microsomes de foie de Porc (Oliver *et al.* [330]),
- des microsomes d'oviducte de Poule (Hanover *et Lennarz* [331])
et des microsomes ou des coupes de thyroïde (Anumula *et Spiro* [332]).

L'origine de ce matériel n'a pas toujours été étudiée.

- Il pourrait, comme le suggèrent Hsu *et al.* [333], résulter de la dégradation (enzymatique ?) des oligosaccharide-PP-Dol.
- Il pourrait également provenir des glycoprotéines nouvellement synthétisées après action d'endo- β -N-acétylglucosaminidase H comme le proposent d'une part Anumula *et Spiro* [334].

Par des expériences de chasse par du mannose après incorporation de [2- 3 H] mannose Cacan *et al.* [335] ont démontré que ce matériel peut provenir de la dégradation d'oligosaccharide-pyrophospho-dolichol.

D'autre part Anumula *et Spiro* [336] ont proposé une seconde hypothèse : ces oligosaccharides proviendraient d'une réaction secondaire de l'oligosaccharide-transférase par transfert sur l'eau en tant qu'accepteur à la place de la protéine.

Trois hypothèses expliquant l'origine de ces oligosaccharides sont donc possibles :

- . dégradation des oligosaccharide-PP-Dol
- . déglycosylation "en bloc" des glycoprotéines,
- . transfert des oligosaccharides sur l'eau.

Etant donné le rôle important joué par les glycannes dans les fonctions biologiques des glycoprotéines, l'étude de la dégradation des intermédiaires lipidiques peut mettre en évidence une voie de régulation de la biosynthèse des glycoprotéines.

Dans un travail antérieur, réalisé par incubation *in vitro* de splénocytes de Rat avec des glycosyl-nucléotides, Hoflack et al. [337] ont révélé l'existence de phospho-oligosaccharides dans lesquels le groupement phosphate est lié au premier résidu de GlcNAc. Ce fait suggère qu'une coupure de la liaison pyrophosphate des oligosaccharides-PP-Dol sous l'action d'une pyrophosphatase particulière serait la première étape du catabolisme des intermédiaires lipidiques. Une compétition entre l'oligosaccharidyltransférase et cette pyrophosphatase réglerait la balance entre la glycosylation et la non-glycosylation des protéines.

H - CONCLUSION

La régulation du cycle des dolichols dépend donc :

- de la disponibilité des substrats au site de biosynthèse,
- de l'effet du GDP-Man,
- de la teneur en enzymes,
- du contrôle hormonal,
- de la privation en glucose,
- de stress physiques ou chimiques,
- enfin de la compétition entre l'oligosaccharidyltransférase et une pyrophosphatase.

Les résultats que nous allons présenter dans les chapitres suivants concernent la caractérisation de l'oligosaccharide-pyrophospho-dolichol pyrophosphatase, sa topologie et la localisation subcellulaire des sites de dégradation de la partie glycanique.

TRAVAUX PERSONNELS

I N T R O D U C T I O N

Il apparaît que la N-glycosylation des protéines est accompagnée d'un processus de dégradation des intermédiaires lipidiques. L'étude de cette dégradation n'avait été réalisée jusqu'à présent que de manière indirecte lors d'incorporations *in vivo* de monosaccharides et *in vitro* de glycosylnucléotides dans les glycoprotéines. Les connaissances acquises permettent d'envisager deux schémas réactionnels :

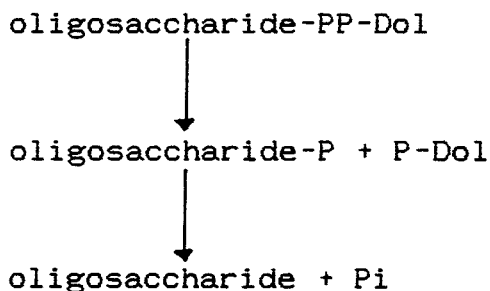


Schéma n° 1 : passage par un oligosaccharide-phosphate intermédiaire

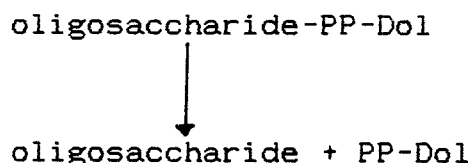


Schéma n°2 : libération directe d'oligosaccharide

Dans le schéma n° 1 il faut envisager l'action d'une pyrophosphatase puis d'une phosphatase pour obtenir la libération d'oligosaccharides neutres.

Dans le schéma n° 2, sous l'action d'une "phospho estérase" ou par transfert sur l'eau réalisé par l'oligosaccharidyl-transférase il y aurait libération directe d'oligosaccharides neutres.

L'un de ces deux schémas existe-t-il dans la cellule ?

Ou alors, ces deux schémas peuvent-ils coexister ?

Quelle sera la destinée des oligosaccharides libérés ?

Voici les questions auxquelles nous allons essayer de répondre en exposant nos résultats acquis depuis notre arrivée dans le groupe de recherche dirigé par le Professeur A. Verbert.

CHAPITRE I :
MISE EN EVIDENCE DE LA DEGRADATION DES
OLIGOSACCHARIDE-PP-DOL CHEZ LA LEVURE

I - CHOIX DU MODELE EXPERIMENTAL

L'étude de la dégradation des oligosaccharide-PP-Dol nécessite de trouver un modèle cellulaire dans lequel la première étape, c'est-à-dire la coupure de la liaison pyrophosphate, ne soit pas masquée par l'action d'une endoglycosidase ou par un processus de maturation des glycoprotéines qui pourraient tous deux libérer du matériel oligosaccharidique.

Le modèle biologique est simple puisque aucune endo- β -N-acétylglucosaminidase n'est décrite chez la levure (voir revues générales de Tanner et Lehle [338] et Maley et al. [339]).

D'autre part la maturation des glycoprotéines chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* est un phénomène limité à la déglucosylation et au retrait d'un résidu de mannose pour passer d'une structure $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ à $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$; la maturation se prolonge ensuite dans le cas des glycoprotéines ectocellulaires par l'élaboration de mannanes de haute masse moléculaire pouvant contenir entre 50 et 150 résidus de mannose.

La levure semble alors le bon modèle pour étudier la libération de phospho-oligosaccharides.

En outre la purification à partir de la levure de(s) l'enzyme(s) responsable(s) de la dégradation des oligosaccharide-PP-Dol nous permettrait d'isoler et cloner le(s) gène(s) correspondant(s). Une fois ce gène cloné, il pourrait être réintroduit dans une autre cellule (ou dans la levure, ce matériel cellulaire se prêtant particulièrement bien à des manipulations de ce type) et les conséquences de son expression pourraient ainsi être examinées.

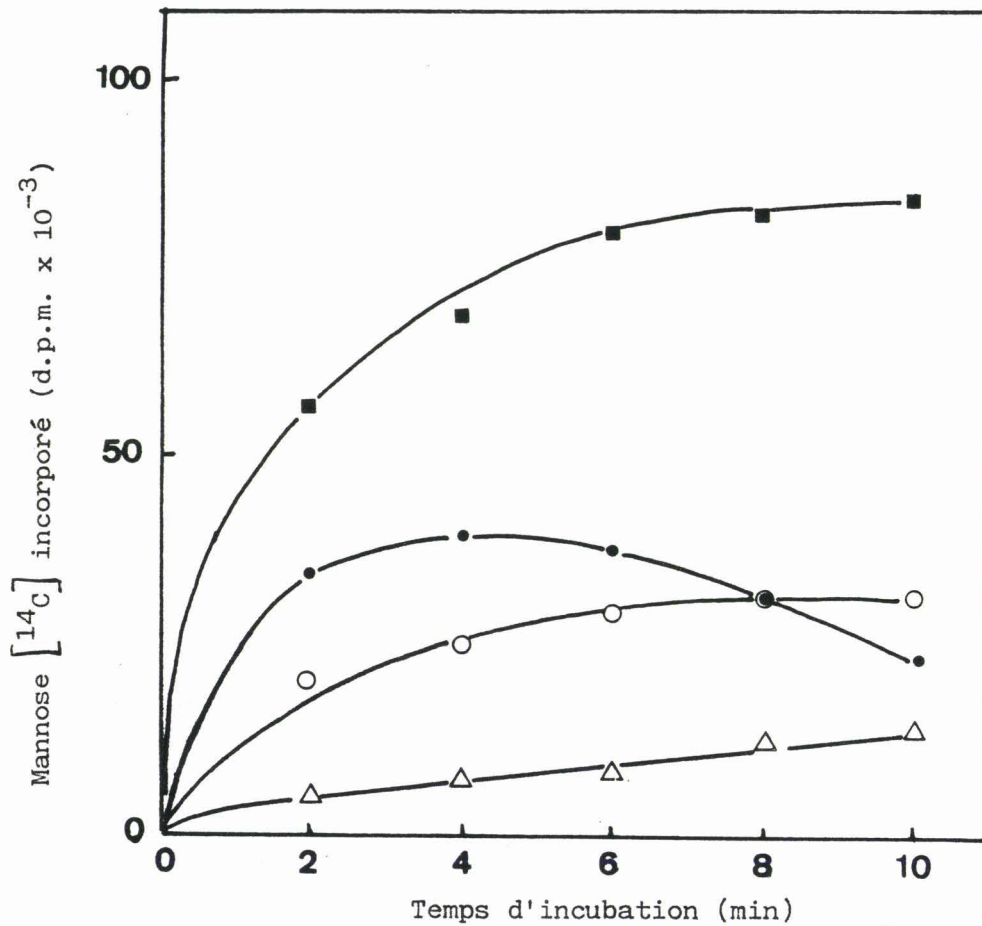


Fig. 27: Cinétique d'incorporation du Man $[^{14}\text{C}]$ sur les intermédiaires lipidiques, les protéines acceptrices endogènes et libération de matériel oligosaccharidique. Le transfert du mannose radioactif est suivi pour le Man-P-Dol (●-●), les oligosaccharide-PP-Dol (■-■), les protéines (○-○) et le matériel oligosaccharidique soluble (Δ-Δ) après passage sur BioGel P₂.

II - MISE EN EVIDENCE DE PHOSPHO-OLIGOSACCHARIDES LIBERES AU COURS DE LA SYNTHÈSE *IN VITRO* DES INTERMÉDIAIRES LIPIDIQUES DU CYCLE DES DOLICHOLS CHEZ LA LEVURE

A - PREPARATION DES MEMBRANES MICROSOMALES DE LEVURE

Afin d'obtenir une meilleure utilisation des glycosynucléotides lors de la biosynthèse des intermédiaires lipidiques en évitant une dilution par les glycosynucléotides endogènes de la levure nous avons utilisé une préparation de membranes microsomales de levure dont le protocole nous a été fourni par L. Lehle (Regensburg, R.F.A.; voir la partie "matériel et méthodes" de l'article 1).

B - ETUDE CINÉTIQUE DE L'INCORPORATION *IN VITRO* DE GDP-[¹⁴C] MANNOSE DANS LES MEMBRANES DE LEVURE

Une suspension de membranes de levure (24mg de protéines/ml) est incubée à 37°C en présence de GDP-[¹⁴C] mannose 10µM, UDP-GlcNAc 100µM, MnCl₂ 2mM et MgCl₂ 5mM, en présence de tampon Tris. HCl 20mM pH 7,4. Toutes les 2 minutes des prélèvements correspondants au dixième du volume total du mélange d'incubation sont effectués et traités selon le protocole d'extraction séquentielle des intermédiaires lipidiques décrit dans le chapitre "appendice technique".

Les résultats obtenus et représentés dans la figure 27 montrent que l'incorporation du mannose radioactif dans les intermédiaires lipidiques est très rapide en présence de microsomes de levure. Dès la 6ème minute la synthèse des oligosaccharide-PP-Dol et la glycosylation des protéines semble terminées ; d'autre part après 4 minutes d'incorporation le Man-P-Dol semble disparaître.

Ces résultats, comparés à ceux obtenus par Cacan *et al* [340], dans l'étude de la synthèse des intermédiaires lipidiques par des lymphocytes de Rat en présence de GDP-Man, et par Cecchelli *et al*. [341] à l'aide de lymphocytes perméabilisés, montrent que des membranes de levure synthétisent très rapidement des intermédiaires lipidiques et des glycoprotéines.

Dans le cas de la levure la disparition du Man-P-Dol serait la conséquence d'une O-glycosylation des protéines endogènes. En effet, Sharma *et al*. [342] ont montré en 1974 que chez la levure plus de 80 % de la radioactivité incorporée dans les glycoprotéines peuvent être libérés par β-élimination. Or Babczinski et Tanner [343] ont mis en évidence que le premier

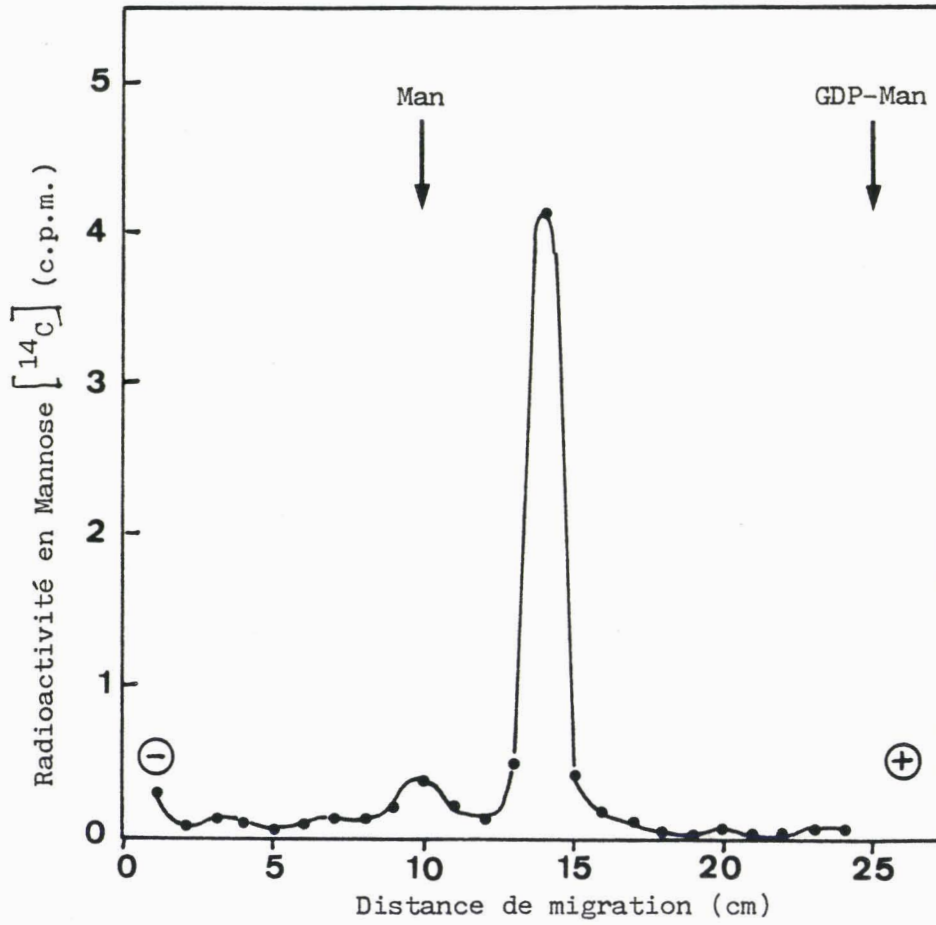


Fig. 28 : Electrophorèse du matériel oligosaccharidique libéré après 10 minutes d'incubation.

résidu de mannose lié directement à la sérine (ou thréonine) est incorporé dans les protéines via le Man-P-Dol. Nous avons appliqué la technique de β -élimination suivie d'une précipitation au méthanol à 60 % pour séparer les oligomannositols solubles des N-glycoprotéines selon le protocole décrit par Parodi [344] ; les résultats que nous avons obtenus indiquent que la radioactivité liée aux protéines est solubilisée à 60 % par cette technique. Il faut noter que l'incubation des membranes a été effectuée à 37°C alors que Sharma a fait fonctionner son système membranaire à 20°C. La température pourrait favoriser la N-glycosylation aux dépens de la O-glycosylation.

Nous avons vérifié l'influence de la température sur le rapport: radioactivité liée aux O-glycannes/radioactivité liée aux N-glycannes et constaté une diminution de ce rapport de 2 à 1,2 en fonction de l'augmentation de la température d'incubation entre 22 et 47°C. Il semble donc que la N-glycosylation des protéines chez la levure soit activée par la température. Ceci est en accord avec les résultats obtenus par Zueco et al. [345].

Les résultats des recherches effectuées précédemment par A. Verbert et coll. permettent de penser qu'il existe dans la levure comme chez les lymphocytes un système de dégradation des oligosaccharide-PP-Dol avec libération de matériel oligosaccharidique. Nous avons donc analysé les phases aqueuses avec la même technologie employée dans les études menées sur les lymphocytes.

C - ANALYSE DES PRODUITS LIBERES DANS LA PHASE AQUEUSE

Les phases supérieures aqueuses obtenues lors de l'extraction séquentielle des intermédiaires lipidiques sont chromatographiées par tamisage moléculaire sur Bio-Gel P-2 afin d'isoler le matériel oligosaccharidique de haute masse moléculaire des glycosyl-nucléotides marqués et de leurs produits de dégradation. Les produits radioactifs correspondant à ce matériel oligosaccharidique sont analysés par électrophorèse sur papier dans le tampon citrate pH 3,5 selon la technique décrite par Cacan et al. [346]. La figure 28 correspond au profil électrophorétique du matériel oligosaccharidique libéré après 10 minutes d'incubation des membranes de levure en présence de GDP-Man. Il apparaît deux pics, l'un neutre, l'autre migrant vers l'anode ; ce dernier représente plus de 80 % de la radioactivité déposée sur papier. D'autre part, nous avons pu constater que le pourcentage de matériel chargé négativement demeure à peu près constant au cours de l'incubation. En effet, dès les premiers prélèvements nous trouvons 87 % et pour le dernier prélèvement 83 % de matériel chargé. Il semble donc que le processus de dégradation ne soit pas lié à l'accumulation des oligosaccharide-PP-Dol non utilisés lors de la N-glycosylation.

L'électrophorèse sur papier se prêtant difficilement à des analyses ultérieures, nous avons utilisé une technique d'échange d'ions sur QAE-Sephadex A-25 décrite par Varki et Kornfeld [347] pour l'analyse des glycanes contenant du mannose-6-phosphate. Ceci nous a permis de vérifier qu'après 10 minutes d'incubation de membranes de levure avec du GDP-Man le matériel oligosaccharidique libéré dans la phase aqueuse contient 85 % de composés possédant 2 charges négatives (voir article 1, figure 2a).

III - DISCUSSION

Il apparaît donc que le système de membranes de levure est un bon modèle pour l'étude de la dégradation des oligosaccharide-PP-Dol. En effet l'incorporation du mannose à partir de GDP-Man dans les intermédiaires lipidiques et les glycoprotéines se déroule aussi rapidement qu'avec un système membranaire de lymphocytes perméabilisés. D'autre part malgré la O-glycosylation des protéines les oligosaccharide-PP-Dol représentent au bout de 10 minutes d'incubation 20 % environ de la radioactivité totale de toutes les fractions.

De plus, le matériel oligosaccharidique relâché représente 4,1 % de la radioactivité totale. Aussi ce système membranaire semble très utile pour caractériser une activité enzymatique responsable de la libération dans les phases aqueuses de ces oligosaccharides chargés négativement.

Néanmoins au début de ce travail il fallait résoudre deux problèmes importants.

Le premier est d'éviter de devoir faire fonctionner un système membranaire dans le sens de la biosynthèse des intermédiaires lipidiques pour en même temps étudier la dégradation de ceux-ci. Il fallait donc établir un système membranaire de dégradation *in vitro* des oligosaccharide-PP-Dol avec pour cela nécessité d'utiliser un détergent afin de solubiliser ce substrat.

Le second problème est la conséquence du premier. En effet, la présence d'un détergent dans le protocole d'extraction séquentielle des intermédiaires lipidiques modifie complètement la répartition de ces derniers dans les différentes phases aqueuses ou organiques. Ainsi dans un mélange chloroforme/méthanol/eau (3:2:1, V/V/V) les oligosaccharide-PP-Dol solubilisés par du Triton X-100 en présence de protéines se retrouvent après centrifugation aussi bien dans la phase aqueuse que dans la phase organique ; alors que sans détergent ils sont normalement emprisonnés dans l'interphase avec les protéines dénaturées et ne peuvent être extraits que dans le mélange CMW (10:10:3, V/V/V).

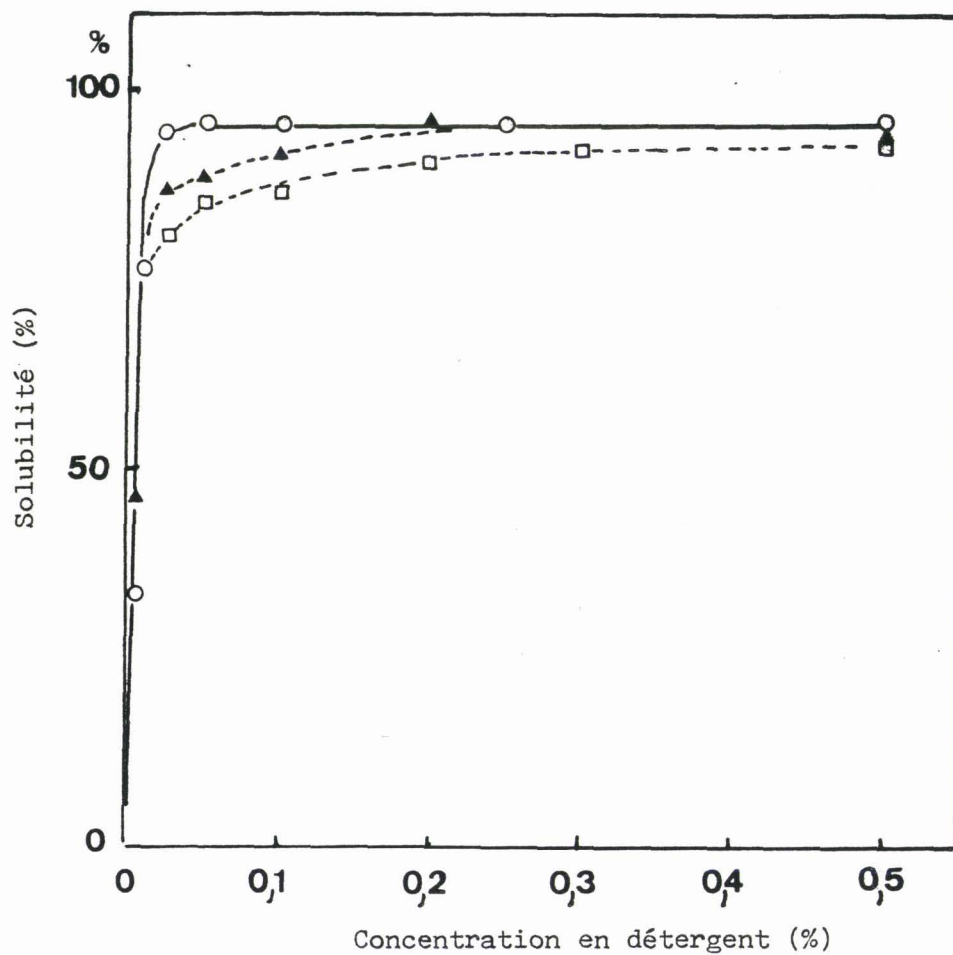


Fig. 29 : Solubilisation d'oligosaccharide-PP-Dol par des détergents en solution aqueuse.

(o-o) Triton X-100 (V/V)
(▲-▲) Nonidet P-40 (V/V)
(□-□) Octylglucoside (P/V)

CHAPITRE II :

CARACTERISATION D'UNE ACTIVITE OLIGOSACCHARIDE- PYROPHOSPHO-DOLICHOL PYROPHOSPHATASE CHEZ LA LEVURE

I - MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE DE SEPARATION DE L'OLIGOSACCHARIDE-PP-DOL DU MATERIEL OLIGOSACCHARIDIQUE LIBERE LORS DE LA COUPURE DE LA LIAISON PYROPHOSPHATE

Afin de solubiliser le substrat dans un milieu aqueux ainsi que l'oligosaccharide-PP-Dol ayant un caractère amphiphile nettement marqué (c'est-à-dire glycanne hydrophile et dolichol hydrophobe) il est donc nécessaire de trouver un détergent qui ne soit pas incompatible avec la séparation du substrat des produits et avec l'activité enzymatique étudiée.

A - SOLUBILISATION DE L'OLIGOSACCHARIDE-PP-DOL PAR DIVERS DETERGENTS

Un mélange d'oligosaccharide-PP-Dol radioactifs en solution dans du CMW sont préparés par marquage métabolique *in vivo* de splénocytes de Souris avec du [2-³H] mannose selon le protocole décrit par Cacan et al. [348].

La solution CMW est ensuite évaporée sous azote puis reprise par des volumes constants de solutions aqueuses contenant des concentrations croissantes en divers détergents.

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 29. Il apparaît que, parmi les 3 détergents neutres étudiés, le Triton X-100 est plus efficace que le Nonidet P-40 et l'octylglucoside. Les détergents ionisés, comme le SDS (dodécylsulfate de sodium), le CTAB (bromure de cétyltriméthyl ammonium), le DOC (desoxycholate de sodium) ou même un détergent de type zwitterion comme le CHAPS [3-(3-cholamidopropyl)-diméthyl-ammonio-1-propane sulfonate] donnent tous approximativement le même résultat que les trois premiers détergents. Nous obtenons la solubilisation à 86% par le Nonidet P-40 à 0,025 % alors que Chalifour et Spiro [349] ont obtenu 100 % de solubilisation avec le même détergent à 0,02 %. Ce résultat différent peut sans doute être attribué à un phénomène d'absorption sur la surface en polycarbonate des tubes utilisés dans nos expériences.

Nous verrons par la suite (chapitre III,B) que les détergents ionisés sont dans l'ensemble inhibiteurs de l'activité enzymatique que nous étudions et donc peu utilisables.

Le premier problème étant facilement résolu, il fallait pouvoir mettre au point une technique permettant d'isoler les produits de la réaction enzymatique et ayant un caractère hydrophile (phospho-oligosaccharides) du substrat amphiphile solubilisé par le Triton X 100.

B - APPLICATION D'UNE METHODE DE PARTAGE DE PHASES AU TRITON X-114

Nous avons effectué plusieurs tentatives de démixtion provoquée du mélange CMW contenant des oligosaccharide-PP-Dol en présence de détergent en espérant provoquer ainsi la concentration des oligosaccharide-PP-Dol au niveau de l'interphase.

L'échec fut total, même en remplaçant le détergent par une protéine possédant un domaine de fixation des lipides comme la sérum albumine bovine.

Nous inspirant des travaux de Pryde et Phillips [350] sur l'étude des protéines des membranes de granules chromaffines à l'aide de la technique de séparation de phases au Triton X-114 mise au point par Bordier [351] ; nous avons pensé que, comme les phospholipides des membranes de surrénales entraînés dans la phase détergente après démixtion, les oligosaccharide-PP-Dol et le P-Dol pouvaient avoir le même comportement.

Il faut rappeler que le détergent Triton X-114, dont le nombre de groupements "ethoxy" est inférieur de 2 unités par rapport au Triton X-100, forme des solutions aqueuses micellaires transparentes à basses températures. Le chauffage de ces solutions provoque la formation d'aggrégats constitués de larges micelles qui rendent la solution trouble à partir de 20 - 22°C (point de "rosée"). A cette température la solution se sépare lentement en deux phases : une phase supérieure aqueuse pauvre en détergent (environ 0,05 %) et une phase inférieure plus lourde riche en détergent. La phase supérieure correspond à peu près à 95 % du volume de la solution initiale et la phase inférieure plus petite contient presque tout le détergent.

Cette technique appliquée à des oligosaccharide-PP-Dol en solution dans du Triton X-114 à 1 % donne le résultat espéré et présenté dans la figure 1 de l'article 1.

Quelle que soit leur concentration dans la solution aqueuse, les oligosaccharide-PP-Dol sont entraînés à 90 % dans la phase inférieure par le Triton X-114 lors du chauffage à 37°C. Le "bruit de fond" résiduel de 10 % que l'on obtient parfois dans la phase supérieure peut être attribué à une contamination de

l'extrait CMW par du mannose radioactif utilisé lors du marquage *in vivo* des splénocytes. En effet, lors de l'extraction séquentielle des intermédiaires lipidiques, si les lavages par la phase supérieure théorique (chloroforme/méthanol/eau, 3 : 48 : 47, V/V/V) sont effectués en grands nombres (24), la valeur de ce bruit de fond descend à 2-3% .

En utilisant des phospho-oligosaccharides obtenus par hydrolyse alcaline des oligosaccharide-PP-Dol et des oligosaccharides neutres obtenus par hydrolyse acide douce (voir "appendice technique") nous avons vérifié que ces deux types de composés se répartissent après un seul demixage à 81-86 % dans la phase aqueuse supérieure pauvre en Triton X-114. On ne peut empêcher les agrégats de micelles de détergent d'entraîner dans leur descente une certaine quantité de composés hydrosolubles.

La présence de Triton X-100 dans un milieu contenant du Triton X-114 pourrait nuire au demixage comme le signale Bordier [352]. Le Triton X-114 devient soluble dans la phase supérieure quand la teneur en Triton X-100 atteint 0,2 % pour une teneur totale en détergent égale à 1% . Nous même avons pu constater que, si le rapport X-114/X-100 est égal à 4, le demixage devient problématique bien que la solution soit trouble à 37°C. D'autre part les oligosaccharide-PP-Dol apparaissent alors répartis dans toute la solution.

Dans les conditions expérimentales que nous utilisons pour étudier l'activité pyrophosphatase nous ne descendons pas en dessous d'un rapport X-114/X-100 égal à 25, sauf dans les études de l'influence de la concentration en détergent sur l'activité enzymatique. Deux précautions sont alors adoptées : premièrement ajouter plusieurs fois 100 µl de solution "fraîche" de Triton X-114 à 1 % après chaque demixage et deuxièmement effectuer une gamme témoin sans enzyme.

Afin d'éviter que la réaction d'hydrolyse du substrat par l'enzyme ne puisse se prolonger après addition du Triton X-114 s'il s'averrait que l'enzyme se retrouve dans la phase inférieure avec le substrat, nous avons ajouté à la solution d'arrêt (contenant le Triton X-114) de l'EDTA 10 mM tamponnée à pH9 et du sulfate de sodium 166 mM. La présence de l'EDTA permet d'arrêter la réaction enzymatique par complexation des cations. Le sulfate de sodium 166 mM en multipliant d'un facteur 5 la force ionique du milieu abaisse le point de rosée de 10°C (Maclay [353]), l'on favorise ainsi le demixage et par là la séparation du substrat des produits de la réaction d'hydrolyse.

C - DISCUSSION

Cette technique au Triton X-114 semble avantageuse pour plusieurs raisons.

Les conditions physico-chimiques utilisées sont suffisamment douces pour ne pas provoquer l'hydrolyse des oligosaccharide-PP-Dol, comme il s'en produit en chauffant à 100°C ou en présence d'acide trichloracétique (ATCA).

D'autre part le Triton X-114 seul peut avoir deux usages :

premièrement à une température inférieure à 20°C :
solubiliser le substrat et perméabiliser les membranes,

deuxièmement au dessus de 22°C par démixtion:
séparer le substrat des produits libérés.

Characterization of an oligosaccharide-pyrophosphodolichol pyrophosphatase activity in yeast

Michel BELARD, René CACAN and André VERBERT*

Laboratoire de Chimie Biologique (Unité Associée au C.N.R.S. N° 217 et Laboratoire Pilote du Ministère de l'Éducation Nationale), Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

Use of Triton X-114 allowed us to develop a new method to separate hydrophilic oligosaccharidic material from hydrophobic oligosaccharide pyrophosphodolichols (oligosaccharide-*PP*-Dol). Taking advantage of this procedure we characterize, in yeast microsomal membranes, an enzymic activity that hydrolyses oligosaccharide-*PP*-Dol into oligosaccharidic material. H.p.l.c. analysis together with alkaline-phosphatase- and endo-*N*-acetyl- β -D-glucosaminidase-susceptibility demonstrate that the oligosaccharidic released material is mainly composed of oligomannosides containing a chitobiose phosphate at the reducing end. The enzymic activity requires bivalent cations and is inhibited by pyrophosphate, NAD⁺ and bacitracin. As other, commercially available, pyrophosphatases have no action on lipid intermediates, the described pyrophosphatase activity appears to be the specific enzyme for oligosaccharide-*PP*-Dol. This enzymic splitting of the pyrophosphate bond might be the primary event in the catabolism of lipid intermediates.

INTRODUCTION

N-Glycosylation of proteins proceeds via the transfer of the oligosaccharide moiety from an oligosaccharide-*PP*-Dol to an asparagine residue of the nascent protein. In contrast with the voluminous literature detailing the metabolic pathway for sequential glycosylation of lipid intermediates, far less attention has been given to the degradation of oligosaccharide-*PP*-Dol. In fact, the release of soluble oligosaccharide phosphates and of neutral oligosaccharides has been observed in a number of glycoprotein-synthesizing systems (Hsu *et al.*, 1974; Oliver & Hemming, 1975; Cacan *et al.*, 1980; Anumula & Spiro, 1983). We previously demonstrated that this catabolic pathway starts with the cleavage of the pyrophosphate bond of oligosaccharide-*PP*-Dol (Cacan *et al.*, 1980, 1987), although Anumula & Spiro (1983) have proposed that part of this material could originate from a side reaction due to the oligosaccharidyl-transferase using water as acceptor.

In the present paper we characterize the enzyme activity responsible for the primary event in oligosaccharide-*PP*-Dol degradation. Taking advantage of the property of Triton X-114 to segregate, after phase separation, phospholipids from more hydrophilic material (Bordier, 1981; Pryde & Phillips, 1986), we developed a procedure to extract, for further identification, the water-soluble material released from oligosaccharide-*PP*-Dol used as a substrate. Using yeast microsomal membranes as enzyme source, we describe here a novel pyrophosphatase activity acting on oligosaccharide-*PP*-Dol.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

GDP-[U-¹⁴C]mannose (10.73 GBq/mmol) and D-[2-³H]mannose (588 GBq/mmol) were from Amersham International (Amersham, Bucks., U.K.).

Zymolyase-100 T from *Arthrobacter luteus* was from Kirin Brewery (Tokyo, Japan). Alkaline phosphatase from calf intestine and endo-*N*-acetyl- β -D-glucosaminidase H from *Streptomyces griseus* were from Boehringer (Mannheim, Germany). Inorganic pyrophosphatase from baker's yeast, nucleotide pyrophosphatase from *Crotalus adamanteus* venom and all other analytical-grade reagents were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.). QAE-Sephadex A-25 was obtained from Pharmacia (Uppsala, Sweden) and Bio-Gel P-2 (200-400 mesh) were from Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA, U.S.A.). Standard oligomannosides with one *N*-acetylglucosamine residue at the reducing end were kindly provided by Dr. G. Strecker (Villeneuve d'Ascq, France). The [2-³H]Man-oligosaccharide-*PP*-Dol compounds were prepared by metabolic labelling of mouse splenocytes as previously described by Cacan *et al.* (1987). The yeast strain (X 2180-1A, wild-type *Saccharomyces cerevisiae*) was kindly provided by Dr. W. Tanner (Regensburg, Germany).

Preparation of yeast microsomal membranes

Saccharomyces cerevisiae was grown at 30 °C in a medium containing 0.5% yeast extract, 1% (w/v) bactopectone and 2% (w/v) glucose. The cells were harvested in mid-exponential phase, washed twice with 0.1 M-NH₄HCO₃, resuspended in 0.1 M-NH₄HCO₃ containing 50 mM-2-mercaptoethanol and incubated at 30 °C for 10 min under a slow stirring at 35 rev./min. The cells were collected by centrifugation at 1000 *g* for 10 min at 20 °C, washed twice with 0.1 M-sodium citrate buffer, pH 5.8, containing 0.8 M-sorbitol, then resuspended in the same buffer containing a fresh solution of Zymolyase-100 T (20 μ g/ml final concn.) for spheroplast formation. The mixture was incubated at 30 °C for 1 h with continuous gentle mixing. The spheroplasts were collected by low-speed centrifugation (1000 *g* for

Abbreviation used: oligosaccharide-*PP*-Dol, oligosaccharide pyrophosphodolichols.

* To whom all correspondence should be addressed.

10 min), gently resuspended and washed twice with citrate buffer as above. Cell lysis of spheroplasts was obtained by homogenization (ten strokes in a Potter apparatus) in 20 mM-Tris/HCl buffer, pH 7.4, containing 3 mM-MgCl₂ and 160 mM-NaCl. Nuclei, non-disrupted cells and mitochondria were removed by 10000 *g* centrifugation for 10 min at 4 °C, and the supernatant was centrifuged at 48000 *g* for 30 min at 4 °C. The final pellet containing yeast microsomal membranes was resuspended in 100 mM-Tris/HCl buffer, pH 7.4 (30 mg of protein/ml), or was kept frozen at -80 °C until use.

Phase separation of neutral oligosaccharides and oligosaccharide phosphates from oligosaccharide-*PP*-Dol by using Triton X-114 solution

Classical sequential lipid extraction based on phase separation with chloroform/methanol/water (3:2:1, by vol.) is not suitable when exogenous oligosaccharide-*PP*-Dol are added in the presence of detergent, since they partition into both the aqueous and the organic phases. Thus a different procedure had to be developed. A simple method had been described for separating hydrophobic and hydrophilic proteins by using phase separation with Triton X-114 (Bordier, 1981). Briefly, the method is based upon solubilizing proteins in the non-ionic detergent Triton X-114 followed by heating the aqueous solution obtained above its cloud point (around 22 °C). The solution then separates into two clear phases, respectively depleted and enriched in detergent, i.e. an aqueous phase containing the hydrophilic proteins and a detergent phase containing the hydrophobic proteins. The method has been applied to oligosaccharide-*PP*-Dol.

Labelled oligosaccharide-*PP*-Dol were solubilized at 0 °C in 20 mM-Tris/HCl buffer, pH 7.4, containing 154 mM-NaCl and 1% (w/v) Triton X-114 in a total volume of 100 μ l. This clear solution was overlaid at 0 °C on a cushion (500 μ l) of 8.5% (w/v) sucrose in 20 mM-Tris/HCl buffer, pH 7.4, containing 154 mM-NaCl and 0.05% Triton X-114 in a 1.5 ml conical Eppendorf microcentrifuge tube. The tube was then incubated at 37 °C for 5 min and clouding of the solution occurred. The tube was centrifuged at 2500 *g* for 3 min at room temperature in a Beckman microcentrifuge. After centrifugation the detergent phase was found as an oily droplet at the bottom of the tube. To improve the extraction of oligosaccharide-*PP*-Dol, the upper aqueous phase was removed, Triton X-114 was added to give a 1% solution and again a clear solution was obtained by leaving the mixture at 0 °C. This solution was again overlaid on sucrose cushion identical with that described above, incubated at 37 °C and centrifuged as described above. As indicated on Fig. 1(a), to increase the percentage of oligosaccharide-*PP*-Dol in the lower phase (from 85% to more than 90%) the process has to be repeated at least twice. Fig. 1(b) indicates that the partition is independent of the amount of labelled oligosaccharide-*PP*-Dol.

Standard assay for oligosaccharide-*PP*-Dol pyrophosphatase activity

Approx. 150000 d.p.m. of [2-³H]Man-oligosaccharide-*PP*-Dol was dissolved in 50 μ l of 1% Triton X-114 in 20 mM-Tris/HCl buffer, pH 7.4, containing 154 mM-

NaCl and mixed, in a conical Eppendorf microcentrifuge tube, with 20 μ l of yeast microsomal membranes solubilized in 1% Triton X-114 in 100 mM-Tris/HCl buffer, pH 7.4 (30 mg of protein/ml). The mixture (total volume 100 μ l) was incubated at 35 °C for 1 h and then reaction was stopped by dilution with 500 μ l of ice-cold 1% Triton X-114 solution. The reaction products and remaining substrate were extracted according to the phase-separation technique described above.

Synthesis of lipid intermediates *in vitro* with GDP-[¹⁴C]mannose and yeast membranes

Incorporation of [¹⁴C]mannose from GDP-[¹⁴C]-mannose (10.73 GBq/mmol) into endogenous yeast microsomal acceptors was performed in a final reaction volume of 0.1 ml containing 20 mM-Tris/HCl buffer, pH 7.4, 5 mM-MgCl₂, 2 mM-MnCl₂, 100 μ M-UDP-*N*-acetylglucosamine, 10- μ M-GDP-[¹⁴C]mannose and yeast microsomal membranes (2.25 mg of protein). After incubation at 37 °C for specified time periods, reaction was stopped by diluting the mixture to 0.4 ml (4 mM-MgCl₂ with 1 mg of carrier immunoglobulin G) and the solution was mixed with 0.8 ml of methanol and 1.2 ml of chloroform. Lipid intermediates and glycoproteins were extracted by the multiple extraction procedure as previously described (Cacan *et al.*, 1980). The labelled oligosaccharide phosphates and neutral oligosaccharides released in the aqueous phase were separated from precursor and precursor-degradation products by gel filtration on a Bio-Gel P-2 column (1 cm \times 50 cm) in 0.1 M-acetic acid. The glycoprotein pellet was dissolved in conc. formic acid by heating at 100 °C for 10 min. Radioactivities were counted in scintillation medium and quenching correction was made by external ratio standardization.

Analysis of anionic oligosaccharides on QAE-Sephadex

The number of negative charges on the oligosaccharides was determined by batch elution from QAE-Sephadex (Varki & Kornfeld, 1980). The material was dissolved in 10 mM-Tris base, passed through 1 ml column of QAE-Sephadex equilibrated in 10 mM-Tris base and eluted stepwise with increasing concentrations of NaCl in 10 mM-Tris base (5 ml each). A final elution with 1 M-NaCl in 0.1 M-HCl was done before re-equilibration with 100 mM-Tris base followed by 10 mM-Tris base.

H.p.l.c. of oligosaccharides

After treatment with endo-*N*-acetyl- β -D-glucosaminidase H of exogenous oligosaccharide-*PP*-Dol (Chalifour & Spino, 1984) or of oligosaccharide phosphates (Cacan *et al.*, 1980) the resulting oligosaccharides were desalted on Bio-Gel P-2, concentrated under vacuum and dissolved in acetonitrile/water (7:3, v/v). H.p.l.c. was performed on a Spherisorb-NH2 (5 μ m particle size) column (250 mm \times 4.6 mm). Elution was achieved with a linear gradient of acetonitrile/water from 7:3 to 1:1 (v/v) for 40 min at a flow rate of 1 ml/min at room temperature. Fractions (0.5 ml) were collected and their radioactivity was determined by liquid-scintillation counting. Oligosaccharides used as standards were co-chromatographed with each sample.

Yeast oligosaccharide-pyrophosphodolichol pyrophosphatase

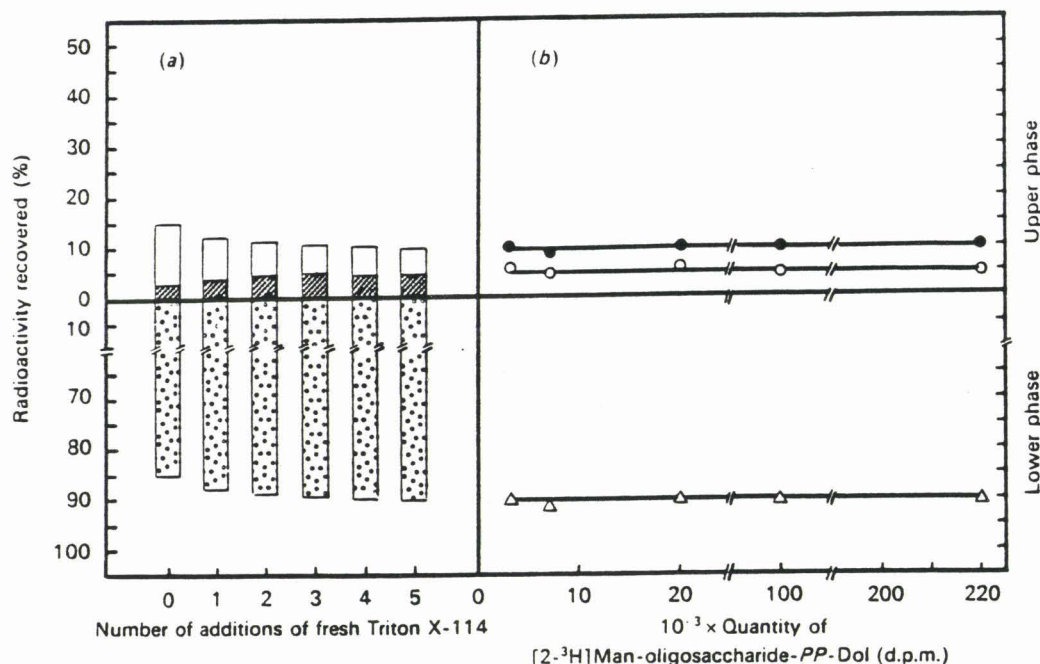


Fig. 1. Partition of oligosaccharide-PP-Dol after Triton X-114 phase separation

Labelled oligosaccharide-PP-Dol were solubilized at 0 °C in 1% Triton X-114 and the solution was overlaid on a 8.5% (w/v) sucrose cushion in buffer (see the Materials and methods section). After phase separation at 37 °C the detergent phase was separated from the aqueous phase by 2500 g centrifugation for 3 min. Panel (a) indicates the partition of radioactivity in the lower detergent phase (stippled area) and in the upper aqueous phase (hatched areas represent the radioactivity in the sucrose cushion) according to the number of repeat extractions with fresh 1% Triton X-114. Panel (b) represents, according to the amount of labelled oligosaccharide-PP-Dol added, the partition of the radioactivity in the total upper phase (●), in the sucrose cushion (○) and in the lower detergent phase (△) after two repeat extractions with 1% Triton X-114.

RESULTS

Formation of oligosaccharides during N-glycosylation by yeast membranes

When yeast microsomal membranes were incubated at 37 °C with GDP-[¹⁴C]mannose and UDP-N-acetylglucosamine in the conditions described in the Materials and methods section, labelled glycosylated products were recovered as Man-P-Dol, oligosaccharide-PP-Dol and glycoproteins. In addition, the aqueous phase of the sequential lipid extraction contained, besides labelled precursors and their degradation products, a higher-molecular-mass labelled material that was eluted soon after the void volume on Bio-Gel P-2 chromatography. As shown in Fig. 2(a), analysis of this material on QAE-Sephadex reveals two populations: a non-retained neutral fraction (15%) and a negatively charged (2 net charges) fraction (85%). When the anionic material was treated with alkaline phosphatase (12 units for 16 h at 37 °C) or with endo-N-acetyl-β-D-glucosaminidase H (10 units for 16 h at 37 °C) it was converted into neutral compounds, indicating that its charge was due to the presence of a phosphate group linked to the N-acetylglucosamine residue at the reducing end of a chitobiosyl unit of an oligomannoside, as we had already described for rat spleen lymphocytes (Cacan *et al.*, 1980). At that time we had proposed that these oligosaccharide phosphates originated from the splitting of the pyrophosphate bond of oligosaccharide-PP-Dol, and the high yield of oligosaccharide phosphates obtained with yeast prompted us to use yeast microsomal membranes

to characterize the enzymic activity responsible for the cleavage of oligosaccharide-PP-Dol.

It is of note that, although the oligosaccharidic moiety of lipid intermediate was composed of Man₉- and Man₈-species (mean proportions 57% and 43% respectively), the oligosaccharidic moiety of oligosaccharide phosphates was mainly (95%) of Man₈-species, indicating the action of a specific mannosidase, as already described by Jelinek-Kelly *et al.* (1985).

Use of the Triton X-114 phase-separation method to assay the cleavage of exogenous oligosaccharide-PP-Dol by yeast microsomal membranes

Oligosaccharide-PP-Dol were prepared from mouse splenocytes after metabolic labelling with [³H]mannose and incubated with yeast microsomal membranes in the presence of 1% Triton X-114 in the condition of the standard assay at 35 °C. After the phase-separation procedure as described in the Materials and methods section, it was observed that the radioactivity of the detergent phase containing labelled oligosaccharide-PP-Dol decreased with time, although the radioactivity increased in the aqueous phase (Fig. 3a). It has to be noted that this phenomenon was dependent on the amount of membranes added (Fig. 3b), being linear up to 20 μl of membrane suspension, i.e. 600 μg of protein, and did not occur when membranes were previously heat-denatured (10 min at 70 °C). The small percentage of hydrophilic material released at zero time was due to the fact that the phase-separation technique requires three

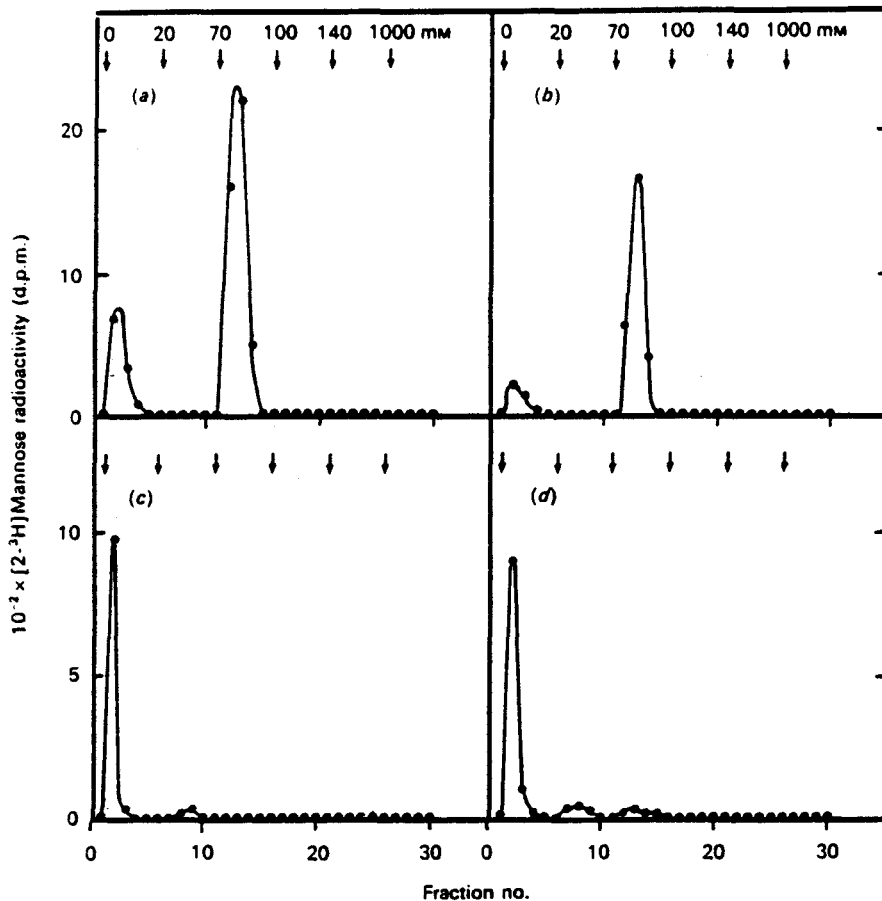


Fig. 2. QAE-Sephadex analysis of the soluble oligosaccharidic material released during oligosaccharide-*PP*-Dol degradation

Oligosaccharidic material released in the aqueous phase after synthesis of oligosaccharide-*PP*-Dol *in vitro* with labelled GDP-mannose and yeast membranes (panel *a*), or recovered in the aqueous phase obtained by Triton X-114 phase separation after incubation of exogenous labelled oligosaccharide-*PP*-Dol with Triton X-114-solubilized yeast membranes (panel *b*), was applied to QAE-Sephadex columns, and eluted stepwise with increasing concentrations of NaCl in 10 mM-Tris base (0, 20, 70, 100 and 140 mM) corresponding to a net negative charge of 0, -1, -2, -3 and -4. The charged oligosaccharidic material obtained in panel (*b*) was re-analysed on QAE-Sephadex after treatment with endo-*N*-acetyl- β -D-glucosaminidase H (panel *c*) or after treatment with alkaline phosphatase (panel *d*).

repeated heatings at 37 °C, during which reaction can occur.

Characterization of the products released in the aqueous phase

After incubation of labelled oligosaccharide-*PP*-Dol with yeast membranes followed by phase separation as described in the Materials and methods section, the aqueous phase was washed three times with 4 ml of theoretical lower phase [chloroform/methanol/4 mM-MgCl₂ (85:14:1, by vol.)] in order to eliminate residual detergent and to denature hydrophilic proteins. After being desalted on Bio-Gel P-2, the material was submitted to ion-exchange analysis on a QAE-Sephadex column. Fig. 2(*b*) reveals two populations, as had been earlier observed in the incubation with endogenously formed oligosaccharide-*PP*-Dol (Fig. 2*a*). When the anionic population was treated with endo-*N*-acetyl- β -D-glucosaminidase H (Fig. 2*c*) or with alkaline phosphatase (Fig. 2*d*), it was converted into neutral components, indicating that the major compound released in the aqueous phase was an oligomannoside terminated by a

chitobiose phosphate unit. The size of this oligosaccharidic moiety was determined by h.p.l.c. analysis of the oligosaccharide released by endo-*N*-acetyl- β -D-glucosaminidase. Fig. 4(*b*) indicates that oligosaccharide phosphates are mainly composed of three populations containing nine, eight and five mannose units in the respective proportions 43%, 23% and 31% on a molar basis. Since the exogenous oligosaccharide-*PP*-Dol used as substrate was composed of three species only (with nine, eight and seven mannose units in the respective proportions 78%, 11% and 11%), these results indicate that during incubation some of the oligosaccharidic moieties are degraded into smaller species.

Thus the use of the Triton X-114 phase-separation procedure allowed us to demonstrate the release of oligosaccharide phosphates when oligosaccharide-*PP*-Dol are incubated with yeast microsomal membranes, indicating the action of an oligosaccharide-*PP*-Dol pyrophosphatase, which was further characterized.

To test whether this release of hydrophilic material was due to a specific enzyme, other pyrophosphate-hydrolysing enzymes were assayed on oligosaccharide-

Yeast oligosaccharide-pyrophosphodolichol pyrophosphatase

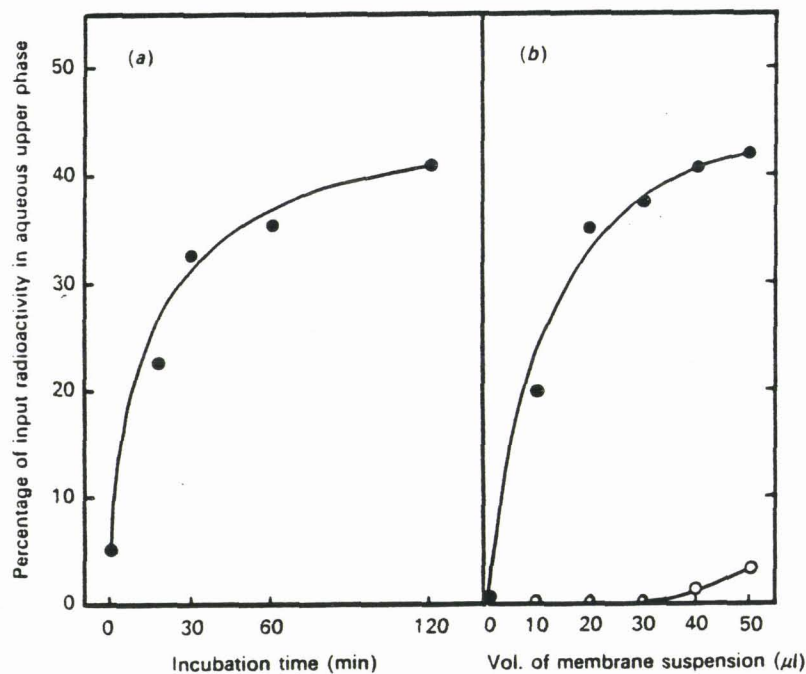


Fig. 3. Time- and membrane-concentration-dependence of oligosaccharide-PP-Dol hydrolysis

Labelled oligosaccharide-PP-Dol were incubated in the conditions described in the Materials and methods section. Extent of hydrolysis was expressed as a percentage of the input radioactivity as a function of time with 50 μ l of membrane suspension (panel a). The membrane-concentration-dependence (panel b) was tested with 1 h incubations with native (●) or heat-denatured (10 min at 70 °C) yeast membranes (○).

Table 1. Bivalent-cation-dependence of oligosaccharide-PP-Dol pyrophosphatase activity

The assays were performed as described in the Materials and methods section in the standard incubation conditions without bivalent cations (control). Assays were then performed in the presence of chelators (EDTA, EGTA) or bivalent cations. The data represent means for three different experiments, and are expressed as percentages of the control.

Incubation conditions	Relative activity (% of control)
Complete (minus bivalent cations)	100
Plus EDTA (10 mM)	50.7
Plus EGTA (10 mM)	35.7
Plus MgCl ₂ (10 mM)	113.2
Plus MnCl ₂ (10 mM)	149.5
Plus CaCl ₂ (10 mM)	150.8

PP-Dol. After a 1 h incubation, no hydrolysis was observed with alkaline phosphatase from calf intestine or with pyrophosphatase from baker's yeast, and only a little hydrolysis (1.8%) was obtained with nucleotide pyrophosphatase from *Crotalus adamanteus* venom. Control experiments indicated that the three enzymes

were active on their appropriate substrates (results not shown).

Temperature-, pH- and cation-dependence of the enzyme activity

No activity was detected at 0 °C and the enzymic activity showed a rather broad optimal temperature between 30° and 35 °C. Preincubation of the enzyme at different temperatures during 10 min followed by incubation for 1 h in the standard conditions showed that the enzymic activity remained stable up to 50 °C. The half-life was determined to be 1 h at 62 °C, and the activity was totally destroyed by preincubation at 70 °C.

The effect of pH was studied in the range 6–9.5 with Mes/Tris buffers. Optimal activity was observed between pH 7 and 7.5, and no activity could be detected at pH above 9. The optimal pH corresponded to a maximum of stability when the enzyme activity was assayed after preincubation at different pH values for 1 hr.

Table 1 shows that the enzyme activity was stimulated by the presence of 10 mM-Ca²⁺ and -Mn²⁺ and, to a lesser extent, of 10 mM-Mg²⁺. The cation-dependence of the reaction was confirmed by the inhibitory effect of chelators such as EDTA and EGTA (10 mM final concn.).

Effects of phosphate, pyrophosphate, NAD⁺ and bacitracin on the enzyme activity

Since the reaction involves the splitting of a pyrophosphate bond, we investigated the effect of phosphate- or pyrophosphate-containing substrates and

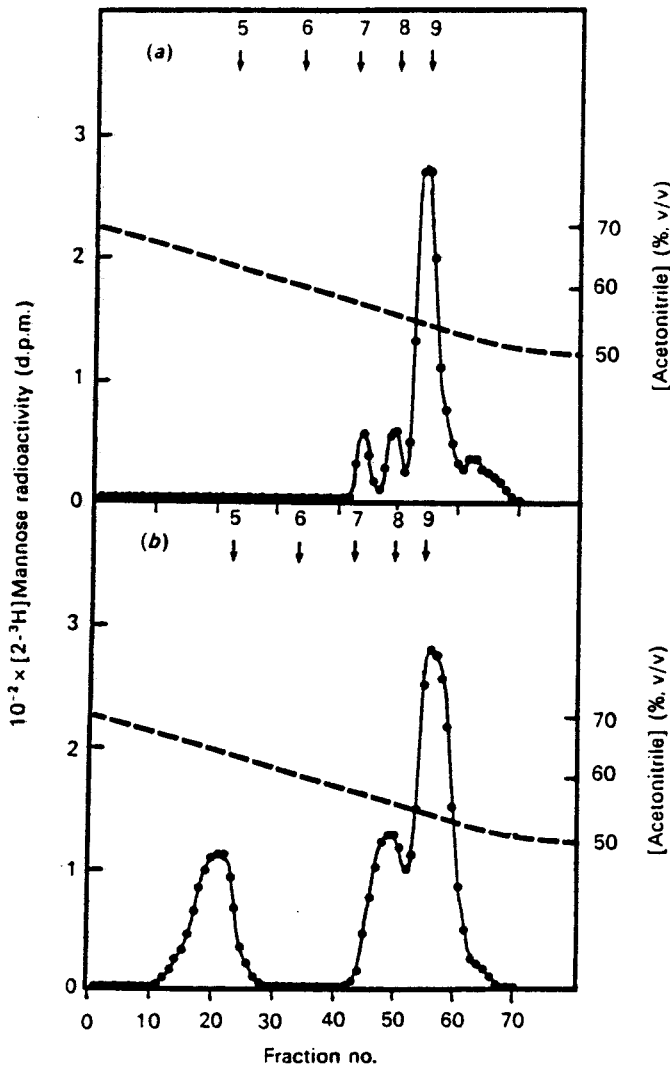


Fig. 4. H.p.l.c. analysis of labelled oligosaccharides

By endo-*N*-acetyl- β -D-glucosaminidase H treatment labelled oligosaccharides were released either from oligosaccharide-PP-Dol substrate (panel *a*), or from oligosaccharide phosphates (panel *b*). H.p.l.c. analyses were performed on a Spherisorb-NH₂ column eluted with a linear gradient of acetonitrile/water from 7:3 to 1:1 (v/v). Arrows indicate the position of standard oligosaccharides: 9, Man₉GlcNAc; 8, Man₈GlcNAc; 7, Man₇GlcNAc; 6, Man₆GlcNAc; 5, Man₅GlcNAc.

of bacitracin, which is known to inhibit the cleavage of the pyrophosphate bond of dolichol pyrophosphate (Wedgwood & Strominger, 1980). Fig. 5 clearly shows that pyrophosphate and NAD⁺ are potent inhibitors (total inhibition at 10 mM), although 10 mM-phosphate led to 35% inhibition only. Bacitracin was also an effective inhibitor, since an 80% inhibition was obtained when it was added at the concentration of 10 mM. We were unable to assay at a higher concentration of bacitracin since at concentrations above 10 mM the detergent effect of bacitracin rendered oligosaccharide-PP-Dol themselves soluble in the aqueous phase (Fig. 5*d*).

Effect of detergent on the enzyme activity

When assayed with increasing concentrations of Triton X-100 (Fig. 6*a*) or Triton X-114 (Fig. 6*b*), the enzymic activity was enhanced up to the detergent concentration of about 0.5%. This increase was probably due both to the solubilization of the substrate by the detergent and to the latency of the enzyme. In fact, it is known that the oligosaccharide linked to pyrophosphodolichol is at the luminal face of the rough endoplasmic reticulum (Hanover & Lennarz, 1981), and thus it can be expected that the pyrophosphatase activity would have the same location. The enzymic activity remained stable during the 1 h incubation in the presence of up to 1% Triton X-100, but at higher concentrations denaturation occurred. It has to be noted that the phase-separation procedure with Triton X-114 was not altered by the presence of Triton X-100 (at least up to a Triton X-100/Triton X-114 ratio of 1:2), as demonstrated by control experiments without membranes (Fig. 6*a*).

DISCUSSION AND CONCLUSION

Since our previous observation (Cacan *et al.*, 1980) of the degradation of lipid intermediates during the process of glycosylation in mouse splenocytes *in vitro*, it has been also shown with other biological models (Hanover & Lennarz, 1982; Anumula & Spiro, 1983) that oligosaccharide-PP-Dol exhibit a dual fate, i.e. either used for the transfer of their oligosaccharidic moiety *en bloc* on to a protein acceptor or degraded into oligosaccharide phosphates and neutral oligosaccharides. In fact, the formation of oligosaccharide phosphates would be the initial step of a catabolic process leading to smaller neutral oligosaccharides (Cacan *et al.*, 1987) and presumably to monosaccharides.

In the present paper we first demonstrate that this catabolic process occurs also during *N*-glycosylation *in vitro* with yeast microsomal membranes but with a high proportion of oligosaccharide phosphates, presumably due to a slower further degradation process. Thus yeast membranes appear to be a good enzyme source for characterization of the primary event of oligosaccharide-PP-Dol degradation.

The characterization of this first reaction requires solubilization of the exogenous oligosaccharide-PP-Dol used as substrate, then separation of the hydrophilic products from the amphipathic substrate. Since the classical Folch procedure does not yield a net partition of oligosaccharide-PP-Dol in the organic phase when they have been previously solubilized with detergent, we devised a novel procedure based on phase separation of Triton X-114 solution at a temperature above the cloud point, as first described by Bordier (1981).

When labelled exogenous oligosaccharide-PP-Dol are incubated with yeast membranes, part of the radioactivity is recovered in the hydrophilic upper phase in a time-dependent and membrane-concentration-dependent manner. These labelled products have been characterized as oligosaccharide phosphates mainly with the general structures Man₉GlcNAc₂-P, Man₈GlcNAc₂-P and Man₅GlcNAc₂-P in the proportions 43%, 23%, and 31% respectively. It may be noted that when oligosaccharide-PP-Dol are endogenously labelled with GDP-[¹⁴C]mannose in the absence of detergent the

Yeast oligosaccharide-pyrophosphodolichol pyrophosphatase

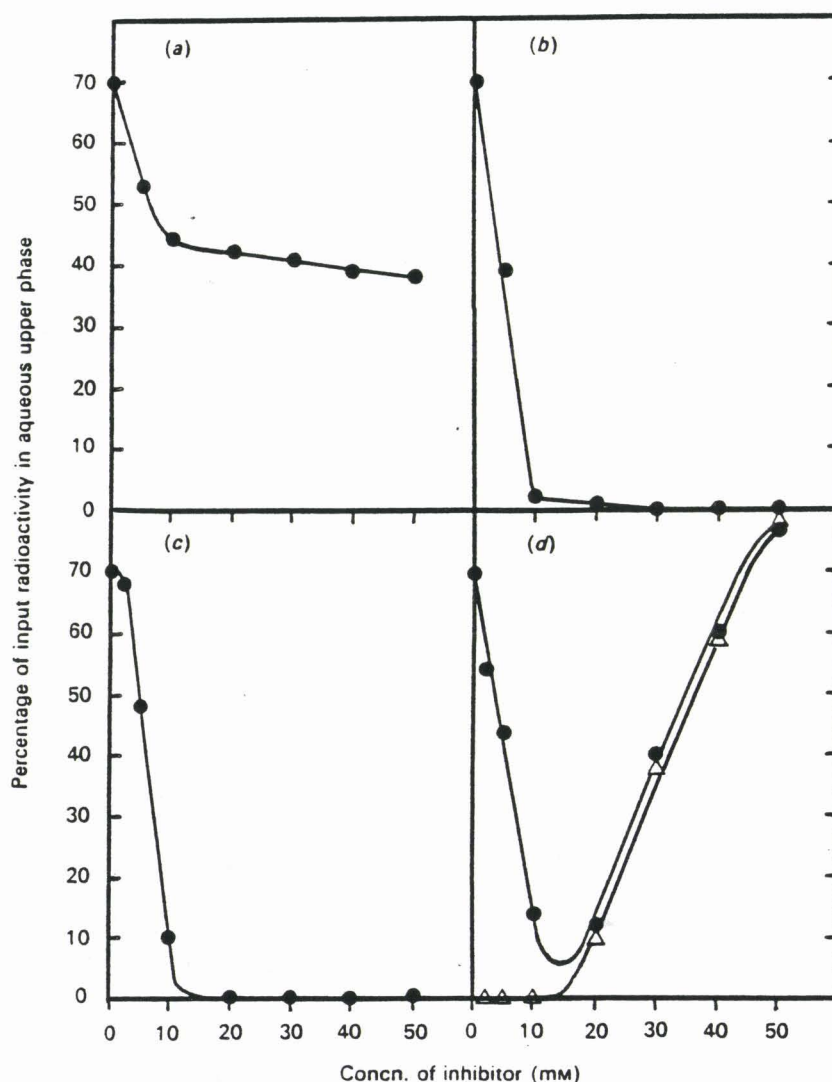


Fig. 5. Inhibition of oligosaccharide-PP-Dol pyrophosphatase activity

Incubations were performed in the standard conditions as described in the Materials and methods section with various concentrations (from 0 to 50 mM) of inorganic phosphate (panel a), pyrophosphate (panel b) or NAD⁺ (panel c). Panel (d) indicates the effect of increasing amounts of bacitracin incubated in the presence (●) or in the absence (Δ) of yeast membranes.

oligosaccharide phosphates produced are mainly of Man₈GlcNAc₂-P structure although the donor lipid intermediates possess nine mannose residues. This is in agreement with the rough-endoplasmic-reticulum location of a specific mannosidase reported by Bischoff & Kornfeld (1983) and described also in yeast by Jelinek-Kelly *et al.* (1985), which reinforces the proposal that the splitting of oligosaccharide-PP-Dol occurs on their biosynthetic site, i.e. the lumen of rough endoplasmic reticulum. The presence of Man₅GlcNAc₂-P species in the assay with exogenous oligosaccharide-PP-Dol is presumably due to the presence of other mannosidases released by detergent, as mentioned by Jelinek-Kelly *et al.* (1985).

The pyrophosphatase activity described appears to be the specific enzyme for oligosaccharide-PP-Dol, since other pyrophosphatases do not act on these lipid intermediates. This enzyme exhibits an optimal pH between 7 and 7.5 and an optimal temperature between 30° and 35 °C, and appears to be cation-dependent,

mainly for Mn²⁺ and Ca²⁺. More interesting is its inhibition by pyrophosphate-containing compounds and by bacitracin, which is known to interact with the pyrophosphate bond of lipid intermediates, as has been demonstrated by Wedgwood & Strominger (1980) and previously utilized by Cacan *et al.* (1980) to inhibit the degradation of lipid intermediates in rat splenocytes. This raises the question whether the enzyme activity described in the present paper would be supported by the pyrophosphodolichol pyrophosphatase described by Wedgwood & Strominger (1980), the function of which would be to regenerate dolichol phosphate from dolichol pyrophosphate released after the action of the oligosaccharidyltransferase.

Thus the biological significance of this enzyme activity could be a regulatory step in the *N*-glycosylation pathway: it could control the availability of oligosaccharide-PP-Dol used as donors, and this first degradation event would regenerate dolichol phosphate required for the so-called 'dolichol cycle'.

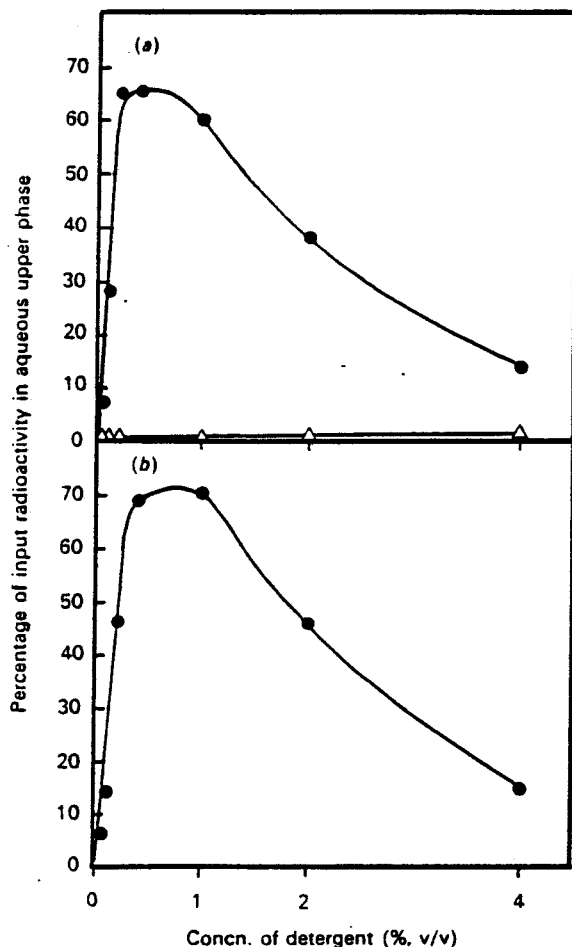


Fig. 6. Effect of detergent on the oligosaccharide-PP-Dol pyrophosphatase activity

Incubations were performed in the standard conditions as described in the Materials and methods with increasing concentrations of Triton X-100 (panel *a*) in the presence (●) or in the absence (△) of yeast membranes. Panel (*b*) indicates the effect of increasing concentrations of Triton X-114.

This research was supported in part by the Centre National de la Recherche Scientifique and by the Ministère de l'Éducation Nationale (Laboratoire Pilote et Unité Associée N° 217: Relation Structure-Fonction des Constituants Membranaires; Director, Professor Jean Montreuil) and by the Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois. We are very grateful to Professor J. Montreuil for his constant interest in the progress of this work and for providing research facilities. We acknowledge Professor W. Tanner and Dr. L. Lehle (Regensburg, Germany) for providing the yeast strain and encouraging discussions. We are indebted to Dr. Ph. Clément (Société Lesaffre, Marcq-en-Baroeul, France) for giving us access to yeast culture and valuable advice. We are thankful to Dr. J. C. Michalski (Villeneuve d'Ascq, France) for valuable help in h.p.l.c. analysis and to Mrs. Myriam Coniez for her skilful technical assistance.

REFERENCES

- Anumula, R. K. & Spiro, R. G. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 15271-15282
- Bischoff, J. & Kornfeld, R. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 7909-7910
- Bordier, C. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 1604-1607
- Cacan, R., Hoflack, B. & Verbert, A. (1980) *Eur. J. Biochem.* **106**, 473-479
- Cacan, R., Cecchelli, R. & Verbert, A. (1987) *Eur. J. Biochem.* **166**, 469-474
- Chalifour, R. J. & Spiro, R. G. (1984) *Arch. Biochem. Biophys.* **229**, 386-394
- Hanover, J. A. & Lennarz, W. J. (1981) *Arch. Biochem. Biophys.* **211**, 1-19
- Hanover, J. A. & Lennarz, W. J. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 2787-2794
- Hsu, A. F., Baynes, J. W. & Heath, E. C. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **71**, 2390-2395
- Jelinek-Kelly, S., Akiyama, T., Saunier, B., Tkacz, J. S. & Herscovics, A. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 2253-2257
- Oliver, G. J. A. & Hemming, F. W. (1975) *Biochem. J.* **152**, 191-199
- Pryde, J. G. & Phillips, J. H. (1986) *Biochem. J.* **233**, 525-533
- Varki, A. & Kornfeld, S. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 10847-10858
- Wedgwood, J. F. & Strominger, J. L. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 1120-1123.

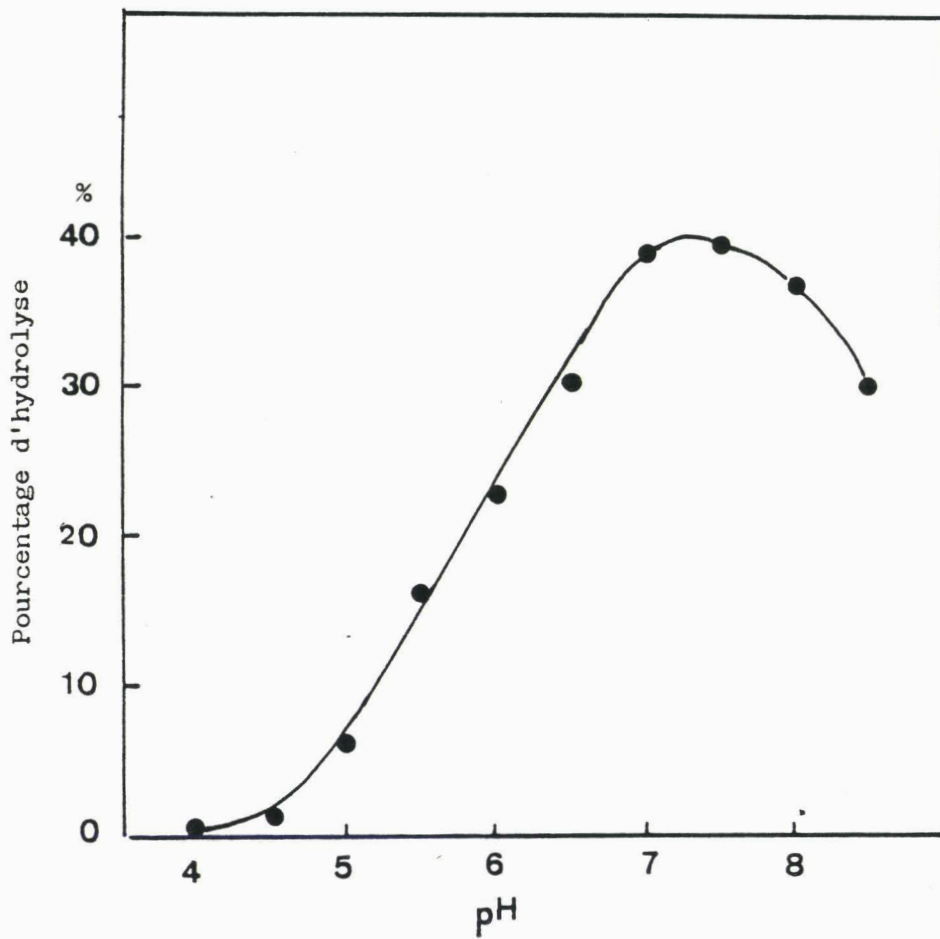


Fig. 30 : Influence du pH sur l'hydrolyse enzymatique des oligosaccharide-PP-Dol.

II - ETUDE DE DIFFERENTS PARAMETRES ENZYMATIQUES DE L'OLIGOSACCHARIDE-PYROPHOSPHYL-DOLICHOL PYROPHOSPHATASE DE LEVURE

A - INFLUENCE DU PH

1 - Sur l'activité enzymatique

Nous avons mesuré le pourcentage d'hydrolyse des oligosaccharide-PP-Dol obtenu en 1 h à 37°C par des membranes microsomales de levure solubilisées par du Triton X-100 à 0,1 % en présence de $MnCl_2$ 2mM à différentes valeurs de pH réalisées par un mélange acide citrique/Tris 50mM.

Les résultats présentés dans la figure 30 montrent que le maximum d'activité est obtenu entre 7,0 et 7,5. Cette valeur est plus compatible avec le contenu du réticulum endoplasmique qu'avec celui de la vacuole chez la levure.

Nous avons ensuite étudié l'influence de la nature chimique de différentes substances ayant un pouvoir tampon à pH 7,4 (pK de 6,1 à 8,3) sur l'activité enzymatique.

TABLEAU I.

Influence de la nature chimique de différentes substances tampon sur l'hydrolyse enzymatique des oligosaccharide-PP-Dol mesurée à pH 7,4.

Tampon	pK	% d'hydrolyse
HEPES (acide N-2-hydroxyethyl piperazine-N'-3-propane sulfonique)	7,5	48
Imidazole	7,0	49,5
Tris	8,3	50,5
MES [acide 2-(N-morpholino) ethane sulfonique]	6,15	51,5
Cacodylate (dimethylarsenate de sodium)	6,10	51,5
MOPS [acide 3-(N-morpholino) propane sulfonique]	7,2	55

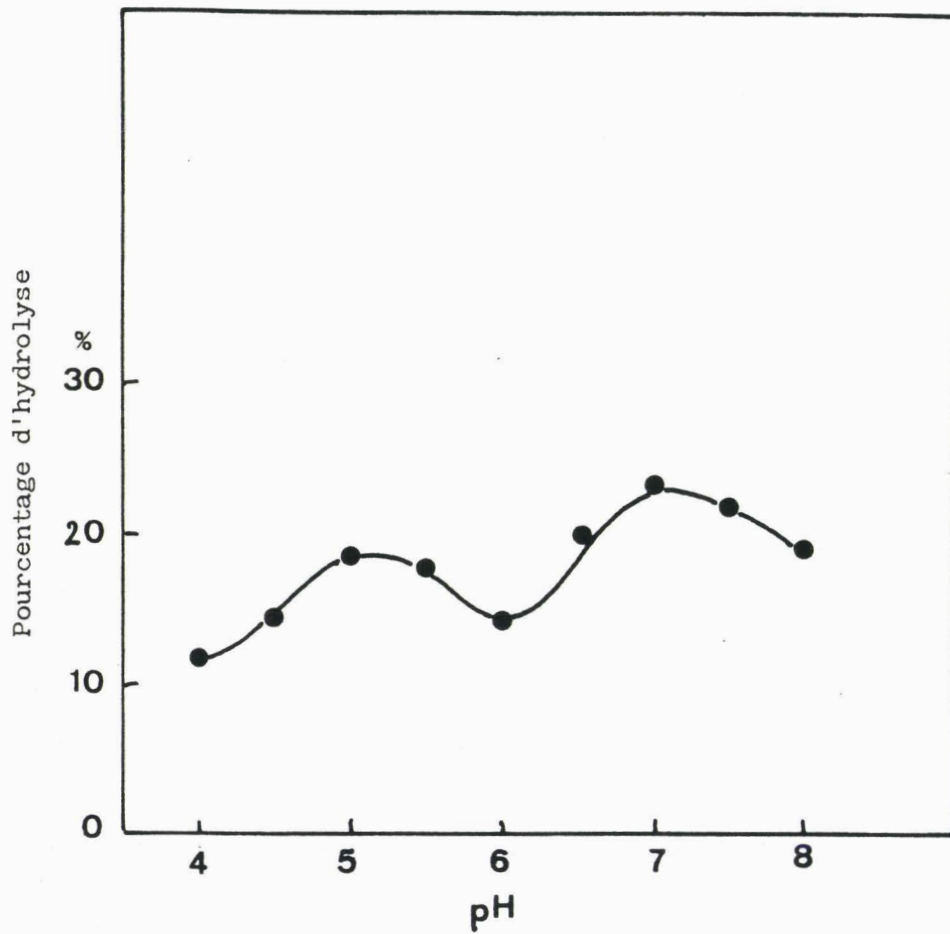


Fig. 31: Influence du pH sur la stabilité de l'enzyme

Les résultats obtenus et présentés dans le tableau I montrent qu'il n'y a pas de grandes différences entre les différents pourcentages d'hydrolyse. Nous avons préféré l'utilisation du Tris d'une part pour son effet inhibiteur de certaines α -mannosidases de levure (Jelinek-Kelly et Herscovics [354]), d'autre part le MOPS, qui semble plus efficace, présente un faible pouvoir détergent qui interfère avec le partage de phases du Triton X-114 (résultats personnels non présentés).

Les composés phosphatés, de par leur effet inhibiteur ou complexant des cations bivalents, ne sont pas utilisables dans la mesure de cette activité pyrophosphatasique (figure 5a et b, article 1).

Le temps de l'incubation à 37°C étant relativement long (1 h) dans l'essai standard pour obtenir un pourcentage d'hydrolyse nettement supérieur au "bruit de fond", il fallait donc tenir compte de la stabilité de l'enzyme en fonction du pH.

2 - Sur la stabilité de l'enzyme

Des membranes microsomales de levure ont été laissées pendant 1h à 20°C en présence des différents mélanges acide citrique/Tris 50 mM et de Triton X-100 à 0,5 %. Cette dernière condition est légèrement dénaturante, nous le verrons plus loin. Le pH est ensuite ramené à la valeur 7,4 pour tous les mélanges étudiés puis une solution d'oligosaccharide-PP-Dol est ensuite ajoutée et le mélange est ensuite incubé 1 h à 37°C.

Les résultats présentés dans la figure 31 montrent que l'activité mesurée est plus stable à des valeurs voisines de pH 7. La courbe présente un deuxième maximum à pH 5. Actuellement nous ne pouvons expliquer ce phénomène que par la présence d'enzymes vacuolaires. La purification de la protéine responsable de cette activité pyrophosphatasique permettra sans doute d'interpréter ces résultats.

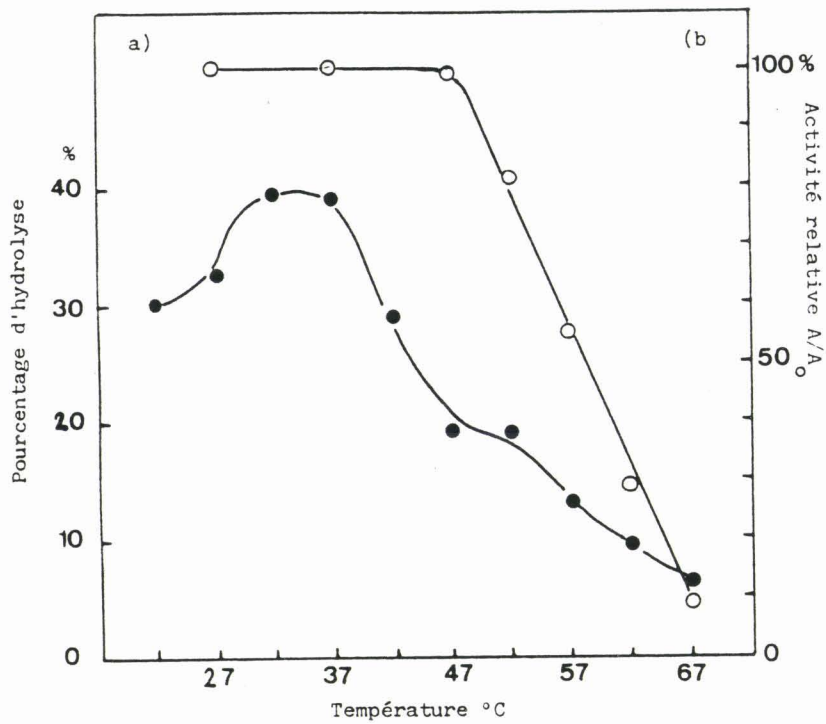


Fig. 32 : a) Influence de la température sur l'hydrolyse enzymatique des oligosaccharide-PP-Dol (-●-●-).
 b) Influence de la température sur la stabilité thermique après 10 min de chauffage à différentes températures puis mesure de l'activité résiduelle 1 h à 37°C (-○-○-)

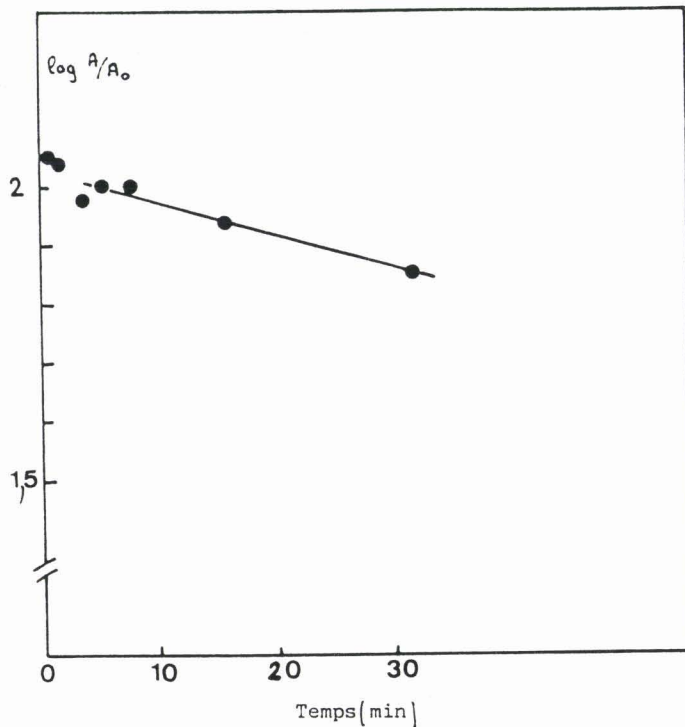


Fig. 33: Cinétique de dénaturation thermique à 62°C.
 L'activité résiduelle (A) est comparée à l'activité initiale (A₀), puis le logarithme du rapport A/A₀ est représenté en fonction du temps.

B - INFLUENCE DE LA TEMPERATURE

1 - Sur l'activité enzymatique

Des membranes microsomales de levures sont incubées 1 h à différentes températures en présence de tampon Tris.HCl 50 mM pH 7,4 de Triton X-100 à 0,1 % et d'oligosaccharide-PP-Dol.

Les résultats de la figure 32(a) montrent que la température optimale est située entre 30 et 40°C. La courbe présente un palier situé entre 47 et 52°C que l'on retrouve au cours des mêmes expériences effectuées avec des préparations membranaires différentes.

2 - Sur la stabilité de l'enzyme

Des membranes microsomales de levure soumises à des chocs thermiques de 10 min à différentes températures suivis d'un refroidissement rapide puis de la mesure de l'activité enzymatique résiduelle (A) comparée à l'activité initiale (A₀) montrent que l'enzyme est stable dans son environnement membranaire sans détergent jusqu'à une température maximale de 47°C. (Fig.32 b).

Une étude de cinétique de dénaturation thermique effectuée à 62°C suivie de la mesure de l'activité résiduelle met en évidence une nette stabilité de la préparation membranaire puisque le temps de demi-vie est de 1 heure à cette température (Fig.33).

3 - Sur le bilan des produits formés

En introduction des travaux personnels nous avons posé comme hypothèse l'existence d'un schéma (n°1) dans lequel il y aurait libération d'oligosaccharide-phosphates puis d'oligosaccharides neutres. On peut donc envisager que l'effet de la température puisse être différent vis-à-vis des deux enzymes impliqués.

La méthode au Triton X-114 de mesure du pourcentage d'hydrolyse des oligosaccharide-PP-Dol ne donne comme résultats que la somme des produits hydrosolubles formés. Nous avons donc effectué des hydrolyses de 1 heure à différentes températures, récupéré les phases aqueuses, éliminé le Triton X-114, puis enfin analysé les produits formés par chromatographie d'échange d'ions sur QAE-Sephadex A25.

Les résultats présentés dans le tableau II montrent que l'augmentation de la température modifie le rapport de la radioactivité liée aux oligosaccharides-phosphates (POS) sur la radioactivité liée aux oligosaccharides neutres (OS).

TABLEAU II.

Influence de la température sur la nature des produits formés lors de l'hydrolyse des oligosaccharides-PP-Dol par des membranes microsomales de levure.

Température(°C)	pourcentages relatifs	
	produits neutres (OS)	produits de charge-2 (POS)
35	12	88
47	32	68
52	50,5	49,5
62	45	55

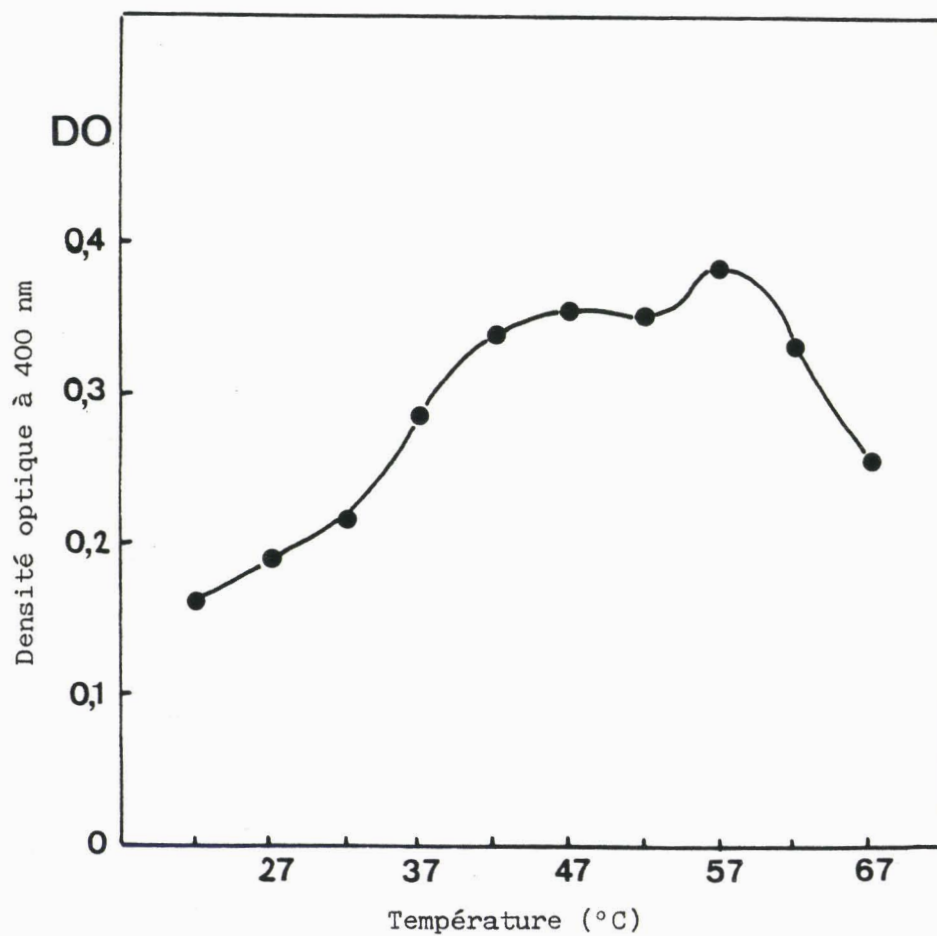


Fig. 34: Influence de la température sur l'hydrolyse du p-nitrophénylphosphate pendant 10 min à pH 8,8 par la phosphatase alcaline de levure.

Alors que l'hydrolyse globale des oligosaccharide-PP-Dol diminue avec l'augmentation de la température (Fig.32a), les résultats présentés dans le tableau II montre que celle-ci semble favoriser la formation des produits neutres de deux façons.

D'une part, dans le schéma n°1 les produits chargés n'auraient pas le temps de s'accumuler car ils seraient aussitôt hydrolysés par une phosphatase activée par la température.

Nous avons vérifié l'influence de la température sur l'activité phosphatasique des membranes microsomales de levure vis-à-vis d'un substrat synthétique le para-nitrophénylphosphate en présence de Triton X-100 à 0,2 %, de tampon Tris.HCl 50 mM pH 8,8 et de MgCl₂ 1mM. Les résultats présentés dans la figure 34 montrent qu'en effet la phosphatase de levure possédant une température optimale de 57°C pourrait dégrader rapidement les oligosaccharide-phosphates.

Parmi les deux phosphatases existantes dans la levure, phosphatase acide et phosphatase alcaline, il est peu vraisemblable que la phosphatase acide puisse être impliquée. En effet, il s'agit d'une protéine soluble sécrétée dans milieu extracellulaire, dont la biosynthèse est réprimée par le phosphate inorganique (50-80 μM)). Or les membranes microsomales de levure sont au cours de la préparation débarassées des protéines solubles, et les fermentations sont conduites à pH 4,5 en présence de phosphate 14,6 mM. De plus l'incubation des membranes avec les oligosaccharide-PP-Dol est conduite à pH 7,4, c'est une valeur assez éloignée de pH 3,8 qui est l'optimum pour la phosphatase acide.

L'action de la phosphatase alcaline est plus vraisemblable, en effet son pH optimum est 8,8 mais à pH 7,4 l'enzyme possède encore 50 % de son activité. C'est un enzyme qui tapisse la face interne des vacuoles, donc susceptible de se retrouver dans la préparation membranaire. En outre, sa biosynthèse n'est pas réprimée par le phosphate inorganique.

D'autre part, dans le schéma n° 2 seuls les produits neutres sont libérés. Mais si l'on envisage un troisième schéma en associant les deux premiers, c'est-à-dire deux réactions concurrentes de dégradation des oligosaccharide-PP-Dol: l'une donnant des produits neutres, l'autre donnant des produits chargés ; il est possible que l'une des deux activités soit plus sensible à la dénaturation thermique que l'autre. Cette hypothèse expliquerait bien des résultats comme nous allons le voir par la suite.

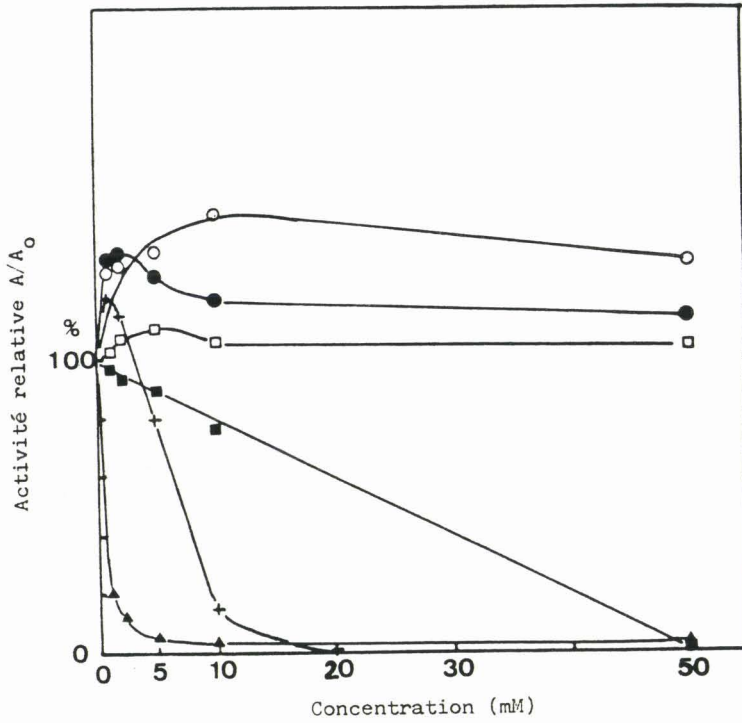


Fig. 35 : Influence de différents cations sur l'hydrolyse enzymatique d'oligosaccharide-PP-Dol par des membranes de levure en présence de CaCl_2 (o-o), MnCl_2 (•-•), MgCl_2 (□-□), ZnCl_2 (▲-▲), Mo^{2+} (+-+) et $\text{Mo}^{2+} + \text{CaCl}_2$ 10mM (-■-■-)

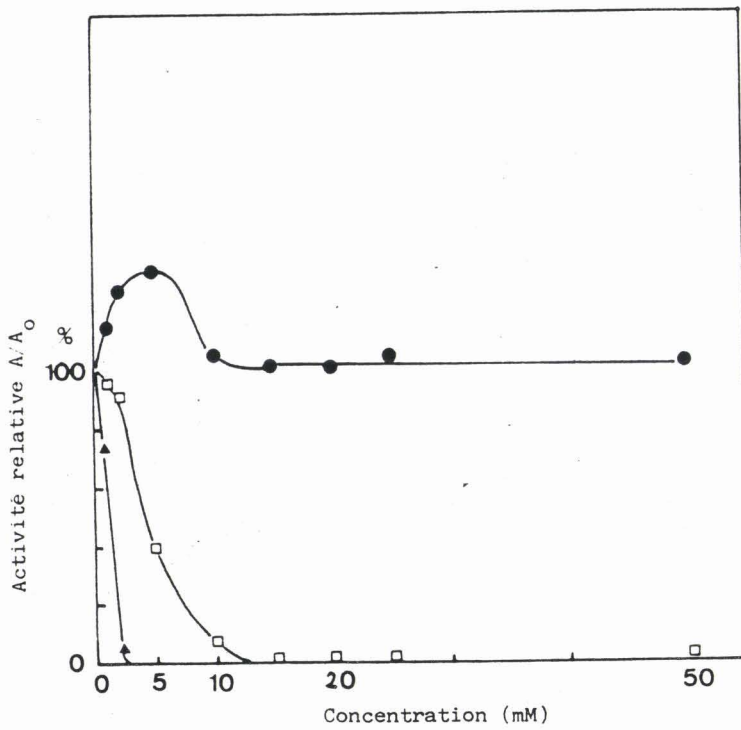


Fig. 36 : Influence de l'EDTA sur l'hydrolyse enzymatique d'oligosaccharide-PP-Dol - en présence de CaCl_2 20mM
 EDTA (Na_4) : -□-□- EDTA ($\text{Na}_2, \text{Mg}^{++}$) : -●-●-
 - en l'absence de CaCl_2 : -▲-▲-

C - INFLUENCE DE DIFFERENTS CATIONS

Wedgwood et Strominger [355] ont décrit une activité dolichol-pyrophosphatasique dans les lymphocytes humains qui ne demande pas de cations pour agir (ni Mg^{2+} , Mn^{2+} ou Ca^{2+}) et même qui est activée par l'EDTA 50 mM.

Scher et Waechter [356] ont également décrit cette activité dans le cerveau de Veau qui est faiblement inhibée par $MnCl_2$ et NaF 20 mM, inhibée plus fortement par $CaCl_2$ 20mM et, ce qui est troublant, cette activité est stimulée par l'ortho-, le pyro- et le metatriphosphate.

Nous avons donc étudié l'effet de divers cations sur la dégradation des oligosaccharide-PP-Dol par des membranes de levure.

Les résultats présentés dans la figure 35 montrent que le calcium est le meilleur activateur, alors que Mo^{2+} et Zn^{2+} sont inhibiteurs.

Selon Attias et Bonnet [357] Ca^{2+} et Zn^{2+} sont de puissants inhibiteurs de la phosphatase alcaline de levure.

L'activation par l'ion Ca^{2+} de la dégradation des oligosaccharide-PP-Dol semble indiquer que cette activité enzymatique est différente de la dolichol-pyrophosphatase de Wedgwood ou de Scher, de même elle est différente de la phosphatase alcaline.

Les courbes obtenues avec les ions Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} et Mo^{2+} passent par un optimum pour ensuite se stabiliser ; sauf en présence de l'ion Mo^{2+} pour lequel il apparaît ensuite un effet inhibiteur. Ce phénomène biphasique disparaît on ajoute du $CaCl_2$ 10 mM.

La molybdate de sodium, comme le vanadate de sodium, sont des inhibiteurs connus de l'ATPase. Le fait, que l'inhibition par l'ion Mo^{2+} de l'hydrolyse des oligosaccharide-PP-Dol soit plus faible en présence de l'ion Ca^{2+} , permet de penser que la fixation de l'ion Mo^{2+} n'est pas irréversible.

La présence de cations comme Ca^{2+} semble favoriser la réaction d'hydrolyse, vraisemblablement par formation d'un complexe avec la partie pyrophospho-diester du substrat. En effet, après une mise en présence des membranes avec de l'EDTA tétrasodique 10 mM à 0°C, puis addition de $CaCl_2$ 20 mM on retrouve l'activité initiale quelle que soit le temps de contact. Alors que l'EDTA (Na_4) ajouté dans le milieu de la réaction enzymatique provoque une inhibition de la réaction comme le montre la figure 36.

L'utilisation de complexon III, comme l'EDTA Na_2Mg , ne produit aucune inhibition, bien au contraire. Entre les concentrations 1 et 10 mM on observe une légère activation de la réaction.

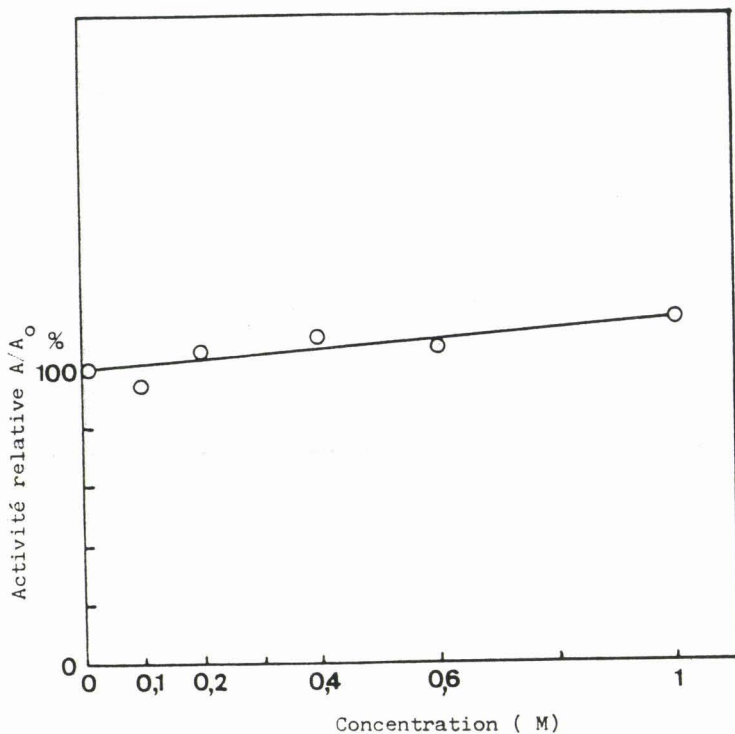


Fig. 37 : Influence du NaCl sur l'hydrolyse enzymatique d'oligosaccharide-PP-Dol en présence de CaCl₂ 10mM et de Triton X-100 à 0,05 %.

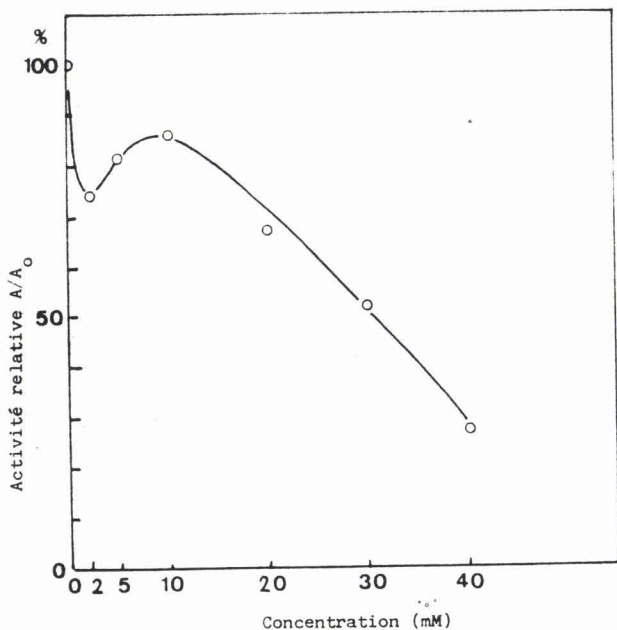


Fig. 38 : Inhibition par le fluorure de potassium de l'hydrolyse des oligosaccharide-PP-Dol par des membranes de levure.

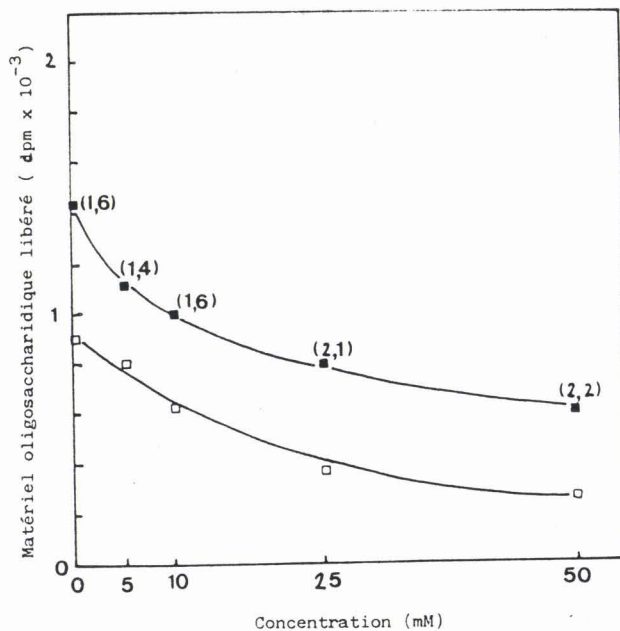


Fig. 39 : Effet de l'inhibition par le fluorure de potassium sur la nature du matériel oligosaccharidique libéré lors de l'hydrolyse des oligosaccharide-PP-Dol par des membranes de levure. Les chiffres entre parenthèses désignent le rapport de la radioactivité liée aux oligosaccharide-phosphates (-■-) sur la radioactivité liée aux oligosaccharides neutres (-□-).

D - INFLUENCE DE DIFFERENTS ANIONS

1 - Effet du chlorure de sodium

D'après Klingenberg *et al.* [358] le pouvoir de solubilisation d'un détergent augmente en fonction de la force ionique et selon Adair *et al.* [359] la cis-prényltransférase des membranes des cellules ascitiques d'Ehrlich a son activité augmentée de 40 % en présence de NaCl 0,4 M et de Triton X-100.

Aussi, utilisant des conditions expérimentales assez voisines (activité membranaire, substrat hydrophobe, détergent), nous nous sommes intéressés à l'influence de la force ionique sur l'hydrolyse des oligosaccharide-PP-Dol.

Dans cette expérience nous avons utilisé une concentration en Triton X-100 égale à 0,05 %, suffisamment forte pour permettre la solubilisation totale du substrat et suffisamment faible pour produire l'ouverture partielle des vésicules microsomales (voir chapitre IV).

Les résultats présentés dans la figure 37 montrent une légère corrélation entre l'augmentation de la force ionique et l'augmentation de l'activité hydrolytique.

On peut alors supposer que quelques interactions ioniques participent dans l'association de cette pyrophosphatase avec les membranes.

2 - Effet du fluorure de potassium

D'après Smirnova [360] le fluorure de potassium 1 mM inhibe à 80 % la pyrophosphatase inorganique de levure et selon Scher et Waechter [361] l'ion fluorure (20 mM) serait faiblement inhibiteur de la dolichol pyrophosphatase et fortement inhibiteur de la dolichol phosphatase.

La présence d'oligosaccharide-phosphates et d'oligosaccharides dans les produits de l'hydrolyse enzymatique des oligosaccharide-PP-Dol nous a incité à étudier l'effet de l'ion fluorure sur la réaction globale d'hydrolyse (Fig.38) et sur la nature des produits formés (Fig.39).

Comme Scher et Waechter nous trouvons 30 % environ d'inhibition par le fluorure de potassium 20 mM, mais l'analyse des produits formés par chromatographie d'échange d'ions montre que les oligosaccharides neutres (OS) ne disparaissent pas complètement

et que les composés chargés (POS) ne s'accumulent pas. Le rapport de la radioactivité liée aux POS sur la radioactivité liée aux OS passe de 1,6 (sans inhibiteur) à 2,2 (avec KF 50 mM).

Si la dégradation des oligosaccharide-PP-Dol se déroule selon une suite de réactions successives :



l'inhibition de la phosphatase provoquerait une accumulation d'oligosaccharide-P et inversement une disparition totale des produits neutres ; or ce n'est pas le cas. On peut donc penser que ce schéma est incorrect et que le schéma n° 2 envisagé comme hypothèse dans l'introduction, c'est-à-dire la libération directe d'oligosaccharides neutres, n'est pas exclus.

3 - Effet du phosphate et du pyrophosphate

Les résultats sont présentés dans la figure 5 (a et b) de l'article 1.

La nature des produits formés n'a pas été étudiée.

L'inhibition par le phosphate de sodium semble ne plus augmenter au delà de la concentration 10 mM, concentration correspondante à la teneur en CaCl_2 du milieu. On peut donc penser que l'inhibition mesurée est en fait la conséquence d'une complexation du calcium (nécessaire à l'activité enzymatique) par le phosphate.

En outre, d'après Attias et Bonnet [362] le phosphate est un inhibiteur compétitif ($K_i = 2,5$ mM) de la phosphatase alcaline de levure.

Si l'on suppose que l'action de la phosphatase sur les oligosaccharides phosphates est l'étape limitante dans la cascade des réactions du schéma n° 1, l'addition de phosphate 10 mM devrait provoquer 80 % d'inhibition apparente de l'hydrolyse globale des oligosaccharide-PP-Dol.

Nous utilisons la relation suivante :

$$i = \frac{I}{I + K_i \left(1 + \frac{S}{K_m}\right)}$$

i = pourcentage d'inhibition, I = concentration en inhibiteur, K_i = constante d'inhibition, S = concentration en oligosaccharide-phosphate et K_m = constante d'affinité. En négligeant S devant K_m (conditions expérimentales), on obtient $i = 0,8$.

Or on constate sur la figure 5a que pour une concentration 10 mM en phosphate on obtient seulement 35 % d'inhibition.

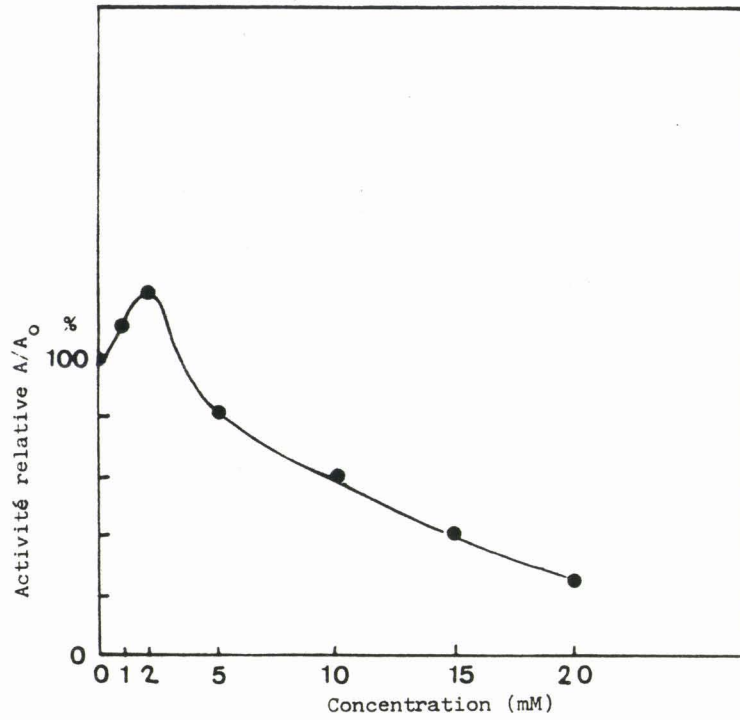


Fig. 40 : Inhibition par le méthylène diphosphate de l'hydrolyse des oligosaccharide-PP-Dol par des membranes de levure en présence d'une concentration constante (10mM) en CaCl₂

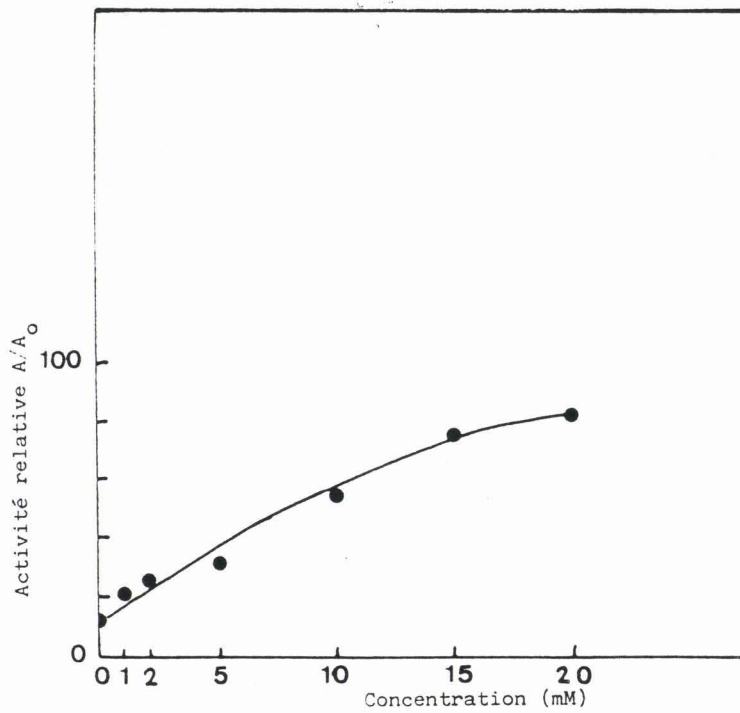
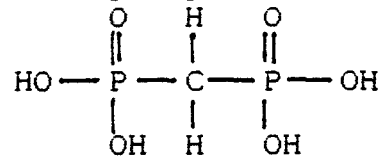


Fig. 41 : Reversion par CaCl₂ de l'inhibition par le méthylène diphosphate 10mM.

L'inhibition par le pyrophosphate est plus nette que celle obtenue avec le phosphate, en effet on obtient 85 % d'inhibition pour une concentration 10 mM. On peut alors supposer que le pyrophosphate, par son analogie de structure avec le substrat, est un inhibiteur spécifique de l'enzyme qui hydrolyse les oligosaccharide-PP-Dol.

4 - Effet du méthylène diphosphonate

Le 1,1-méthylène diphosphonate a la formule suivante :



C'est un analogue de structure du pyrophosphate dans lequel le groupement méthylène remplace l'atome d'oxygène qui lie les deux atomes de phosphore. Ce composé a un plus grand pouvoir de complexation des cations métalliques que le pyrophosphate.

Dans l'article de Wedgwood et Strominger [363] on note que seul le phosphate inorganique inhibe la dolichol phosphatase alors que le glucose-6-P, le mannose-1-P, l'AMP, l'ATP et le méthylène diphosphonate n'inhibent pas cette activité.

Selon Smirnova et al. [364] la pyrophosphatase de levure est faiblement inhibée par le méthylène diphosphonate ($K_i=1100 \mu\text{M}$) alors que le K_m pour le pyrophosphate de magnésium est égal à $0,9 \mu\text{M}$.

Etant donné que nous avons obtenu une inhibition assez forte de l'hydrolyse des oligosaccharide-PP-Dol par le pyrophosphate, nous nous sommes alors intéressés au méthylène diphosphonate.

Les expériences menées en présence de CaCl_2 10 mM montrent d'après la figure 40 que dans un premier temps les faibles concentrations en inhibiteur produisent une activation puis une inhibition au delà de 4 mM. Ce phénomène d'activation ne peut pour l'instant être expliqué. S'il s'agissait d'une activation allostérique dans laquelle le méthylène diphosphonate se fixerait sur l'enzyme au niveau des sites de fixation du substrat, il faudrait pour cela que la courbe obtenue dans l'étude de la vitesse en fonction de la concentration en substrat soit sigmoïdienne et qu'il soit possible de désensibilier l'enzyme, or ce n'est pas le cas.

Sachant que le méthylène diphosphonate a la propriété de complexer les cations métalliques, nous avons voulu savoir s'il était possible d'obtenir une réversion de l'inhibition par addition de CaCl_2 . Les résultats de la figure 41 montrent en effet que l'addition de calcium permet de réactiver l'enzyme qui a été inhibée au préalable par une concentration en méthylène

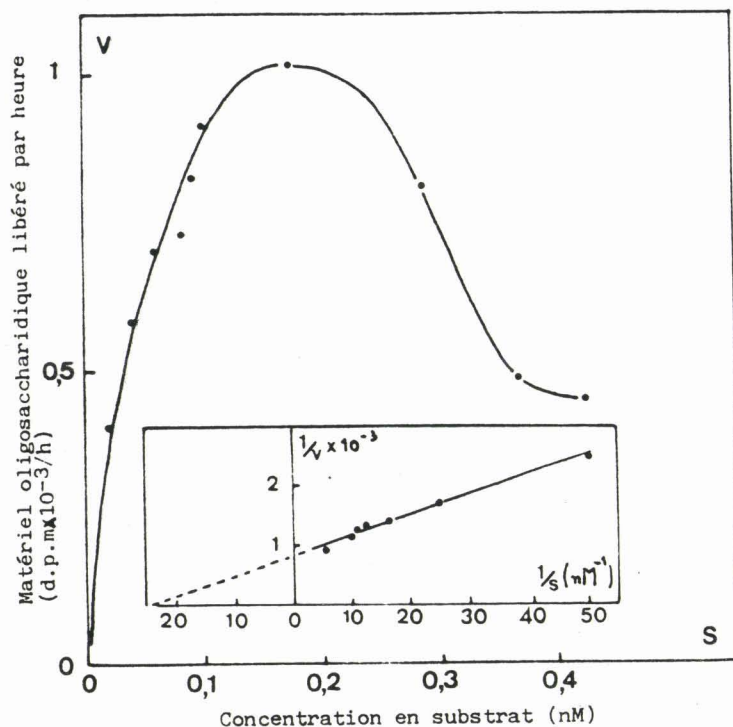


Fig. 42 : Influence de la concentration en $\text{Glc}_{0-3}\text{Man}_9\text{GlcNac}_2\text{-PP-Dol}$ sur la vitesse d'hydrolyse.

TABLEAU III :
VALEUR DE LA CONSTANCE D'AFFINITE DE L'OLIGOSACCHARIDYLTRANSFERASE
VIS A VIS DES INTERMEDIAIRES LIPIDIQUES

Origines	valeurs du Km apparent (μM)	Structure glycanique du substrat	Références
Oviducte de Poule	5	12 - 14 résidus	Das et Heath (365)
Levure	0,5	$\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNac}_2$ GlcNac_2	S harma et al. (366)
	1,2		
Thyroïde de Porc	0,55	$\text{Glc}_2\text{Man}_9\text{GlcNac}_2$	Franc et Bouchilloux (367)
Thyroïde de Veau	3,6	$\text{Glc}_{2-3}\text{Man}_9\text{GlcNac}_2$	Spiro et al. (368)
microsomes			
après purification	0,3 en présence de phosphatidylcholine		Chalifour et Spiro (369)

diphosphonate 10 mM. On retrouve pour le mélange CaCl_2 10 mM + méthylènediphosphonate 10 mM la même activité dans les figures 40 et 41.

E - ETUDE DE LA SPECIFICITE D'ACTION VIS A VIS DU SUBSTRAT

1 - Influence de la concentration en substrat

La préparation d'oligosaccharide-PP-Dol par incorporation *in vivo* de [2- ^3H]mannose (703 GBq/mmol, 19 Ci/mmol) dans des splénocytes de Souris en présence de castanospermine à 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nous a donné après analyse par hydrolyse acide douce et par HPLC un matériel de départ constitué de 53 % de population glucosylée, 34 % de population à 9 résidus de mannose et 13 % d'autres formes. Donc en estimant par excès le nombre de résidus de mannose radioactif par mole d'oligosaccharide-PP-Dol égal à 9, il est alors possible de calculer la concentration en substrat d'après la radioactivité totale de l'essai exprimée en d.p.m. et en tenant compte de la radioactivité spécifique du mannose de départ.

Les résultats obtenus et présentés dans la figure 42 montrent :

premièrement :

La vitesse maximale est obtenue par une concentration d'environ 0,17 nM en substrat et en prenant les valeurs de vitesse obtenues pour des concentrations inférieures à cette dernière on peut, à l'aide de la méthode graphique de Lineweaver et Burk estimer la valeur du K_m égale à $0,04 \pm 0,005$ nM.

Cette valeur de K_m semble très faible si on la compare avec celles de l'oligosaccharidyl transférase qui sont données dans le tableau III.

Cette différence pourrait être attribuée à un problème de dilution isotopique lors de l'incorporation *in vivo*. Si par exemple seuls 4 résidus de mannose sont marqués sur un total de 9, la valeur du K_m serait modifiée d'un facteur 2, alors qu'il faudrait un facteur compris entre 1 000 et 10 000 pour trouver une valeur comparable.

En outre, il est plus vraisemblable que tous les résidus de mannose sont marqués, puisque lors de ces incorporations *in vivo* on peut mettre en évidence des oligosaccharides radioactifs libérés de composition $\text{Man}_3\text{-}_4\text{GlcNAc}$.

deuxièmement

Dans la figure 42 on peut observer un abaissement de la vitesse alors que la concentration en substrat est augmentée.

Nous avons pensé dans un premier temps que le substrat provenant d'un extrait brut dans le mélange CMW pouvait contenir un "lipide complexe" inhibiteur de l'activité hydrolytique étudiée.

Ce phénomène n'est pas à exclure, puisqu'il a été constaté par Forsee et al. [370] et Chambers et al. [371] pour les mannosyltransférases de l'aorte de Porc Man-P-Dol dépendantes. Ainsi dès la concentration $1\mu\text{M}$ en Man-P-Dol pour un K_m égal à $0,2\mu\text{M}$ il se produit une inhibition que ces auteurs ont attribué à la présence de contaminants lipidiques dans l'extrait obtenu par le mélange chloroforme-méthanol.

Dans notre cas la purification des oligosaccharide-PP-Dol par chromatographie d'échange d'ions sur DEAE-cellulose suivie d'un désalage sur Sephadex LH20 n'a pas annulé ce phénomène.

Nous avons alors préparé un extrait concentré dans le mélange CMW à partir de 60 rates de Souris. Cet extrait non radioactif, ajouté en quantités croissantes dans un milieu d'incubation de membranes de levure en présence d'une concentration non "inhibitrice" d'oligosaccharide-PP-Dol radioactifs, inhibe à 50 % maximum l'hydrolyse du substrat marqué sans l'annuler complètement.

S'il nous fallait envisager une inhibition par un excès de substrat, comme celle constatée par Das et Heath [372] pour l'oligosaccharidyltransférase d'oviducte de Poule dès la concentration $10\mu\text{M}$ en oligosaccharide-PP-Dol, ce phénomène apparaîtrait très vite au vu des quantités infimes utilisées dans nos expérimentations.

2 - Spécificité vis-à-vis du glycanne

a) Etude de l'hydrolyse de GlcNAc₁₋₂-PP-Dol

Nous avons préparé des oligosaccharide-PP-Dol, dont les glycanes sont relativement "courts", par incorporation *in vitro* d'UDP-GlcNAc ($6\text{-}^3\text{H}$; $244,2\text{ GBq}/\text{mmole}$, $6,6\text{ Ci}/\text{mmole}$) dans des splénocytes perméabilisés au NH_4Cl $0,154\text{ M}$ selon la technique décrite par Cecchelli et al. [373]. Une partie de l'extrait obtenu à l'aide du mélange chloroforme/méthanol (2:1, V/V) a été traitée par hydrolyse acide douce (HCl 10mM , $10\text{ min } 100^\circ\text{C}$) puis le matériel oligosaccharidique libéré a été analysé par chromatographie HPLC. La composition est de 52 % GlcNAc et 48 % GlcNAc₂.

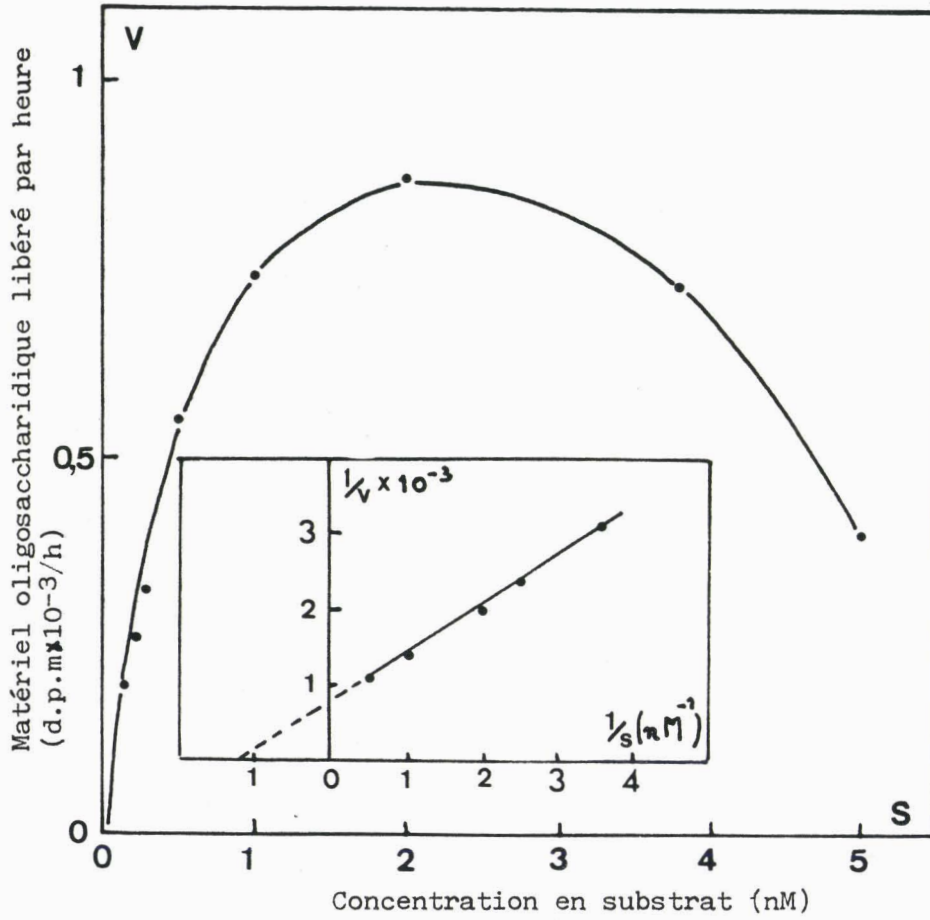


Fig. 43 : Influence de la concentration en GlcNAc₁₋₂-PP-Dol sur la vitesse d'hydrolyse.

L'influence de la concentration en substrat sur l'hydrolyse de ces oligosaccharide-PP-Dol par des membranes de levure donne les résultats présentés dans la figure 43.

D'une part il apparaît que l'affinité de l'enzyme pour ce type de structure est plus faible que pour les intermédiaires lipidiques contenant un oligosaccharide complet. En effet la valeur du K_m est nettement plus élevée : 0,83 nM comparée à 0,04 nM précédemment trouvée.

D'autre part on retrouve un phénomène d'inhibition apparente par un excès de substrat.

Nous avons voulu savoir si une purification plus poussée des oligosaccharide-PP-Dol permettrait de voir disparaître cette inhibition apparente par un excès de substrat.

Dans une première approche les oligosaccharide-PP-Dol ont été passés en solution dans du Triton X-100 à 0,05 % sur une colonne de concanavoline A immobilisée sur Sepharose. Nous retrouvons les mêmes résultats que Hsu et al. [374], c'est-à-dire 80 % des intermédiaires lipidiques sont retenus par la colonne, puis élués par une solution d' α -D-méthylglucoside 0,1 M. Ces oligosaccharide-PP-Dol débarassés de l'éluant précédent et utilisés dans une nouvelle étude de l'influence de la concentration en substrat redonnent le même phénomène d'inhibition.

Dans une deuxième approche nous avons tenté en vain de purifier les oligosaccharide-PP-Dol par HPLC sur colonne de Silice selon la technique décrite par Wells et al. [375] à l'aide du mélange éluant chloroforme/méthanol/ammoniaque.

Devant ces échecs nous envisageons de préparer *in vivo* des oligosaccharide-PP-Dol à l'aide de différentes souches cellulaires sauvages et mutantes de mammifères et de levure fournies, les unes par S. Krag, les autres par P. Robbins.

b) Etude de l'hydrolyse des oligosaccharide-PP-Dol en présence de concanavoline A

Nous avons alors voulu savoir si, en bloquant à l'aide de concanavoline A soluble la partie glycanique des intermédiaires lipidiques, l'hydrolyse de la liaison pyrophosphate par des membranes de levure pouvait toujours avoir lieu.

Auparavant nous avons vérifié que la présence de la concanavoline A n'interfère pas avec le coefficient de partage de phase au Triton X-114 des oligosaccharide-PP-Dol.

La manipulation s'est déroulée en deux temps :

premierement une préincubation à 20°C des oligosaccharide-PP-Dol avec la concanavoline A en présence de Triton X-100,

deuxièmement une incubation d'une heure à 37°C du mélange précédent en présence de membranes de levure.

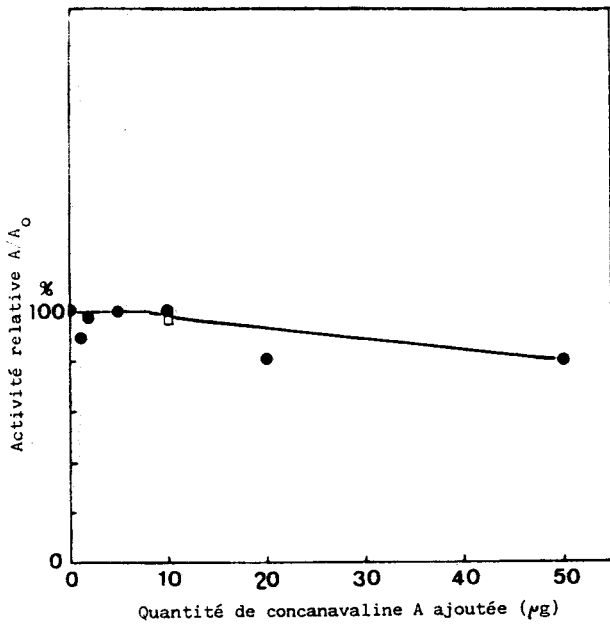


Fig. 44 : Influence de la ConA.
□ : Contrôle en présence de 10 µg de concanavaleine A et de 20 µg de mannanes de levure.

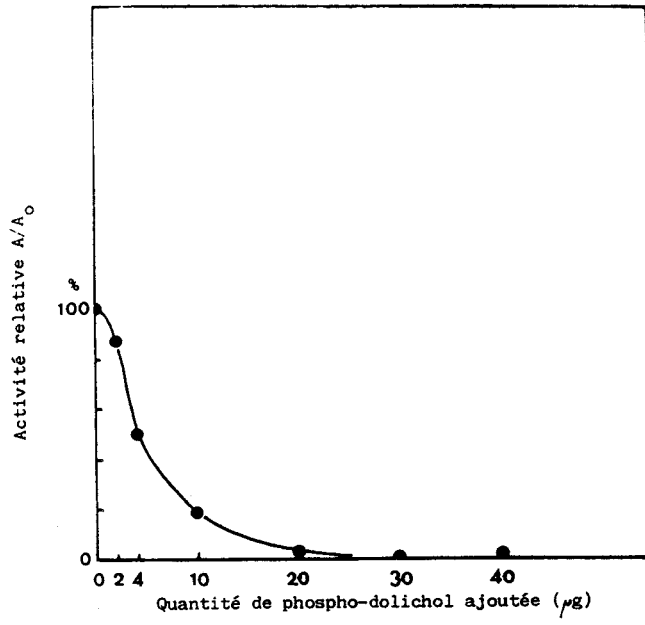


Fig. 45 : Retro-inhibition par le phospho-dolichol.

Les résultats présentés dans la figure 44 montrent que jusqu'à une concentration de 1 mg/ml de concanavoline A l'enzyme garde toute son activité. Un contrôle effectué en présence d'une quantité de mannanes de levure double par rapport à la concanavoline A donne approximativement la même activité que celle obtenue sans lectine. Etant donné que pour de plus fortes concentrations en lectine (5mg/ml) l'activité résiduelle est de 80 % on ne peut pas dire qu'il s'agit là d'un effet spécifique sans effectuer des contrôles en présence de mannanes à des concentrations correspondantes.

En outre, il est possible que quantitativement très peu de lectine réagisse avec les oligosaccharide-PP-Dol mis lors de l'incubation et qu'une grande part de la lectine se lie à des structures glycaniques endogènes présentes dans la préparation de membranes de levure et modifie l'activité de leurs enzymes.

Il n'en demeure pas moins vrai que si l'on suppose que l'association entre la lectine et les oligosaccharide-PP-Dol s'est produite lors de la préincubation celle-ci n'a pas empêché leur hydrolyse ; donc que la partie glycanique des intermédiaires lipidiques est peu reconnue par la pyrophosphatase, ce qui la rapproche de l'enzyme trouvé par Wedgwood et Stroninger.

3 - Spécificité vis-à-vis du dolichol

Ne disposant pas d'intermédiaires lipidiques identiques dans leur partie glycanique mais variant dans le nombre de résidus isoprènes, nous n'avons pas pu à proprement parler étudier la spécificité de la pyrophosphatase vis-à-vis de la partie dolichol.

Néanmoins si l'enzyme possède un site de reconnaissance de la partie dolichol on doit pouvoir mettre en évidence une rétro-inhibition par le phospho-dolichol.

A l'aide d'une solution stock de phospho-dolichol de foie de Porc à 2 mg/ml dans le mélange chloroforme/méthanol (2 : 1, V/V) nous avons préparé une gamme de tubes contenant entre 2 et 40 µg de phospho-dolichol, puis nous avons évaporé les solvants organiques et remis en solution les résidus dans du Triton X-100 à 0,05 % à l'aide d'ultrasons.

La mesure de l'hydrolyse des oligosaccharide-PP-Dol par les membranes de levure en présence de quantités croissantes en phospho-dolichol montre dans la figure 45 que l'enzyme est inhibé par ce phospho-lipide. Ce résultat apparaît intéressant dans la mesure où nous avons vu précédemment que les lipides complexes (en principe présents dans un extrait de rates de Souris par le mélange CMW) inhibent l'activité.

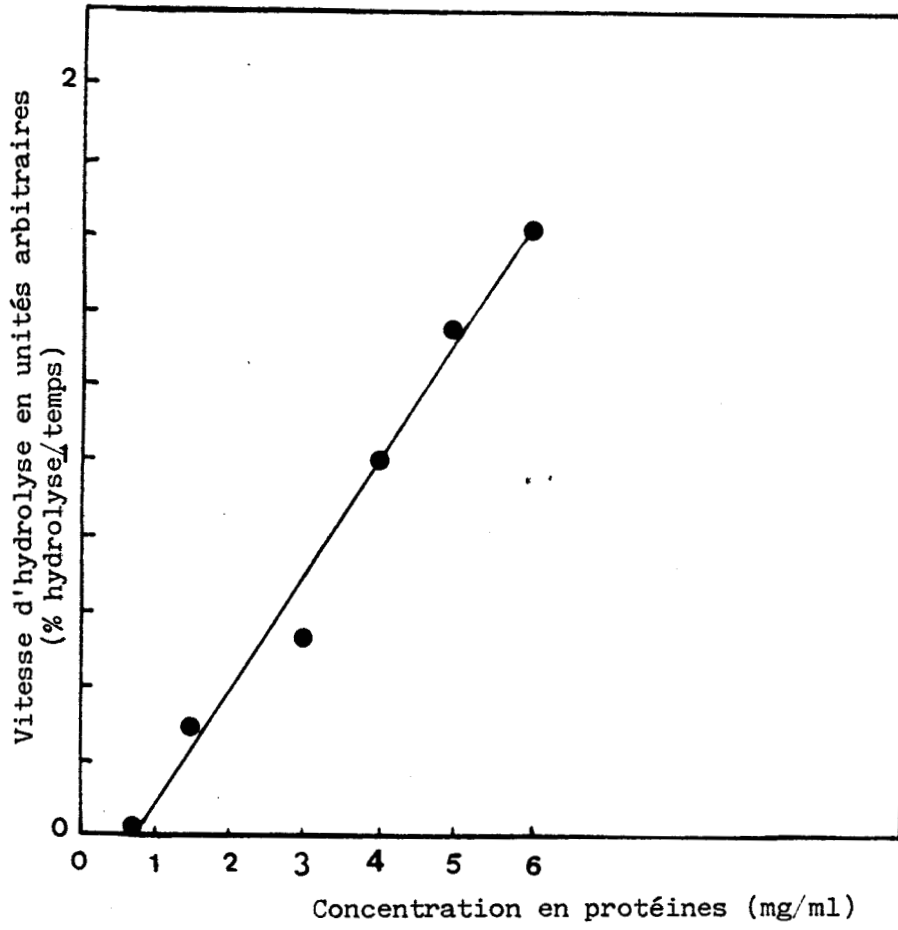


Fig. 46 : Influence de la concentration en enzyme.

III - ASPECTS MEMBRANAIRES DE L'OLIGOSACCHARIDE-PYROPHOSPHORYL-DOLICHOL PYROPHOSPHATASE

A - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN ENZYME SUR LA VITESSE D'HYDROLYSE DU SUBSTRAT

Cette étude semble *a priori* loin de l'aspect membranaire des enzymes. Alors qu'en général dans le graphe $v = f(E)$ des enzymes solubles la vitesse augmente dès l'origine avec les concentrations en enzyme les plus faibles ; il n'est pas rare dans le cas des enzymes membranaires de constater un phénomène de seuil. Ainsi Lehle [376] a pu constater pour la N-acétylglucosaminyl-1-phosphotransférase de levure un seuil de concentration en dessous duquel l'enzyme ne réagit pas, de même Keller et al. [377] à propos de la même enzyme dans l'oviducte de Poule, Chalifour et Spiro [378] pour l'oligosaccharidyl transférase de thyroïde de Boeuf et Ronin pour l'enzyme de Porc [200a].

Ce fait nous est apparu quand nous avons effectué nos premières tentatives de purification de la pyrophosphatase avec un protocole nécessitant une dilution préalable pour laquelle nous ne trouvions plus une activité en proportion avec la dilution.

Dans l'analyse des résultats présentés dans la figure 46 on voit qu'il existe un seuil d'environ 1 mg de protéines par ml. Pour savoir s'il s'agit d'un problème de dénaturation par dilution nous avons essayé en vain de contrecarrer ce phénomène à l'aide d'une solution de glycérol à 10% , de tréhalose 1M ou en maintenant constante la teneur en protéines dans le milieu à l'aide de serum albumine bovine.

Il serait important pour l'avenir de résoudre ce problème si nous voulons purifier l'enzyme.

B - EFFET DE LA CONCENTRATION ET DE LA NATURE DES DETERGENTS SUR L'ACTIVITE PYROPHOSPHATASIQUE DES MEMBRANES DE LEVURE

La dispersion de l'accepteur lipidique et des enzymes provenant des membranes de levure dans le milieu d'incubation nécessite la présence d'un détergent.

La courbe d'activité de la pyrophosphatase en fonction de la concentration en Triton X-100 (figure 6a, article 1) passe par un maximum relativement large situé entre 0,2 et 0,4 % (V/V) où l'activité latente ($\frac{\text{activité totale} - \text{activité libre}}{\text{activité totale}}$) est de 99,1% .

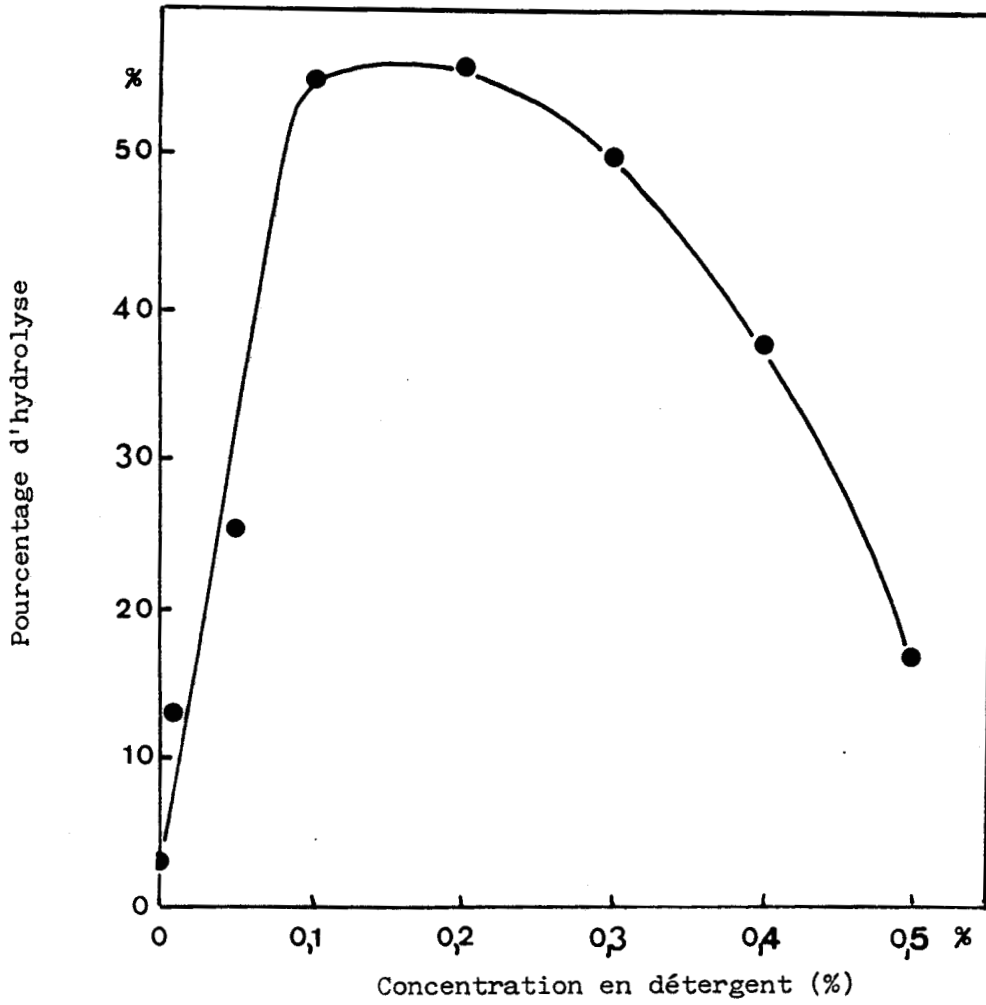


Fig. 47 : Influence de la concentration en Nonidet-P40

Ce résultat semble indiquer que cette pyrophosphatase est solidement attachée aux membranes microsomales de levure.

La perte d'activité observée aux concentrations en Triton X-100 supérieures à 0,4 % pouvant résulter de la dénaturation de l'enzyme, nous avons examiné la cinétique d'hydrolyse en présence d'une concentration en détergent égale à 1 % à diverses températures.

Nous avons pu constater qu'à cette concentration l'enzyme est rapidement dénaturé à 40°C, alors que nous avons vu précédemment qu'une suspension de membranes microsomales de levure est relativement stable jusqu'à 47°C.

En outre, à 10°C la vitesse est plus faible mais l'enzyme reste actif plus longtemps. Ce résultat montre que la dénaturation observée à 37°C en présence de concentrations en détergent supérieures à 0,4 % peut être attribuée au détergent lui-même.

La courbe d'activité de la pyrophosphatase en fonction de la concentration en Triton X-114 (figure 6b, article 1) donne un optimum légèrement déplacé vers de plus fortes valeurs de concentration en détergent (1 %), alors que la courbe obtenue avec le Nonidet P-40 donne un optimum entre 0,1 et 0,2% (Fig.46).

D'autres détergents, neutres comme l'octylglucoside ou ioniques comme le désoxycholate, le CHAPS, le SDS ou le CTAB sont soit peu efficaces soit nettement dénaturants ; ce qui exclut leur utilisation. selon Sharma et al.[379] le désoxycholate et l'octylglucoside inhibent fortement l'oligosaccharidyl transférase de levure.

C - TOPOLOGIE MEMBRANAIRE DE L'OLIGOSACCHARIDE-PYROPHOSPHORYL-DOLICHOL PYROPHOSPHATASE

Lors des incorporations *in vivo* de mannose radioactif la plus grande part du matériel oligosaccharidique soluble est toujours située à l'intérieur des vésicules membranaires là où se déroule la synthèse des intermédiaires lipidiques du cycle des dolichols. Ceci nous amène à croire que l'activité pyrophosphatasique est localisée au niveau des membranes du réticulum endoplasmique, et cela d'autant plus que nous n'avons jamais retrouvé cette activité dans le cytosol après fractionnement cellulaire.

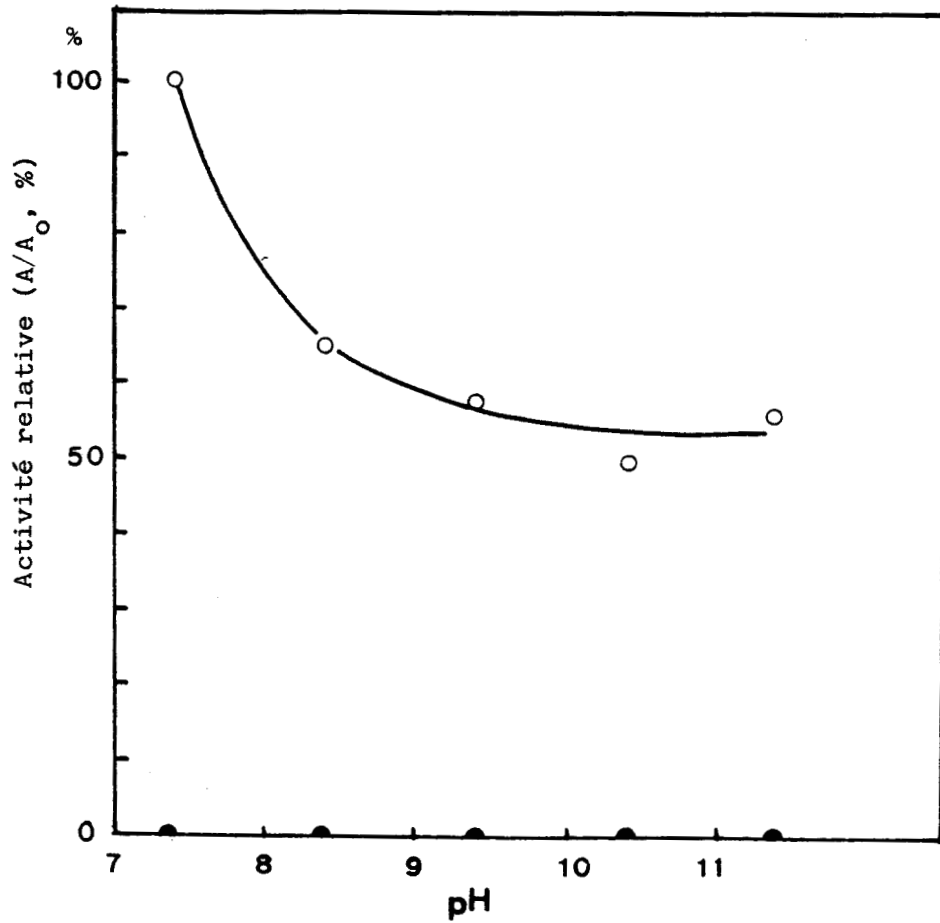
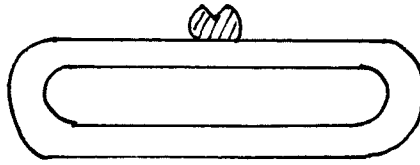
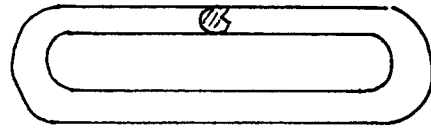


Fig. 48 : Activités résiduelles de membranes microsomales de levure après traitements alcalins.
(O-O) Coloris membranaires
(●-●) Surnageants

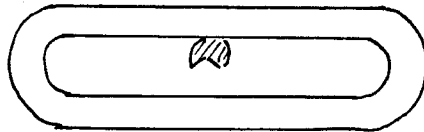
Il apparaît alors quatre types de localisation membranaire :



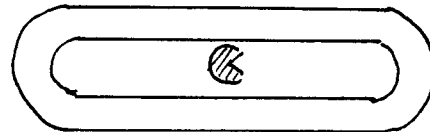
Type A : l'enzyme tapisse la face cytoplasmique



Type B : l'enzyme est intégré dans la membrane



Type C : l'enzyme tapisse la face luminale



Type D : l'enzyme est libre dans la lumière

D'une part le fait qu'il faille une concentration en Triton X-100 d'environ 0,2 % nettement supérieure aux 0,05 % seulement nécessaires pour solubiliser le substrat *in vitro* permet d'éliminer le type A de localisation.

D'autre part, nous avons utilisé la technique des "open sheets" décrite par Fujiki *et al.* [380]. En diluant des organelles (50 à 1000 fois) dans du carbonate de sodium 100 mM (pH 11,5) pendant 30 min à 0°C puis en effectuant une centrifugation à 230 000 g et un lavage du culot par de l'eau distillée à 0°C, on convertit les vésicules fermées en morceaux de membrane ouverts et le contenu des vésicules ainsi que les protéines membranaires périphériques des deux faces sont éliminés.

Les traitements d'une suspension de membranes microsomales de levure dans des solutions tampons de pH croissants suivis de lavages à l'eau distillée et d'une centrifugation montrent que l'activité enzymatique reste associée au culot (Fig. 48). On peut donc éliminer les hypothèses de localisation selon les types C et D.

D'autant plus qu'il est encore nécessaire d'utiliser du Triton X-100 à 0,10-0,15 % pour obtenir un maximum d'activité pyrophosphatase. L'activité latente passe de 99,1 % pour les vésicules fermées à 44 % pour les vésicules ouvertes.

Il faut donc envisager que la pyrophosphatase est localisée selon le type B, c'est-à-dire plus ou moins "enfouie" dans l'épaisseur de la membrane.

TABLEAU IV :

Sensibilité à la trypsine de l'enzyme responsable de la dégradation des oligosaccharide -PP-Dol

Pourcentages d'hydrolyse obtenus en 1 heure à 37°C par des culots de membranes microsomales de levure en présence de :

	Triton X-100 0,025 %	Triton X-100 0,1 %
Microsomes intacts	1,15	48,5
Microsomes intacts après 30 min à 0°C	3,25	46
Microsomes ouverts ("open sheets")	1,63	28,8
Microsomes intacts pré- traités par la trypsine à pH 7,4	0,47	26,16
Microsomes intacts pré- traités par Trypsine à pH 8,5	0	19,68
Microsomes ouverts pré- traités par trypsine à pH 7,4	0	7,63
Microsomes ouverts pré- traités par trypsine à pH 8,5	0	0

Les microsomes intacts sont en suspension dans du Tris.Cl 100mM pH 7,4 + tréhalose 1M. Les microsomes ouverts ("open sheets") sont obtenus par action de Co_3Na_2 0,1M pH 11,4 30 min à 0°C puis relavés dans le tréhalose 1M à pH 7,4.

Le traitement à la trypsine 1 mg/ml 1 heure à 20°C est suivi d'un lavage par un mélange antiprotéasique (PMSF 0,1 mM + ovomucoïde 1 mg/ml + aprotinine 1 mg/ml) contenant du tréhalose 1 M à pH 7,4 +

Membranes microsomales de levure (5mg de protéines) en suspension dans 1 ml Tris. Cl 100mM pH7,4 contenant du NaCl 0,154M et du Triton X-114 à 0,5 % (V/V).

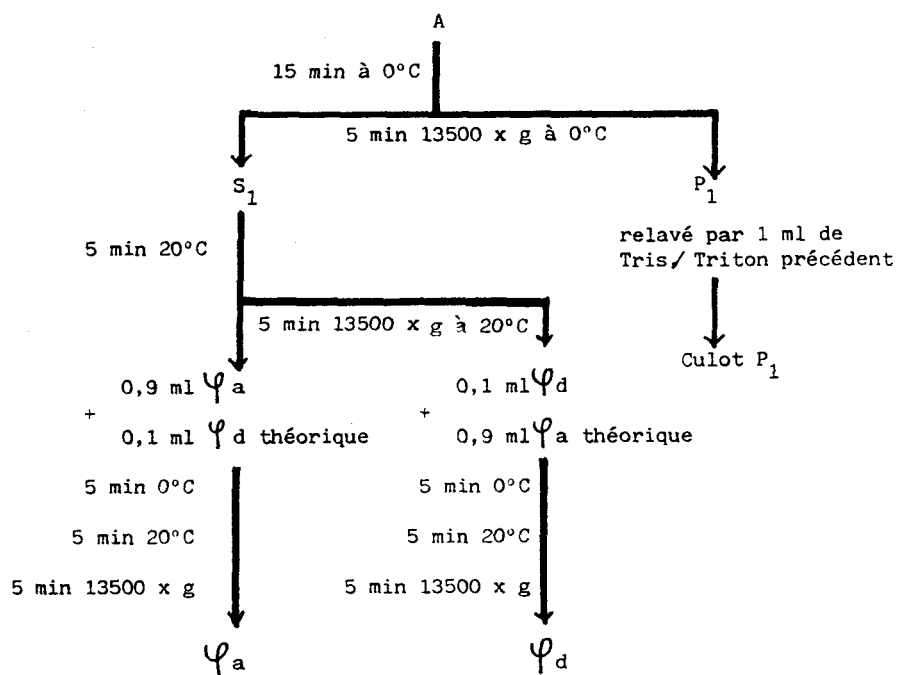


TABLEAU V :

Activité hydrolytique des différentes fractions obtenues

Fractions	Hydrolyse des oligosaccharides-PP-Dol (%)	Activités relatives (%)
Suspension initiale : A	41	100
Culot : P ₁	2	5
Surnageant : S ₁	41	100
Phase aqueuse : Ψ _a	22	55
Phase "détergente" : Ψ _d	4	10

L'attaque trypsique des vésicules ouvertes va montrer que l'enzyme est partiellement intégré dans la membrane. En effet, une étude préalable a montré que des vésicules fermées contiennent encore 70,6 % de leur activité initiale alors que des vésicules solubilisées par du Triton X-100 à 1 % et traitées à la trypsine ne possèdent plus que 1,3 % de l'activité initiale.

Ainsi dans les résultats présentés dans le tableau IV on peut constater que le traitement alcalin des vésicules membranaires produit une perte de 40 % de l'activité initiale. Malgré cette dénaturation l'activité résiduelle nécessite d'utiliser pour la mettre en évidence une concentration en détergent 4 fois plus importante que celle requise pour solubiliser le substrat. Ce fait semble indiquer que l'enzyme est plus ou moins enfoui dans la membrane. En outre il apparaît que le traitement de microsomes intacts par la trypsine, à 1mg/ml pendant 1 heure à 20°C à pH 7,4 ou à pH 8,5 provoque des pertes d'activité respectives de 44 % et 58 % . Ce résultat correspond vraisemblablement à une perméabilisation des membranes par la trypsine comme l'ont signalé Feldman *et al.* [381] et Hanover et Lennarz [382] à propos de la Man-P-Dol synthétase.

Il apparaît qu'après ouverture des membranes l'activité résiduelle après attaque trypsique à pH 7,4 est de 7,63 % et à pH 8,5 elle devient nulle ; or si l'on tient compte d'une perte de 40 % due au traitement alcalin et d'une perte de 44 % par perméabilisation trypsique à pH 7,4 on devrait obtenir 15,45 % d'hydrolyse et 11,6 % d'hydrolyse à pH 8,5. Etant donné que les pourcentages d'hydrolyse obtenus sont inférieurs à ces dernières valeurs, on peut alors supposer qu'après ouverture des membranes par le carbonate de sodium la trypsine a pu agir sur l'enzyme et donc que ce dernier est situé sur la face lumineuse des membranes microsomaux de levure.

D - ETUDE DE LA BALANCE HYDROPHILE/HYDROPHOBE DE L'OLIGOSACCHARIDE-PYROPHOSPHORYL-DOLICHOL PYROPHOSPHATASE

1 - Fractionnement séquentiel au Triton X-114

Dans un premier essai (voir schéma ci-contre) nous avons traité des membranes microsomaux de levure par une solution de TrisHCl 100 mM pH 7,4 contenant du Triton X-114 à 0,5 % avec un rapport détergent/protéine (P/P) égal à 1. Après 15 min à 0°C cette solution trouble a été clarifiée par centrifugation 5 min à 13500 Xg à 0°C et donne un surnageant clair (S₁) et un précipité blanc (P₁).

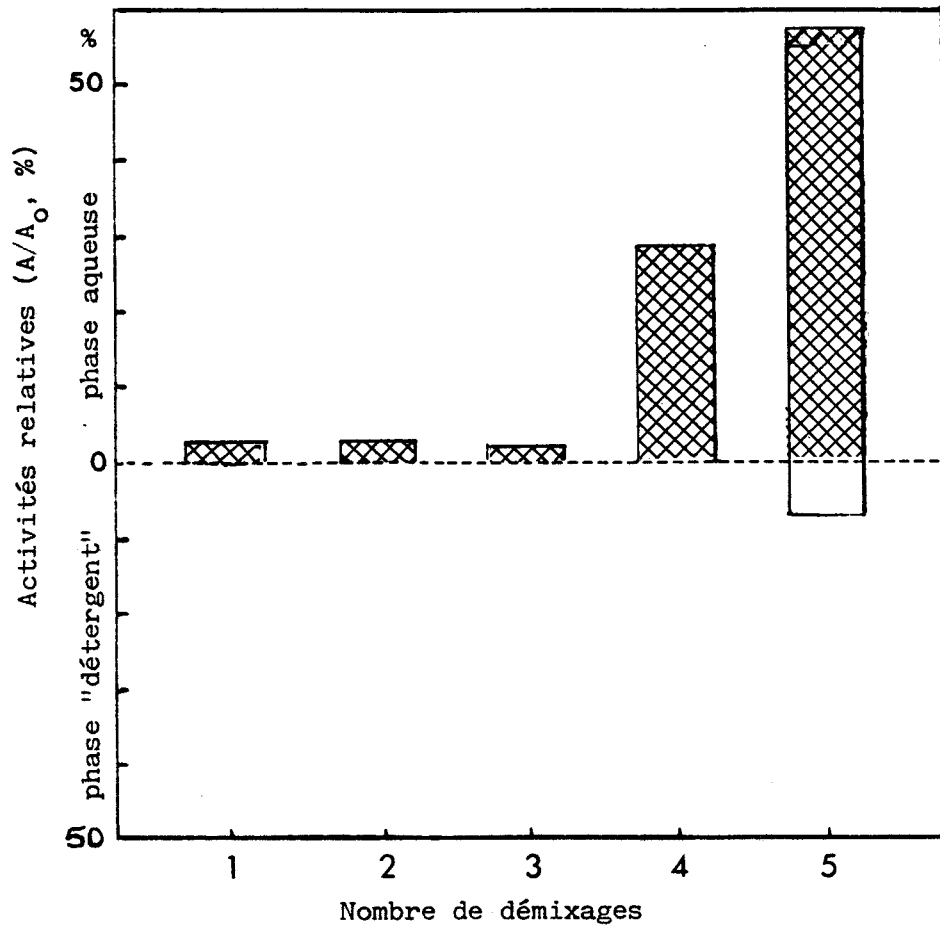


Fig. 49 : Distribution de l'activité enzymatique après chromatographie de partage de phases à contre-courant en présence de Triton X-114.

Le surnageant est ensuite laissé 5 min à 20°C pour permettre le démixage du détergent puis à nouveau centrifugé. On sépare la phase aqueuse supérieure de la phase "détergente" inférieure obtenue. La phase aqueuse et la phase "détergente" sont resuspendues et diluées à froid par des volumes complémentaires de phase "détergente" et phase aqueuse théoriques obtenus par des manipulations à "blanc" sans membrane.

Les différentes fractions obtenues sont analysées au point de vue activité hydrolytique des oligosaccharide-PP-Dol.

Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau V.

On constate que l'activité se retrouve finalement à 55 % dans la phase aqueuse. Ceci semble indiquer que l'activité mesurée serait portée par une (ou des) protéine(s) hydrophile(s).

D'autres expériences effectuées avec une concentration initiale en Triton X-114 plus élevée (2 %, V/V) et en provoquant le démixage à 37°C au lieu de 20°C ont révélé une dénaturation plus importante sans doute provoquée par l'effet combiné du détergent et de la température.

2 - chromatographie de partage de phases à contre-courant

Le principe est simple : on prépare autant de phases aqueuses théoriques et de phases "détergentes" théoriques que de transfert que l'on veut effectuer. L'échantillon est préparé dans le tube de départ et après un premier démixage la phase aqueuse supérieure est transférée dans un tube contenant une phase "détergente" théorique, tandis que la phase "détergente" restant au fond du premier tube reçoit un volume de phase aqueuse théorique identique à celle que l'on vient de retirer.

Les conditions expérimentales sont les mêmes que dans l'expérience précédente et les résultats obtenus sont présentés dans la figure 49 .

Il apparaît dans cette expérience que l'activité enzymatique suit la migration de la phase aqueuse supérieure. Les 7 % d'enzyme dans la phase "détergente" étant situés dans le dernier tube obtenu après 5 démixages, et non dans le premier tube, semble indiquer qu'il n'y a pas deux formes d'enzyme (hydrophile et hydrophobe) mais que ces 7 % peuvent être dus à une contamination de matériel. En effet, il est très difficile d'aspirer complètement la phase aqueuse surnageante et nous n'avons pas trouvé (pour l'instant) de solution de densité intermédiaire entre les deux phases pouvant servir de "tampon" séparateur.

D'autres tentatives ont été effectuées pour améliorer cette chromatographie mais nous avons constaté qu'en augmentant la concentration en Triton X-114 nous augmentions également la dénaturation et de plus la répartition de l'activité enzymatique entre la phase aqueuse et la phase "détergente" était légèrement modifiée, la phase aqueuse restant malgré tout prédominante.

En conclusion, cette manipulation est en accord avec un caractère hydrophile de l'activité enzymatique responsable de l'hydrolyse des oligosaccharide-PP-Dol.

CHAPITRE III :

DESTINEES DU MATERIEL OLIGOSACCHARIDIQUE LIBERE

DE LA LEVURE AU SPLENOCYTE

Dans le premier article, nous avons mis en évidence que la dégradation par les membranes microsomales de levure libère un matériel oligosaccharidique :

. dans la phase aqueuse obtenue au cours de l'extraction des intermédiaires lipidiques, ce qui confirme les résultats obtenus par Cacan et al. [383,384] sur des splénocytes de Rat et de Souris,

. ainsi que dans la phase aqueuse obtenue lors du partage de phase au Triton X-114 après hydrolyse *in vitro* d'oligosaccharide-PP-Dol.

L'hydrolyse de la liaison pyrophosphate représente peut-être la première étape dans le catabolisme des intermédiaires lipidiques. L'étape suivante serait soit la déphosphorylation soit la déglucosylation. Les oligomannosides obtenus seraient ensuite dégradés jusqu'à $\text{Man}_3\text{GlcNAc}$ et suivraient une "route" subcellulaire encore méconnue.

I - ETUDE DE L'HYDROLYSE *IN VITRO* DE PHOSPHO-OLIGOSACCHARIDES PAR DES MEMBRANES DE LEVURE

Nous voulions savoir si les oligosaccharides neutres obtenus lors de l'hydrolyse *in vitro* d'oligosaccharide-PP-Dol par des membranes de levure (voir figure 2 b, article 1) peuvent provenir de l'action d'une phosphatase ou d'une endo- β -N-acétylglucosaminidase sur les phospho-oligosaccharides libérés.

Pour cela nous avons préparé des phospho-oligosaccharides par hydrolyse alcaline douce des oligosaccharide-PP-Dol de composition glucidique connue. Ces phospho-oligosaccharides ont été purifiés par chromatographie d'échange d'ions sur QAE-Sephedex A25 puis mis en présence de membranes microsomales de levure, cacodylate 20mM et Tris 60mM pH 7,4, CaCl_2 4mM et Triton X-100 à 0,2 % .

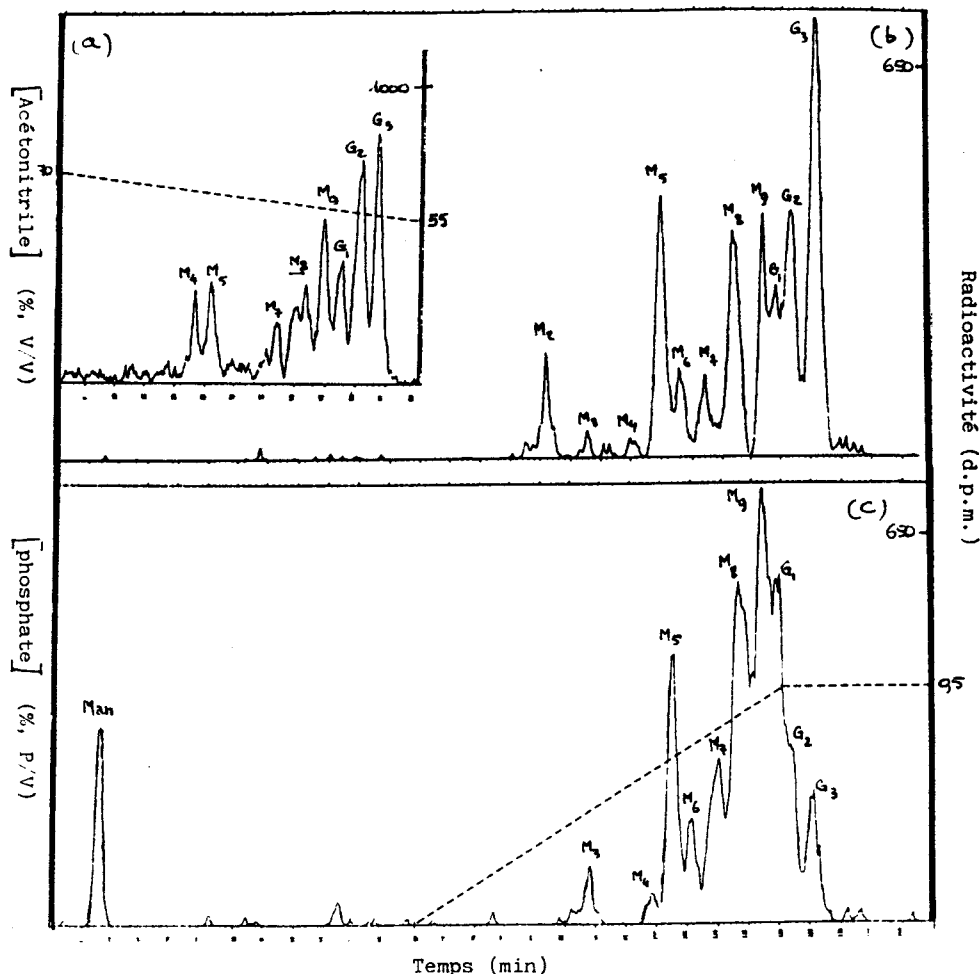


Fig. 50 : Analyse par H.P.L.C. des oligosaccharides marqués.

L'hydrolyse acide douce des oligosaccharide-PP-Dol libère des oligosaccharides neutres (a) et l'hydrolyse des oligosaccharide-phosphates par les membranes de levure après 5 min (b) et après 8 heures (c) libère des oligosaccharides chargés négativement ainsi que du mannose libre.

M₂, M₃, M₄, M₅, M₆, M₇, M₈, M₉ indiquent les oligomannosides ayant un nombre de résidus de mannose compris entre 2 et 9.
G₁, G₂, G₃ indiquent les oligomannosides ayant un nombre de résidus de glucose compris entre 1 et 3.

TABLEAU V1 :

Cinétique d'hydrolyse d'oligosaccharide-phosphates par des membranes de levure. Les résultats sont exprimés en % relatifs de la radioactivité liée à chaque espèce d'oligosaccharide.

Temps	Oligosaccharide-phosphates (Glc _x Man _y GlcNAc ₂ -P)									Man
	G ₃	G ₂	G ₁	M ₉	M ₈	M ₇	M ₆	M ₅	M ₄₊₃₊₂	
5 min	20,9	12,2	5,6	8	12,8	4	5	19	12,5	0
30 min	15,4	8,7	7,7	11,7	9,8	4,1	4,3	14,4	15,4	8,5
1 heure	7,4	7	11,9	11,2	12,3	5,6	4,4	13	7	19,6
4 heures	7	5,2	11,5	11,7	12,2	5,3	4,3	12	5,3	25,5
8 heures	0,8	2,5	12,4	14,4	13,2	7	3,7	11,4	4,9	29,7

Des prélèvements ont été effectués à différents temps, débarassés du détergent, puis désalés par chromatographie sur gel de Sephadex G25 et enfin analysés par HPLC (voir appendice technique).

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau VI et dans la figure 50; où figurent les diagrammes d'éluion: (a) des oligosaccharides des oligosaccharide-PP-Dol qui ont servi à préparer les substrats, (b) et (c) des produits obtenus après 5 min et 8 heures d'hydrolyse.

Le matériel neutre est élué en premier (voir profil des oligosaccharides obtenus par hydrolyse acide douce des oligosaccharide-PP-Dol), tandis que le matériel chargé est élué par un gradient de force ionique (voir profil des oligosaccharide-phosphates après 5 min d'hydrolyse).

Ces résultats montrent qu'à part le mannose libre aucun oligosaccharide neutre n'est libéré même après 8 heures d'hydrolyse. Ceci semble indiquer deux faits importants :

- le premier est la "non-hydrolyse" des oligosaccharides phosphatés par la phosphatase de levure, alors que celle-ci est présente dans la préparation membranaire et agit sur un substrat de synthèse chimique (le para-nitro-phénylphosphate, voir chapitre III)

- le second est l'absence de coupure de la liaison osidique comprise entre les deux résidus de N-acétyl-glucosamine.

Ce deuxième point confirme que la levure est le bon modèle, puisqu'aucune activité endo- β -N-acétyl-glucosaminidase ne semble présente dans la fraction microsomale.

L'analyse de la composition en oligosaccharide-phosphate, dont les valeurs sont données dans le tableau VI, montre que les formes G₃ et G₂ disparaissent au profit de la forme G₁ qui s'accumule.

On remarque que la somme des formes G₃ et G₂ disparues (-29,8 %) n'est pas équivalente à la quantité de forme G₁ accumulée (+ 6,8 %). On peut donc penser que des α -glucosidases hydrolysent rapidement les formes G₃ et G₂ et plus lentement la forme G₁.

Kilker *et al.* [385] et Saunier *et al.* [386] ont décrit dans la levure deux glucosidases :

- une α 1-2glucosidase (I) également distribuée entre la fraction soluble et la fraction membranaire d'un homogénat de levure, inactive sur les formes G₁,

- une α 1-3glucosidase (II) soluble active sur les formes G₂ et G₁ entièrement mannosylées et inactive sur Glc₁₋₂Man₅GlcNAc₂.

Si nous pouvons comprendre la présence de l' α -glucosidase I dans notre préparation membranaire, nous ne pouvons expliquer la présence de l' α -glucosidase II malgré le lavage des membranes microsomales lors de leur préparation.

On remarque également que la forme M_9 s'accumule lentement (+6,4 %). Il s'agit vraisemblablement d'une forme intermédiaire stationnaire, c'est-à-dire qu'il s'en forme autant qu'il en disparaît. En effet, on devrait obtenir une augmentation de 23 % si la forme M_9 n'était pas dégradée.

Les formes M_8 , M_7 et M_6 sont à peu près constantes, alors que sont dégradées faiblement les formes M_5 et plus rapidement les formes M_4 , M_3 , M_2 . On notera que ces dernières sont accumulées dans un premier temps puis dégradées dans un deuxième temps. L'accumulation de Mannose libre (+ 29,7 %) révèle l'action de mannosidases sur les oligosaccharide-phosphates.

On peut penser que l' α -mannosidase de levure spécifique du passage de M_9 à M_8 (découverte par Jelinek-Kelly et al. [387,388]) a pu agir dans notre cas malgré la présence de Tris 60 mM qui inhibe cette activité à 80 %. Ces auteurs signalent également la présence d'une autre α -mannosidase dans les membranes de levure solubilisée par le Triton X-100 qui permet le passage de M_8 à M_7 et M_6 avec libération de mannose libre.

Une autre α -mannosidase d'origine vacuolaire peut également agir sur les oligosaccharide-phosphates. Cet enzyme a été isolé par Yoshihisa et al. [389], il tapisse la face luminale des membranes des vacuoles et n'est libéré sous forme soluble qu'après traitement alcalin par Co_3Na_2 10mM. Mais ces auteurs n'indiquent pas la spécificité de cet enzyme vis-à-vis de différents substrats.

En conclusion, cette expérience montre que la déglucosylation et la démannosylation partielle sont les premières étapes après la coupure de la liaison pyrophosphate des oligosaccharide-PP-Dol. En outre, on peut envisager que chez la levure les oligosaccharides neutres proviendraient d'une seconde voie de dégradation des oligosaccharide-PP-Dol.

III - VOIES DE DEGRADATION DES OLIGOSACCHARIDE-PP-DOL DANS DES CELLULES DE MAMMIFERES

Lors des expériences *in vivo* d'incorporation de mannose dans des splénocytes, la présence, à côté des phospho-oligosaccharides libérés, d'oligosaccharides neutres de tailles plus petites laissait soupçonner l'existence de réactions concurrentes ou successives dans cette voie du catabolisme des intermédiaires lipidiques. En 1987, Cacan *et al.* [390] ont démontré par des expériences de chasse après marquage métabolique sur les splénocytes de Souris que la séquence de ces réactions serait d'abord la déphosphorylation des phospho-oligosaccharides suivie par une déglucosylation et une démannosylation rapides.

Nous avons participé à ce thème de recherche en collaborant au travail de R. Cacan, A. Lepers et A. Verbert entrepris sur la localisation subcellulaire de la dégradation du matériel oligosaccharidique libéré dans le splénocyte de Souris.

Les résultats obtenus figurent dans l'article n°2 ci-annexé.

Catabolic pathway of oligosaccharide-diphospho-dolichol

Subcellular sites of the degradation of the oligomannoside moiety

René CACAN, Anne LEPERS, Michel BELARD and André VERBERT

Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois
(Unité mixte de recherche du CNRS 111)

(Received March 6/June 15, 1989) — EJB 89 0265

The degradation of oligosaccharide-diphospho-dolichol leads to the release of oligosaccharide material ranging from $(\text{Glc})_3(\text{Man})_9(\text{GlcNAc})_2\text{-P}$ to $(\text{Man})_3$ species and further smaller species. The subcellular location of the glucosidases and mannosidases involved in this catabolic process has been investigated on the basis of their differential sensitivity towards specific inhibitors (castanospermine, deoxymannojirimycin and swainsonine). The results indicate that the first steps of degradation down to the $(\text{Man})_6$ species occurs in the rough endoplasmic reticulum. This result is supported by the fact that the $(\text{Man})_6$ species is the end product when lipid-intermediate-derived glucosylated oligosaccharides are incubated with purified rough endoplasmic reticulum membranes.

Swainsonine and lysosomotropic agents (chloroquine and ammonium chloride) do not affect the degradation process, thus indicating that neither Golgi apparatus nor lysosomes are involved in this catabolism. The observation of the same degradation pattern of the released oligosaccharide material in mannosidosis fibroblasts, lacking lysosomal mannosidases, confirms these results.

Finally, the subcellular distribution of the released oligosaccharide material indicates that the oligomannosides larger than $(\text{Man})_6$ species are sequestered in the particulate fraction whereas, in contrast, oligomannosides smaller than $(\text{Man})_6$ species are found predominantly in the cytosol.

Taken altogether, the experiments demonstrate that the first steps of the degradation of oligosaccharide-diphospho-dolichol occurs in the rough endoplasmic reticulum producing oligomannosides of the $(\text{Man})_6$ species which are then translocated to the cytoplasm to be further degraded.

The release of oligosaccharide material has been demonstrated to be associated with glycoprotein synthesis in a number of biological systems including mouse myeloma microsomes [1], rat splenocytes [2], rat liver [3], pig liver microsomes [4], hen oviduct microsomes [5], thyroid microsomes of thyroid slices [6] and yeast membranes [7]. Although the origin of this material has not always been investigated, it could originate from newly synthesized glycoprotein under the action of endo-*N*-acetyl- β -D-glucosaminidase as proposed by Anumula and Spiro [6]. We have demonstrated, both in cell extracts and by metabolic labelling [8], that this material could originate from the degradation of oligosaccharide-diphospho-dolichol. We recently characterized in yeast a novel pyrophosphatase which degraded specifically oligosaccharide-diphospho-dolichol producing oligosaccharide phosphate [7]. The hydrolysis of the diphosphate bond represents the primary event in the catabolism of lipid intermediates. Subsequent steps in this pathway give rise to a variety of phosphorylated or non-phosphorylated oligosaccharides with variable amounts of glucose, mannose and *N*-acetylglucosamine residues. We have previously demonstrated [8] that the sequence of events was

initially the dephosphorylation of the complete oligosaccharide phosphate followed by rapid deglycosylation and demannosylation.

A great variety of mannosidase activities is involved either in trimming reactions of the *N*-glycosylation process or in the catabolism of glycoproteins. They differ in their specificity, their sensitivity to various inhibitors such as deoxymannojirimycin and swainsonine, and they are differently located within the cell: rough endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, lysosomes or cytosol.

We have previously described that the oligomannosides generated from oligosaccharide-diphospho-dolichol are further degraded to $(\text{Man})_3$ species. We would now like to know the subcellular route followed by this catabolic pathway. Is the oligosaccharide degraded as an accompanying process of the trimming of glycoprotein in the Golgi vesicles? Is the oligosaccharide degraded in lysosomes or in the cytosol? Using the differential sensitivity to mannosidase inhibitors, and taking advantage of lysosomal mannosidase deficiency in mannosidosis fibroblasts, we have investigated the subcellular sites of degradation of the oligosaccharide moiety released from oligosaccharide-diphospho-dolichol.

Correspondence to A. Verbert, Laboratoire de Chimie Biologique et Unité Mixte de Recherche du CNRS no. 111, Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

Abbreviations. Oligosaccharide-PP-Dol, oligosaccharide-diphospho-dolichol; ER, endoplasmic reticulum.

MATERIALS AND METHODS

Materials

All reagents were of analytical grade. D-[2- ^3H]Mannose (429 GBq/mmol) and GDP-[^{14}C]mannose (11.43 GBq/mmol)

were purchased from Amersham International (Bucks, UK). UDP-GlcNAc, sucrose, chloroquine were from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). Castanospermine, swainsonine and endo-*N*-acetyl- β -D-glucosaminidase H from *Streptomyces griseus* were from Boehringer (Mannheim, FRG). Deoxymannojirimycin was from Miles Laboratories (Naperville, IL, USA). Cell culture media [Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI-1640); minimum essential medium (MEM) and Ham F-10] were obtained from Gibco (Grand Island, NY, USA). Glucose-free RPMI-1640, and glucose-free MEM were prepared by Eurobio Laboratories (Paris, France). Standard oligomannosides with one *N*-acetylglucosamine residue at the reducing end were kindly provided by Dr G. Strecker (Villeneuve d'Ascq, France).

Cell preparation and culture

Splenocytes were prepared from 4-week-old Swiss mice [2]. Briefly, suspensions of splenocytes were prepared by pressing the spleen through a fine stainless-steel gauze (0.5-mm mesh) and washed twice with RPMI-1640 medium by low-speed centrifugation. When splenocytes were cultured in the presence of inhibitors, the incubation was made in RPMI-1640, at a cell concentration of 10^8 cells/ml, under 5% CO₂ atmosphere.

Normal human fibroblasts were grown in MEM medium supplemented with 15% foetal calf serum, under 5% CO₂ atmosphere. Fibroblasts from a patient with mannosidosis which were kindly provided by Dr M. T. Zobot (Hôpital Debrousse, Lyon, France) were cultured in Ham F-10 medium supplemented with 12% foetal calf serum, under 5% CO₂ atmosphere.

Splenocyte permeabilization

The plasma membrane of splenocytes was rendered permeable to sugar nucleotides (semi-intact cells) by treatment with isotonic ammonium chloride as described by Cacan et al. [9].

Rough endoplasmic reticulum preparation

Rough endoplasmic reticulum (rough ER) was prepared from liver of 4-week-old Swiss mice according to Debeire et al. [10]. A crude postmitochondrial fraction was first prepared by a 20000 *g* centrifugation. The supernatant was centrifuged at 105000 *g* for 1 h through a 10-ml 1 M sucrose cushion in a SW-27 Spinco rotor. The resulting pellet, devoid of most plasma membrane sheets, was resuspended in 1.6 M sucrose. The submicrosomal fractions were separated on a discontinuous sucrose gradient made with 7 ml 1.8 M sucrose, 7 ml 1.6 M sucrose containing the crude microsomal fraction, 14 ml 1.4 M sucrose and 7 ml 1 M sucrose. All sucrose solutions contained 0.01 M Tris/HCl pH 7.4 and 0.5 mM MgCl₂. The tubes were centrifuged for 3 h at 105000 *g* in a SW-27 Spinco rotor. The lower interphase contained the rough endoplasmic reticulum membranes.

Rough ER-derived vesicles were found to be enriched 9.2-fold over the homogenate in glucose-6-phosphatase activity [11] (12.5% yield), 0.7-fold in sialyltransferase activity [12] (1% yield), and 1-fold in acid- β -hexosaminidase [11] (1.5% yield).

Incubation with semi-intact cells

Semi-intact cells were incubated as described previously [9] with 10 μ M GDP-[¹⁴C]mannose and 100 μ M UDP-

GlcNAc in the presence of 5 mM MgCl₂ and 2 mM MnCl₂ for 20 min at 37°C.

Metabolic labelling

Splenocytes were incubated in Hepes-buffered glucose-free RPMI-1640 medium at a cell concentration of 5×10^8 cells/ml, in the presence of 2.7 MBq/ml of [2-³H]mannose for 1 h as described previously [8].

Fibroblasts were resuspended and incubated in Hepes-buffered glucose-free MEM medium at a cell concentration of 5×10^5 cells/ml, in the presence of 3.7 MBq/ml of [2-³H]mannose.

Sequential lipid extraction and preparation of soluble oligosaccharide material

After incubation, cells were pelleted and sequential lipid extraction was performed as described elsewhere [2, 4]. The soluble oligosaccharide material released in the aqueous phase was separated from precursor and precursor-degradation products by gel filtration on a Bio-Gel P-2 column (1 cm \times 50 cm, 200–400 mesh) in 0.1 M acetic acid. Radioactivities of the chloroform/methanol fraction (Man-*P*-Dol), of the chloroform/methanol/water fraction (oligosaccharide-*PP*-Dol), of the glycoprotein pellet and of the soluble oligosaccharide material were counted in scintillation medium and quenching correction was made by external ratio standardization.

HPLC analysis of oligosaccharides

Analysis of the oligosaccharide moieties of oligosaccharide-*PP*-Dol was performed by mild acid hydrolysis (0.01 M HCl, 100°C, 15 min, in methanol/water, 1/1 by vol.). Analysis of the soluble oligosaccharide fraction was achieved after endo-*N*-acetyl- β -D-glucosaminidase H treatment in order to convert oligomannosides with (GlcNAc)₂-*P* or (GlcNAc)₂ into species with a single GlcNAc at the reducing end like the authentic markers used as internal standards. It has to be noted that the released oligomannosides of (Man)₅ species and smaller ones have a single GlcNAc residue as previously demonstrated [8]. Briefly around 200000 dpm oligosaccharide material was treated with 10 mU enzyme in 50 mM citrate buffer pH 5.5 for 12 h.

The separation of oligosaccharides possessing a chitobiosyl unit, i.e. (GlcNAc)₂, or one *N*-acetylglucosamine residue at the reducing end was achieved by HPLC on an amino-derivatized column: Supelcosil LC-NH₂, 5 μ m (Supelco, Bellefonte, PA, USA) with a solvent system acetonitrile/water (70/30 by vol.) for 15 min, at a flow rate of 1 ml/min. The proportion of water was then increased to reach, after an hour, a ratio acetonitrile/water of 50/50 (by vol.) with a flow rate of 1 ml/min. The separation of the labelled oligosaccharides was followed by continuous-flow detection of the radioactivity with a flow-one β -detector (Flotec, France) using Luma Flow II (Lumac, Netherlands) as scintillation liquid.

Rough endoplasmic reticulum mannosidase activity measurement

The oligosaccharides used as substrates for the detection of mannosidase activities of rough ER were prepared by endo-*N*-acetyl- β -D-glucosaminidase H digestion of metabolically

labelled oligosaccharide-*PP-Dol* according to Chalifour and Spiro [13]. After analysis, the oligosaccharide material was composed (on the basis of radioactivity) of 30% glucosylated-(Man)₉-GlcNAc species, 59% (Man)₉-GlcNAc and 11% (Man)₈-GlcNAc. This material was incubated with rough ER membranes under the following conditions: 500000 dpm oligosaccharides were incubated with 0.8 mg microsomal protein, in the presence of 0.5% Triton X-100 in 100 μl 50 mM sodium cacodylate buffer pH 6.5 for 24 h. The reaction was stopped by the addition of 2 vol. methanol and 3 vol. chloroform. The oligosaccharides in the aqueous phase obtained after centrifugation were resolved by Bio-Gel P-2 chromatography and analyzed by HPLC.

Separation of the particulate fraction from cytosol

Human fibroblasts (5×10^7 cells) were first incubated with [2-³H]mannose as described above. After incubation, cells were washed with 10 ml glucose-free incubation medium and swollen for 5 min in 4 ml hypotonic medium containing 15 mM KCl, 1.5 mM magnesium acetate, 1 mM dithiothreitol and 10 mM Hepes pH 7.5. The isotonicity was restored by the addition of 700 mM KCl, 40 mM magnesium acetate, 1 mM dithiothreitol and 400 mM Hepes pH 7.5. The cells were broken in a Potter-Elvehjem apparatus by 10 strokes at 1500 rpm and ultracentrifuged in a SW-50-1 rotor (spinco) at 105000 g for 1 h. The pelleted particulate material and the supernatant were submitted to sequential lipid extraction and the aqueous phases were purified on Bio-Gel P-2 chromatography before HPLC analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

Oligosaccharide material released during *N*-glycosylation in semi-intact and intact splenocytes

When semi-intact splenocytes were incubated with GDP-[¹⁴C]Man and UDP-GlcNAc, oligosaccharide-*PP-Dol* was synthesized and the *N*-glycosylation process was accompanied by the release of soluble oligosaccharide material. Fig. 1a shows the distribution of the released oligosaccharide species compared to the size of the oligosaccharide moieties bound to *PP-Dol* from which they originate. The (Man)₉ species was the major constituents of oligosaccharide-*PP-Dol*, although the soluble oligosaccharide material was composed of three major species: (Man)₉, (Man)₈ and (Man)₇.

In contrast, when metabolic labelling of intact splenocytes was performed with [2-³H]mannose, the soluble oligosaccharide material was much more degraded, down to the (Man)₄ species (Fig. 1b), even though oligosaccharide-*PP-Dol* contained large oligomannosides [mainly Glc₁(Man)₉ and (Man)₉]. It should be noted that in each case the labelled oligosaccharide material was associated with the cells and not released into the incubation medium (not shown, see [8]). This results indicates that the oligomannoside material released from oligosaccharide-*PP-Dol* was further degraded in two steps, only one of which was observed with semi-intact cells [from (Man)₉ to (Man)₆ species] suggesting that permeabilized cells have lost a cellular compartment where further demannosylation occurs, or that transport to this compartment is no longer possible in such cells.

Effect of castanospermine

After preincubation of splenocytes with 50 μg/ml castanospermine, a specific inhibitor of rough ER glucosidase I,

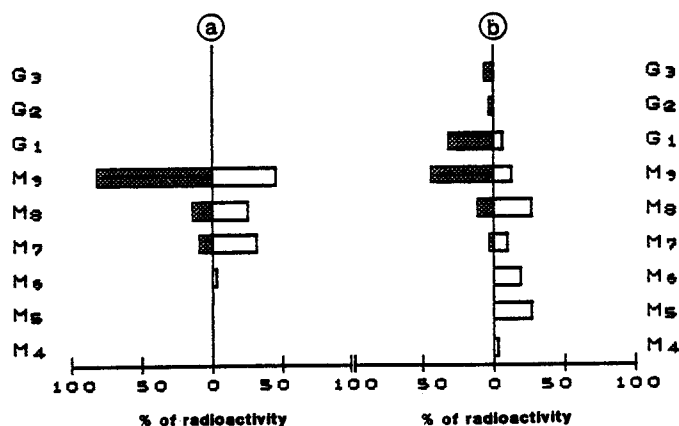


Fig. 1. Distribution of the radioactivity bound to oligomannosides after incubation with permeabilized and intact splenocytes. Semi-intact splenocytes were incubated with UDP-GlcNAc and GDP-[¹⁴C]Man (a). Metabolic labelling of splenocytes was performed with [2-³H]Man (b). After incubation the pattern of radioactivity bound either to oligosaccharide moieties of oligosaccharide-*PP-Dol* (hatched area), or to soluble oligosaccharide material (open area) were determined by HPLC. M₄, M₅, M₆, M₇, M₈, M₉, indicate oligomannosides with mannose residues ranging over 4–9. G₁, G₂, G₃ indicate mannosides with 9 mannose residues and a number of glucose residues ranging over 1–3. The radioactivity associated with oligosaccharide-*PP-Dol* was 48000 dpm and 3532000 dpm for semi-intact cells and in metabolic labelling respectively. The radioactivity associated with soluble oligosaccharide material was 52000 dpm and 320000 dpm for semi-intact cells and in metabolic labelling respectively.

metabolic labelling with tritiated mannose leads to the appearance of glucosylated species in the released oligomannoside material (45% of the total radioactivity, see Table 1). This demonstrates that the first steps in the degradation of the released oligosaccharide material occur in the rough ER, the same site where oligosaccharide-*PP-Dol* is synthesized.

Effect of deoxymannojirimycin

An important point to establish is whether rough ER mannosidases are involved in the further demannosylation steps. The mannose analogue deoxymannojirimycin has been used to determine the role of the rough ER α -mannosidases [14]. Two mannosidase activities have been described: the first one, deoxymannojirimycin-resistant, is responsible for the conversion of (Man)₉(GlcNAc)₂ to (Man)₈(GlcNAc)₂ linked to glycoproteins [14]. The second one, deoxymannojirimycin-sensitive, has been isolated by Schweden et al. [15] and cleaves three of four α -1,2-mannose residues from (Man)₉(GlcNAc)₂ yielding (Man)₆(GlcNAc)₂ oligosaccharides.

When intact splenocytes were preincubated for 15 min with deoxymannojirimycin (0.001–1 mg/ml), then incubated for 1 h with [2-³H]mannose in the presence of the inhibitor, it was observed that although the radioactivity bound to oligosaccharide-*PP-Dol* and glycoproteins remained constant (Fig. 2a), the radioactivity bound to oligosaccharide material was increased (Fig. 2b). Table 1 indicates that this increase is due to inhibition of the demannosylation process. These results suggest that the deoxymannojirimycin-sensitive rough ER mannosidase activity, previously described as acting on free oligomannosides [15], is involved in the first degradation steps of the released (Man)₉ oligomannosides.

Table 1. Influence of various inhibitors on the pattern of oligomannosides released during 1-h incubation of splenocytes with $[2\text{-}^3\text{H}]$ mannose. The amount of radioactivity indicates, for each experiment, the total radioactivity of the released oligosaccharide material. The results for bound radioactivity are expressed as the percentage of the total bound to each oligomannoside species

Incubation	Radioactivity (total)	Radioactivity bound to								
		G ₃	G ₂	G ₁	M ₉	M ₈	M ₇	M ₆	M ₅	M ₄
	dpm	% total								
Standard incubation	322 500	0	0	5.5	13	28	10	17	25	1.5
+ castanospermine (50 µg/ml)	590 170	17	18	10	22	7	8	7	11	0
+ dMM (1 mg/ml)	461 790	0	0	22.5	33	8	7	13	15.5	1
+ swainsonine (100 µg/ml)	298 900	0	0	0	17	32	9	16	25	0
+ NH ₄ Cl (20 mM)	373 350	0	0	11	18	22.5	10.5	11.5	24	2.5
+ chloroquine (25 µM)	365 240	0	0	5	13	30	7	13	30	2

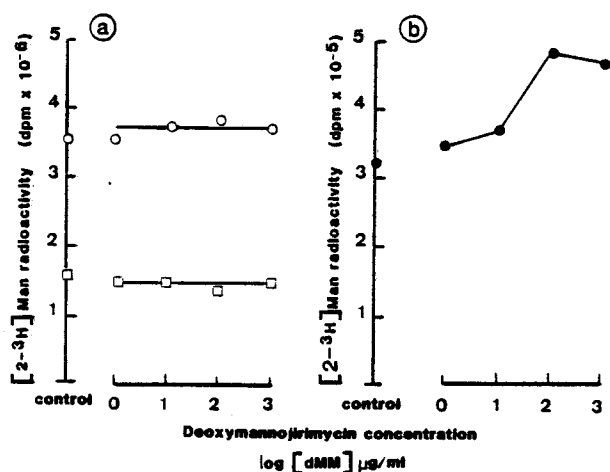


Fig. 2. Effect of deoxymannojirimycin concentration on the incorporation of $[2\text{-}^3\text{H}]$ Man on oligosaccharide-PP-Dol, on glycoproteins and on the formation of soluble oligosaccharide material. Splenocytes were preincubated for 15 min with various concentrations (1–1000 µg/ml) of deoxymannojirimycin (dMM), then $[2\text{-}^3\text{H}]$ Man was added in the conditions described in Materials and Methods. After a 1-h incubation the radioactivity bound to oligosaccharide-PP-Dol (○—○), to glycoprotein (□—□) and to the soluble oligosaccharide material (●—●) was determined after sequential lipid extraction

Experiments with rough ER membranes

To determine whether this degradation could be carried out with rough ER membranes, isolated mouse liver rough ER membranes were incubated with oligosaccharide material derived from oligosaccharide-PP-Dol after cleavage with endo-*N*-acetyl- β -D-glucosaminidase H. The results are shown in Fig. 3 where the kinetics of appearance of the various mannosylated species was followed over 24 h. It clearly shows that the (Man)₉ species was continuously degraded into (Man)₈ species which, in contrast to rough ER glycoprotein processing, is not an end product, since it is further stepwise degraded to the (Man)₆ species. The (Man)₆ species is indeed the end product in the rough ER since it accumulated there. The (Man)₅ species, which was recovered in low quantity in some experiments, was due to contaminating lysosomal membranes. In control experiments, with addition of swainsonine to inhibit lysosomal mannosidase, (Man)₅ species was not observed.

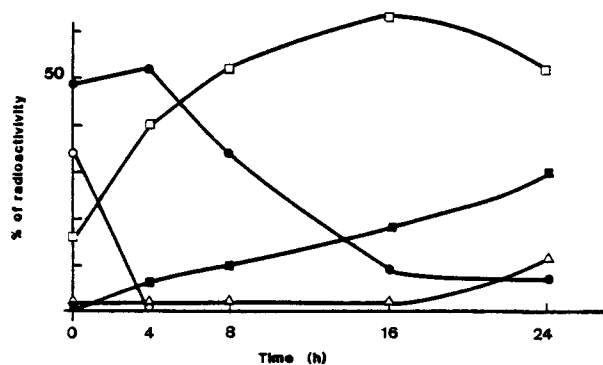


Fig. 3. Determination of mannosidase activities in rough-ER-derived vesicles. Labelled oligomannosides (500 000 dpm represent 100%) prepared from oligosaccharide-PP-Dol by the action of endo-*N*-acetyl- β -D-glucosaminidase H were incubated with rough-ER-derived vesicles in the conditions described in Materials and Methods with 100 µg/ml swainsonine. The kinetics of the degradation was followed during 24 h. At each time, the distribution of the radioactivity between glycosylated species (○—○), (Man)₉ (●—●), (Man)₈ (□—□), (Man)₇ (■—■) and (Man)₆ oligomannosides (△—△) was determined by HPLC

These experiments establish that the first steps of the degradation required rough ER glucosidases and mannosidases to form the (Man)₆ species, as had already been observed in semi-intact cells. Inhibition of these first steps should allow further steps in the degradation pathway to be abolished. Complete inhibition can be obtained by using the combined effect of castanospermine and deoxymannojirimycin as shown below.

Chase experiment in the presence of inhibitors

In a typical chase experiment with excess of unlabelled mannose after a 20-min incubation with $[2\text{-}^3\text{H}]$ mannose, the loss of radioactivity in oligosaccharide-PP-Dol and Man-P-Dol was not totally recovered on protein and soluble oligosaccharide material (Fig. 4a). In contrast, when the chase was performed in the presence of 50 µg/ml castanospermine and 1 mg/ml deoxymannojirimycin (Fig. 4b), the loss of radioactivity associated with the oligosaccharide-PP-Dol was entirely recovered on protein and soluble oligosaccharide material. Analysis of oligosaccharide populations in this material indicated that over 90% of oligosaccharides remained as

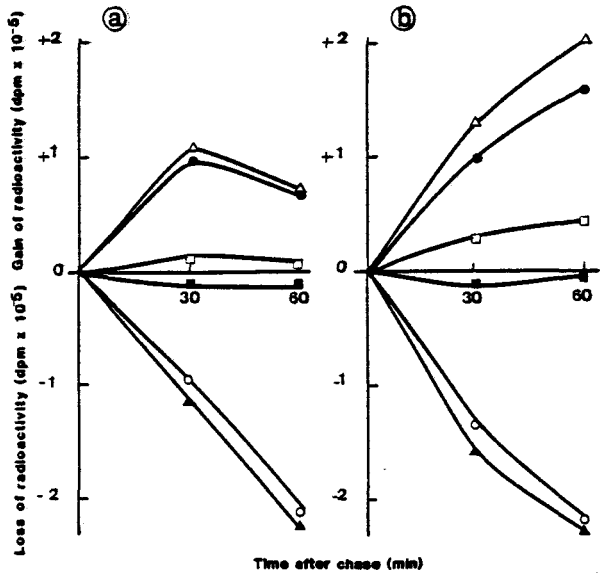


Fig. 4. Effect of castanospermine plus deoxymannojirimycin on chase experiment. Splenocytes were first pulsed with $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Man}$ for 20 min. After the incubation a large excess (800-fold) of unlabelled mannose was added in the absence (a) or in the presence (b) of 50 $\mu\text{g/ml}$ castanospermine together with 1 mg/ml deoxymannojirimycin. The kinetics of the chase were followed during 60 min. The upper panels indicate the increase of radioactivity and the lower panels indicate the decrease of radioactivity, on Man-*P*-Dol (■—■), on oligosaccharide-*PP*-Dol (○—○) on glycoprotein (□—□) and on soluble oligosaccharide material (●—●). The total gain (Δ — Δ) and total loss (\blacktriangle — \blacktriangle) of radioactivity are represented for both experiments

(Man)₉ and glucosylated species, demonstrating that in the absence of inhibitors the released oligosaccharide material was further degraded into smaller species. Thus, the first steps of degradation are due to the action of rough ER glucosidases and rough ER α -mannosidases. The remaining question is at which cytoplasmic site(s) does the further degradation of (Man)₆ species occur?

Effect of swainsonine and of lysosomotropic agents

Swainsonine is known to be a specific inhibitor of Golgi mannosidase II and of lysosomal α -mannosidases [16]. Preincubation of splenocytes with swainsonine (10–100 $\mu\text{g/ml}$) for 15 min and further incubation with $[2\text{-}^3\text{H}]\text{mannose}$, does not lead to significant changes in the degradation process of oligomannosides as reported in Table 1.

Weak bases, such as chloroquine [17] and NH_4Cl [18], affect lysosomal functions. As shown in Table 1, when splenocytes were cultured overnight in the presence of 25 μM chloroquine or 20 mM NH_4Cl , again no changes were observed in the degradation of oligosaccharides. These results suggest that neither Golgi nor lysosomal enzymes are involved in the degradation process of the (Man)₆ species.

Studies with mannosidosis fibroblasts

Fibroblasts from a patient with mannosidosis accumulate substantial amounts of oligosaccharides which has been correlated with the absence of lysosomal α -mannosidase activities [19, 20]. Such cells offer a convenient model to determine whether these enzymes are involved in the catabolic pathway

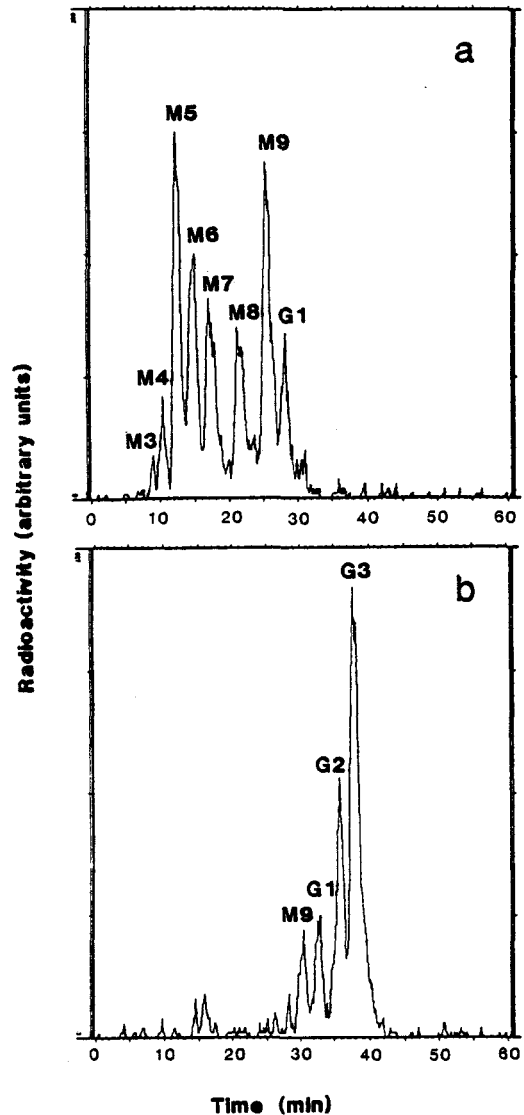


Fig. 5. Separation of labelled oligomannosides synthesized by human mannosidosis fibroblasts. Human mannosidosis fibroblasts were labelled with $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Man}$ for 1 h. After incubation the soluble oligosaccharide material (a) and the oligomannosides from oligosaccharide-*PP*-Dol (b) were analysed by HPLC. M₃, M₄, M₅, M₆, M₇, M₈, M₉ indicate oligomannosides with a number of mannose residues ranging over 3–9. G₁, G₂, G₃ indicate oligomannosides with a number of glucose residues ranging over 1–3. The shift of 5 min observed between (a) and (b) is due to the additional GlcNAc residue which forms the chitobiosyl unit bound to oligomannosides derived from oligosaccharide-*PP*-Dol by mild acid hydrolysis, compared to the single GlcNAc residue of the soluble oligosaccharidic material analyzed after endo-*N*-acetyl- β -D-glucosaminidase H hydrolysis

of the oligosaccharides released from oligosaccharide-*PP*-Dol. We first established that metabolic labelling of normal fibroblasts with $[2\text{-}^3\text{H}]\text{mannose}$ also gives rise to soluble oligosaccharide material containing all the species from Glc₁(Man)₉ to (Man)₄ as observed in splenocytes (not shown). When the same labelling was carried out with mannosidosis fibroblasts, the analysis of the soluble oligosaccharide material revealed (Fig. 5a) the same distribution of oligosaccharide populations. This result clearly proves that lysosomal enzymes are not responsible for this degradation of oligomannosides.

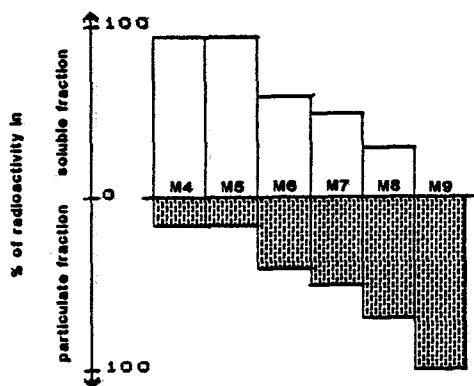


Fig. 6. Distribution of metabolically labelled oligomannosides between particulate and soluble subcellular fraction. Human fibroblasts were labelled with $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Man}$ for 1 h. After incubation cells were washed free of extracellular precursor and homogenized. The soluble oligomannosides of the 105000 g pellet (hatched area, total radioactivity 195000 dpm) and of the cytosolic fraction (open area, total radioactivity 390000 dpm) was determined by HPLC. M_4 , M_5 , M_6 , M_7 , M_8 , M_9 indicate oligomannosides with a number of mannose residues ranging over 4–9

In human mannosidosis fibroblasts, lysosomal α -mannosidases are absent; however, Cenci Di Bello et al. [21] have stated that normal human fibroblasts contain a lysosomal α -1,6-mannosidase activity that could be unaffected in genetic mannosidosis. Nevertheless the fact that species smaller than $(\text{Man})_6$ are recovered indicates that at least one α -1,2- or α -1,3-linkage has been cleaved and demonstrates that the corresponding lysosomal enzymes are not involved. We have checked that the degradation process of oligosaccharide-*PP*-Dol does exist in human mannosidosis fibroblasts since the oligosaccharide moiety of their lipid intermediates contains more than 90% of fully mannosylated species (Fig. 5b).

Considering the results of the experiments described above, it appears that cytosol is the best candidate for the subcellular location of the degradation of oligosaccharide material from $(\text{Man})_6$ to $(\text{Man})_3$ species. To test this hypothesis we determined the distribution of the different oligosaccharides produced from oligosaccharide-*PP*-Dol degradation between the membrane particulate and cytosolic fractions.

Distribution of oligomannosides between particulate and cytosolic fractions

Human fibroblasts were first incubated with $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Man}$ for 1 h, then thoroughly washed by low-speed centrifugation. The cells were then homogenized as described in Materials and Methods. After centrifugation at 105000 g for 1 h, the labelled oligosaccharide content was analyzed in the pellet and in the supernatant. The results (Fig. 6) clearly indicate that oligomannosides larger than $(\text{Man})_7$ species are mostly sequestered in the particulate fraction, whereas oligomannosides lower than $(\text{Man})_6$ species are predominantly in the cytosolic fraction.

CONCLUSION

We have observed the cleavage of oligosaccharide-diphospho-dolichol leading to the release of oligosaccharide phosphate as an accompanying process to the dolichol-dependent *N*-glycosylation. After rapid dephosphorylation and

deglycosylation, the oligomannoside is then stepwise-degraded into smaller species and presumably to free monosaccharide [8]. The inhibition of the deglycosylation of the released oligosaccharide by castanospermine, a specific inhibitor of the rough ER glucosidase I, indicated that the deglycosylation process occurs in the rough ER.

In the present paper, we demonstrate that the further demannosylation process occurs in two different subcellular sites: the rough ER and the cytosol. In the first step, the rough-ER-located $(\text{Man})_9$ species are hydrolysed into $(\text{Man})_6$ species. This finding is supported by the following observations.

a) Compared to metabolic labelling in viable cells, incubation of sugar nucleotides with semi-intact cells indicated that the degradation is blocked at $(\text{Man})_6$ species.

b) The responsible mannosidase activities are inhibited by deoxymannojirimycin, as expected for rough ER mannosidases [15].

c) Incubation of oligomannosides, obtained from oligosaccharide-diphospho-dolichol, with purified rough ER membranes, leads to the formation of $(\text{Man})_6$ species as final product.

This shows that semi-intact cells behave as a subcellular fraction in which the relationship between the various compartments has been abolished, indicating that oligosaccharide-*PP*-Dol cleavage (either for protein *N*-glycosylation or for degradation) and the demannosylation of soluble oligosaccharides down to $(\text{Man})_6$ species occur in the same subcellular compartment.

The main subcellular fractions where the second set of reactions [from $(\text{Man})_6$ to $(\text{Man})_3$ species] may occur are the Golgi apparatus, lysosomes or cytosol. Glycoprotein-processing mannosidases have been characterized in the Golgi: mannosidase I, 1-deoxymannojirimycin-sensitive, acting on $(\text{Man})_8$ species to form the $(\text{Man})_5$ species [22, 23] and GlcNAc-dependent mannosidase II which is known to lead to the formation of the trimannoside inner core of *N*-glycoproteins [24, 25]. Recently, in rat liver cis-Golgi fraction, a mannosidase activity has been shown to be able to transform $(\text{Man})_5$ species to $(\text{Man})_3$ species without the prior branching of GlcNAc residues [26]. The presence of a Golgi endomannosidase activity which releases a $\text{Glc}(\alpha\text{-}1,3)\text{Man}$ disaccharide from $\text{Glc}_1(\text{Man})_9$ species has recently been reported [27]. Lysosomes possess α -mannosidases which can be inhibited by swainsonine and which act preferentially on linear oligomannosides in contrast to mannosidases present in cytosol which are active on $(\text{Man})_9$ species and degrade them to $(\text{Man})_3$ species [28]. The physiological significance of cytosolic mannosidases has not yet been determined.

The pattern of oligomannosides is not affected when incubations are made in the presence of either swainsonine, chloroquine or NH_4Cl . This indicated that Golgi or lysosomal mannosidases are not involved in this degradation process. This is reinforced by the fact that human mannosidosis fibroblasts that are deficient in lysosomal α -mannosidases, also exhibit the same degradation capacity. Thus it appears that the most likely location for the last demannosylation steps is the cytosol. This is confirmed by the fact that only species in the range or smaller than $(\text{Man})_6$ are recovered in a 105000 g supernatant. This is in a good agreement with the specificity of cytosolic mannosidase for branched oligomannosides as reported by Tulsiani and Touster [28].

For a complete understanding of this catabolic pathway some important points remain to be resolved.

a) Which of the various possible isomers of each oligomannoside are obtained? This should define precisely the order in which the various mannose residues are cleaved off.

b) As previously reported [6, 8], the oligomannoside material possesses a chitobiosyl unit or one GlcNAc residue at the reducing end, the latter result indicating the action of an endo-*N*-acetyl- β -D-glucosaminidase activity. Does this cleavage occur in the rough ER, as proposed by Anumula and Spiro [6], or in the cytoplasm as a function of the cytosolic enzyme described by Pierce et al. [29, 30]?

c) The last question is: how does the oligomannoside material translocate from the rough ER lumen to the cytoplasm since passive diffusion across the rough ER membranes for species as large as (Man)₆GlcNAc or (Man)₆(GlcNAc)₂ appears to be unlikely.

This research was supported in part by the *Centre National de la Recherche Scientifique (Unité mixte de recherche n° 111. Relation structure-fonction des constituants membranaires; Director: Professor Jean Montreuil)*, by the *Ministère de l'Éducation Nationale* and by the *Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois*. We are very grateful to Professor J. Montreuil for his constant interest in the progress of this work and for providing research facilities. We thank Drs Jean-Claude Michalski and Gérard Strecker (Villeneuve d'Ascq, France) for their help and advice in HPLC analysis and Dr Marie-Thérèse Zabot (Lyon, France) for kindly providing mannosidosis fibroblasts. We are very grateful to Dr Peter Daniel (Eunice Kennedy Shriver Center for Mental Retardation, Waltham, MA, USA) for helpful discussions during the preparation of the manuscript. We are indebted to Mrs Myriam Coniez and Miss Odette Labiau for their skilful technical assistance.

REFERENCES

- Hsu, A. F., Baynes, J. W. & Health, E. C. (1974) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **71**, 2390–2395.
- Cacan, R., Hoflack, B. & Verbert, A. (1980) *Eur. J. Biochem.* **106**, 473–479.
- Richard, M., Tytgat, F. & Louisot, P. (1978) *Biochimie* **60**, 593–599.
- Oliver, G. J. A., Harrison, J. & Hemming, F. W. (1975) *Eur. J. Biochem.* **58**, 223–229.
- Hanover, J. A. & Lennarz, W. J. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 2787–2794.
- Anumula, R. K. & Spiro, R. G. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 15271–15282.
- Belard, M., Cacan, R. & Verbert, A. (1988) *Biochem. J.* **255**, 235–242.
- Cacan, R., Cecchelli, R. & Verbert, A. (1987) *Eur. J. Biochem.* **166**, 469–474.
- Cacan, R., Cecchelli, R., Hoflack, B. & Verbert, A. (1984) *Biochem. J.* **224**, 277–284.
- Debeire, P., Hoflack, B., Cacan, R., Verbert, A. & Montreuil, J. (1977) *Biochimie* **59**, 473–477.
- Beaufay, H., Amar-Cortese, A., Feytmans, E., Thinés-Sempoux, D., Wibo, M., Robbi, M. & Berthet, J. (1974) *J. Cell. Biol.* **61**, 188–200.
- Bauvois, B., Cacan, R., Fournet, B., Caen, J., Montreuil, J. & Verbert, A. (1982) *Eur. J. Biochem.* **121**, 567–572.
- Chalifour, R. J. & Spiro, R. G. (1984) *Arch. Biochem. Biophys.* **229**, 386–394.
- Bischoff, J., Liscum, L. & Kornfeld, R. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 4766–4774.
- Schweden, J., Legler, G. & Bause, E. (1986) *Eur. J. Biochem.* **157**, 563–570.
- Tulsiani, D. R. P., Harris, T. M. & Touster, O. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 7936–7939.
- Wiesmann, U. N., DiDonato, S. & Herschowitz, N. N. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **66**, 1338–1348.
- Hasilik, A. & Kornfeld, S. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 4937–4945.
- Strecker, G. & Montreuil, J. (1979) *Biochimie* **61**, 1199–1246.
- Daniel, P. F. (1987) *Methods Enzymol.* **138**, 94–116.
- Cenci Di Bello, I., Dorling, P. & Winchester, B. (1983) *Biochem. J.* **215**, 693–696.
- Tabas, I. & Kornfeld, S. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 11655–11633.
- Tulsiani, D. R. P., Hubbard, S. C., Robbins, P. W. & Touster, O. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 3660–3668.
- Tabas, I. & Kornfeld, S. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 7779–7786.
- Harpaz, N. & Schachter, H. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 4894–4902.
- Monis, E., Bonay, P. & Hughes, C. (1987) *Eur. J. Biochem.* **168**, 287–294.
- Lubas, W. A. & Spiro, R. G. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 3990–3998.
- Tulsiani, D. R. P. & Touster, O. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 6506–6514.
- Pierce, R. J., Spik, G. & Montreuil, J. (1979) *Biochem. J.* **180**, 673–676.
- Pierce, R. J., Spik & Montreuil, J. (1980) *Biochem. J.* **185**, 261–264.

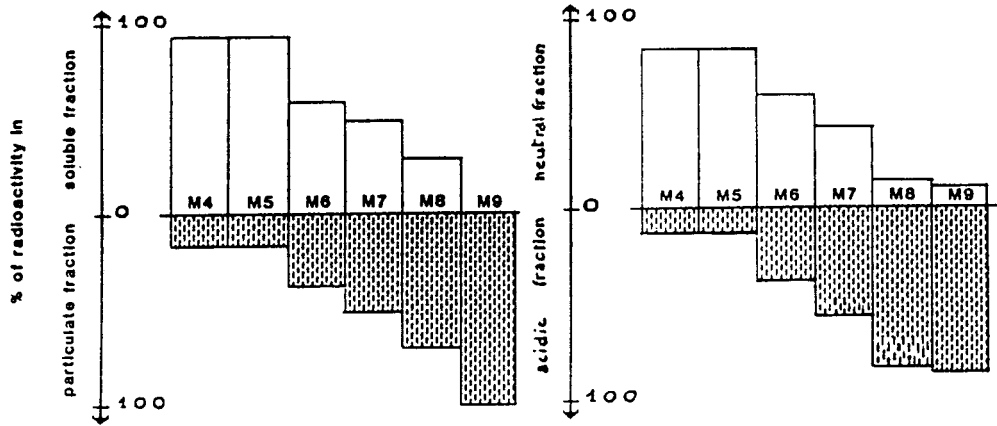


Fig. 6. Distribution of metabolically labelled oligomannosides between particulate and soluble subcellular fraction. Human fibroblasts were labelled with $[2-^3\text{H}]\text{Man}$ for 1 h. After incubation cells were washed free of extracellular precursor and homogenized. The soluble oligomannosides of the 105000 g pellet (hatched area, total radioactivity 195000 dpm) and of the cytosolic fraction (open area, total radioactivity 390000 dpm) was determined by HPLC. M₄, M₅, M₆, M₇, M₈, M₉ indicate oligomannosides with a number of mannose residues ranging over 4-9 [d'après l'article 2 p.132].

Fig. 51 : Répartition des oligomannosides marqués métaboliquement entre la fraction acide et la fraction neutre. Des splénocytes de Souris sont marqués avec du $[2-^3\text{H}]\text{Man}$ pendant 1h. Après incubation une extraction séquentielle des intermédiaires lipidiques est effectuée. Le matériel oligosaccharidique libéré dans la phase aqueuse est analysé par HPLC, deux familles de composés sont obtenues : une fraction neutre et une fraction acide.

Résultats complémentaires à l'article 2

Dans cet article la distribution des oligosaccharides entre les fractions particulaires et cytosoliques (Fig. 6, Art. 2) a été déterminée par HPLC après action de endo- β -N-acétylglucosaminidase H de *Streptomyces griseus* ; il n'était donc pas possible de faire la distinction entre les espèces phosphatées et non-phosphatées.

Toutefois, en analysant par HPLC avec un gradient de phosphate le matériel oligosaccharidique libéré dans la phase aqueuse après un marquage de 1 heure avec du [2- 3 H] Man de splénocytes de Souris, nous avons pu constater que la répartition entre les espèces neutres et acides est approximativement la même que celle entre la fraction soluble et particulaire de fibroblastes humains (Fig.51).

Par exemple 89 % des espèces M₃ sont phosphatées (caractère acide et phosphatase-sensible) dans les splénocytes et situés à 100 % dans la fraction particulaire des fibroblastes. Inversement 85 % des espèces M₄ sont neutres dans les splénocytes et situées à 84 % dans la fraction soluble des fibroblastes.

Bien que les modèles biologiques soient différents et que les contenus respectifs des deux fractions subcellulaires étudiées n'aient pas été analysés de la même façon, on peut néanmoins supposer que les phospho-oligosaccharides restent enfermés dans les vésicules membranaires tandis que les oligosaccharides neutres de petite taille se retrouvent dans le cytosol.

Il faut noter qu'environ 10 % du total du matériel oligosaccharidique se retrouve dans le milieu de l'incubation *in vivo* sans que l'on puisse encore dire s'il s'agit d'un phénomène de sécrétion ou d'une destruction des structures membranaires de quelques cellules fragilisées ou éclatées.

Les recherches que nous avons effectuées sur la dégradation des oligosaccharide-PP-Dol en utilisant comme modèle la levure *Saccharomyces cerevisiae*, nous ont permis de dégager les points suivants :

* Il existe dans les membranes microsomales de levure une activité enzymatique responsable de la coupure de la liaison pyrophosphate de l'oligosaccharide-PP-Dol :

l'oligosaccharide-pyrophospho-dolichol pyrophosphatase.

En premier lieu l'étude de l'incorporation *in vitro* de GDP-Man dans les intermédiaires lipidiques avec des membranes microsomales de levure a montré l'existence de matériel oligosaccharidique retrouvé dans la phase aqueuse lors de l'extraction séquentielle. Ce matériel est constitué majoritairement d'oligosaccharides phosphatés sur le premier résidu de N-acétylglucosamine et d'une minorité d'oligosaccharides neutres.

Par ailleurs, ce matériel oligosaccharidique est retrouvé dans les incubations *in vitro* d'oligosaccharide-PP-Dol avec des membranes de levure en présence de détergent.

* L'étude de l'influence de différents cations et de l'EDTA sur cette réaction d'hydrolyse montre que l'activité observée n'est pas le fait de la dolichol-pyrophosphatase décrite par Wedgwood et Strominger [391] et par Scher et Waechter [392].

* L'étude de la spécificité d'action de cette pyrophosphatase vis-à-vis du substrat fait apparaître une différence d'affinité selon la taille de la partie glycanique. Les intermédiaires lipidiques possédant un glycanne de grande taille semblent plus facilement dégradés que les intermédiaires lipidiques portant un glycanne plus court. Par ailleurs, la glucosylation des intermédiaires n'aurait pas de rôle protecteur et sa spécificité d'action serait plus dirigée vers la partie dolichol. En effet, l'hydrolyse de la liaison pyrophosphate se produit en présence de concanavoline A et cette réaction est fortement inhibée en présence de phospho-dolichol. Ces résultats sont néanmoins préliminaires ; la purification de l'enzyme et la préparation d'oligosaccharide-PP-Dol d'une seule espèce glycanique nous permettra d'être plus précis dans cette étude de spécificité d'action.

CONCLUSIONS

* L'étude de la solubilisation des membranes par des détergents et l'attaque trypsique des vésicules ouvertes par traitement alcalin permettent de penser que cette pyrophosphatase a son site actif dirigé vers la face luminale du réticulum endoplasmique. Les premiers essais de fractionnement séquentiel et de chromatographie de partage de phases en utilisant le Triton X-114 révèlent un caractère nettement hydrophile de cette activité.

* l'étude de l'hydrolyse *in vitro* d'oligosaccharides phosphatés montre que les membranes microsomales de levure sont équipées de glucosidases et de mannosidases, mais sont incapables de déphosphoryler ce matériel oligosaccharidique. En outre, l'absence d'oligosaccharides neutres confirme que la levure est le bon modèle, puisqu'aucune activité endo- β -N-acétylglucosaminidase n'est présente.

* La présence d'oligosaccharides neutres à côté d'oligosaccharides phosphatés, l'activation par la température, l'inhibition par les ions fluorure et phosphate de l'activité phosphatasique des membranes laissent soupçonner qu'il existerait :

**une autre activité hydrolytique des oligosaccharide-PP-Dol
amenant directement la libération d'oligosaccharides neutres.**

Les recherches entreprises en collaboration avec R. Cacan, A. Lepers et A. Verbert sur la localisation subcellulaire du matériel oligosaccharidique libéré dans le splénocyte de Souris et sur la destinée de ce matériel dans la cellule, font apparaître que ce dernier subit une dégradation progressive dans le réticulum endoplasmique puis se retrouve dans le cytosol pour y être transformé en espèces plus petites.

L'état de la question peut se résumer à l'aide du schéma ci-contre.

Ce schéma est très incomplet. En effet, Hanover et Lennarz [393] ont obtenu après congélation et décongélation des microsomes d'oviducte de Poule la libération sous forme neutre de 40 % des oligosaccharides synthétisés *in vitro*. Quelle serait leur origine ? Ces oligosaccharides restant emprisonnés dans la lumière des microsomes pourraient provenir :

. soit d'une hydrolyse de la liaison pyrophosphate suivie d'une déphosphosylation rapide,

. soit de l'hydrolyse de la liaison phosphoester du premier résidu de N-acétylglucosamine ou d'une action secondaire de l'oligosaccharidyl transférase comme un transfert sur l'eau.

Les résultats présentés dans l'article 2 ainsi que dans la partie complémentaire montrent que dans le réticulum endoplasmique la dégradation s'arrête à l'espèce M_6Gn_2P .

Par ailleurs peuvent exister des réactions de conversion des espèces $G_3M_9Gn_2$ et M_9Gn_2 pour aboutir :

- . soit à M_6Gn_2 qui serait ensuite dégradé en M_5Gn ,
- . soit à M_5Gn_2 dont on ignore la destinée.

La présence d'oligosaccharides neutres et chargés au cours des expériences de marquage effectuées *in vivo* et *in vitro* ne permet pas de déterminer le mécanisme exact de leur filiation et de leur destinée. Les résultats présentés dans l'article 2, et plus particulièrement la présence dans le cytosol d'oligosaccharides ne possédant qu'un seul résidu de N-acétylglucosamine en position terminale réductrice, permettent d'envisager l'existence d'une endo- β -N-acétylglucosaminidase située soit dans le RER, comme le proposent Anumula et Spiro [394], ou dans le cytoplasme comme l'enzyme décrit par Pierce et al. [395,396].

PERSPECTIVES

Le thème général des recherches effectuées par le groupe de A. Verbert porte sur l'étude de la régulation de la biosynthèse des glycoconjugués.

Les résultats obtenus démontrent que les oligosaccharide-pyrophospho-dolichols peuvent suivre deux voies métaboliques opposées :

- l'une vers la glycosylation des protéines,
- l'autre vers leur dégradation en phospho-oligosaccharides.

Ceci nous amène à nous poser deux questions :

La "pyrophosphatase" spécifique mise en évidence dans le travail qui vient d'être présenté fait-elle partie intégrante du complexe de glycosylation ?

Quelle est la signification biologique des phospho-oligosaccharides libérés ?

C'est pour répondre à ces deux questions que nous allons poursuivre ce travail par l'isolement de la protéine responsable de cette activité pyrophosphatasique et l'identification du gène correspondant.

Cette démarche nous permettra à plus long terme, de connaître le rôle de son expression dans la cellule.

APPENDICE TECHNIQUE

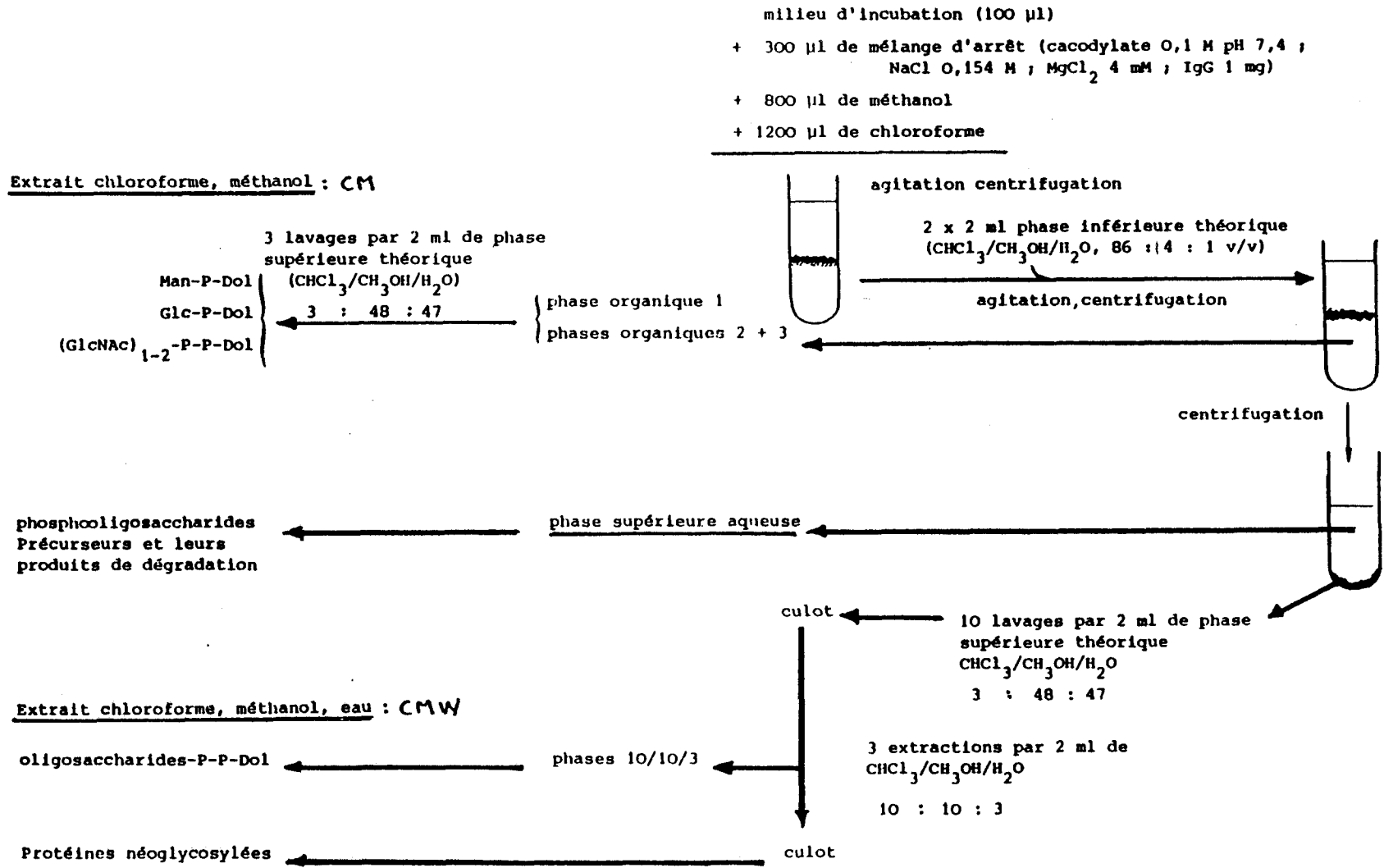


FIGURE 52: Extraction séquentielle des intermédiaires lipidiques

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

I - PREPARATION DES SPENOCYTES DE SOURIS ET PERMEABILISATION

Les splénocytes sont préparés à partir de rate de Souris (Swiss) âgées de 6 semaines environ. Dans un premier temps, la rate est dilacérée dans le milieu MEM sans glucose. Après filtration sur grille (1 mm) et sur gaze (48 μ m), la suspension est centrifugée à 500 xg pendant 5 min. Le culot cellulaire obtenu à partir de 4 rates est resuspendu dans le milieu MEM sans glucose à raison de 20.10⁶ cellules par ml.

Les incorporations *in vivo* de précurseurs radioactifs sont effectuées directement à l'aide de cette suspension de cellules dont les hématies n'ont pas été éliminées.

La perméabilisation des splénocytes et l'hémolyse des hématies sont obtenues par action de NH₄Cl 0,154 M pendant 20 min à température ambiante puis d'une filtration sur gaze, d'une centrifugation et d'un lavage par 20 ml de milieu MEM sans glucose.

II - EXTRACTION SEQUENTIELLE DES INTERMEDIAIRES LIPIDIQUES

Les différentes étapes de la méthode sont décrites dans la figure 52 ci-contre.

Cette méthode de préparation nous permet d'obtenir :

1 - Une phase aqueuse renfermant les glycosyl-nucléotides marqués, leurs produits de dégradation (ose-1-phosphate, ose) et les produits de dégradation des intermédiaires lipidiques (phospho-oligosaccharides et oligosaccharides neutres) ;

2 - Une phase chloroforme/méthanol (CM) contenant les intermédiaires lipidiques de type dolichol contenant un ou deux résidus glycosyl : Man-P-Dol, Glc-P-Dol, GlcNAc₁₋₂-PP-Dol, ainsi que les sphingolipides et certains gangliosides.

3 - Une phase chloroforme/méthanol/eau (CMW) qui permet l'extraction des oligosaccharide-PP-Dol et des gangliosides les plus hydrophiles.

4 - Un résidu protéique renfermant entre autre les protéines nouvellement glycosylées.

III - CARACTERISATION DES PRODUITS OBTENUS DANS LA PHASE CMW

A - COMPORTEMENT CHROMATOGRAPHIQUE DES INTERMEDIAIRES LIPIDIQUES SUR COLONNE D'ECHANGE D'IONS (DEAE - CELLULOSE)

La DEAE-cellulose permet de retenir les dérivés polypréniques selon leur charge électrique, c'est-à-dire selon qu'ils possèdent un groupement phosphate ou pyrophosphate.

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 et par le mélange chloroforme/méthanol (2:1, V/V). Elle est ensuite remise en suspension dans ce même solvant et des colonnes de 1 ml sont montées dans des pipettes Pasteur. L'échantillon est déposé au sommet de la colonne. L'élution est réalisée par passages successifs de 20 ml de différents solvants :

- a : chloroforme/méthanol (2:1, V/V)
- b : méthanol
- c : chloroforme/méthanol (2:1, V/V) contenant de l'acétate d'ammonium 10 mM
- d : chloroforme/méthanol (2:1, V/V) contenant de l'acétate d'ammonium 50 mM
- e : chloroforme/méthanol/eau (10:10:3, V/V/V) contenant de l'acétate d'ammonium 10 mM.

Les oligosaccharide-PP-Dol obtenus sont ensuite désalés sur Sephadex LH-20 en utilisant le mélange CMW.

B - TRAITEMENTS "MENAGES" PAR LES ACIDES ET LES BASES

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

1 - Hydrolyse acide douce

Nous avons utilisé la technique suivante : dans un tube à méthanolyse on mélange 1 ml d'extrait CMW et 1 ml HCl 20 mM dans un mélange méthanol/eau (1:1, V/V). Après 15 min à 100°C le tube est refroidi, puis le milieu est neutralisé par 1 ml de NaOH 20 mM dans du méthanol. La phase aqueuse supérieure contient le matériel oligosaccharidique libéré.

2 - Hydrolyse alcaline douce

Nous avons utilisé la technique suivante : dans un tube à méthanolyse on mélange 1 ml d'extrait CMW et 1ml de NH₄OH à 20 % dans l'eau. Après 1 heure à 100°C le tube est refroidi, puis on extrait le matériel lipidique par 3 fois 1ml de chloroforme. La phase aqueuse supérieure contient le matériel oligosaccharidique libéré.

IV - CARACTERISATION DES PRODUITS OBTENUS DANS LES PHASES AQUEUSES PAR HPLC

Les phases aqueuses provenant de l'extraction séquentielle des intermédiaires lipidiques ou du partage de phase au Triton X-114 sont débarassées du détergent et concentrées sous vide, puis reprises par 1 ml d'acide acétique 0,1M.

L'échantillon est déposé au sommet d'une colonne (1x100 cm) de Bio-Gel P-2. L'élution est réalisée par de l'acide acétique 0,1 M à un débit de 12 ml/h. La fraction exclue du gel est ensuite concentrée sous vide, dissoute dans 100 μ l de mélange acétonitrile/eau (7:3, V/V), filtrée sur filtre de 0,22 μ m puis injectée sur une colonne (4,6 x 250 mm) de silice-amino-propyl [Supelcosil LC-NH₂ (5 μ m)]. L'élution est réalisée à un débit de 1 ml/min par un gradient linéaire amenant la proportion d'eau de 30 à 45 % en 1 heure pour les oligosaccharides neutres. L'élution des oligosaccharides phosphatés est ensuite obtenue par un gradient linéaire de force ionique en remplaçant progressivement les 45 % d'eau par 50 % de phosphate pH 5,5 à 1 % (P/V) pour terminer par un palier de force ionique constante pendant 40 min.

La séparation des produits marqués est suivie par détection continue de la radioactivité à l'aide d'un détecteur β -"flow-one" (Flotec, France) et de liquide scintillant Luma Flow II (Lumac, Hollande).

BIBLIOGRAPHIE

	<u>Références</u>	<u>Pages</u>
Abeijon, C. et Hirschberg, C.B. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85 : 1010-1014	3	6
Adair, W.L. et Robertson, S. (1980) Biochem. J., 189 : 441-445.	92 281	21 57
Adair, W.L. et Keller, R.K. (1982) J. Biol. Chem., 257 : 8990-8996.	52	16
Adair, W.L. et Cafmeyer, N. (1983) Biochim. Biophys. Acta, 751 : 21-26.	100	24
Adair, W.L., Cafmeyer, N. et Keller, R.K. (1984) J. Biol. Chem., 259 : 4441-4446.	359	99
Adair, W.L. et Cafmeyer, N. (1987) Chem. Scr., 27 : 19-23.	282	57
Adair, W.L. et Cafmeyer, N. (1987) Arch. Biochem. Biophys., 258 : 491-497.	295	59
Albright, C.F., Orlean, P. et Robbins, P.W. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86 : 7366-7369	91 140	21 33
Allen, C.M., Jr., Kalin, J.R., Sack, J. et Verizzo, D. (1978) Biochemistry, 17 : 5020-5026.	43	14
Anumula, R.K. et Spiro, R.G. (1983) J. Biol. Chem., 258 : 15271-15282.	332 334 336 394	65 65 65 139
Appelkvist, E.L., Chojnacki, T. et Dallner, G. (1981) Biosci. Rep., 1 : 619-626.	288	58
Appelkvist, E.L. (1987) Acta Chem. Scand., B41 : 73-75.	55	16
Appelkvist, E.L. et Dallner, G. (1987) in "Peroxisomes in Biology and Medicine", Fahimi, H.D. et Sies, H. (Eds.) Springer - Verlag, Berlin, 53-66.	56	16
Arakawa, H. et Mookerjea, S. (1984) Eur. J. Biochem., 140 : 297-302.	78	20
Astrand, I-M., Fries, E., Chojnacki, T. et Dallner, G. (1986) Eur. J. Biochem., 155 : 447-452.	51 278	16 57
Attias, J. et Bonnet, J.L. (1972) Biochim. Biophys. Acta, 268 : 422-430.	357 362	97 100

Aubert, J.P., Biserte, G. et Loucheux-Lefebvre, M.H. (1976) Arch. Biochem. Biophys., 175 : 410-418.	204	44
Aubert, J.P., Helbecque, N. et Loucheux-Lefebvre, M.H. (1981) Arch. Biochem. Biophys., 208 : 20-29.	206	44
Babczynski, P. et Tanner, W. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun., 54 : 1119-1124.	141 343	33 70
Ballou, C.E. (1976) Adv. Microb. Physiol., 14 : 93-158.	8	8
Ballou, L., Gopal, P., Krummel, B., Tammi, M. et Ballou, C.E. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 83 : 3081-3085.	225	46
Banerjee, D.K., Kousvelari, E.E. et Baum, B.J. (1985) Biochem. Biophys. Res. Commun., 126 : 123-129.	324	64
Banerjee, D.K., Kousvelari, E.E. et Baum, B.J. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84 : 6389-6393.	325	64
Banerjee, D.K. (1988) Indian J. Biochem. Biophys., 25 : 8-13.	311	62
Banerjee, D.K. (1989) J. Biol. Chem., 264 : 2024-2028.	169	36
Barnes, G., Hansen, W., Holcomb, C. et Rine, J. (1984) Mol. Cell. Biol., 4 : 2381-2388.	89 158	21 35
Bause, E. et Lehle, L. (1979) Eur. J. Biochem., 101 : 531-540.	144	33
Bause, E. et Legler, G. (1981) Biochem. J., 195 : 639-644.	208	45
Bause, E., Hettkamp, H. et Legler, G. (1982) Biochem. J., 203 : 761-768.	207	44
Bause, E. (1983) Biochem. J., 209 : 323-330.	209 247	45 47
Bause, E. (1984) Biochem. Soc. Trans., 12 : 514-517.	248	47
Baynes, J.W., Hsu, A.-F. et Heath, E.C. (1973) J. Biol. Chem., 248 : 5693-5704.	138 326	33 64
Beeley, J.G. (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun., 76 : 1051-1055.	205	44

Behrens, N.H., Parodi, A.J. et Leloir, L.F. (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 68 : 2857-2860.	174	38
Belocopitow, E. et Boscoboïnik, D. (1982) Eur. J. Biochem., 125 : 167-173.	289	58
Bergman, L.W. et Kuehl, W.M. (1978) Biochemistry, 17 : 5174-5180.	68	19
Bordier, C. (1981) J. Biol. Chem., 256 : 1604-1607.	351 352	76 77
Bosch, M., Trombetta, S., Engstrom, U. et Parodi, A.J. (1986) J. Biol. Chem., 263 : 17360-17365.	243	47
Bretthauer, R.K. et Wu, S. (1975) Arch. Biochem. Biophys., 167 : 151-160.	143	33
Brown, M.S. et Goldstein, J.L. (1980) J. Lipid Res., 21 : 505-517.	277	57
Byrd, J.C., Tarentino, A.L., Maley, F., Atkinson, P.H. et Trimble, R.B. (1982) J. Biol. Chem., 257 : 14657-14666.	9	9
Cacan, R., Hoflack, B. et Verbert, A. (1980) Eur. J. Biochem., 106 : 473-479.	328 340 346 383	65 70 72 122
Cacan, R., Cecchelli, R. et Verbert, A. (1987) Eur. J. Biochem., 166 : 469-474.	335 348 384 390	65 75 122 126
Caltabiano, M.M., Koestler, T.P., Poste, G. et Greig, R.G. (1986) J. Biol. Chem., 261 : 13381-13386.	308	61
Capasso, J.M., Abeijon, C. et Hirschberg, C.B. (1988) J. Biol. Chem., 263 : 19778-19782.	4	6
Carson, D.D., Earles, B.J. et Lennarz, W.J. (1981) J. Biol. Chem., 256 : 11552-11557.	218 284	57
Catterall, J.B., O'Malley, B.W., Robertson, M.A., Staden, R., Tanaka, Y. et Brownlee, G.G. (1978) Nature, 275 : 510-513.	212 219	45 45
Cecchelli, R., Cacan, R. et Verbert, A. (1985) Eur. J. Biochem., 153 : 111-116.	341 373	70 105
Chalifour, R.J. et Spiro, R.G. (1988) J. Biol. Chem., 263 : 15673-15680.	349 369 378	75 103 111

Chambers, J.P. et Elbein, A.D. (1975) J. Biol. Chem., 250 : 6904-6915.	317	63
Chambers, J.P., Forsee, W.T. et Elbein, A.D. (1977) J. Biol. Chem., 252 : 2498-2506.	128 318 371	29 63 105
Chapman, A., Li, E. et Kornfeld, S. (1979) J. Biol. Chem., 254 : 10243-10249.	118	27
Chapman, A., Fujimoto, K. et Kornfeld, S. (1980) J. Biol. Chem., 255 : 4441-4446.	162	35
Chapman, A.E. et Calhoun, J.C. (1988) Arch. Biochem. Biophys. 260 : 320-333.	230 237 314	46 47 63
Chen, W.W. et Lennarz, W.J. (1977) J. Biol. Chem., 252 : 3473-3479.	232	47
Chen, W.W. et Lennarz, W.J. (1978) J. Biol. Chem., 253 : 5780-5785.	120	28
Cheng, S., Gong, Q., Parkison, C., Robinson, E.A., Appella, E., Merlino, G.T. et Pastan, I. (1987) J. Biol. Chem., 262 : 11221-11227.	275	55
Chojnacki, .T. et Dallner, G. (1988) Biochem. J., 251 : 1-9.	48 93	15 21
Chu, F.K. et Maley, F. (1980) J. Biol. Chem., 255 : 6392-6397.	313	62
Clark, G.F., Miller, K.R. et Smith, P.B. (1983) J. Biol. Chem., 258 : 14263-14270.	297	59
Conchie, J. et Strachan, I. (1980) Carbohydr. Res., 63 : 193-216.	6	8
Connelly, L.W. et Keller, R.K. (1984) Biosci. Rep., 4 : 771-776.	61	17
Conzelmann, A., Riezman, H., Desponds, C. et Bron, C. (1988) EMBO J., 7 : 2233-2240.	165	36
Couto. J.R., Huffaker, T.C. et Robbins, P.W. (1984) J. Biol. Chem., 259 : 378-382.	117	27
Criscuolo, B. et Krag, S. (1982) J. Cell Biol., 94 : 586-591.	86	21

Dallner, G. et Hemming, F.W. (1981) in "Mitochondria and Microsomes", Lee, C.P., Schatz, G. et Dallner, G. (Eds.) Addison-Wesley, Reading, MA, 655-682.	18	11
Das, R. et Heath, E.C. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77 : 3811-3815.	263 365 372	52 103 105
Datema, R. et Schwarz, R.T. (1980) Eur. J. Biochem., 109 : 331-341.	319	63
Datema, R. et Schwarz, R.T. (1981) J. Biol. Chem., 256 : 11191-11198.	321	63
de Iannino N.I. et Dankert, M.A. (1988) Arch. Biochem. Biophys., 260 : 139-145.	185	39
de Ropp, J.S. et Troy, F.A. (1985) J. Biol. Chem., 260 : 15669-15674.	27 34	12 12
de Ropp, J.S., Knudsen, M.J. et Troy, F.A. (1987) Chem. Scr., 27 : 101-108.	28	12
DeRosa, P.A. et Lucas, J.J. (1982) J. Biol. Chem., 257 : 1017-1024.	300	60
Dutt. A., Tang, J.P., Welply, J.K. et Carson, D.D. (1986) Endocrinology, 118 : 661-673.	304	60
Edman, J.C., Ellis, L., Blacher, R.W., Roth, R.A. et Rutter, W.J. (1985) Nature, 317 : 267-270.	273	55
Eggens, I., Chojnacki, T., Kenne, L. et Dallner, G. (1983) Biochim. Biophys. Acta, 751 : 355-368.	283	57
Ekström, T., Eggens, I. et Dallner, G. (1982) FEBS Lett., 150 : 133-136.	54	16
Ekström, T.J., Chojnacki, T. et Dallner, G. (1984) J. Biol. Chem., 259 : 10460-10468.	44	14
Elbein, A.D. (1979) Ann. Rev. Plant. Physiol., 30 : 239-272.	103	25
Elbein, A.D. (1981) Biochem. J., 193 : 477-485.	168	36
Elmberger, P.G., Kalén, A., Appelkvist, E.L. et Dallner, G. (1987) Eur. J. Biochem., 168 : 1-11.	57	16
Elmberger, P.G. et Engfeldt, P. (1985) Acta Chem. Scand., B39 : 323-325.	62	17

Esmon, B., Esmon, P.C. et Schekman, R. (1984) J. Biol. Chem., 259 : 10322-10327.	13	9
Evans, P.J. et Hemming, F.W. (1973) FEBS Lett., 31 : 335-338.	137	33
Feldman, R.I., Bernstein, M. et Schekman, R. (1987) J. Biol. Chem., 262 : 9332-9339.	149 381	34 118
Forsee, W.T., Griffin, J.A. et Schutzbach, J.S. (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun., 75 : 799-805.	127 370	29 105
Franc, J.L. et Bouchilloux, S. (1984) Biochim. Biophys. Acta, 800 : 166-170.	366	103
Freeze, H.H., Willies, L., Hamilton, S. et Koza-Taylor, P. (1989) J. Biol. Chem., 264 : 5653-5659.	173	37
Fujiki, Y., Hubbard, A.L., Fowler, S., et Lazarow, P.B. (1982) J. Cell Biol., 93 : 97-102.	380	115
Gasnier, F., Morelis, R., Louisot, P. et Gateau, O. (1987) Biochim. Biophys. Acta, 925 : 297-304.	145	33
Geetha-Habib, M., Noiva, R., Kaplan, H.A. et Lennarz, W.J. (1988) Cell, 54 : 1053-1060.	271	55
Glabe, C.G., Hanover, J.A. et Lennarz, W.J. (1980) J. Biol. Chem., 255 : 9236-9242.	213 217 259	45 45 51
Gold, P. et Green, M. (1983) J. Biol. Chem., 258 : 12967-12975.	179	38
Grange, D.K. et Adair, W.L. (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun., 79 : 734-740.	46	15
Grant, S.R., Welply, J.K., Olson, E.N. et Lennarz, W.J. (1986) Arch. Biochem. Biophys., 248 : 424-428.	305	61
Gruner, S.M. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82 : 3665-3669.	26	12
Hanover, J.A. et Lennarz, W.J. (1979) J. Biol. Chem., 254 : 9237-9246.	106	25
Hanover, J.A. et Lennarz, W.J. (1980) J. Biol. Chem., 255 : 3600-3604.	72 150 192 382	19 34 41 118

Hanover, J.A. et Lennarz, W.J. (1981)	31	12
Arch. Biochem. Biophys., 211 : 1-19.	98	22
	254	51
Hanover, J.A. et Lennarz, W.J. (1982)	107	25
J. Biol. Chem., 257 : 2787-2794.	109	25
	184	39
	331	65
	393	138
Harford, J.B. et Waechter, C.J. (1977)	294	58
Biochem. Biophys. Res. Commun.,		
76 : 1036-1043.		
Haselbeck, A. et Tanner, W. (1982)	146	34
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 79 : 1520-1524.	154	34
Haselbeck, A. et Tanner, W. (1984)	155	34
FEMS Microbiol. Lett., 21 : 305-308.		
Haselbeck, A. (1989)	147	34
Eur. J. Biochem., 181 : 663-668.		
Hayes, G.R. et Lucas, J.J. (1983)	302	60
J. Biol. Chem., 258 : 15095-15100.		
Heifetz, A. et Elbein, A.D. (1977)	77	20
J. Biol. Chem., 252 : 3057-3063.		
Heifetz, A. et Eelbein, A.D. (1977)	112	27
Biochem. Biophys. Res. Commun., 75 : 20-28.		
Hemming, F.W. (1974)	16	11
in "Biochemistry of Lipids", Vol. 4,		
Goodwin, T.W. (Eds.) Butterworth, London, 39-97.		
Hemming, F.W. (1983)	17	11
in "Biosynthesis of Isoprenoid Compounds",		
Vol.2, Potter, J.W.L. et Spurgeon, S.L. (Eds.)		
John Wiley, New York, 305-354.		
Herscovics, A., Golovtchenko, A.M., Warren, C.D.	136	33
Bugge, B. et Jeanloz, R.W. (1977)		
J. Biol. Chem., 252 : 224-234.		
Herscovics, A., Bugge, B. et Jeanloz, R.W. (1977)	177	38
J. Biol. Chem., 252 : 2271-2277.		
Herscovics, A., Bugge, B. et Jeanloz, R.W. (1977)	291	58
FEBS Lett., 82 : 215-218.		
Hirschberg, C.B. et Snider, M.D. (1987)	32	12
Ann. Rev. Biochem., 56 : 63-87.	151	34
Hoflack, B., Cacan, R. et Verbert, A. (1981)	222	46
Eur. J. Biochem., 117 : 285-290.	337	65

Hoflack, B., Debeire, P., Cacan, R., Montreuil, J. et Verbert, A. (1982)	235	47
Eur. J. Biochem., 124 : 527-531.	236	47
Hopp, H.E., Romero, P.A., Daleo, G.R. et Pont Lezica, R. (1978)	186	40
Eur. J. Biochem., 84 : 561-571.		
Hopp, H.E., Romero, P.A. et Pont Lezica, R. (1978)	187	40
FEBS Lett., 86 : 259-262.		
Hortin, G. et Boime, I. (1980)	251	49
J. Biol. Chem., 255 : 8007-8010.		
Hortin, G., Stern, A.M., Miller, B., Abeles, R.H. et Boime, I. (1983)	252	49
J. Biol. Chem., 258 : 4047-4050.		
Hsu, A-F., Baynes, J.W. et Heath, E.C. (1974)	327	64
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 71 : 2390-2395.	333	65
	374	107
Hubbard, S.C. et Ivatt, R.J. (1981)	102	25
Ann. Rev. Biochem., 50 : 555-583.	221	46
	250	49
Huffaker, T.C. et Robbins, P.W. (1982)	116	27
J. Biol. Chem., 257 : 3203-3210.		
Huffaker, T.C. et Robbins, P.W. (1983)	125	29
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80 : 7466-7470.	159	35
	170	37
	181	38
Jackson, B.J. et Robbins, P.W. (1986)	126	29
Yeast, 2 : S 166 (Abstr.).		
Jelinek-Kelly, S., Akiyama, T., Saunier, B., Tkacz, J.S. et Herscovics, A. (1985)	11	9
J. Biol. Chem., 260 : 2253-2257.	387	125
Jelinek-Kelly, S. et Herscovics, A. (1988)	12	9
J. Biol. Chem., 263 : 14757-14763.	354	90
	388	125
Jensen, J.W., Springfield, J.D. et Schutzbach, J.S. (1980)	121	28
J. Biol. Chem., 255 : 11268-11272.		
Jensen, J.W. et Schutzbach, J.S. (1981)	122	28
J. Biol. Chem., 256 : 12899-12904.	316	63
Kang, M.S., Spencer, J.P. et Elbein, A.D. (1978)	167	36
J. Biol. Chem., 253 : 8860-8866.	320	63
Kaplan, H.A. et Lennarz, W.J. (1986)	267	53
Fed. Proc., 45 : 1679.		

Kaplan, H.A., Welply, J.K. et Lennarz, W.J. (1987)	196	43
Biochim. Biophys. Acta, 906 : 161-173.	261	51
	270	54
Kaplan, H.A., Naider, F. et Lennarz, W.J. (1988)	269	54
J. Biol. Chem., 263 : 7814-7820.		
Kato, S., Tsuji, M., Nakanishi, Y. et Suzuki, S. (1980)	287	58
Biochem. Biophys. Res. Commun, 95 : 770-776.		
Katz, F.W., Rothman, J.E., Lingappa, V.R., Blobel, G. et Lodish, H.F. (1977)	71	19
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74 : 3278-3282.	256	51
Kaushal, G.P. et Elbein, A.D. (1985)	82	20
J. Biol. Chem., 260 : 16303-16309.		
Kaushal, G.P. et Elbein, A.D. (1986)	113	27
Arch Biochem. Biophys., 250 : 38-47.		
Kaushal, G.P. et Elbein, A.D. (1987)	114	27
Biochemistry, 26 : 7953-7960.		
Kean, E.L. (1980)	306	61
J. Biol. Chem., 255 : 1921-1927.		
Kean, E.L. (1982)	307	61
J. Biol. Chem., 257 : 7952-7954.		
Keenan, R.W., Fischer, J.B. et Kruczek, M.F. (1977)	60	17
Arch. Biochem. Biophys., 179 : 634-642.		
Keller, R.K., Boon, D.Y. et Crum, F.C. (1979)	79	20
Biochemistry, 18 : 3946-3952.	377	111
Keller, R.K. (1986)	41	12
J. Biol. Chem., 261 : 12053-12059.	45	14
	279	57
Keller, R.K., Adair, W.L., Cafmeyer, N., Simion, F.A., Fleischer, B. et Fleischer, S. (1986)	296	59
Arch. Biochem. Biophys., 249 : 207-214.		
Keller, R.K. (1987)	280	57
Chem. Scr., 27 : 63-70.		
Keller, R.K. (1987)	47	15
Trends Biochem. Sci., 12 : 443-445.		
Kilker, R.D. Jr., Saunier, B., Tkacz, J.S. et Herscovics, A. (1981)	385	124
J. Biol. Chem., 256 : 5299-5303.		

Klingenberg, M. (1979) in "Methods in Enzymology", 56 : 229-233. S.P.Colowick et N.O.Kaplan (Eds) Academic Press, N.Y.	358	99
Knecht, D.A., Dimond, R.L., Wheeler, S. et Loomis, W.F. (1984) J. Biol. Chem., 259 : 10633-10640.	172	37
Koch, G.L.E. (1987) J. Cell, Sci., 87 : 491-492.	272	55
Koivu, J., Myllyla, R., Helaakoski, T., Pihlajaniemi, T., Tasanen, K. et Kivirikko, K.I. (1987) J. Biol. Cchem., 262 : 6447-6449.	276	55
Kornfeld, S., Gregory, W. et Chapman, A. (1979) J. Biol. Chem., 254 : 11649-11654.	238 322	47 63
Kornfeld, R. et Kornfeld, S. (1980) in "Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans" Lennarz, W.J. (Eds), Academic Press, New-York, 1-34.	193 199 264	42 44 52
Kousvelari, E.E., Grant, S.R., Banerjee, D.k., Newby, M.J. et Baum, B.J. (1984) Biochem. J., 222 : 17-24.	323	64
Krag, S.S. (1985) Curr. Top. Membr. Transp., 24 : 181-249.	33	12
Krebs, E.G. et Beavo, J. (1979) Ann. Rev. Biochem., 48 : 923-959.	157	35
Kronquist, K.E. et Lennarz, W.J. (1978) J. Supramol. Struct., 8 : 51-65.	211	45
Kuo, S.C. et Lampen, J.O. (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun., 58 : 287-295.	74	20
Lai, C.S. et Schutzbach, J.S. (1984) FEBS Lett., 169 : 279-282.	24	12
Lehle, L. et Tanner, W. (1976) FEBS Lett., 71 : 167-170.	75 105	20 25
Lehle, L. (1980) Eur. J. Biochem., 109 : 589-601.	66 376	19 111
Lehle, L., Schulz, I. et Tanner, W. (1980) Arch. Microbiol., 127 : 213-237.	67	19
Lehrman, M.A., Zhu, X. et Khounlo, S. (1988) J. Biol. Chem., 263 : 19796-19803.	84 90	21 21

Lennarz, W.J. et Grant, S.R. (1983) Eur. J. Biochem., 134 : 575-583.	315	63
Lennarz, W.J. (1987) Biochemistry, 26 : 7205-7210.	110 132 152	26 31 34
Li, E., Tabas, I. et Kornfeld, S. (1978) J. Biol. Chem., 253 : 7762-7770.	65	19
Li, E., et Kornfeld, S. (1979) J. Biol. Chem., 254 : 1600-1605.	7	8
Li, E., et Kornfeld, S. (1979) J. Biol. Chem., 254 : 2754-2758.	134	31
Lingappa, V.R., Lingappa, J.R., Prasad, R., Ebner, K.E. et Blobel, G. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75 : 2338-2341.	257	51
Löw, P., Peterson, E., Mizuno, M., Takigawa, T., Chojnacki, T. et Dallner, G. (1985) Biochem. Biophys. Res. Commun., 130 : 460-466.	94 96	21 22
Löw, P., Peterson, E., Mizuno, M., Takigawa, T., Chojnacki, T. et Dallner, G. (1986) Biosci. Rep., 6 : 677-683.	97	22
Low, M.G. et Saltiel, A.R. (1988) Science, 239 : 268-275.	164	36
Lucas, J.J. et Levin, E. (1977) J. Biol. Chem., 252 : 4330-4336.	299	60
Maclay, W.N. (1956) J. Colloid Sci., 11 : 272-285.	353	77
Maley, F., Trimble, R.B., Tarentino, A.L. et et Plummer, T.H. Jr. (1989) Anal. Biochem., 180 : 195-204.	339	68
Marshall, R.D. (1974) Biochem. Soc. Symp., 40 : 17-26.	200	44
Mc Closkey, M.A. et Troy, F.A. (1980) Biochemistry 19 : 2061-2066.	35 153	12 34
Mc Dowell, W., Grier, T.J., Rasmussen, J.R. et Schwarz, R.T. (1987) Biochem. J., 248 : 523-531.	123	28
Molnar, J., Chao, H. et Ikehara, Y. (1971) Biochim. Biophys. Acta, 239 : 401-410.	73	20
Monti, J.A., Christian, S.T. et Schutzbach, J.S. (1987) Biochim. Biophys. Acta, 905 : 133-142.	30	12

Montreuil, J., Monsigny, M., Spik, G., Duquesne, N., Chéron, A., Descamps, J. et Fournet, B. (1969) Z. Physiol. Chem., 350 : 664.	197	44
Montreuil, J. (1982) in "Comprehensive Biochemistry", Vol. 19B-Part II, Neuberger, A., Van Deenen, L.L.M. (Eds.), Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, Oxford, New-York, 1-188.	4a 195	7 43
Montreuil, J. (1984) Biol. Cell, 51 : 115-132.	1 5	5 7
Moraes, C.T., Bosh, M. et Parodi, A.J. (1988) Biochemistry, 27 : 1543-1549.	183	39
Murgolo, N.J. et Wong, T.K. (1986) Fed. Proc., Fed. Am. Soc. Exp. Biol., 45 : 1669.	37	12
Murgolo, N.J., Patel, A., Stivala, S.S. et Wong, T.K. (1989) Biochemistry, 28 : 253-260.	38	12
Murphy, L.A. et Spiro, R.G. (1981) J. Biol. Chem., 256 : 7487-7494.	191 228	41 46
Neuberger, A. (1968) Communication au Symposium de Bochum	199a	44
Niewiarowska, A., Caltabiano, M.M., Bailey, D.S., Poste, G. et Greig, R.G. (1987) J. Biol. Chem., 262 : 14815-14820.	309	61
Oda-Tamai, S., Kato, S. et Akamatsu, N. (1989) Biochem. J., 261 : 371-375.	298	59
Oliver, G.J.A., Harrison, J. et Hemming, F.W. (1975) Eur. J. Biochem, 58 : 223-229.	330	65
Orlean, P., Albright, C. et Robbins, P.W. (1988) J. Biol. Chem., 263 : 17499-17507.	156	35
Palamarczyk, G. et Chojnacki, T. (1973) FEBS Lett., 34 : 201-203.	175	38
Palamarczyk, G., Lehle, L. et Tanner, W. (1979) FEBS Lett., 108 : 111-115.	81	20
Palamarczyk, G., Lehle, L., Mankowski, T., Chojnaki, T. et Tanner, W. (1980) Eur. J. Biochem., 105 : 517-523.	95	22
Pan, Y.T. et Elbein, A.D. (1985) Arch. Biochem. Biophys., 242 : 447-456.	135	32

Parodi, A.J., (1977) Eur. J. Biochem., 75 : 171-180.	176	38
Parodi, A.J. et Leloir, L.F. (1979) Biochim. Biophys. Acta, 559 : 1-37.	63	19
Parodi, A.J. (1979) J. Biol. Chem., 254 : 8343-8352.	344	72
Parodi, A.J., Quesada-Allue, L.A. et Cazzulo, J.J. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 78 : 6201-6205.	233	47
Parodi, A.J. et Quesada-Allue, L.A. (1982) J. Biol. Chem., 257 : 7637-7640.	240	47
Parodi, A.J., Martin-Barrientos, J. et Engel, J.C. (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun., 118 : 1-7.	241	47
Pennock, J.F., Hemming, F.W. et Morton, R.A. (1960) Nature, 186 : 470-472.	15	11
Perez, M. et Hirschberg, C.B. (1985) J. Biol. Chem., 260 : 4671-4678.	99	23
Pierce, R.J., Spik, G. et Montreuil, J. (1979) Biochem J., 180 : 673-676.	395	139
Pierce, R.J., Spik, G. et Montreuil, J. (1980) Biochem. J., 185 : 261-264.	396	139
Pihlajaniemi, T., Helaakvski, T., Tasanen, K., Myllyla, R., Huhtala, M-L-, Koivu, J. et Kivirikko, K.I. (1987) EMBO J., 6 : 643-649.	274	55
Pless, D.D. et Lennarz, W.J. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74 : 134-138.	210	45
Previato, J.O., Mendelzou, D.H. et Parodi, A.J. (1986) Mol. Biochem. Parasitol., 18 : 343-353.	182 242	39 47
Pryde, J.G. et Phillips, J.H. (1986) Biochem. J., 233 : 525-533.	350	76
Rathod, P.K., Tashjian, A.H. et Abeles, R.H. (1986) J. Biol. Chem., 261 : 6461-6469.	253	49
Ravoet, A.M., Amar-Costesec, A., Godelaine, D. et Beaufay, H. (1981) J. Cell. Biol., 91 : 679-688.	76 180	20 38
Reuvers, F., Boer, P. et Steyn-Parvé, E.P. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun., 82 : 800-804.	292	58

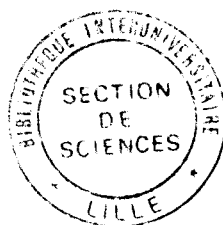
Richard, M., Tytgat, F. et Louisot, P. (1978) Biochimie, 60 : 593-599.	329	65
Rine, J., Hansen, W., Hardeman, E., et Davis, R. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80 : 6750-6754.	85 88	21 21
Rip, J.W., Rupar, C.A., Ravi, K. et Carroll, K.K. (1985) Prog. Lipid. Res., 24 : 269-309.	19	11
Rip, J.W. et Carroll, K.K. (1985) Biochem. J., 227 : 705-710.	59	17
Robbins, P.W., Hubbard, S.C., Turco, S.J. et Wirth, D.F. (1977) Cell, 12 : 893-900.	64	19
Roberts, J.L., Phillips, M., Rosa, P.A. et Herbert, E. (1978) Biochemistry, 17 : 3609-3618.	69	19
Roitsch, T. et Lehle, L. (1989) Eur. J. Biochem., 181 : 525-529.	202	44
Romero, P. et Herscovics, A. (1986) J. Biol. Chem., 261 : 15936-15940.	245	47
Ronnett, G.O. et Lane, M.D. (1981) J. Biol. Chem., 256 : 4704-4707.	70	19
Rossignol, D.P., Scher, M., Waechter, C.J. et Lennarz, W.J. (1983) J. Biol. Chem., 258 : 9122-9127.	50	16
Rothman, J.E. et Lodish, H.F. (1975) Nature, 269 : 775-780.	258	51
Runge, K.W., Huffaker, T.C. et Robbins, P.W. (1984) J. Biol. Chem., 259 : 412-417.	160 189	35 41
Runge, K.W. (1985) Yeast mutations in the glucosylation steps of the asparagine-linked glycosylation pathway. PhD Thesis, M.I.T. Cambridge, U.S.A.	171	37
Runge, K.W. et Robbins, P.W. (1986) J. Biol. Chem., 261 : 15582-15590.	161 190	35 41
Sabbatini, D.D. et Blobel, G. (1970) J. Cell Biol., 45 : 146-157.	216	45
Sagami, H. et Lennarz, W.J. (1987) J. Biol. Chem., 262 : 15610-15617.	58 111	16 26

Saunier, B., Kilker, R.D.Jr., Thacz, J.S., Quaroni, A. et Herscovics, A. (1982) J. Biol. Chem., 257 : 14155-14161.	386	124
Scheffer, A.J. et Beintema, J.J. (1974) Eur. J. Biochem., 46 : 221-223.	203	44
Scher, M.G. et Waechter, C.J. (1984) J. Biol. Chem., 259 : 14580-14585.	290 356 361 392	58 97 99 136
Schlesinger, M.J., Ashburner, M. et Tissières, A. (Eds.) (1982) "Heat Shock : From Bacteria to Man", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.	310	62
Schutzbach, J.S. et Verma, A.K. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun., 71 : 203-211.	129	29
Schwarz, R.T., Mayor, S., Menon, A.K. et Cross, G.A.M. (1989) Biochem. Soc. Trans., 17 : 746-748.	166	36
Shailubhai, K., Dong-Yu, B., Saxena, E.S. et Vijay, I.K. (1988) J. Biol. Chem., 263 : 15964-15972.	83	20
Shapiro, D.J. Taylor, J.M., Mc Knight, G.S., Palacios, R., Gonzalez, C., Kiely, M.L. et Schimke, R.T. (1974) J. Biol. Chem., 249 : 3665-3671.	215	45
Sharma, C.B., Babczinski, P., Lehle, L. et Tanner, W. (1974) Eur. J. Biochem., 46 : 35-41.	142 342	33 70
Sharma, C.B., Lehle, L. et Tanner, W. (1981) Eur. J. Biochem., 116 : 101-108.	234 244 246 366 379	47 47 47 103 113
Sharma, C.B., Lehle, L. et Tanner, W. (1982) Eur. J. Biochem., 126 : 319-325.	115	27
Sheares, B.T. et Robbins, P.W. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 83 : 1993-1997.	214	45
Shibaev, V.N. (1978) Pure Appl. Chem., 50 : 1421-1436.	124	28
Shibata, S., Saito, H. et Nakanishi, H. (1982) Biochim. Biophys. Acta, 714 : 456-464.	3a	6
Singh, B.N. et Lucas, J.J. (1981) J. Biol. Chem., 256 : 12018-12022.	301	60

Smirnova, I.N., Baykov, A.A. et Avaeva, S.M. (1986) FEBS Lett., 206 : 121-124.	360	99
Smirnova, I.N., Kudryavtseva, N.A., Komissarenko, S.V., Tarusova, N.B. et Baykov, A.A. (1988) Arch. Biochem. Biophys., 267 : 280-284.	364	102
Snider, M.D., Sultzman, L.A. et Robbins, P.W. (1980) Cell, 21 : 385-392.	108 148	25 34
Snider, M.D. et Robbins, P.W. (1982) J. Biol. Chem., 257 : 6796-6801.	194	42
Snider, M.D. et Rogers, O.C. (1984) Cell, 36 : 753-761.	131 231 255	31 46 51
Spiro, R.G. (1970) Ann. Rev. Biochem., 39 : 599-638.	198	44
Spiro, M.J., Spiro, R.G. et Bhoyroo, V.D. (1979) J. Biol. Chem., 254 : 7668-7674.	368	103
Spiro, R.G., Spiro, M.J. et Bhoyroo, V.D. (1983) J. Biol. Chem., 258 : 9469-9476.	229	46
Spiro, M.J. et Spiro, R.G. (1985) J. Biol. Chem., 260 : 5808-5815.	101	24
Staneloni, R.J. et Leloir, L.F. (1979) TIBS, 4 : 65-67.	224	46
Stoll, J., Robbins, A.R. et Krag, S.S. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 79 : 2296-2300.	163	35
Stoll, J. et Krag, S.S. (1988) J. Biol. Chem., 263 : 10766-10773.	20 285	11 58
Stoll, J., Rosenwald, A.G. et Krag, S.S. (1988) J. Biol. Chem., 263 : 10774-10782.	21 42	11 14
Struck, D.K. et Lennarz, W.J. (1980) in "The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans", Lennarz, W.J. (Ed.) Plenum Press, London, 35-84.	36 104 201	12 25 44
Tanner, W. et Lehle, F. (1987) Biochim. Biophys. Acta, 906 : 81-99.	338	68
Tavares, I.A., Coolbear, T. et Hemming, F.W. (1981) Arch. Biochem. Biophys., 207 : 427-436.	22	11
Tollbom, O. et Dallner, G. (1986) Br. J. Exp. Pathol., 67 : 757-764.	23	11

Tollbom, O., Chojnacki, T. et Dallner, G. (1989) J. Biol. Chem., 264 : 9836-9841.	49	15
Torossian, K. et Maclachlan, G. (1987) Biochim. Biophys. Acta, 925 : 305-313.	188	40
Torres, C.R. et Hart, G.W. (1984) J. Biol. Chem., 259 : 3308-3317	2	6
Trimble, R.B., Maley, F. et Tarentino, A.L. (1980) J. Biol. Chem., 255 : 10232-10238.	226 312	46 62
Trimble, R.B., Byrd, J.C. et Maley, F. (1980) J. Biol. Chem., 255 : 11892-11895.	227	46
Trimble, R.B. et Atkinson, P.H. (1986) J. Biol. Chem., 261 : 9815-9824.	10	9
Tsai, P-K., Frevert, J. et Ballou, C.E. (1984) J. Biol. Chem., 259 : 3805-3811.	14	9
Turco, S.J., Stetson, B. et Robbins, P.W. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74 : 4411-4414.	223	46
Valtersson, C., Van Duijn, G., Verkleij, A.J., Chojnacki, T., de Kruijff, B. et Dallner, G. (1985) J. Biol. Chem., 260 : 2742-2751.	25	12
Van Duijn, G., Verkleij, A.J., de Kruijff, B., Valtersson, C., Dallner, G. et Chojnacki, T., (1987) Chem. Scr., 27 : 95-100.	29 40	12 12
Van Duijn, G., Valtersson, C., Chojnacki, T., Verkleij, A.J., Dallner, G. et de Kruijff, B. (1986) Biochim. Biophys. Acta, 861 : 211-213.	39	12
Varki, A. et Kornfeld, S. (1980) J. Biol. Chem., 255 : 10847-10858.	347	73
Verma, A.K., Raizada, M. et Schutzbach, J.S. (1977) J. Biol. Chem., 252 : 7235-7242.	130	29
Vijay, I.K., Perdew, G.H. et Lewis, D.E. (1980) J. Biol. Chem., 255 : 11210-11220.	119	28
Vijay, I.K. et Perdew, G.H. (1980) J. Biol. Chem., 255 : 11221-11226.	133	31
Vijay, I.K. et Oka, T. (1986) Eur. J. Biochem., 154 : 57-62.	303	60
Villemez, C.L. et Carlo, R.L. (1979) J. Biol. Chem., 254 : 4814-4819.	178	38

Villemez, C.L. et Carlo, R.L. (1980) J. Biol. Chem., 255 : 8174-8178.	80	20
Waldman, B.C., Oliver, C. et Krag, S. (1987) J. Cell Physiol., 131 : 302-317.	87	21
Waechter, C.J. et Lennarz, W.J. (1976) Ann. Rev. Biochem., 45 : 95-112.	220 249 262	46 49 52
Warren, C.D. et Jeanloz, R.W. (1973) FEBS Lett., 31 : 332-334.	139	33
Wedgwood, J.F. et Strominger, J.L. (1980) J. Biol. Chem., 255 : 1120-1123.	286 293 355 363 391	58 58 97 102 130
Wells, G.B., Turco, S.J., Hanson, B.A. et Lester, R.L. (1981) Anal. Biochem., 110 : 397-406.	375	107
Welply, J.K., Shenbagamurthi, P. Lennarz, W.J., et Naider, F. (1983) J. Biol. Chem., 258 : 11856-11863.	260 265	51 52
Welply, J.K., Shenbagamurthi, P., Naider, F., Park, H.R. et Lennarz, W.J. (1985) J. Biol. Chem., 260 : 6459-6465.	266	52
Welply, J.K., Kaplan, H.A., Shenbagamurthi, P., Naider, F. et Lennarz, W.J. (1986) Arch. Biochem. Biophys., 246 : 808-819.	268	53
Wieland, F., Dompert, W., Bernhardt, G. et Sumper, M. (1980) FEBS Lett., 120 : 110-114.	2a	6
Wong, T.K. et Lennarz, W.J. (1982) J. Biol. Chem., 257 : 6619-6624.	53	16
Yagodnik, C., de la Canal, L. et Parodi, A.J. (1987) Biochemistry, 26 : 5937-5943.	239	47
Yoshihisa, T., Ohsumi, Y. et Anraku, Y. (1988) J. Biol. Chem., 263 : 5158-5163.	389	125
Zueco, J., Mormeneo, S. et Sentandreu, R. (1986) Biochim. Biophys. Acta, 884 : 93-100.	345	72



RESUME DE THESE

La biosynthèse des oligosaccharides liés N-glycosidiquement aux protéines commence par celle d'un précurseur glycolipidique : l'oligosaccharide-pyrophospho-dolichol. Ce produit final du cycle des dolichols peut s'engager soit dans une réaction de transfert "en bloc" sur les protéines, soit dans une voie de dégradation dont "l'enzyme-clef" est une pyrophosphatase spécifique.

Après avoir mis au point une nouvelle méthode de mesure de cette activité hydrolytique, nous avons caractérisé pour la première fois cette pyrophosphatase chez la levure et étudié quelques uns de ses paramètres physico-chimiques et enzymatiques.

Nous avons également étudié la destinée du matériel oligosaccharidique libéré dans le splénocyte de Souris.

D'une part, il apparaît que ce matériel subit une dégradation progressive dans le réticulum endoplasmique puis se retrouve dans le cytosol pour y être transformé en espèces plus petites. D'autre part, le fait que les oligosaccharides neutres ne semblent pas tous provenir des phospho-oligosaccharides laisse soupçonner qu'il existerait une autre activité hydrolytique des oligosaccharide-pyrophospho-dolichols.

La voie de dégradation que nous avons étudiée peut être un point de régulation de la biosynthèse des N-glycoprotéines par le biais du contrôle du taux d'intermédiaires lipidiques disponibles pour la glycosylation.

