

50376  
1994  
157

50376  
1994  
157

# THÈSE



Présentée par :

**CORINNE VILLERS**

pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université  
des Sciences et Technologies de Lille

**Spécialité : Biochimie**

## **Origine et Rôle du matériel oligosaccharidique soluble libéré lors du processus de N-glycosylation**

Soutenue le : 25 Février 1994

La commission d'examen est composée des :

Professeur A. Verbert , président

Professeur R.T. SCHWARTZ et Docteur G. TRUGNAN , rapporteurs

Professeurs Ph. ROUSSEL et R. CACAN , examinateurs

SCD LILLE 1



D 030 259641 9

50376  
1994  
157

50376  
1994  
157

Je voudrais ici exprimer en quelques mots l'estime que j'éprouve pour tous ceux qui ont activement contribué au déroulement et à la réalisation de ma thèse.

Très vifs remerciements à André et René :  
Sans vous, cette thèse n'existerait pas.

André, pour la confiance que vous m'avez témoignée en m'accueillant dans votre laboratoire, me permettant également d'effectuer des stages ou de participer à différents congrès.

René, vos encouragements constants, votre immense disponibilité et les merveilleux "cours particuliers" auxquels j'ai eu droit ont rendu fort agréables ces "quelques années" passées au 005.

A Monsieur Ralph. T. Schwartz

Mon séjour dans votre laboratoire est un excellent souvenir. En plus de votre accueil charmant, nous avons pu aborder la mise en évidence de matériel oligosaccharidique soluble dans des cellules BHK infectées ou non par le Sindbis virus. Soyez remercié de l'intérêt que vous portez à ce travail pour avoir accepté d'en être le rapporteur.

A Monsieur Germain Trugnan

Vous avez accepté de me faire profiter de votre haute compétence scientifique en jugeant ce travail. Je suis très honorée de votre présence dans les membres du jury en tant que rapporteur et vous en remercie vivement.

A Monsieur Philippe Roussel

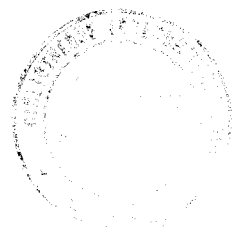
Après avoir été membre du jury de DEA, vous acceptez aujourd'hui de participer à celui de thèse, c'est un grand plaisir pour moi.

Je tiens également à remercier H.S. Conradt qui m'a accueillie dans son laboratoire afin d'étendre mes études de la N-glycosylation aux cellules d'insectes et aux cellules BHK-21 recombinantes.

Je ne saurais terminer sans remercier toute l'équipe du "005" :  
Anne-Marie, Odette, Catherine, Virginie et Daniel.

mais aussi tous ceux qui m'ont conseillée, encouragée ou témoigné leur amitié :  
Madi, Anne, Frédéric et Papy.

ou m'ont "prêté" leur produits précieux :  
Hubert Hondermarck, pour les dipeptides.



Ce travail a été effectué sous la direction du Professeur René Cacan dans le Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Technologies de Lille, UMR n°111 du CNRS dirigée par le Professeur André Verbert. Il a bénéficié d'une allocation de recherche du Ministère de la Recherche et de la Technologie.

Au cours de cette thèse, trois publications et sept communications ont été réalisées :

Publications :

Cacan, R., Villers, C., Bélard, M., Kaiden, A., Krag, S. et Verbert, A. (1992) "Different fates of the oligosaccharide moieties of lipid intermediates." *Glycobiology* 2, 127-136.

Villers, C., Cacan, R., Labiau, O., Mir, A.M. et Verbert, A. (1994) "Release of oligomannoside type glycans as a marker of the degradation of newly synthesized glycoproteins." *Biochem. J.* accepté (vol. 297).

Villers, C., Plancke, Y., Cacan, R. et Verbert, A. (1993) "Rapid detection of the alternative N-glycosylation pathway using high pH anion exchange chromatography." *Glycoconjugate J.* accepté (vol. 10).

Communications :

Cacan, R., Villers, C., Bélard, M., Labiau, O. and Verbert, A. "Different fates of the oligosaccharide moieties of lipid intermediates" Joint meeting des sociétés Allemande, Néerlandaise et Française de Biochimie, Villeneuve d'Ascq, 26-27 Septembre 1991.

Villers, C., Bélard, M., Labiau, O., Mir, A.M., Verbert, A. and Cacan, R. "Etude de la destinée des intermédiaires lipidiques : une approche de la régulation de la N-glycosylation." Congrès de la Société Française de Biochimie et de Biologie Moléculaire. Villepinte, 2-4 Décembre 1991.

Villers, C., Cacan, R., Labiau, O., Mir, A.M. and Verbert, A.

"Etude de la dégradation des oligosaccharides pyrophosphodolichols et des glycoprotéines néosynthétisées dans les cellules CHO." Forum des Jeunes Chercheurs de la Société de Biochimie et de Biologie Moléculaire. Caen, 7-10 Juillet 1992.

Villers, C., Labiau, O., Mir, A.M., Cacan, R. and Verbert, A. "Different fates of oligosaccharide moieties of lipid intermediates as potential regulation steps of the N-glycosylation process." Joint meeting des sociétés Allemande, Néerlandaise et Française de Biochimie. Oss, Pays-Bas, Novembre 1992.

Villers, C., Cacan, R., Mir, A.M., Labiau, O. et Verbert, A. "Release of oligomannoside type glycans as a marker of the degradation of newly synthesized glycoproteins". XII international Symposium on glycoconjugates. Cracovie, Pologne, 15-20 août 1993.

Villers, C., Cacan, R., Mir, A.M., Labiau, O. et Verbert, A. "Libération d'oligomannosides comme témoins de la dégradation des glycoprotéines nouvellement synthétisées". Congrès d'automne de la Société de Biochimie et de Biologie Moléculaire. Villepinte, 7-10 Décembre 1993.

La collaboration entre l'équipe de R. Cacan et celle de H.S. Conradt (Braunschweig, Allemagne) s'est concrétisée par deux communications :

Villers, C., Mir, A.M., Gawlitzek, M., Cacan, R., Conradt, H.S. and Verbert, A. "Influence of cell culture conditions on the synthesis and utilization of lipid intermediates in BHK21 recombinant cells. Second meeting of contractous on animal cell biotechnology. Lisbonne, Portugal, Février 1993.

Gawlitzek, M., Villers, C., Verbert, A., Wagner, R. et Conradt, H.S. (1993) "Changes in the glycosylation pattern of recombinant proteins effected by defined culture conditions of BHK-21 cells."

## SOMMAIRE

### EXPOSE BIBLIOGRAPHIQUE

#### I/ SYNTHÈSE D'UNE N-GLYCOSYLPROTEINE

- 1) Données métaboliques
  - 1-1 Biosynthèse
    - a) Le cycle des dolichols
      - a-1 Structure du dolichol p 1
      - a-2 Etapes du cycle et topographie de la réaction p 2
    - b) La réaction de transfert
      - b-1 Structure de l'oligosaccharidyl transferase p 4
      - b-2 Transfert en bloc p 5
    - c) Matériel oligosaccharidique soluble p 8
  - 1-2 Régulation du processus de N-glycosylation
    - a) Régulation du cycle des dolichols
      - a-1 Par le taux de précurseur : le P-dolichol
        - α) Existence d'une réserve de dolichol p10
        - β) Disponibilité en P-dolichol p10
      - a-2 Régulation par les enzymes
        - α) Régulation par le taux d'enzymes p10
        - β) Régulation hormonale d'activité enzymatique p11
    - b) Hypothèses de l'ajustement qualitatif et quantitatif du cycle des dolichols et de la synthèse protéique
      - b-1 Régulation du taux et de la qualité d'oligosaccharide pyrophosphodolichol p11
      - b-2 Régulation du taux d'accepteur protéique p12
      - b-3 Ajustement qualitatif par la teneur en glucose du milieu p13
- 2) Données structurales p14
- 3) Rôle des glycanes
  - 3-1 stabilité p16
  - 3-2 acquisition de la conformation p16

#### II/ TRAFIC DES N-GLYCOSYLPROTEINES INTRACELLULAIRES.

##### A/ Rétention dans le RER

- 1-1 Les signaux d'adressage dans le RER
  - a) Rétention des protéines solubles par reconnaissance de la séquence KDEL p19
  - b) Rétention des protéines transmembranaires par le motif double lysine p21
- 1-2 Devenir des glycoprotéines résidentes du RER
  - a) Maturation p21
  - b) Rétention par glucosylation transitoire sous l'action d'une UDP-Glc : glycoprotéine glucosyltransférase spécifique p22

B/ Glycoprotéine destinée à un autre compartiment

- 1) Etapes de la formation d'une vésicule de transport
- 1-1 Rôle des protéines d'enveloppe formant le "coatamère" p25
  - 1-2 Rôle des protéines liant le GTP : "GTP Binding Proteins" p25
  - 1-3 Rôle des protéines de fusion p26
- 2) Les protéines destinées à l'appareil de Golgi
- 2-1 Les signaux de rétention de l'appareil de Golgi p28
  - 2-2 Modification du glycanne dans l'appareil de Golgi p30
- 3) Les glycoprotéines destinées au lysosome p31
- 4) La voie de sécrétion p32
- 5) Les facteurs perturbant le trafic intracellulaire
- 5-1 Les moyens physiques
    - a) La température p34
    - b) La perméabilisation des cellules p35
  - 5-2 Les inhibiteurs chimiques
    - a) La Bréfeldine A p35
    - b) La monensine p37

C/ Dégradation des protéines et des glycoprotéines endogènes.

- 1) Les protéases endocellulaires p38
- 2) Localisation subcellulaire des différents types de dégradation des protéines nouvellement synthétisées
- a) La voie lysosomique
    - a-1 Description p40
    - a-2 Orientation vers une voie de dégradation en fonction de la différenciation et du type cellulaire p41
  - b) La voie autophagique
    - b-1 Description p41
    - b-2 Régulation p43
  - c) La voie cytosolique p43
  - d) La voie réticulaire ou Pré-Golgienne
    - d-1 Description
      - α) Dégradation localisée dans le RER p44
      - β) Dégradation localisée dans un compartiment Pré-Golgien p46
      - γ) Dégradation localisée dans les compartiments RER et/ou Pré-Golgiens. p47
    - d-2 Régulation de la voie de dégradation réticulaire / Pré-Golgienne
      - α) Oligomérisation p47
      - β) Protection par le substrat p48
      - γ) Orientation vers une voie de dégradation en fonction de l'état de différenciation cellulaire p49
      - δ) Influence du potentiel redox du RER sur la dégradation des protéines dans ce compartiment p50
- 3) Rôles attribués à la dégradation des néoglycoprotéines
- 3-1 contrôle de la conformité avant

l'exportation	p50
3-2 régulation du taux d'expression d'une sous-unité	p51
3-3 présentation de peptides antigéniques	p51

### CONCLUSIONS DES GENERALITES

p54

### TRAVAUX PERSONNELS

MISE EN EVIDENCE DE POINTS POTENTIELS DE REGULATION DE LA  
SYNTHESE DES N-GLYCOSYLPROTEINES

#### DESTINEES DES GLYCANNES DES INTERMEDIAIRES LIPIDIQUES

p55

##### ARTICLE I

p56-64

#### DISCUSSION DE L'ARTICLE I

##### CARACTERISATION DU MATERIEL OLIGOSACCHARIDIQUE SOLUBLE.

- 1) Les oligosaccharides phosphates et les oligosaccharides neutres sont les témoins de voies de dégradation p65
- 2) Hétérogénéité des oligosaccharides neutres : origines respectives p67

#### LA LIBERATION D'OS-GN1 COMME MARQUEURS DE LA DEGRADATION DE NEOGLYCOPROTEINES

p71

##### ARTICLE II

p72-79

#### DISCUSSION DE L'ARTICLE II

I/ MISE EN EVIDENCE D'UNE COMPETITION ENTRE LE TRANSFERT ET LA FORMATION DES OLIGOSACCHARIDES NEUTRES. p80

II/ DEGRADATION DES NEOGLYCOPROTEINES. p83

III/ LOCALISATION SUBCELLULAIRE DU PROCESSUS DE DEGRADATION DES NEOGLYCOPROTEINES.

- 1) Utilisation d'inhibiteurs de protéases p87
- 2) Utilisation de la Bréfeldine A p88
- 3) Caractéristiques de la dégradation des néoglycoprotéines dans notre modèle p90
- 4) Le compartiment intermédiaire.
  - a) description p90
  - b) Fonctions potentielles de l'ERGIC p92
  - c) Modèles p92

## MATERIELS ET METHODES

### I/ MATERIEL CELLULAIRE

- 1) Choix du modèle cellulaire
  - a) Les cellules CHO p95
  - b) Les cellules B3F7
    - b-1 Origine p95
    - b-2 Carte d'identité des cellules p95
- 2) Culture cellulaire p96

### II/ METHODOLOGIE

- 1) Marquage métabolique p96
- 2) Extraction séquentielle des lipides p97
- 3) Préparation des échantillons
  - a) Obtention d'oligosaccharides à partir d'oligosaccharides pyrophosphodolichols. p99
  - b) Obtention des glycanes des néoglycoprotéines p99
  - c) Purification du matériel oligosaccharidique soluble p99
- 4) Utilisation d'inhibiteurs
  - a) Inhibiteurs de la synthèse protéique p100
  - b) Inhibiteurs de processing p100
  - c) Inhibiteurs de protéases lysosomiques p101
  - d) Inhibiteurs du trafic intracellulaire p101

### III/ ANALYSE HPLC DU MATERIEL OLIGOSACCHARIDIQUE

- 1) Chromatographie Liquide Haute Performance p101
- 2) Chromatographie d'échange anionique à pH élevé (HPAEC)
  - a) Principe p102
  - b) Mise en évidence de la voie alterne de N-glycosylation p103

### ARTICLE III

p104-109

### CONCLUSIONS GENERALES

p110-111

### BIBLIOGRAPHIE

p112-125



## ABBREVIATIONS

AlF<sub>4</sub><sup>-</sup> : Fluorure d'aluminium  
ALLN : N-Acétyl Leu Leu Norleucinal  
α-MEM : milieu minimum essentiel  
Arf : ADP Ribosylation Factor  
Asn : asparagine  
ATP : adénosine triphosphate  
BfA : Bréfeldine A  
Bip : Binding Immunoglobuline Protein  
CCCP : Carbonylcyanide-3-chlorophenylhydrazone  
CHO : Chinese Hamster Ovary  
Cst : castanospermine  
dMM : 1-désoxymannojirimycine  
dNM : 1-désoxynojirimycine  
Dol : dolichol  
DTT : di-thiothréitol  
EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétracétique  
endo-H : endo-β-N-acétylglucosaminidase H (*Streptomyces plicatus*) EC 3.2.1.96  
ERGIC : Endoplasmic Reticulum Golgi Intermediate Compartment  
Glc : glucose  
Glc-P-Dol : glucosyl phosphodolichol  
GlcNAc : N-acétylglucosamine  
GTP : guanosine triphosphate  
Hépès : acide N-2 hydroxyéthylpipérazine N'-2 éthanesulfonique  
HPAEC : Chromatographie d'Echange Anionique à pH élevé  
HPLC : Chromatographie Liquide Haute Performance  
KDEL : Lysine / acide aspartique / acide glutamique / Leucine  
KK : Lysine / Lysine  
Man : mannose  
Man-P-Dol : mannosyl phosphodolichol  
NEM : N-éthylmaléimide  
NSF : NEM Sensitive Factor  
O-PP-Dol : oligosaccharide pyrophosphodolichol  
OS : oligosaccharides neutres  
OS-Gn1 : oligosaccharides neutres possédant une N-acétylglucosamine en position réductrice  
OS-Gn2 : oligosaccharides neutres possédant deux N-acétylglucosamines en position réductrice  
P-Dol : dolichol phosphate  
PBS : tampon phosphate de sodium  
PNGase : Peptide N-glycosidase F (*Flavobacterium meningosepticum*) EC 3.2.2.18  
POS : oligosaccharides phosphates  
RER : reticulum endoplasmique rugueux  
SNAP : Soluble NSF Attachment Protein  
Thr : thréonine  
TMD : Trans Membrane Domain  
Tris : Tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane

# **EXPOSE BIBLIOGRAPHIQUE**

Les N-glycosylprotéines sont définies comme étant l'association covalente d'un glycanne et d'une chaîne protéique. On peut diviser artificiellement le glycanne en deux parties. La partie interne, associée à la protéine, est commune à chaque N-glycosylprotéine. La diversité est apportée par la partie terminale du glycanne donnant à la glycoprotéine toute sa spécificité.

## I/ SYNTHESE D'UNE N-GLYCOSYLPROTEINE.

### 1) Données métaboliques.

#### 1-1 Biosynthèse.

##### a) Le cycle des dolichols.

La synthèse d'une N-glycosylprotéine nécessite l'élaboration préalable du glycanne. La synthèse du précurseur glycannique s'effectue par l'intermédiaire d'un donneur lipidique intégré dans les membranes du RER : le dolichol-phosphate. Le glycanne est construit de manière séquentielle. Chaque monosaccharide s'ajoutant sur ce lipide accepteur.

#### a-1 Structure du dolichol.

Elle est schématisée dans la figure 1 ci-dessous :

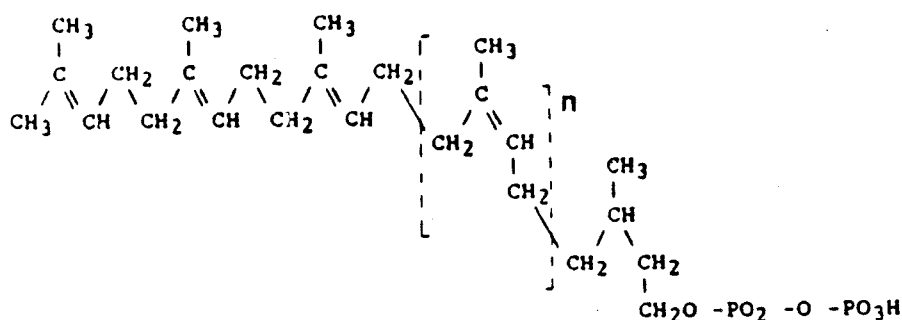


Fig.1 : Structure du dolichol-P

Le dolichol est une chaîne polyisoprénique trouvée dans toute cellule eucaryote. Chez les Mammifères, le dolichol est formé de 16 à 22 unités isoprènes, la dernière unité étant saturée. Seule la fonction d'assemblage du glycanne sous la forme de l'oligosaccharide pyrophosphodolichol (O-PP-Dol) lui est connue.

a-2 Etapas du cycle et topographie de la réaction

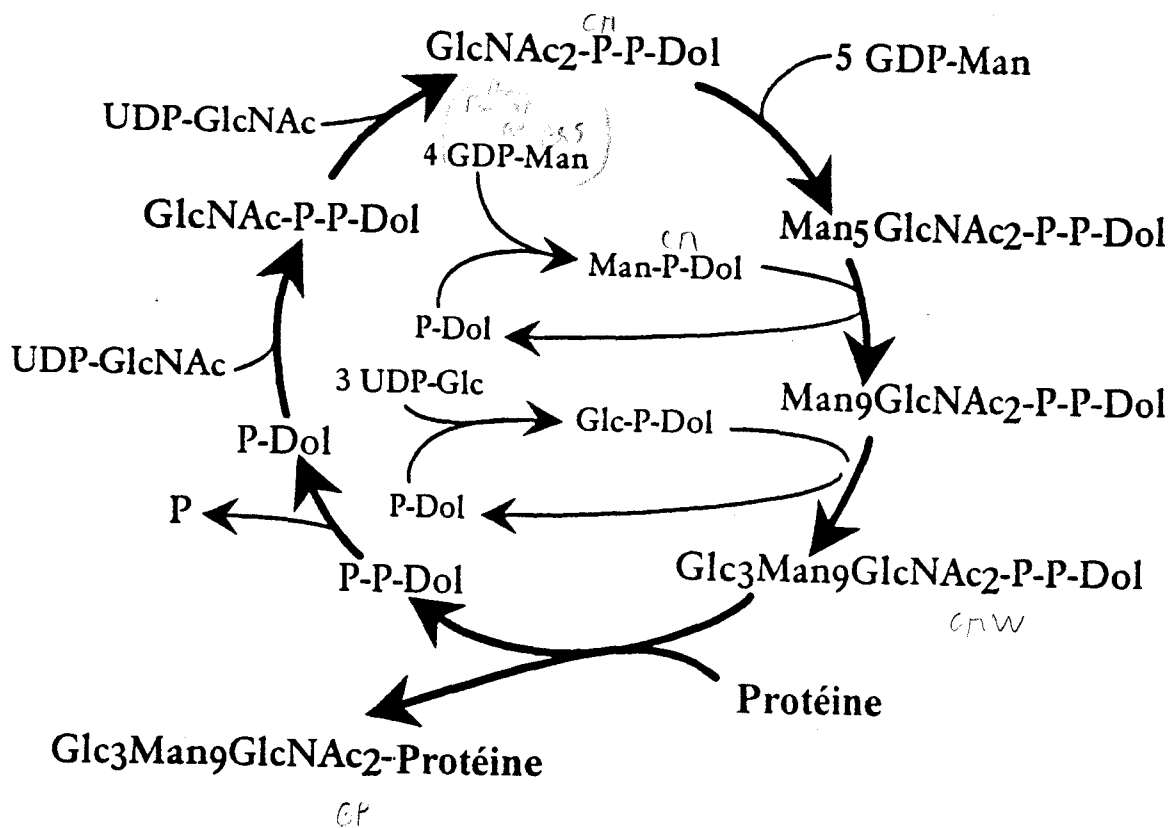


Fig.2 : Cycle des dolichols

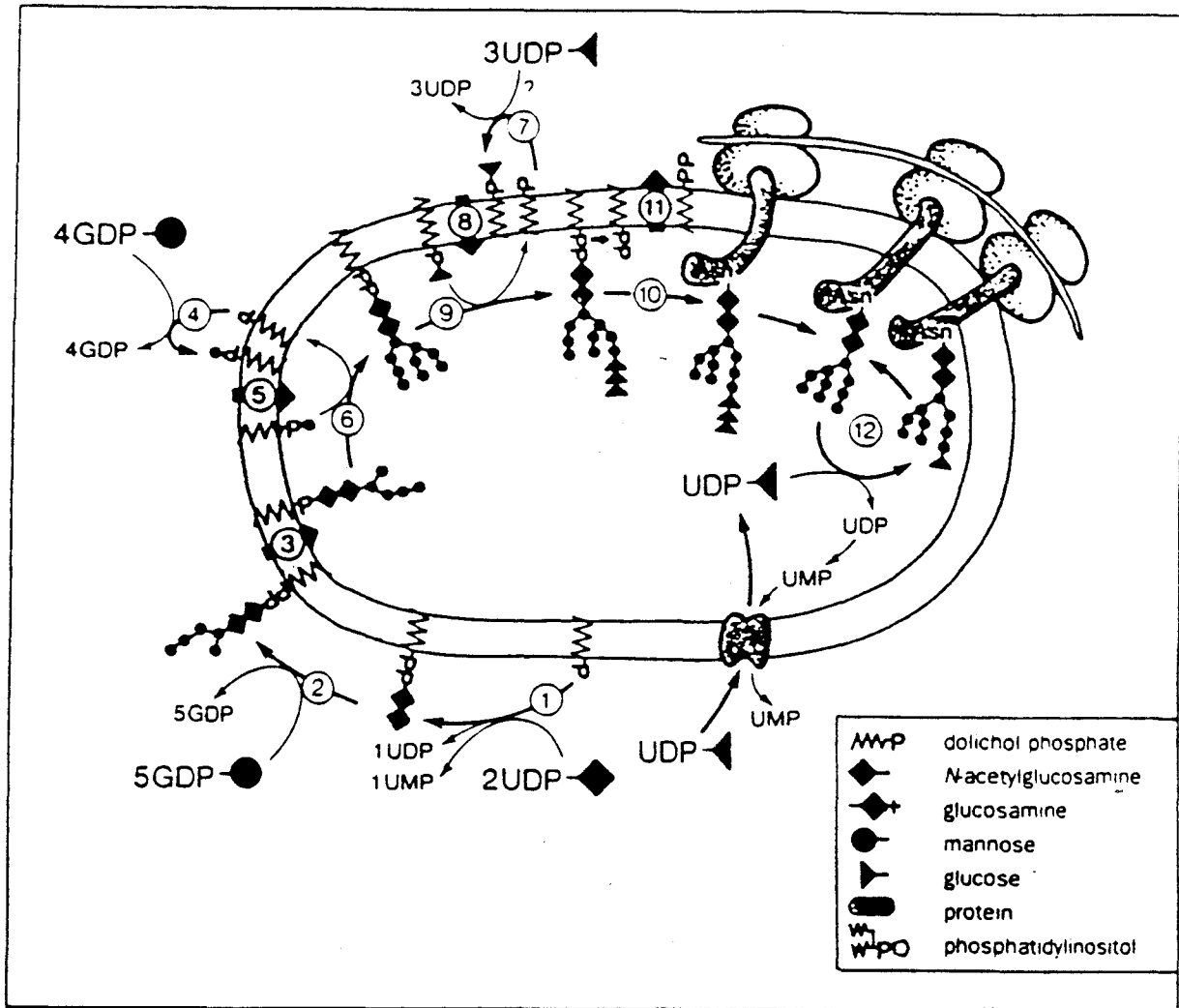


Fig.3 : Topographie du cycle des dolichols d'après Abeijon et Hirschberg (1992).

Les premières étapes du cycle des dolichols (Fig.2) (branchement des deux N-acétylglucosamines apportés par l'UDP-GlcNAc) s'effectuent côté cytosolique de la membrane du RER comme l'ont montré Snider et Rogers (1984), Abeijon et Hirschberg (1992) et Kean (1991). Il en est de même pour la formation du  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$  par l'apport supplémentaire de cinq mannoses par le GDP-Man. Les enzymes catalysant l'assemblage de l'intermédiaire lipidique ainsi formé sont des enzymes transmembranaires résidents du RER. Leur domaine catalytique est orienté côté cytoplasmique. Un mécanisme de flip-flop, non élucidé, permettrait ensuite le passage du

Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-PP-Dol au travers de la membrane du RER. L'élongation du glycanne ainsi que son utilisation sont en effet réalisées du côté luminal du RER (Fig.3) (Hannover et Lennarz 1982 et Snider et Rogers 1984). L'élongation est sous le contrôle d'enzymes dont le domaine catalytique est dirigé vers la lumière du RER. La translocation des nucléotides sucres cytosoliques vers la lumière est nécessaire pour que se poursuive la synthèse du N-glycanne. Elle est possible grâce au Man-P-Dol donneur généré par la Man-P-Dol synthétase catalysant la réaction équilibrée suivante : GDP-Man + P-Dol  $\leftrightarrow$  Man-P-Dol + GDP

La Man-P-Dol synthétase constitue une exception en ce qui concerne sa topologie puisque son domaine catalytique est tourné vers le cytosol alors que l'utilisation du Man-P-Dol est lumineuse (Haselbeck et Tanner 1982).

Quatre mannoses sont ainsi apportés par la mannosyltransférase utilisant le Man-P-Dol. Il en est de même pour les trois glucoses terminaux apportés par le Glc-P-Dol. Le précurseur glycanne formé possède la structure Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-PP-Dol. Le glycanne peut alors être greffé sur une protéine en voie de synthèse : il s'agit d'un processus cotranslationnel catalysé par l'oligosaccharidyltransférase.

## b) La réaction de transfert

### b-1 Structure de l'oligosaccharidyltransférase

Geetha-Habib et al. (1988) ont isolé un complexe membranaire reconnaissant le site de N-glycosylation, appelé GSBP pour "Glycosylation Site Binding Protein". Ce complexe, situé du côté luminal du RER, semblait faciliter l'interaction entre la protéine et l'oligosaccharidyltransférase.

Welleher et al. (1992) ont purifié à partir de microsomes d'origine canine une activité enzymatique isolée sous la forme d'un complexe de deux glycoprotéines de 66 et 63 kDa correspondant respectivement à la ribophorine I et II (protéines intrinsèques du RER) ainsi qu'un polypeptide de 48 kDa. Le polypeptide de 48 kDa est une protéine membranaire de

type I comprenant un petit domaine cytoplasmique et un large domaine dans la lumière du RER. Sa séquence présente 25% d'homologie avec la WP1, une protéine de Levure requise pour l'activité oligosaccharidyltransférase de *Saccharomyces cerevisiae*.

Pour déterminer si la GSBP décrite par Geetha-Habib en 1988 correspond à ce complexe, Kelleher et al. utilisent des anticorps anti-PDI (dirigés contre la Peptide Disulfure Isomérase). La GSBP serait en fait analogue à 90% à la PDI. Les anticorps anti-PDI révèlent la GSBP dans l'extrait brut mais plus dans la fraction contenant le complexe Ribophorines-protéine de 48 kDa. Ce complexe semble stabiliser le système de traduction grâce aux ribophorines tout en catalysant la N-glycosylation par la sous-unité de 48 kDa.

#### b-2 Transfert en bloc

Une liaison  $\beta$  1-N glycosidique (Fig.4) s'établit entre la N-acétylglucosamine du  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$  et l'asparagine intégrée dans une séquence tripeptidique consensus (Pless et Lennarz 1977).

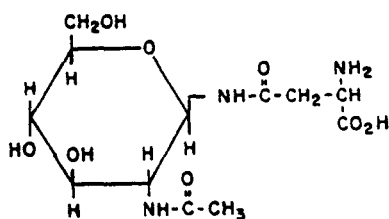


Fig.4 : Structure du N-acétylglucosaminyl asparagine

Ce tripeptide, appelé sequon, est constitué d'Asn-X-Thr où X est un acide aminé quelconque excepté la Proline (Fig.5) (Hart et al 1979). Tous les sequons potentiels ne sont néanmoins pas glycosylés, leur présence est une condition nécessaire mais pas suffisante. Une structure en coude  $\beta$  (" $\beta$ -turn") du chaînon peptidique favorise la réaction de transfert en augmentant l'accessibilité sur le site de N-glycosylation (Aubert et al 1976). Des liaisons Hydrogène peuvent notamment s'établir

entre le groupement amide de l'asparagine et l'hydroxyle de la thréonine.

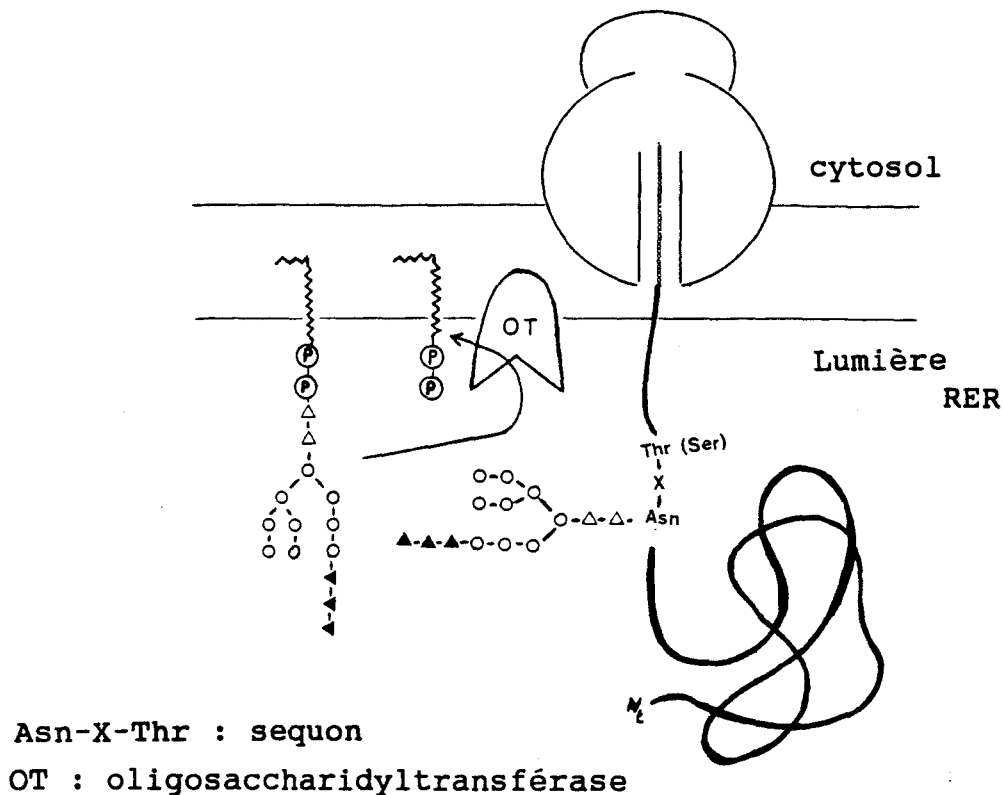


Fig.5 : Schéma de la réaction de transfert du glycanne catalysée par l'oligosaccharidyltransférase

Les travaux de Grabenhorst et al (1993) sur la synthèse de glycoprotéines recombinantes ont permis d'établir une séquence peptidique de neuf acides aminés (GWNETIVGG) créant les conditions nécessaires à la N-glycosylation. L'interleukine 2 humaine (IL2) est une O-glycosylprotéine. L'intégration dans le gène du site de N-glycosylation de l'interféron (une N-glycosylprotéine) permet la synthèse d'une IL2 N-glycosylée mutante.

Le processus de N-glycosylation est cotraductionnel (modèle A, Fig.6). Le transfert a lieu dès que le sequon entre dans la



lumière du RER, ce qui correspond à un minimum de 50 acides aminés traduits pour qu'il soit glycosylé (20 acides aminés au travers de la membrane du RER, 30 au travers du ribosome jusqu'au mRNA traduit).

Cependant, le fait que ce phénomène soit influencé par la région de la protéine se trouvant à plus de 60 acides aminés du côté C-terminal du site de N-glycosylation a suggéré divers modèles (Shakin-Eshleman et al 1993).

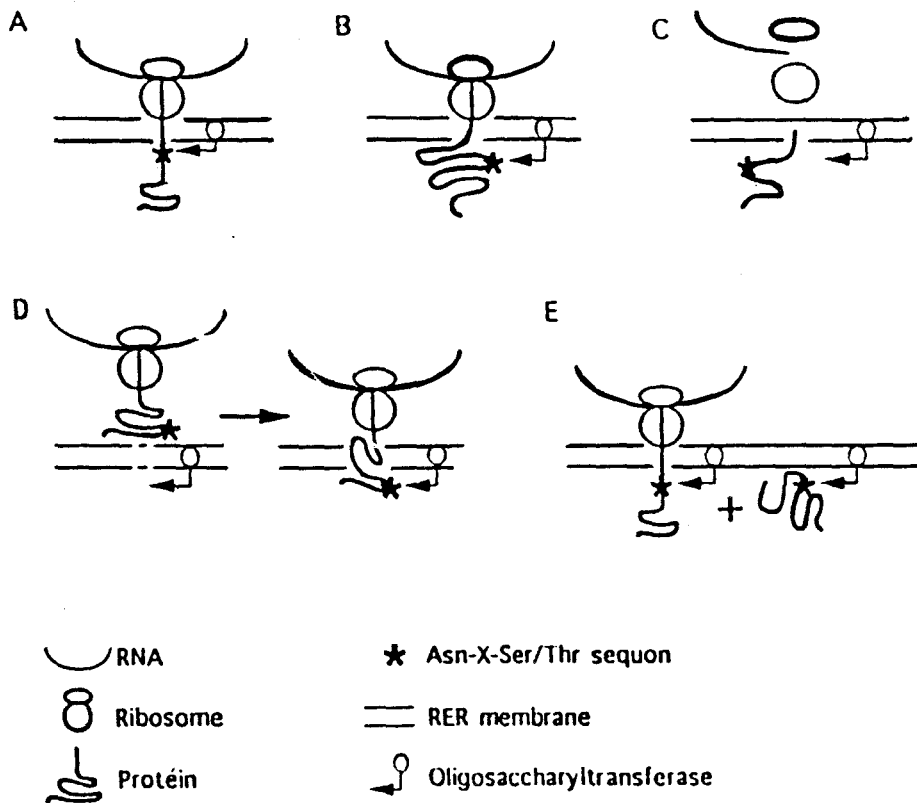


Fig.6 : Modèles proposés par Shakin-Eshleman et al (1993) pour décrire la réaction de N-glycosylation.

modèle B : Plus de 50 acides aminés sont traduits avant le transfert du glycanne, les acides aminés côté C-terminal du sequon déclenchent la mise en conformation de la protéine ce qui facilite la N-glycosylation.

modèle C : Cette mise en conformation a lieu avant le passage de la membrane (du RER).

modèle D : la stabilité du complexe ribosome/SRP ("Signal Recognition Protein") est importante pour la N-glycosylation. L'arrêt prématuré de la traduction réduit le taux de N-glycosylation du sequon le plus proche du C-terminal.

modèle E : un modèle post-translationnel a même été avancé : il consiste en la N-glycosylation d'une protéine entièrement traduite.

Dès sa libération, la glycoprotéine est soumise à des modifications post-translationnelles. Des réactions de maturation se déroulant dans le RER et l'appareil de Golgi vont conduire la glycoprotéine à acquérir sa structure définitive.

### c) Matériel oligosaccharidique soluble.

Le glycanne attaché aux intermédiaires lipidiques est non seulement utilisé pour la synthèse des glycoprotéines, mais il est également retrouvé sous une forme soluble qui accompagne le processus de N-glycosylation. Le matériel oligosaccharidique soluble est hétérogène, formé d'oligosaccharides neutres et d'oligosaccharides chargés de type phosphorylés. Ce matériel soluble, élaboré par le cycle des dolichols, n'étant pas transféré sur une protéine, pourrait représenter un point de régulation du taux d'oligosaccharide pyrophosphodolichol. Il a été mis en évidence dans plusieurs modèles : les microsomes de myélomes murins (Hsu et al 1974), des microsomes de Foie de Porc (Oliver et al 1975), dans le Foie de Rat (Richard et al 1978) ou les splénocytes de Rat (Cacan et al 1980), dans les microsomes d'oviducte de Poule (Hannover et Lennarz 1982). Comme nous le verrons, nous pensons que ce matériel oligosaccharidique soluble est le témoin de réactions de

régulation du cycle des dolichols. Après les données métaboliques, nous envisagerons les points connus de la régulation de la N-glycosylation.

## 1.2 Régulation du processus de N-glycosylation.

### a) Régulation du cycle des dolichols.

#### a.1 Par le taux de précurseur : le dolichol-P.

##### α) Existence d'une réserve de dolichol.

Le site de biosynthèse du dolichol est principalement le RER (Adair et Keller 1982). Le précurseur du dolichol est identique à celui du cholestérol et de l'ubiquinone. Les premières étapes de la biosynthèse de ces composés sont communes. Selon le type cellulaire ou l'état physiologique, il y aurait biosynthèse de novo ou utilisation de dolichol de réserve.

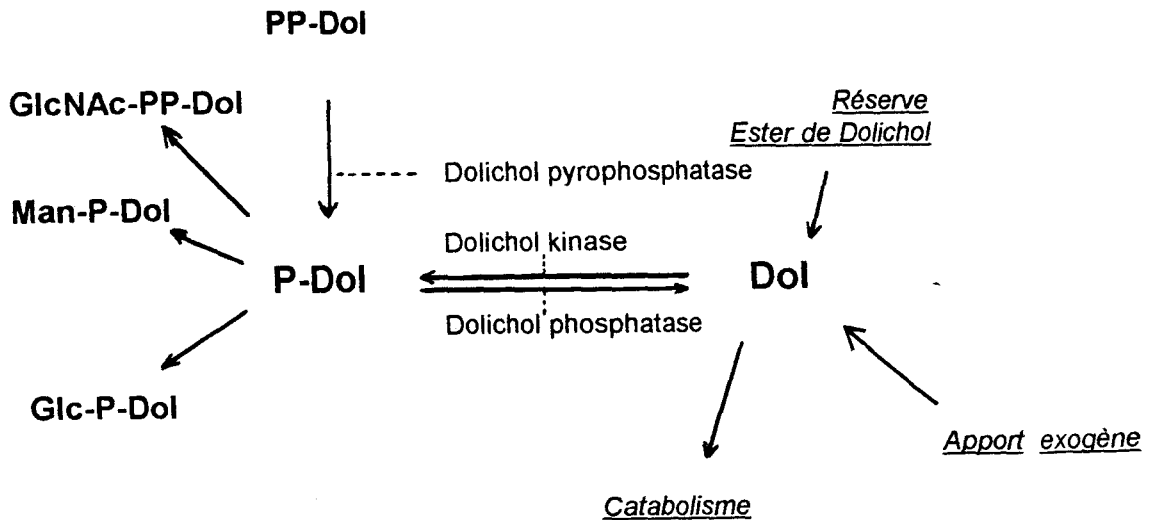


Fig.7 : Métabolisme du dolichol d'après Hemming (1982).

Il existe en effet une réserve de dolichol sous forme d'ester d'acides gras qui restitue le dolichol libre par action d'une

estérase. Une kinase, utilisant le CTP, phosphoryle le dolichol en P-dolichol (Fig.7) (Hemming 1982).

### β) disponibilité en P-dolichol

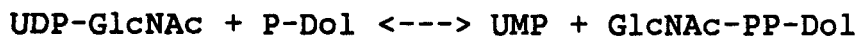
Elle dépend de sa synthèse mais aussi (et surtout) de sa régénération par action d'une pyrophosphatase sur le pyrophosphodolichol lors de la dernière étape du cycle des dolichols. Le maintien du taux de P-dolichol est un équilibre entre la réaction catalysée par la pyrophosphatase (réaction inhibée par la bacitracine qui, en empêchant la régénération du P-dolichol, bloque le cycle) et la réaction visant à le dégrader en dolichol en éliminant le phosphate.

Trois enzymes puisent dans la réserve de P-dolichol pour élaborer l'oligosaccharide pyrophosphodolichol. Il s'agit des Man-P-Dol et Glc-P-Dol synthétases et de la GlcNAC-1-phosphotransférase (Fig.7). Il est à noter cependant que l'apport exogène de P-dolichol, bien que stimulant la synthèse de Man-P-Dol, n'augmente pas la formation d'oligosaccharide pyrophosphodolichol (Rosenwald et al 1990).

### a-2 Régulation par les enzymes.

#### α) Régulation par le taux d'enzymes.

La GlcNAC-1-phosphotransférase est responsable de la première réaction du cycle des dolichols :



Cette réaction est irréversible *in vivo* puisqu'elle nécessiterait une concentration de 75  $\mu\text{M}$  d'UMP pour s'effectuer dans le sens retour. L'enzyme enclenche donc réellement la synthèse du donneur lipidique en accélérant la vitesse d'une réaction irréversible. Son inhibiteur connu, la tunicamycine, est un analogue structural des deux substrats (P-Dol et UDP-GlcNAC). Il bloquerait l'état de transition précédant la réaction elle-même (Lerhman 1991).

Le taux de cet enzyme est augmenté dans une souche mutante de fibroblastes de type CHO (les cellules 3E11). Cette souche a été sélectionnée par sa résistance à des doses croissantes de

tunicamycine, la cellule répond en augmentant le nombre de copies du gène ; l'activité enzymatique est portée à 15 fois celle des cellules sauvages.

Cet enzyme, ubiquitaire, est activé par le Man-P-Dol : pourtant, des souches déficientes en Man-P-Dol telles que Thy-1 (Trowbridge et Hyman 1979) ou les B3F7 (Stoll 1986) présentent cependant une quantité de GlcNAC-PP-Dol identique à celle des cellules normales.

### β) Régulation hormonale d'activité enzymatique.

La Man-P-Dol synthétase voit son activité augmenter lorsqu'elle est phosphorylée. La protéine kinase catalysant cette phosphorylation est AMPC dépendante nécessitant la stimulation d'un récepteur β adrénergique (Banerjee 1987).

Alors que le cycle des dolichols semble être étroitement régulé, rien n'est connu sur la manière dont s'ajuste le taux d'intermédiaire lipidique donneur avec celui des protéines acceptrices.

### b) Hypothèses de l'ajustement qualitatif et quantitatif du cycle des Dolichols et de la synthèse protéique.

#### b-1 Régulation du taux et de la qualité d'oligosaccharide pyrophosphodolichol.

Concernant les oligosaccharides phosphates (POS), l'action d'une pyrophosphatase sur le donneur lipidique permettrait la régénération en une seule étape du P-dolichol libérant, par la même occasion, le glycanne sous forme d'oligosaccharidesphosphates. Ce "by-pass" dépendrait d'une activité pyrophosphatasique mise en évidence par Bélard et al (1988) chez la Levure.

Les oligosaccharides neutres, quant à eux, ont été décrits dans des microsomes isolés de thyroïde (Anumula et Spiro 1983) ainsi que dans des splénocytes de Souris (Cacan et al 1987 et 1989). Ces auteurs évoquent l'action d'une activité endoglycosidasique de l'oligosaccharidyltransférase sur

l'oligosaccharide pyrophosphodolichol pour expliquer, en partie, l'origine d'un matériel oligosaccharidique neutre. La qualité de l'intermédiaire lipidique peut être modifiée et influencer de ce fait son utilisation. En effet, sous la forme  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ , l'efficacité du transfert sur la protéine est maximale. Sous la forme déglucosylée, elle est divisée par 10. Spiro et Spiro (1991) proposent un contrôle de l'utilisation du donneur lipidique par les glucosidases du RER. En orientant le taux de glucosylation du donneur, ce système pourrait influencer le transfert du glycanne sur la protéine ou la dégradation de l'intermédiaire lipidique. L'équilibre entre les formes glucosylées et non glucosylées de l'intermédiaire lipidique serait sous le contrôle d'une navette glucosidase/glucosyltransférase suivant le schéma de la figure 8 :

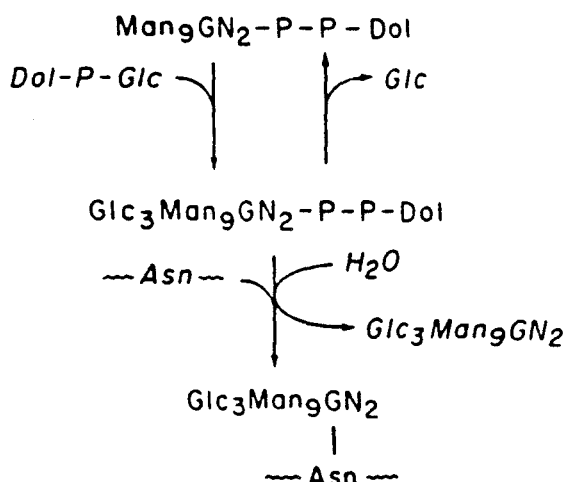


Fig.8 : Navette glucosidase / glucosyltransférase décrite par Spiro et Spiro (1991).

#### b-2 Régulation du taux d'accepteur protéique.

La cellule peut-elle adapter le cycle des dolichols en fonction de ses besoins en synthèse glycoprotéique? Quel est dans ce cas le signal et sur quelle réaction du cycle a lieu la régulation empêchant l'accumulation de donneur lipidique

quand l'accepteur protéique fait défaut? De nombreuses études ont pu suivre les effets du blocage de la synthèse protéique sur le cycle des dolichols (Schmitt et Elbein 1979).

Est-ce l'accumulation d'oligosaccharide pyrophosphodolichol non utilisés qui permet l'adaptation du cycle des dolichols? Pan et Elbein (1990) suggèrent une rétroinhibition directe de la GlcNAC-1-phosphotransférase (première enzyme du cycle des dolichols) par le donneur lipidique non utilisé. A l'inverse, l'activation de la synthèse protéique (par les oestrogènes) tout comme l'addition de peptides exogènes ont pour conséquence l'augmentation de la N-glycosylation.

Une seconde hypothèse, formulée grâce à des expériences de blocage de la synthèse peptidique par le cycloheximide, concerne l'influence du GTP. Le GTP et le cycloheximide entrent en effet en compétition pour le même site de fixation sur la grande sous-unité du ribosome. Le GTP ainsi libéré exercerait un effet de rétroinhibition sur la synthèse du donneur lipidique. Cet effet serait cependant moindre quand les cellules sont incubées en absence de glucose puisque le GTP, dans ce cas, sert d'apport énergétique. L'addition de cycloheximide à des cellules privées de glucose semble accumuler l'oligosaccharide pyrophosphodolichol sous la forme de  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAC}_2\text{-PP-Dol}$ .

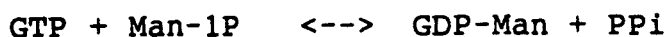
Une troisième constatation rejoint la régulation par le P-dolichol : un des effets du cycloheximide est de bloquer la régénération du P-dolichol puisqu'il ralentit le transfert sur la protéine dont la synthèse est inhibée. Cette non régénération de P-dolichol peut provoquer une déficience dans la synthèse même de l'oligosaccharide pyrophosphodolichol.

### b-3 Ajustement qualitatif par la teneur en glucose du milieu.

L'absence de glucose dans le milieu d'incubation des cellules modifie la nature de l'oligosaccharide pyrophosphodolichol. Chapman et Calhoun (1988) décrivent dans ces conditions la présence de donneur  $\text{Man}_5\text{GlcNAC}_2\text{-PP-Dol}$  au lieu du classique

Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-PP-Dol. La non utilisation du Man-P-Dol ou sa translocation incorrecte pourraient en être la cause.

Dans ces conditions de privation d'énergie (en absence de glucose ou en présence de CCCP, découplant des chaînes d'oxydations cellulaires), la synthèse de GDP-Man qui s'effectue suivant la réaction :

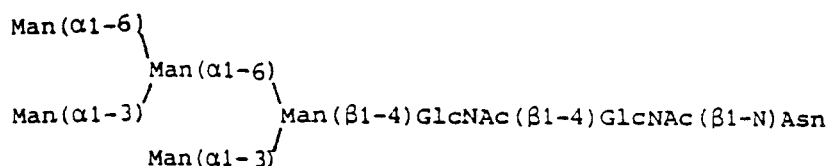


est ralentie car une partie du GTP est utilisée à des fins énergétiques. Les mannosyltransférases des premières étapes du cycle des dolichols ainsi que la Man-P-Dol synthétase, deux utilisateurs du GDP-Man avec des affinités différentes, voient diminuer la concentration en substrat dans ces conditions. Cette observation peut expliquer le défaut de synthèse de l'oligosaccharide pyrophosphodolichol classique.

## 2) Données structurales.

La biosynthèse d'une N-glycosylprotéine telle qu'elle a été décrite ne pourrait expliquer la grande diversité structurale rencontrée. Le précurseur glycanique transféré est en effet commun. La variété des structures n'est obtenue qu'au cours de maturation de la glycoprotéine au travers des compartiments intracellulaires, en particulier l'appareil de Golgi. Ces structures sont classées :

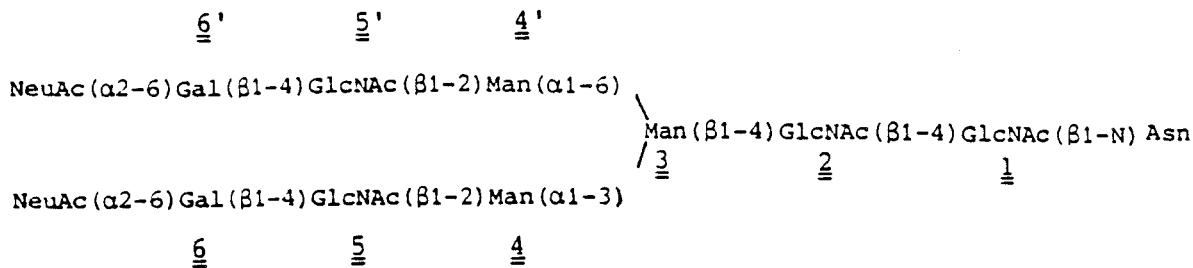
\* en type oligomannosidique ne renfermant que du mannose et de la N-acétylglucosamine :



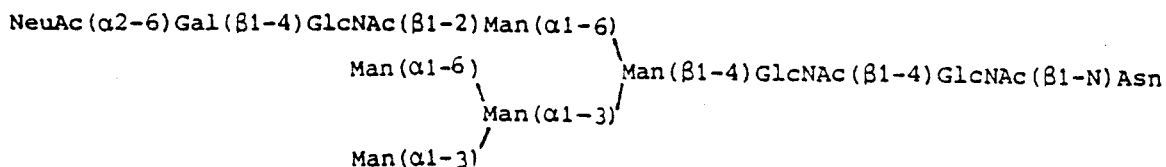
\* en type N-acétyllactosaminique ; le chaînon lactosamine Galβ1-4GlcNAc, branché de 1 à 6 fois sur les mannoses en 4 et



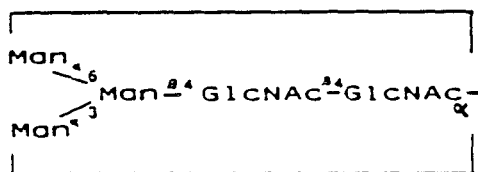
4' conduit aux structures mono à hexa-antennées selon le nombre de chaînes émanant de ces mannoses :



\* en type hybride, compromis entre les deux précédentes :



Si l'on compare ces structures, on constate que, plus on s'éloigne du point d'attache du glycanne sur la protéine, plus la nature des sucres rencontrés se diversifie. En effet, le pentamannosido-chitobiosyl attaché sur le résidu asparaginyll est invariablement présent :



il constitue le noyau commun à toutes les N-glycosylprotéines, témoin de la synthèse dans le RER. Sur ce noyau, viennent s'additionner des squelettes particuliers à chaque type de glycoprotéines. Ces squelettes sont ajoutés dans l'appareil de Golgi après un processus de maturation. En périphérie du glycanne, c'est une multiplicité de possibilités tant en ce qui concerne la nature du monosaccharide que le type de

liaison expliquant la diversité des N-glycosylprotéines rencontrées (Montreuil 1984). La microhétérogénéité que peut recéler une glycoprotéine ajoute à sa complexité. Deux glycoformes d'une même glycoprotéine présentent en effet des structures glycanniques différentes pour un même site de N-glycosylation. La connaissance de ces structures a permis la compréhension du déroulement de leur synthèse.

### 3) Rôle des glycannes.

Il n'existe pas de fonction unique des chaînes glycanniques ; leurs rôles multiples peuvent être regroupés en propriétés physicochimiques et biologiques. Nous ne nous intéresserons qu'à la stabilité et à la conformation des protéines apportées par leur glycosylation laissant de côté leur rôle de signal dans les processus de reconnaissance cellulaire.

#### 3-1 stabilité

Les glycoprotéines sont, en général, plus résistantes à la protéolyse que les protéines non glycosylées (Montreuil 1984). L'exemple de l' $\alpha 1$  glycoprotéine acide humaine indique que ses cinq glycannes de type tri ou tétra antennés recouvrent entièrement la protéine. L'organisation spatiale des glycannes explique leur rôle protecteur face à la protéolyse.

A côté de la protection contre la protéolyse totale, il existe un rôle des glycannes sur la protéolyse partielle intervenant par exemple au cours de la maturation de précurseur d'hormones. Les glycannes, en masquant des sites de clivages protéolytiques, contrôlent l'activation des prohormones (Loh et Gainer 1978).

#### 3-2 Acquisition de la conformation.

Un autre rôle des glycannes est l'induction et le maintien d'une conformation. Les chaînes glycanniques contribuent à l'acquisition de la conformation de la glycoprotéine naissante

grâce à leur caractère hydrophile d'une part et à des interactions entre protéine et glycanne d'autre part.

La N-glycosylation augmente l'efficacité de la mise en conformation de la protéine, de sa stabilité et de son activité biologique.

La phosphatase alcaline isolée chez la Levure est une glycoprotéine possédant douze sequons glycosylables. La mutagénèse dirigée de ces sites de N-glycosylation aboutit à la synthèse d'un enzyme non glycosylé. L'absence de glycannes provoque la perte d'activité de la phosphatase et sa rétention dans le RER, conséquences d'une mauvaise conformation.

Dans le cas du dimère de la lipoprotéine lipase (LPL), l'inhibition de la glucosidase I par la castanospermine empêche l'expression d'une activité LPL. L'élimination des glucoses terminaux semble être un prérequis à la sécrétion d'une lipase active. La perte d'activité serait due à l'absence de dimérisation, étape succédant la déglucosylation des monomères (Carroll et al 1992 ; Ben Zeev et al 1992 ; Masuno et al 1992). Des conclusions identiques ont été obtenues à partir de cellules d'hépatome humain, HepG2, en présence de désoxynojirimycine (dNM), autre inhibiteur de glucosidase (Lodish et Kong 1983).

## II/ TRAFIC DES N-GLYCOSYLPROTEINES INTRACELLULAIRES.

De nombreuses glycoprotéines résidentes du RER ne quittent pas ce compartiment comme en témoigne leur glycanne de type oligomannosidique. Par contre, la plupart des glycoprotéines assemblées dans le RER rejoignent un autre compartiment subcellulaire ou extracellulaire afin d'assurer la fonction qui leur est assignée. Le parcours au travers de la cellule s'accompagne de modifications, notamment la maturation du glycanne. L'exportation depuis le RER jusqu'au compartiment cible nécessite une information, portée soit par la partie protéique, soit par la partie glycanne. La séquence peptidique, quoique très courte (KDEL ou KK des protéines résidentes du RER ou le domaine transmembranaire de protéines Golgiennes), assure néanmoins avec une grande efficacité

l'adressage vers chacun des compartiments intracellulaires. Les signaux glycaniques quant à eux, comprennent le Man-6-P pour l'adressage au compartiment lysosomique, mais aussi les signaux de re-glycosylation. Ces signaux maintiennent la glycoprotéine dans le RER tant qu'elle n'a pas acquis sa conformation définitive.

Nous aborderons successivement la rétention des glycoprotéines dans le RER et la destinée de glycoprotéines exportées vers d'autres compartiments. Ces différentes destinées sont schématisées dans la figure 9.

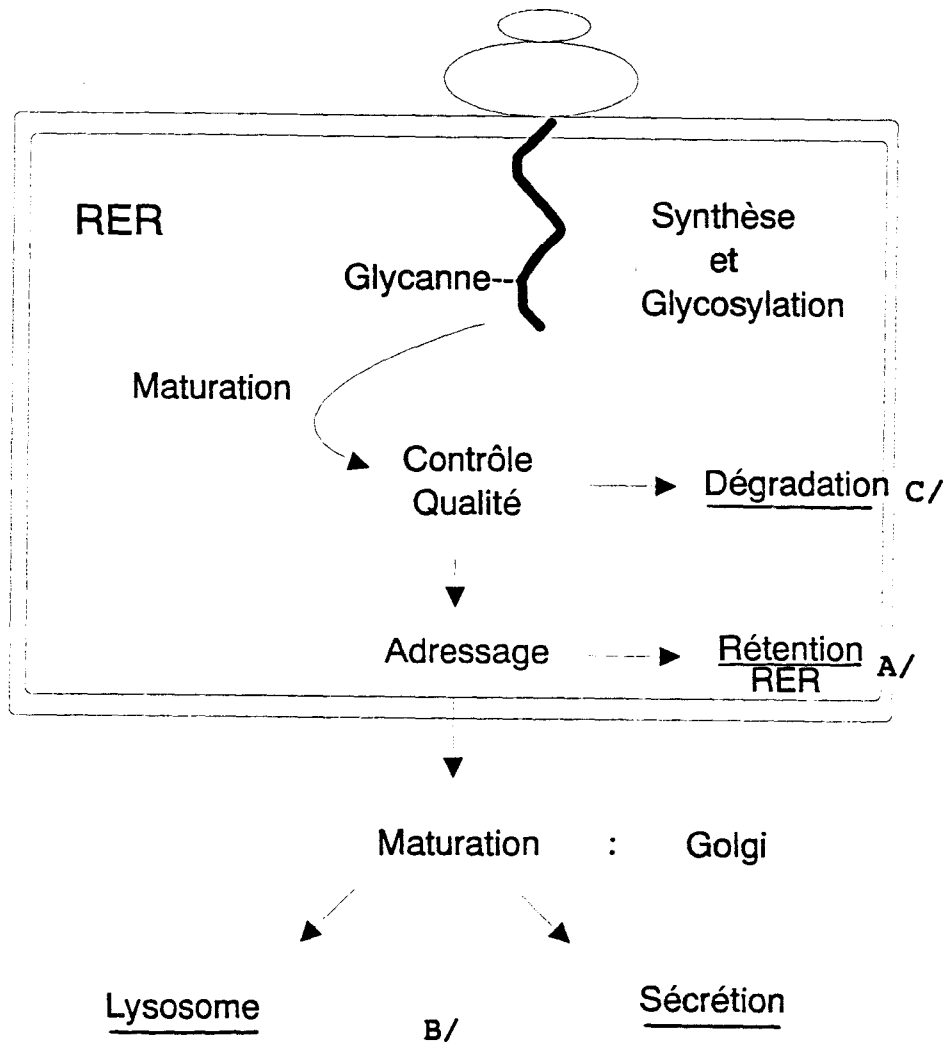


Fig.9 : Destinée d'une N-glycosylprotéine  
A/ RETENTION ; B/ EXPORTATION ; C/ DEGRADATION

## A/ Rétention dans le RER

### 1-1 Les signaux d'adressage dans le RER.

#### a) Rétention des protéines solubles par reconnaissance de la séquence KDEL.

Quatre acides aminés (KDEL) en position C-terminale de protéines solubles suffisent à déterminer leur rétention dans le RER. Alors qu'elles peuvent fuir ce compartiment, entraînées passivement par le flux vésiculaire ("bulk flow"), les protéines ainsi étiquetées vont être spécifiquement triées par une voie de "sauvetage" (Munro et Pelham 1987 ; Pelham et al 1990 et 1991a). Ce mécanisme fait intervenir une voie rétrograde de transport depuis un compartiment post-ER vers le RER, le transport s'effectuant le long des microtubules. Le mécanisme de tri n'est pas totalement élucidé mais s'oriente vers l'existence de récepteurs capables de fixer la séquence KDEL. Ainsi, les protéines possédant cette séquence signal sont recyclées (Fig.10).

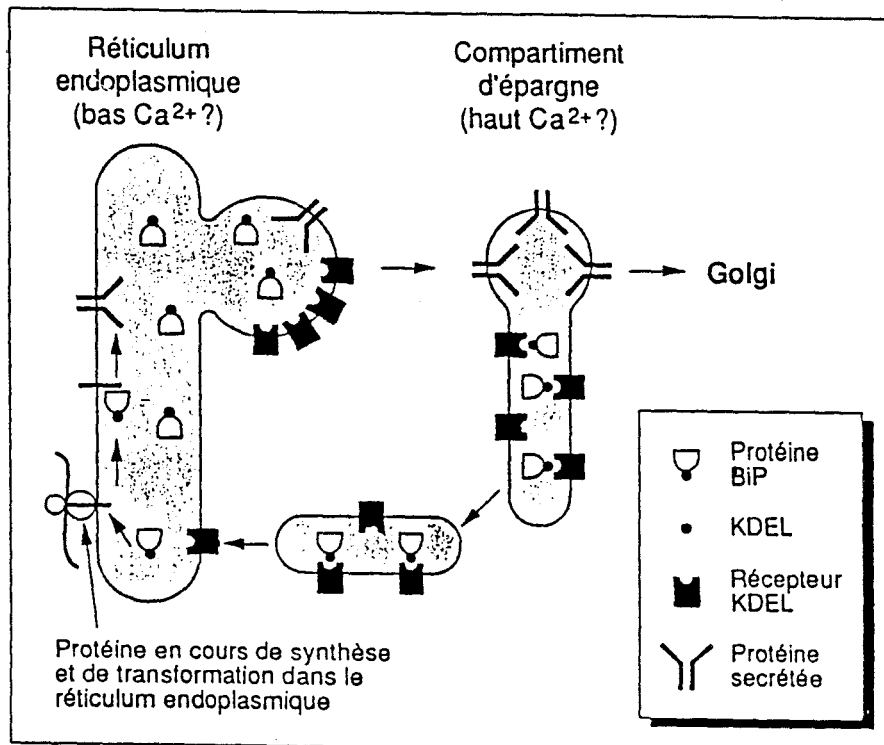


Fig.10 : Mécanisme de rétention des protéines solubles dans le RER par le signal KDEL d'après Kelly (1990).

Chez la levure, le gène ERD2 semble avoir la fonction de récepteur puisque la protéine membranaire de 26 kDa codée par ce gène détermine l'efficacité du système de rétention (HDEL chez la levure) (Sweet et al 1992).

Un récepteur KDEL chez les Mammifères a été identifié grâce à des anticorps monoclonaux. Le cDNA homologue du gène ERD2 a été isolé de cellules bovines ; il code pour une protéine très hydrophobe de 23 kDa (p23) possédant plusieurs domaines transmembranaires. La liaison du récepteur à la séquence KDEL est fonction du pH. La fixation est plus efficace à pH=5-6, pH que l'on observe dans les compartiments pré-golgiens, qu'à pH=6,5, qui est le pH intraluminal du RER dans lequel la protéine est relâchée (Wilson et al 1993).

La localisation intracellulaire de ces récepteurs serait un compartiment intermédiaire entre ER et Golgi appelé l'ERGIC (Vaux et Fuller 1992). D'après Pelham (1988), le tri s'effectue à partir du cis Golgi Network (CGN) car, lorsque la séquence KDEL est greffée sur la cathepsine D (protéine du système endosome/lysosome), elle est modifiée par la N-acétylglucosaminyl-1-phosphotransférase, témoin de son passage dans le cis Golgi. Le CGN, correspondant aux citernes et structures tubulovésiculaires côté cis du Golgi, contiendrait la N-acétylglucosaminyl-1-phosphotransférase. Bien que nécessaire, la présence d'un signal KDEL n'est pas suffisante pour expliquer la rétention. En effet, les protéines liant le calcium dans le RER, les calréticulines (CaBP1, 2, 3 et 4), possèdent toutes une séquence KDEL. Leur localisation dans le RER est vérifiée pour les trois dernières, pas pour CaBP1.

#### b) Rétention de protéines transmembranaires par le motif double lysine.

De nombreuses protéines résidentes du ER ne quittent pas cet organite. Aucune modification de leur structure glycanique n'est observée, leurs O-glycannes ne sont pas substitués par un acide sialique, leurs N-glycannes n'acquièrent pas la

résistance à l'endoglucosaminidase H (endo-H), témoins d'une exportation vers le Golgi. Les protéines transmembranaires de type I seraient maintenues dans le RER grâce à un motif constitué de deux lysines dans leur partie C-terminale (Gabathuler 1990 et Jackson 1990). Les protéines possédant le motif double lysine présentent, par contre, des modifications qui témoignent de l'accès de ces protéines au cis Golgi ; elles ne sont pourtant jamais sécrétées. Le processus de reconnaissance ferait intervenir des facteurs cytosoliques donc non compartimentalisés ; un tri de ces protéines s'effectuerait à partir des différents compartiments de la voie de sécrétion.

Le motif double lysine C-terminal serait un signal de tri depuis chacun des compartiments de la voie de sécrétion vers le RER. Le retrait des deux lysines autorise une circulation le long de la voie de sécrétion. L'efficacité varie en fonction du contexte dans lequel se trouvent les résidus de lysine.

#### 1-2 Devenir des glycoprotéines résidentes du RER.

Dans le RER, les glycoprotéines subissent une maturation par l'action de glucosidases spécifiques, cette maturation nécessite une rétention provisoire dans la lumière du RER. A côté des séquences peptidiques de rétention précédemment décrites, d'autres mécanismes, tels que la glucosylation transitoire, permettent de maintenir des protéines dans le RER.

##### a) Maturation.

Les glycoprotéines résidentes du RER subissent l'action des glucosidases I et II éliminant respectivement le glucose externe en  $\alpha$ 1-3 puis les deux glucoses internes en  $\alpha$ 1-2. La mannosidase du RER retire un (éventuellement deux) mannose(s) conduisant au  $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2^-$  (ou  $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2^-$ ). Elle agit sur les mannoses externes (en  $\alpha$ 1-2) de la branche en  $\alpha$ 1-6 (Kaushal et al 1993).

b) Rétention par glucosylation transitoire sous l'action d'une UDP-Glc:glycoprotéine glucosyltransférase spécifique.

La glucosylation directe de glycoprotéines a été mise en évidence par Ganon et al (1991) et Sousa et al (1991). Cette réaction transitoire s'effectuerait dans le RER de Mammifères, Plantes, Champignons et Protozoaires. Elle concernerait plus de 50% des glycoprotéines. L'enzyme responsable de leur déglucosylation *in vivo* est la glucosidase II bloquée par le dNM. La glucosylation transitoire de glycoprotéines non encore conformées par exemple, éviterait leur trop précoce exportation dans la voie de sécrétion (Suh et al 1989) (Fig.11).

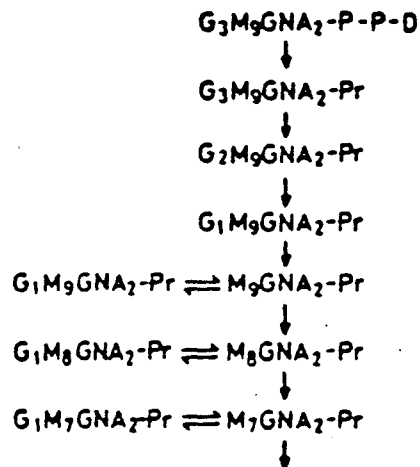


Fig.11 : Re-glucosylation des glycoprotéines nouvellement synthétisées par l'UDP-Glc : glycoprotéine : glucosyltransférase d'après Ganon et al (1991).

La N-glycosylation doit être vue comme un phénomène dynamique puisque le glycanne fixé sur la protéine voit sa structure modifiée, notamment par le glucose. Ce mécanisme empêche le transport de la glycoprotéine vers un autre compartiment avant sa maturation, par exemple.



## B/ Glycoprotéine destinée à un autre compartiment

Lorsqu'une glycoprotéine est destinée à un autre compartiment cellulaire ou à la sécrétion, elle va utiliser des vésicules de transport également appelées navettes "shuttle" pour rejoindre ce compartiment.

### 1) Etapes de la formation d'une vésicule de transport.

Deux voies existent dans le trafic intracellulaire : une voie antérograde, la voie de sécrétion des protéines et glycoprotéines et une voie rétrograde, à laquelle on peut associer l'endocytose. Elles sont résumées dans le schéma de la figure 12 :

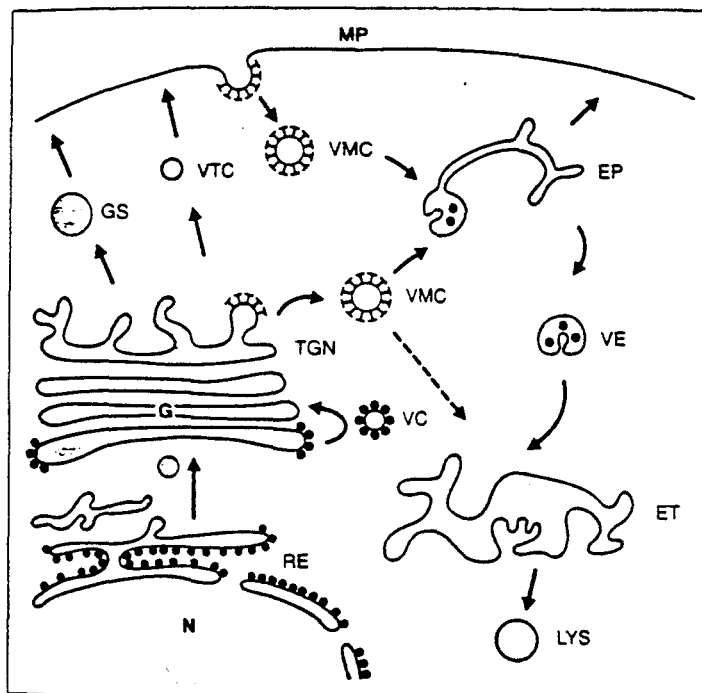


Fig.12 : Schéma du trafic intracellulaire d'après Gruenberg (1993).

#### Voie de biosynthèse :

RE : reticulum endoplasmique      G : Golgi  
 TGN : Trans Golgi Network      MP : membrane plasmique  
 VC : vésicules intragolgiennes entourées par β-COP.  
 GS : granules de sécrétion      VTC : vésicules de Transport Constitutif  
 VMC : vésicules mantelées par la clathrine

#### Voie d'endocytose :

EP : endosomes précoces      ET : endosome tardif  
 LYS : lysosome      VE : vésicule endosomale

Les deux voies impliquent la formation et l'adressage de vésicules de transport. Le recyclage des composés requis pour la formation de ces vésicules fait preuve d'une formidable efficacité puisque 1000 vésicules d'endocytose sont produites par minute à partir de la membrane plasmique, leur demi-vie étant inférieure à une minute. Le transport de molécules entre deux compartiments intracellulaires nécessite la coordination de plusieurs événements retraçant chaque étape du transport, mais aussi de nombreux constituants. L'exportation des protéines depuis le compartiment donneur jusqu'au compartiment accepteur requiert une étape de bourgeonnement et une étape de fusion. Ces deux événements nécessitent de l'énergie apportée sous la forme d'ATP mais également des molécules telles que des acyl coenzyme A, (Rothman et Orci 1992).

Trois grandes classes de protéines vont intervenir dans le transport (Fig.13) (Gruenberg et Clague 1992 ; Kreis 1992).

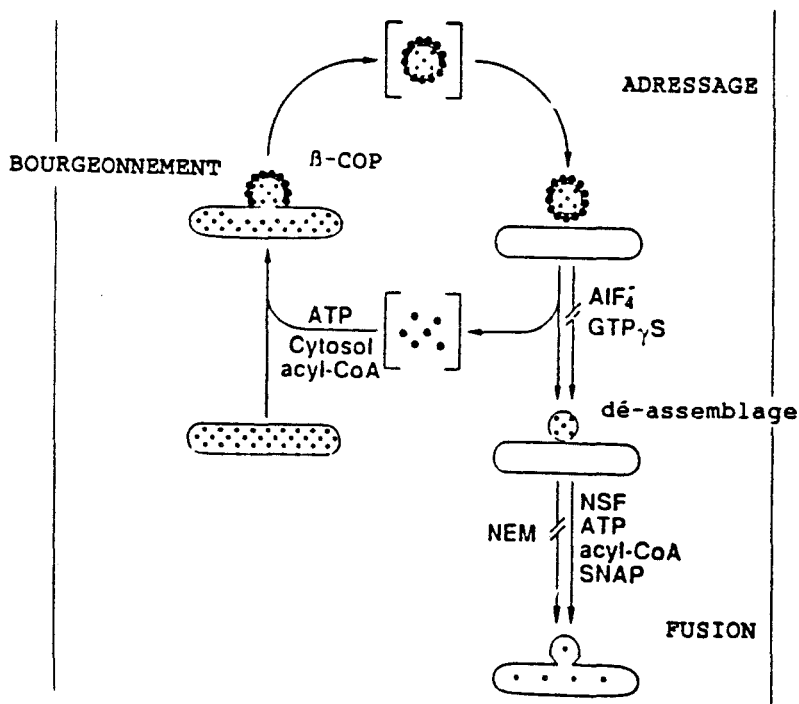


Fig.13 : Principales étapes du transport intracellulaire d'après Wilson et al (1991).

La structure respective de ces constituants est conservée aux différents niveaux du transport.

### 1-1 Rôle des protéines d'enveloppe formant le "coatamère" :

Le bourgeonnement libère une vésicule enveloppée par un cytosquelette. Deux types de protéines d'enveloppe sont connues ; elles sont spécialisées dans la formation de vésicules impliquées dans des transports différents. Tout d'abord, la clathrine, associée aux puits recouverts de la membrane plasmique lors de l'endocytose. Elle est également liée aux vésicules émanant du TGN en route vers les endosomes. Les adaptateurs permettent la formation d'assemblage de protéines ("clusters") excluant les protéines résidentes en reconnaissant spécifiquement les domaines cytoplasmiques des protéines à endocyter. Ces adaptateurs jouent donc un rôle direct dans le tri des protéines. La polymérisation du complexe clathrine/adaptine fournit la force nécessaire au détachement de la vésicule.

Les vésicules de transport entre les compartiments golgiens sont entourées de protéines dénommées  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ -COP (pour "coat protein") constituant le "coatamère". La protéine d'enveloppe  $\beta$ -COP est l'homologue de la bêta-adaptine du complexe adaptine-clathrine. Le transport intragolgien serait non sélectif ("bulk flow") contrairement au transport où intervient la clathrine. Une fois formé, le "coatamère" peut se dépolymériser et être recyclé. L'hydrolyse du GTP permet le désassemblage de cette enveloppe protéique. Cette étape est inhibée par l'analogue structural du GTP : le GTP- $\gamma$ -S.

Il existe un équilibre entre la forme cytoplasmique et la forme membranaire de l'enveloppe protéique associée à la vésicule. Cette association réversible explique leur recyclage (Duden et al 1991).

### 1-2 Rôle des protéines liant le GTP : "GTP Binding Proteins".

Les petites protéines G "Small GTP Binding Proteins" regroupent quatre familles principales (Ras, Rho, ARF/Sar et Ypt1/Sec4/Rab) (Goud et Mc Caffrey 1991). Seules les deux dernières sont impliquées dans le transport vésiculaire. Les

protéines ARF/Sar interviennent dans la formation des vésicules (Sarlp) ou dans l'assemblage/désassemblage du "coatamère" (ARF). Les protéines YPT1/Sec4 ont été mis en évidence chez la Levure, Rab (regroupant en réalité une vingtaine de constituants) est leur homologue chez les Mammifères ; cette famille interviendrait dans l'adressage de la vésicule à son compartiment accepteur.

A côté de ces petites protéines G, interviennent d'autres protéines G, trimériques celles-là. Impliquées dans la transduction de signaux extracellulaires au niveau de la membrane plasmique, ces protéines G trimériques (constituées des sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) contrôleraient également le trafic vésiculaire entre les compartiments Golgiens. Le GTP- $\gamma$ -S constitue un inhibiteur mais également l' $AlF_4^-$ , spécifique de ces protéines G trimériques (Fig.14). L'addition de sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  supprime l'inhibition de la formation des vésicules dont la sous-unité  $\alpha$  est à l'origine.

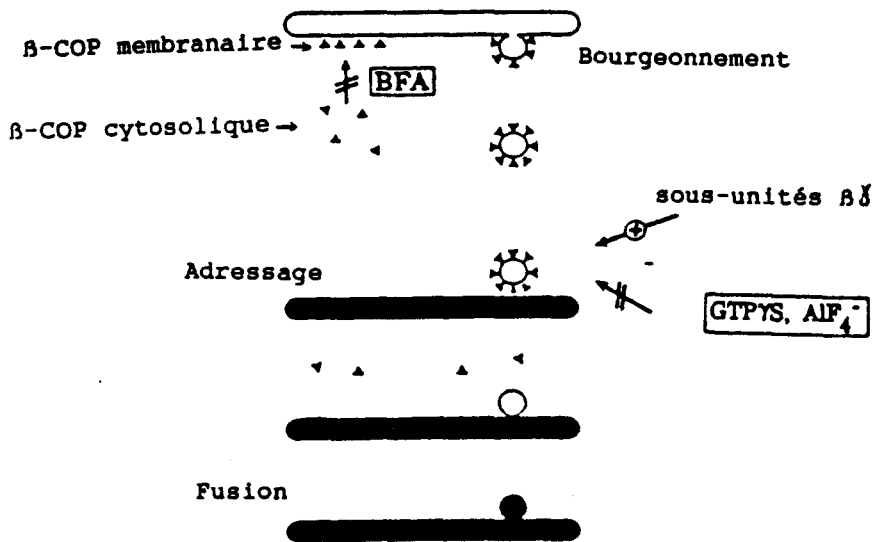


Fig.14 : Rôle et inhibition des protéines G trimériques d'après Burgoyne (1992).

### 1-3 Rôle des protéines de fusion.

Elles permettent le déversement du contenu de la vésicule dans son compartiment cible au cours d'une étape de fusion. Les

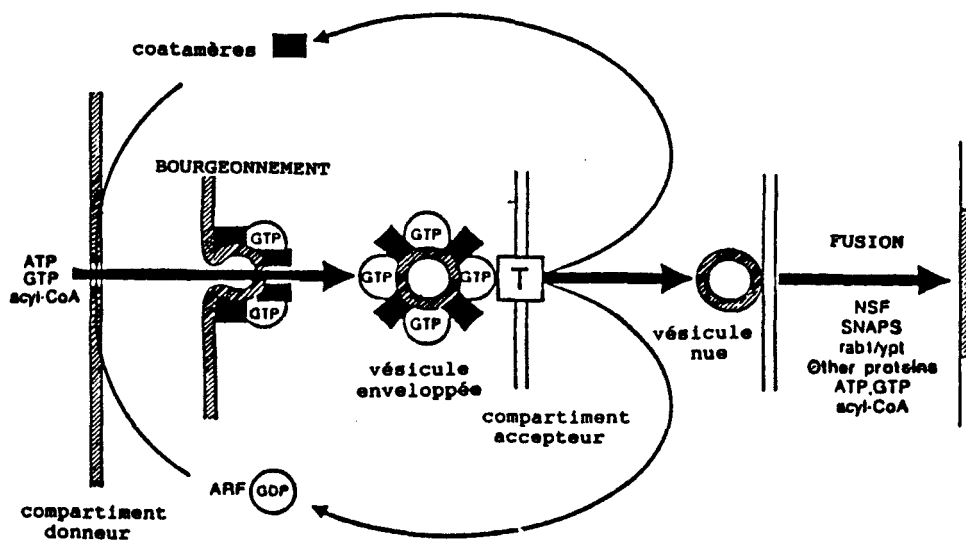


Fig.16 : Schéma des protéines impliquées dans les étapes de Bourgeoisement, Adressage et Fusion des vésicules d'après Rothman et Orci (1992).

forces de répulsion lorsque la distance entre les deux membranes est inférieure à 2 nm sont telles que l'intervention de protéines est essentielle pour que fusionnent des membranes biologiques. La vésicule nue va être capable de fusionner au compartiment accepteur grâce à l'intervention de deux protéines formant un complexe précédant l'étape de fusion (Fig.15). Il s'agit de la protéine d'attachement SNAP (pour Soluble NSF Attachment Protein) qui s'associe à la protéine NSF (NEM Sensitive Factor) afin de permettre l'attachement de la vésicule de transport sur le compartiment accepteur. Cette étape est inhibée par le NEM qui déstabilise le NSF (Waters et al 1991). Toutes ces étapes sont résumées dans la figure 16.

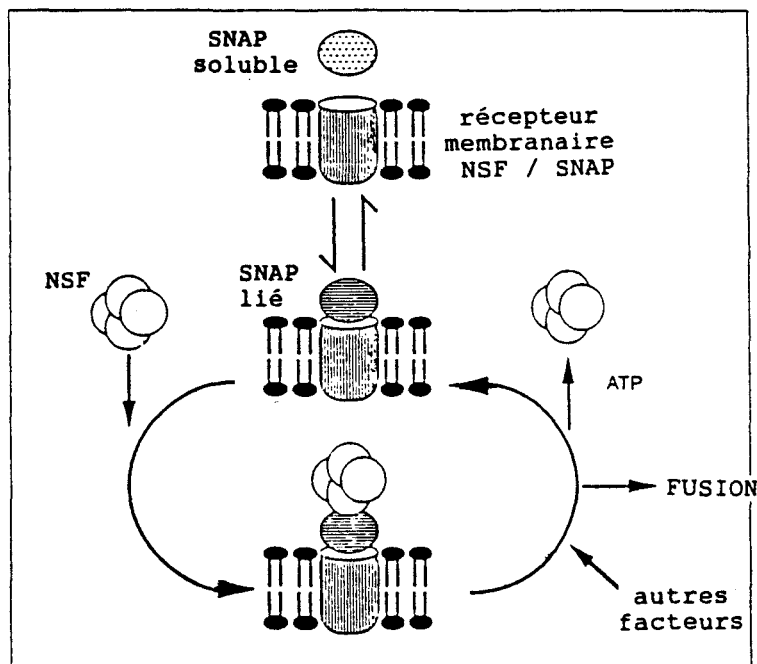


Fig.15 : Protéines impliquées dans l'étape de Fusion des vésicules d'après Wilson et al (1991).

## 2) Les protéines destinées à l'appareil de Golgi.

### 2-1 Les signaux de rétention de l'appareil de Golgi.

Certaines protéines et glycoprotéines assurent leur fonction dans l'appareil de Golgi, par exemple, les glycosyltransférases qui regroupent environ 100 enzymes membranaires impliqués dans la biosynthèse des N- et O-glycosylprotéines et des glycolipides (Schachter 1991 ; Paulson et Colley 1989 ; Shaper et Shaper 1992).

Il est curieux de constater qu'elles ont toutes la même structure en domaine (sans similitude de séquence pour autant). Ces protéines membranaires de type II sont résidentes des citernes Golgiennes. Quelle est la séquence qui implique leur rétention dans le Golgi?

Il semble qu'en plus du domaine transmembranaire (TMD), les séquences adjacentes du TMD du côté N-terminal cytoplasmique et du côté C-terminal luminal sont requises pour une rétention optimale (Tableau I). Aucune homologie de séquence n'existe pour les domaines transmembranaires (Machamer 1993).

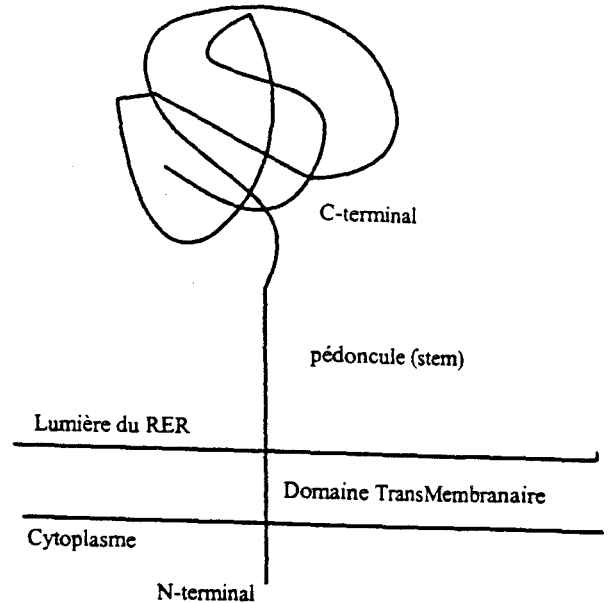
Tableau I : Séquences de rétention de protéines dans l'appareil de Golgi.

GLYCOSYL TRANSFERASE	LOCALISATION SUBCELLULAIRE	SIGNAL DE RETENTION	REFERENCE
IBV M	CG/CGN	TMD	Swift et Machamer (1991)
GnTF-I	MG	TMD	Tang <i>et al</i> (1992)
$\beta$ 1-4GT	TG	TMD	Nilsson <i>et al</i> (1991)
$\alpha$ 2-6ST	TG/TGN	TMD/pédoncule	Munro (1991) Colley <i>et al</i> (1992)
TGN38	TGN	N-terminal cytoplasmique	Humphrey <i>et al</i> (1993)
Kex2p	TGN	N-terminal cytoplasmique	Wilcox <i>et al</i> (1992)

IBV M : protéine d'enveloppe (M) du virus de la Bronchite Infectieuse  
 GnTF-I : N-acétylglucosaminyltransférase I  
 $\beta$ 1-4GT :  $\beta$ 1-4 galactosyltransférase  
 2-6ST : 2-6 sialyltransférase  
 TGN38 et Kex2p sont des marqueurs du TGN

CGN cis Golgi Network  
 CG cis Golgi  
 MG median Golgi  
 TG trans Golgi  
 TGN trans Golgi Network

TMD Domaine TransMembranaire



Les protéines TGN38 (chez les Mammifères) et Kex2p (chez la Levure) possèderaient un résidu clé de Tyrosine dans la région N-terminale cytoplasmique conditionnant la localisation dans le Trans Golgi Network ("TGN"). (ou son compartiment homologue chez la Levure). La clathrine interviendrait directement ou par l'intermédiaire d'adaptine dans la rétention des protéines du TGN. En effet, le signal d'adressage de TGN38 (Tyr-Gln-Arg-Leu) est similaire au signal d'endocytose des récepteurs de la membrane plasmique. Ainsi, l'adressage dans le TGN combine les mécanismes de rétention (par la clathrine) et les mécanismes de tri. En effet, la surexpression de la protéine TGN38 provoque son expression en surface, témoin de la saturation d'un mécanisme de tri de protéines). Cet exemple illustre la complexité du phénomène.

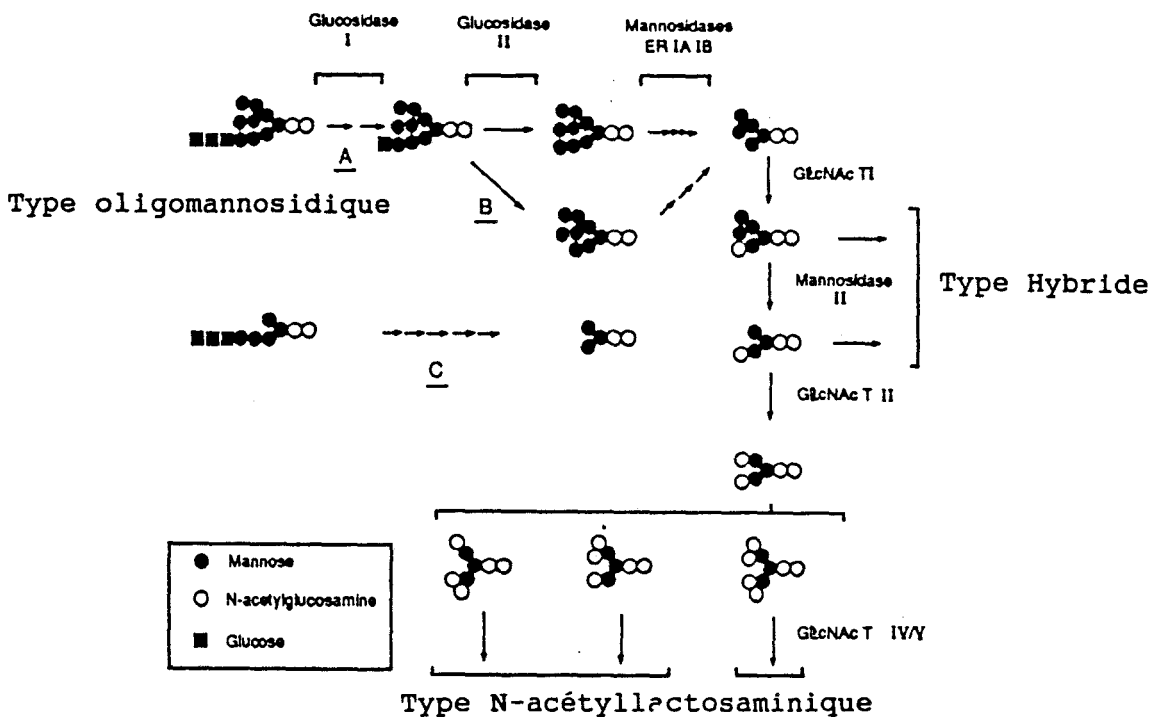
La protéine membranaire M du virus de la bronchite infectieuse (IBV) constitue un modèle. Le premier des trois domaines TM de cette protéine aviaire est nécessaire et suffisant à sa localisation dans le cis Golgi. Si un des acides aminés polaires de ce domaine est muté, la protéine est exprimée à la surface cellulaire. La même protéine exprimée chez la Souris



est localisée dans le réseau Trans Golgien (TGN). Ce sont les 18 acides aminés côté C-terminal cette fois qui sont à l'origine de cette localisation.

## 2-2 Modification du glycanne dans l'appareil de Golgi.

La glycoprotéine acquiert sa structure glycanne définitive après passage dans les différents compartiments golgiens (Fig.17). Cette maturation, appelée "processing" ou épissage consiste en l'élimination de résidus mannosyles par la mannosidase I à l'origine du  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ -. Cette réaction précède le transfert de résidus N-acétylglucosaminyles, galactosyles et sialyles qui sont respectivement transférés par les N-acétylglucosaminyltransférase, galactosyltransférase et sialyltransférase.



Voie A : voie majeure de N-glycosylation  
 Voie B : voie de l'endomannosidase (Lubas et Spiro 1988)  
 Voie C : voie alterne de N-glycosylation

Fig.17 : Maturation du glycanne dans l'appareil de Golgi d'après Hughes (1990).

### 3) Les glycoprotéines destinées au lysosome.

Les hydrolases acides lysosomiques sont adressées vers leur organe grâce à un motif glycanne (contrairement aux séquences de rétention peptidiques précédemment décrites). Cette modification spécifique nécessite l'action concertée de deux enzymes (Fig.18). La N-acétyl-1-phosphotransférase, enzyme localisé dans le reticulum / cis Golgi, greffe un résidu GlcNAc-1-P sur le carbone en 6 du mannose de la glycoprotéine. La phosphodiester N-acétylglucosaminidase, dont la localisation est probablement le Golgi médian, hydrolyse le GlcNAc et génère le signal Man-6-P (Hoflack 1993).

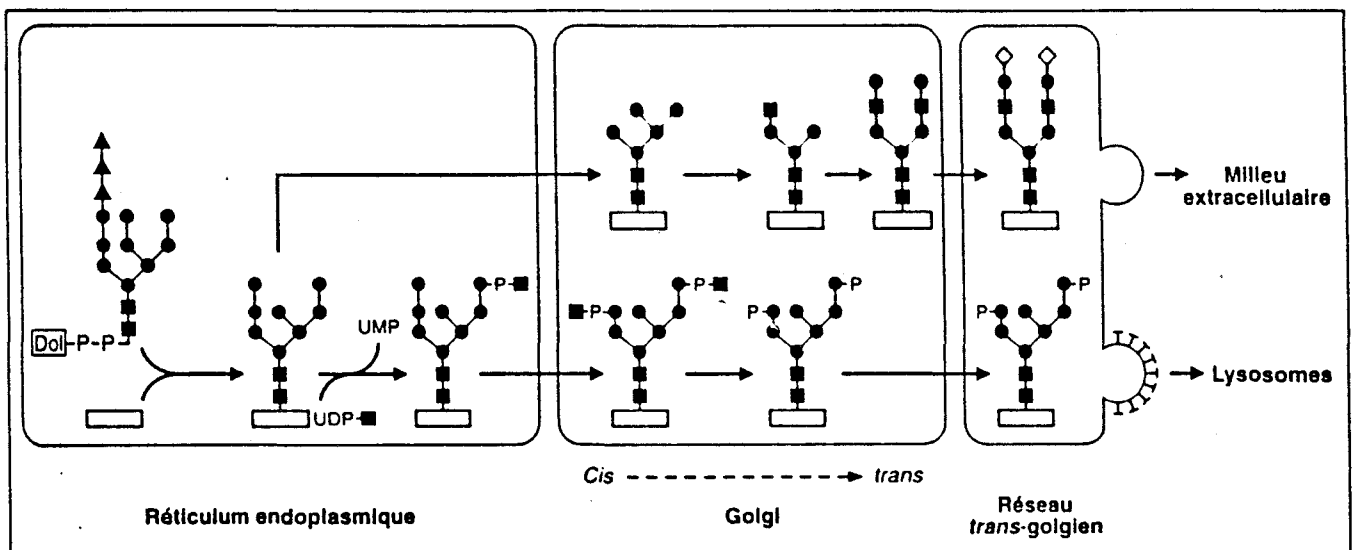


Fig.18 : Synthèse du signal Man-6-P d'après Méresse et al (1993).

La reconnaissance par les récepteurs du Man-6-P permet de trier les glycoprotéines destinées au lysosome possédant cette séquence de celles qui, par défaut, vont subir une maturation glycanne en suivant la voie de sécrétion (Fig.19).

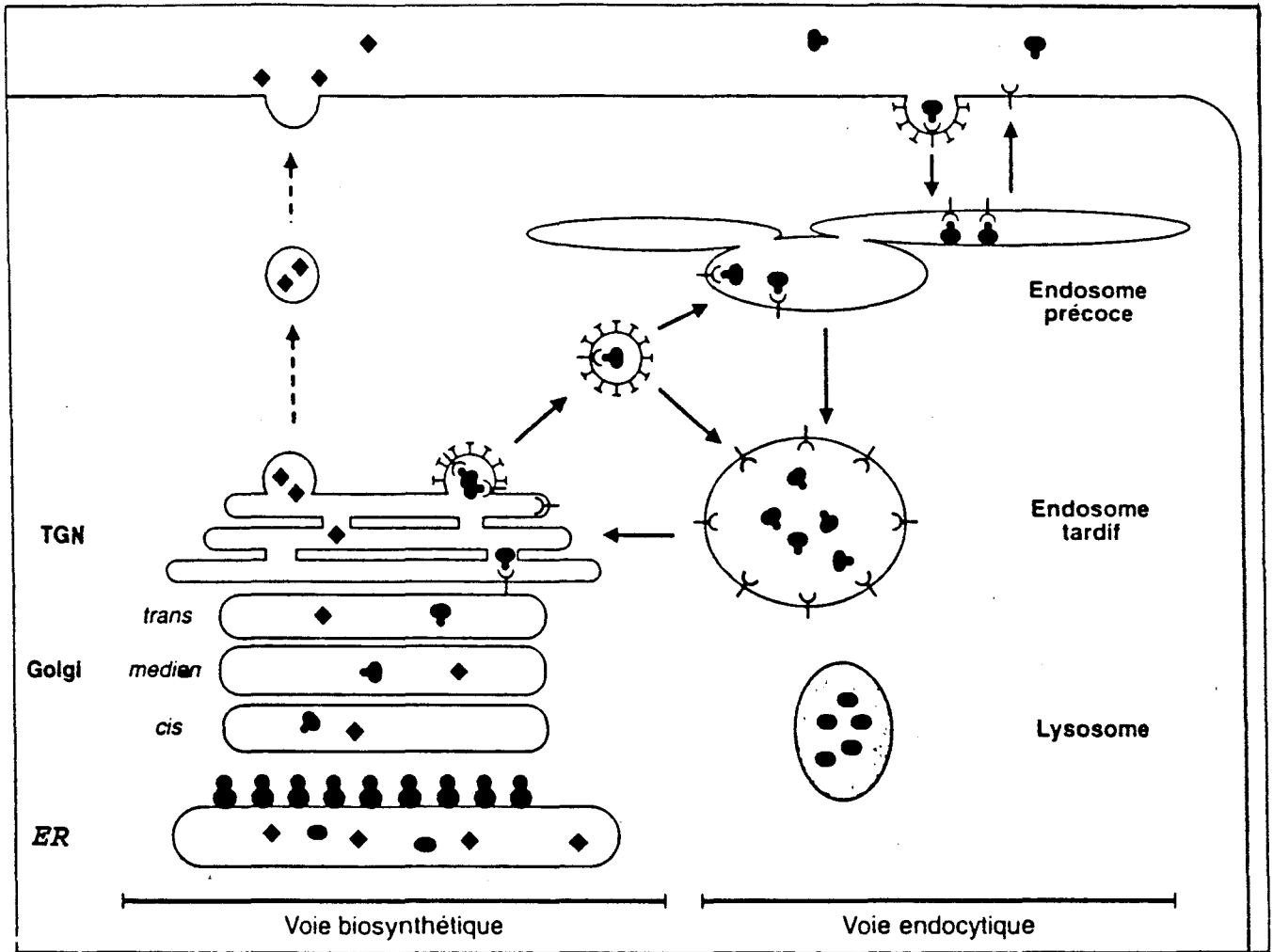


Fig.19 : Adressage lysosomique des protéines possédant le signal Man-6-P d'après Méresse et al (1993).

#### 4) La voie de sécrétion.

Elle apparait comme une voie par défaut. Les glycoprotéines non retenues dans le RER ni l'appareil de Golgi ou un autre compartiment suivent la voie de sécrétion, soit en phase soluble si ces glycoprotéines sont destinées au milieu extracellulaire, soit en phase membranaire s'il s'agit de glycoprotéines exposées à la surface cellulaire. Les glycannes

de ces protéines alors une structure qui est le témoin de la traversée de tous les compartiments golgiens. Mais les glycoprotéines sécrétées ne sont pas forcément stables, leur glycane peut être réarrangé. Cette modification glycanique est plus rapide d'ailleurs que la partie protéique. Les sucres terminaux (acides sialiques) eux-mêmes plus vite que ceux qui constituent le noyau. Ces glycoprotéines seraient capturées à la surface cellulaire et envoyées dans un compartiment endocytyque communiquant avec le Golgi (Fig.20). Deux rôles sont suggérés pour expliquer cette restructuration glycanique. Il pourrait s'agir simplement d'une réparation suite à un mécanisme de dégradation ou d'une réponse de la cellule dans le but de modifier son état de glycosylation (Hughes 1990).

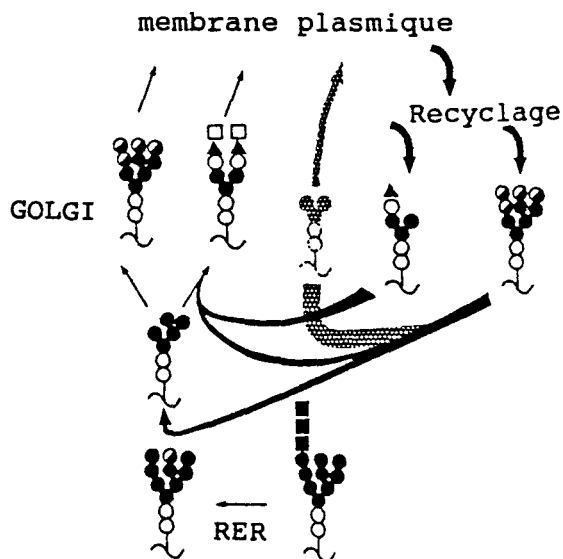


Fig.20 : Modification du glycane de glycoprotéines matures d'après Hughes (1990).

5) Les facteurs perturbant le trafic intracellulaire.5-1 Les moyens physiques.a) La température.

Les fusions membranaires entre vésicule de transport et compartiment cible se déroulent à des températures supérieures à 16°C. En abaissant de cette façon la température d'incubation des cellules, on peut bloquer tout transport intracellulaire (Fig.21).

Il est même possible, pour les cellules de Mammifères, de bloquer sélectivement le trafic entre le RER et l'appareil de Golgi : en se plaçant à 15°C, les glycoprotéines s'accumulent alors dans des structures pré-golgiennes. Le trafic au delà du TGN peut être stoppé par des incubations à 20°C, les glycoprotéines s'accumulent dans le réseau trans Golgien.

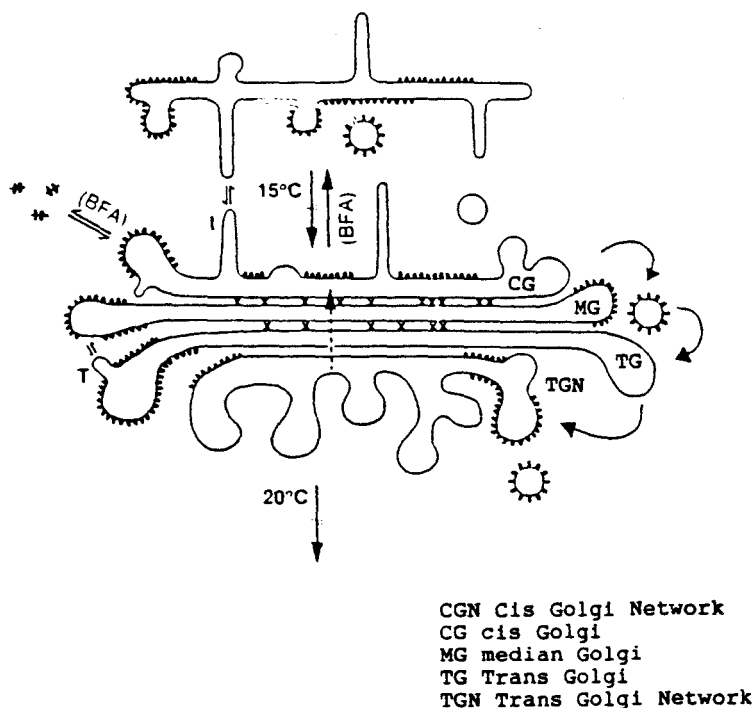


Fig.21 : Blocage du trafic intracellulaire à basse température des cellules de Mammifères d'après Duden et al (1991).

## b) La perméabilisation des cellules.

L'utilisation de cellules perméabilisées permet de modifier le contenu du cytosol sans affecter outre mesure la composition des organites évitant ainsi de recourir à l'utilisation du fractionnement cellulaire qui a un effet plus drastique sur l'intégrité des compartiments cellulaires.

Différentes techniques sont envisageables : elles présentent néanmoins un degré variable rendant la perméabilisation réversible (électroporation) ou non (par l'utilisation de détergents). Entre ces deux extrêmes, existent différentes techniques de perméabilisation utilisant une approche non spécifique (par congélation/décongélation ou basée sur le gonflement des cellules en milieu hypotonique) (Beckers et al 1987). Des techniques plus spécifiques se basent sur la neutralisation des compartiments acides par des bases faibles (Cechelli et al 1983) ou par la perméabilisation sélective de la membrane plasmique par l'utilisation de digitonine, saponine ou de toxines telles que l' $\alpha$ -toxine ou la streptolysine O (Ahnert-Hilger et al 1989).

## 5-2 Les inhibiteurs chimiques.

### a) La Brefeldine A.

La Brefeldine A est une lactone hétérocyclique isolée de *Penicillium brefeldianum* dont l'effet est d'inhiber le trafic intracellulaire. L'effet de la BfA est réversible et s'exerce par la dissociation des protéines d'enveloppe des vésicules assurant le transport entre le reticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (Donalson et al 1991 ; Pelham 1991).

La séquence d'événements qu'on visualise est la suivante :

En une minute, on observe la dissociation des molécules de  $\beta$ -COP (et probablement des coatamères), le gonflement des saccules Golgiens tandis que se fragmente la structure de l'organite entier. L'étape qui est inhibée par la BfA est l'interaction Arf/membrane visant à désassembler les coatamères. Les vésicules nues ont alors tendance à fusionner.

Deux minutes plus tard, commence une redistribution des constituants du Golgi vers le RER (Doms et al 1989). Ce mouvement est appelé mouvement rétrograde puisqu'il est inversé par rapport au mouvement vectoriel des protéines dont la destinée est la membrane plasmique, le milieu extracellulaire ou le compartiment lysosomique. Il consiste en l'apparition d'extensions tubulaires transitoires de 90 nm de diamètre. Il est ATP et protéines cytosoliques dépendant et s'exerce le long des microtubules.

Le blocage du trafic a mis en évidence ce transport rétrograde. On ne sait pas encore si ce transport rétrograde a une signification réelle.

Cinq minutes suffisent pour former un système réticulé Golgi-réticulum. A ce niveau, les témoins de la fusion des compartiments RER-Golgi sont : les protéines résidentes du RER qui subissent l'action des glycosidases Golgiennes modifiant leur état de glycosylation (Chawla et Hughes 1991). Le second témoin de l'action de la drogue est l'inhibition de la sécrétion. La Bréfeldine A a révélé les réseaux existant entre les différents organites. Elle établit en effet une relation de continuité entre RER et Golgi d'une part et entre trans Golgi network et membrane plasmique d'autre part (Lippincott et al 1991). Deux types de transports homotypiques de la cellule sont ainsi mis en évidence : le système RER/Golgi d'une part et le système TGN/membrane plasmique d'autre part (Fig.22).

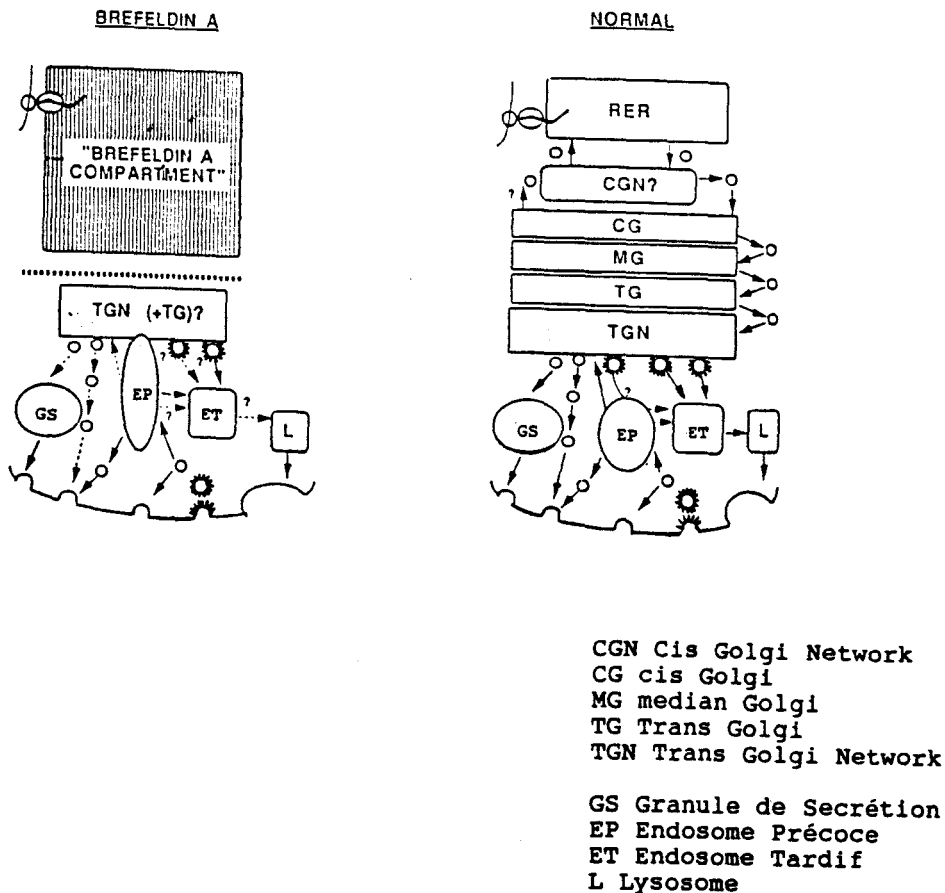


Fig.22 : Action de la Bréfeldine A sur les compartiments intracellulaires d'après Sampath et al (1992).

b) La monensine.

La monensine est un ionophore affectant les compartiments acides de la cellule en permettant l'échange  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  et  $\text{H}^+$  entre ces compartiments. Elle est notamment utilisée pour l'étude du Golgi de cellules animales, elle provoque le gonflement de cet organite (tout comme celui des vésicules de sécrétion) et stoppe le transport intra-Golgien. Il y a accumulation de matériel dans les compartiments médian et trans-golgiens. En présence de cet inhibiteur, les fonctions de clivage protéolytique et de maturation terminale des chaînes glycaniques sont perturbées (Tartakoff 1983).



## C/ Dégradation des protéines et des glycoprotéines endogènes

Nous avons décrit dans un précédent paragraphe l'importance que revêt le glycanne dans la résistance à la protéolyse. Or, on sait maintenant que les protéines et les glycoprotéines nouvellement synthétisées peuvent être dégradées. La plupart des arguments expérimentaux portent cependant sur la dégradation de la partie protéique. Nous décrirons rapidement les acteurs de cette protéolyse.

### 1) Les protéases endocellulaires.

Les protéases endocellulaires sont nombreuses, possédant des caractéristiques et des localisations subcellulaires variables. Elles interviennent aussi bien en modulant la durée de vie d'une protéine qu'en régulant la maturation d'hormones. Elles sont classées en fonction de l'acide aminé constitutif du site actif, du mécanisme d'action ou de leur structure en trois dimensions. Leur distribution est ubiquitaire, tant au niveau des liquides biologiques que des compartiments endocellulaires. Il existe des inhibiteurs dont la spécificité est plus ou moins étroite de chacune des six familles de protéases. Ces familles se répartissent en quatre classes, respectivement, les cystéine-protéases (regroupant deux familles), les sérine-protéases, aspartique- et métallo-protéases (constituées également de deux familles) (Beynon et Bond 1989).

En ce qui concerne les cystéines protéases, elles sont représentées dans trois compartiments intracellulaires sous la forme de cathepsines dans le lysosome (cathepsines B, D, H et L), sous la forme de calpaïnes, protéases dépendantes du calcium de deux types I et II, présentes dans le cytosol et sous la forme de ER60 protéases dans le reticulum endoplasmique (Fig.23). Les cystéines protéases sont inhibées par l'analogue du peptide N-acétyl Leu Leu NorLeucinal (ALLN) à l'exception des ER60 protéases.

lysosome :

Cathepsines (B, D, H et L) ← leupeptine

ER :

ER60 protéases : non inhibées par ALLN

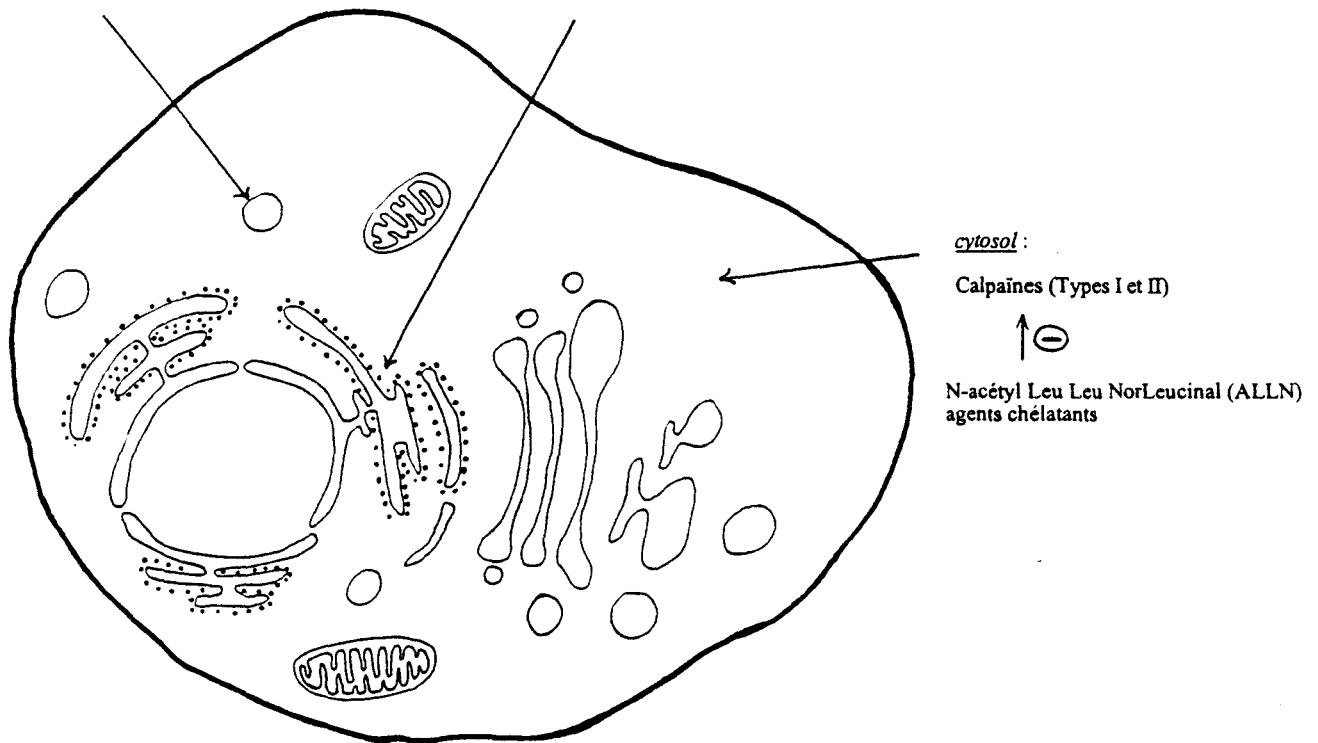


Fig.23 : Exemples de Cystéines protéases, localisation subcellulaire et inhibition.

L'apolipoprotéine E (apo E), glycoprotéine de 34 kDa entrant dans la composition des VLDL et des remnants de chylomicrons, illustre l'action de cystéines protéases, puisque ces protéases seraient impliquées dans la dégradation de la glycoprotéine. L'ALLN, inhibiteurs des calpaïnes, cystéines protéases décrites dans le cytosol, ralentit la dégradation de l'apoE. Cependant, dans ce cas, la localisation présumée de la dégradation serait un compartiment post-Golgien. La présence de cystéines protéases  $Ca^{++}$  dépendantes à l'origine de la dégradation de l'apoE est donc à envisager également dans la lumière de vésicules intracellulaires (Ye et al 1993).

Des protéases ont été identifiées dans le RER (Urade et al 1992) comme étant homologues à la phosphoinositide phospholipase C-alpha (bien que ne possédant ni les mêmes caractéristiques, ni la même activité). Ces protéases sont capables de dégrader des protéines solubles résidentes du RER, les réticuloplasmines, telles que la réticuline, Bip, la protéine disulfure isomérase et la carboxylestérase. Elles sont appelées ER60 protéases et sont régulées par les phospholipides dont les phosphoinositides. En effet, la dégradation dans le RER est inhibée par le phosphoinositol, PIP2 et le phosphatidylsérine mais ni par la phosphatidyléthanolamine, ni par la phosphatidylcholine. Ces ER60 protéases sont des thiols protéases et constituent une nouvelle classe au regard des inhibiteurs classiques des cystéines protéases. Elles seraient inhibées par le para chloro mercuribenzoate (pCMB) mais activées par contre par le  $\beta$ -2 mercapto éthanol.

## 2) Localisation subcellulaire des différents types de dégradation des protéines nouvellement synthétisées.

En ce qui concerne la dégradation des protéines endocellulaires, plusieurs voies sont décrites :

### a) La voie lysosomique.

#### a-1 Description.

La caractéristique des lysosomes est le pH acide d'action des hydrolases qu'ils renferment. Ces organites utilisent une pompe ATPase dépendante afin de concentrer les protons nécessaires à leur acidification. Un compartiment peut ainsi s'individualiser par rapport au pHi intracellulaire, réalisant uniquement à ce niveau des réactions d'hydrolyse. L'inhibition d'un tel compartiment est basée sur sa neutralisation sous l'effet de bases faibles ( $\text{NH}_3$ , chloroquine) ou sur l'utilisation d'inhibiteurs protéasiques par exemple (la leupeptine inhibant les cathepsines B).

Néanmoins, la voie lysosomique concerne essentiellement la dégradation de protéines exogènes. Elles rejoignent le lysosome après endocytose où interviennent par des récepteurs membranaires recyclés à la surface cellulaire.

a-2 Orientation vers une voie de dégradation en fonction de la différenciation et du type cellulaire.

Selon l'état de différenciation cellulaire, une voie de dégradation "lysosome like" peut se mettre en place de manière à détruire certaines protéines nouvellement synthétisées.

Sous certaines conditions de culture (absence de glucose), les cellules HT29 se différencient en entérocytes. Cette propriété en fait un modèle de choix pour l'étude de la N-glycosylation en fonction de la différenciation cellulaire. Les HT29 indifférenciées synthétisent des N-glycosylprotéines de type oligomannosidique qui sont rapidement dégradées tandis que les glycoprotéines homologues des cellules différenciées suivent une maturation classique. L'instabilité des N-glycosylprotéines immatures des cellules indifférenciées est la conséquence de leur adressage vers un compartiment de dégradation. Cette voie catabolique "lysosome like" est en effet inhibée par le  $\text{NH}_4\text{Cl}$  et la leupeptine (Trugnan 1991).

La Swainsonine, inhibiteur des Mannosidases II et lysosomique, stabilise certaines glycoprotéines des cellules indifférenciées qui, en son absence, sont dégradées (Hourri et al 1992) ; elle confirme la nature lysosomique de la dégradation observée dans les cellules indifférenciées.

Les cellules différenciées et indifférenciées présentent donc deux voies différentes de trafic permettant l'adressage spécifique et la maturation des glycoprotéines ou leur dégradation en fonction de l'état de différenciation des cellules.

b) La voie autophagique.

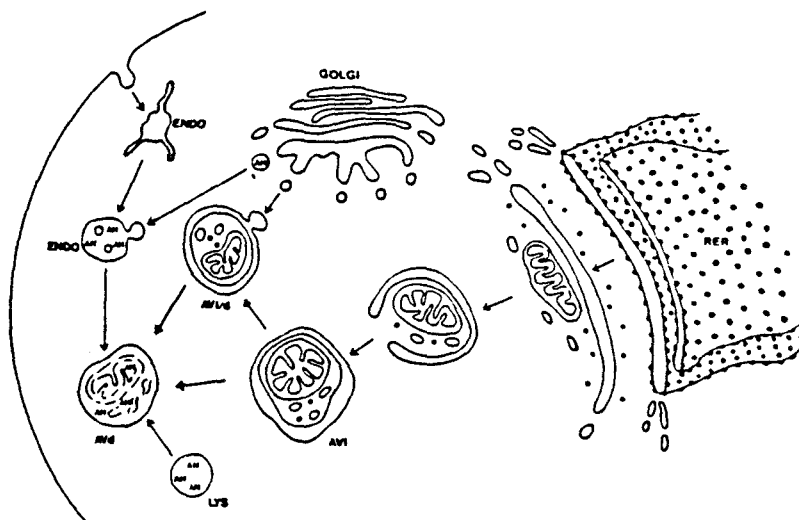
b-1 Description

La séquestration d'une région cytoplasmique est possible par invagination des membranes du RER (Fig.24). La vacuole détachée est entourée d'une double membrane. La maturation de cette vacuole implique :

- la perte de la membrane interne par hydrolyse ou fusion avec la membrane externe ; en effet, les protéines du RER et du cytosol se retrouvent dans un même compartiment. La vacuole est entourée d'une simple membrane.
- l'acquisition d'hydrolases acides.

Deux hypothèses existent : soit l'apport de ces hydrolases se fait par fusion avec un organite préexistant, constituant la source d'enzymes, par exemple le lysosome ou les endosomes tardifs ; soit les enzymes sont envoyées vers la vacuole. L'acidification s'effectue ensuite permettant l'expression de ces hydrolases.

En résumé, l'origine des vacuoles autophagiques serait à priori le RER mais nécessiterait par la suite la fusion avec d'autres organites (Dunn 1990 et Noda et al 1992).



AH : Hydrolase  
 AVi : vacuole autophagique initiale  
 AVi/d : " " intermédiaire  
 AVd : " " de dégradation  
 Lys : lysosome

Fig.24 : Formation d'une vacuole autophagique (d'après Dunn 1990).

## b-2 Régulation.

Cette voie est stimulée dans le cas de cellules cultivées en absence d'apport énergétique, comme moyen de réponse aux conditions défavorables de l'environnement de la cellule. Elle peut concerner des organites tels que les mitochondries. La dégradation de protéines endocellulaires pourrait suivre également ce type de dégradation dans des cas particuliers comme le cancer ou certains cas de différenciation cellulaire.

### c) La voie cytosolique.

La protéolyse cytosolique requiert l'étiquetage de la protéine à dégrader par un motif d'ubiquitine. L'ubiquitine comprend 76 acides aminés et est retrouvée dans tous les tissus et espèces animales. La Glycine en C-terminal de l'ubiquitine se lie au groupement  $\text{NH}_2-\epsilon$  d'une lysine de la protéine à dégrader, le transfert est catalysé par une ligase E3. L'ubiquitine peut donner lieu à une polyubiquitination car elle possède elle-même une lysine en position 48 sur laquelle peuvent se fixer, par leur C-terminal, une ou plusieurs molécules d'ubiquitine donnant un complexe (ubiquitine) $_n$ -protéine. Le protéasome, un complexe protéolytique, dégrade la protéine étiquetée (par un mécanisme ATP dépendant) et recycle l'ubiquitine (Schwartz et Ciechanover 1992).

Trois types de ligases E3 existent, spécifiques des acides aminés:

- \* basiques chargés positivement (Arg, Lys, His)
- \* hydrophobes (Phe, Trp, Tyr, Leu)
- \* neutres (Ala, Ser, Thr)

### d) La voie réticulaire ou Pré-Golgienne.

Les protéines résidentes du RER peuvent subir une dégradation dont une des caractéristiques est d'être inhibée à 15°C. La localisation de cette dégradation est sujette à controverse (Klausner et Sitia 1990 ; Bonifacino et Lippincott 1991). S'agit-il d'une dégradation réticulaire ou Pré-Golgienne?

L'étude de cellules perméabilisées ou de fractions isolées de RER démontrent l'existence de dégradation dans cet organite. D'autres études suggèrent au contraire que la dégradation est température-dépendante, qu'elle nécessite de l'ATP ainsi que des composants cytosoliques définissant un compartiment de dégradation pré-golgien. Les différents exemples sont résumés dans le tableau II.

#### d-1 Description

##### α) Dégradation localisée dans le RER :

L'équipe de Stafford et Bonifacino (1991) a mis en évidence une dégradation protéique dans des cellules perméabilisées. Au cours de la perméabilisation (ici par la streptolysine O), le transport entre organites est supprimé puisque le cytosol et les différents constituants nécessaires à la formation des vésicules sont absents des cellules perméabilisées. Dans ce modèle, la dégradation de la protéine qui sert de sonde (protéine de fusion Tac-TCR) a lieu. De plus, une fraction isolée de RER conduit au même type de dégradation donnant des arguments en faveur du RER comme lieu de dégradation des protéines. L'absence d'ions bivalents (par addition d'EDTA) ou d'apport énergétique (apyrase, GTP- $\gamma$ -S) confirment qu'il n'est pas nécessaire de changer de compartiment pour qu'ait lieu la dégradation. L'utilisation de Brefeldine A est un autre moyen de bloquer le transport vésiculaire entre RER et Golgi. De la même manière, l'absence de transport au delà du RER dans ces cellules n'empêche pas la dégradation de la protéine chimérique Tac-TCR, renforçant l'hypothèse d'une dégradation s'effectuant sur le lieu même de la synthèse protéique.

Tableau II : Dégradation réticulaire/pré-golgienne de protéines selon chacune des voies décrites (RER ; Pré-Golgi ; RER et/ou Pré-Golgi).

LIEU DE LA DEGRADATION	REFERENCE
<u>ER</u>	
Tac-TCR	Stafford et Bonifacino (1991)
Récepteur de l'asialo sous-unité glycoprotéine H2b	Wikström <i>et al</i> (1993)
apolipoprotéine B	Furukawa <i>et al</i> (1992)
sucrase isomaltase	Quaroni <i>et al</i> (1993)
HMG-CoA réductase	Inoue <i>et al</i> (1990) Meigs et Simoni (1992)
Dipeptidyl peptidase IV	Tsuji <i>et al</i> (1992)
<u>Pre-Golgi</u>	
HLA-DR $\beta$	Cotner (1992)
Ribophorine I	Tsao <i>et al</i> (1992)
$\alpha 1$ antitrypsine variant	Ciccarelli <i>et al</i> (1993)
<u>Pre-Golgi et/ou ER</u>	
Récepteur de l'asialo glycoprotéine H2a	Amara <i>et al</i> (1989) Lederkremer et Lodish (1991)
aggrecan	Vertel <i>et al</i> (1993)
Récepteur des cellules T :	
* TCR $\alpha$ - $\beta$	Lippincott <i>et al</i> (1988) Bonifacino <i>et al</i> (1989)
* CD3 $\gamma$	Wileman <i>et al</i> (1990)
préprofacteur $\alpha$	Su <i>et al</i> (1993)
Antigène de surface du virus de l'Hépatite B	Huovila <i>et al</i> (1992)



La dégradation des sous-unités H2b du récepteur des asialoglycoprotéines (ASGPR) persiste lorsque tout transport vésiculaire est empêché ; de plus, elle est mise en évidence dans des cellules perméabilisées confirmant une dégradation s'effectuant dans le RER ou dans un sous-compartiment du RER (Wikström et Lodish 1993).

La dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) est exprimée à la surface des entérocytes. La mutation d'un seul acide aminé de sa séquence provoque sa dégradation dans le RER : sa demi-vie passant de 38 heures à 54 minutes (Tsuji et al 1992). Elle n'est plus exprimée à la surface cellulaire et ses N-glycannes restent majoritairement endo H sensibles. Il semble que la DPP IV serait piégée et dégradée dans le RER. La mutation pourrait empêcher la dimérisation de l'enzyme bloquant son exportation du RER et induisant sa dégradation (également Loch 1992).

#### β) Dégradation localisée dans un compartiment pré-golgien.

A l'opposé est décrite une dégradation également non lysosomique, mais nécessitant un transport hors du RER par rapport au cas précédent déterminant un compartiment pré-golgien. Le blocage du transport intracellulaire vers ce compartiment empêche alors toute dégradation.

La sous-unité HLA-DR-β, instable en absence de chaîne α, est rapidement dégradée. Il est possible cependant d'inhiber cette dégradation en incubant les cellules à 16°C ou en présence de CCCP, conditions connues pour inhiber le transport entre RER et Golgi. Ceci implique un changement de compartiment pour qu'ait lieu la dégradation. (même si ce compartiment n'est pas clairement identifié) (Cotner 1992). De même, la première phase de la dégradation de la ribophorine I s'effectuerait dans un compartiment pré-golgien (Tsao et al 1992).

### γ) Dégradation localisée dans les compartiments RER et/ou pré-golgiens.

Une solution mitigée serait d'envisager que les protéines ayant quitté le RER pourraient y retourner au moyen du transport rétrograde entre RER et Golgi (s'il existe de manière constitutive). Les deux hypothèses (dégradation dans le RER ou dans un compartiment Pré-Golgien) se rejoignent ici dans le sens où, selon les systèmes, l'exportation des protéines du RER est nécessaire à la visualisation de leur dégradation. Celle-ci, non précisée, pourrait avoir lieu dans le RER lui-même.

D'après ce qui a été décrit, la dépendance énergétique est caractéristique d'un compartiment Pré-Golgien tandis que la mise en évidence dans un système de cellules perméabilisées ou dans une fraction isolée caractérise le RER. La dégradation de l'aggreccan de chondrocytes nanométriques (Vertel et al 1993) persiste lorsque tout transport vésiculaire est empêché tandis qu'elle est mise en évidence dans des cellules perméabilisées. Il semble difficile, dans ce cas de trancher entre une dégradation pré-golgienne ou s'effectuant dans un sous-compartiment du RER. Existente d'autres cas où la dégradation débute dans le RER et se poursuit dans un compartiment pré-golgien. La sous-unité H2a du récepteur des asialoglycoprotéines conduit à la formation d'un fragment de 35 kDa qui cofractionne avec les marqueurs du RER. La dégradation de ce fragment peut toutefois se poursuivre dans un compartiment pré-golgien ATP-dépendant (Amara et al 1989).

### d-2 Régulation de la voie de dégradation réticulaire / pré-golgienne.

#### α) Oligomérisation.

L'assemblage de sous-unités peut s'avérer être un moyen d'éviter la dégradation. Dans le cas de protéines multimériques, la formation d'un complexe apte à être transporté hors du RER stabilise les sous-unités susceptibles d'être dégradées. C'est le cas du dimère  $\gamma\epsilon$  du récepteur des

lymphocytes T (TCR). La dégradation de la chaîne  $\epsilon$  est inhibée lors de son assemblage avec la chaîne  $\delta$  ; en attendant de s'associer aux autres sous-unités du TCR, le dimère, maintenu dans le RER, reste stable. Le modèle proposé par Bonifacino et al (1989) suggère que certaines sous-unités de complexes multimériques contiennent des signaux spécifiques déterminant la rétention et/ou la dégradation dans le RER. Ces signaux, présents dans les régions impliquées dans la formation des oligomères, seraient masqués lors de la formation du complexe. Le complexe, ainsi protégé, devient compétent pour le transport au delà du RER.

Bonifacino et al (1990) ont bien étudié le mécanisme de dégradation dans le RER. Ils ont notamment mis en évidence une séquence de rétention des glycoprotéines transmembranaires constituée de 23 acides aminés. (également Lankford 1993). Cette séquence agirait en induisant l'envoi vers un compartiment de dégradation ou serait une séquence signal reconnue par le système protéolytique du RER. Néanmoins, la rétention dans le compartiment RER ne suffit pas à déclencher un processus de dégradation. La rétention artificielle de glycoprotéines induite par la Brefeldine A n'implique pas leur dégradation systématique.

La dimérisation de nombreuses protéines s'effectue par le biais de leur domaine transmembranaire. Ce sont le cas du TCR ou du CMH de classe II (Cosson et al 1991). Pour ces deux derniers cas, les hétérodimères se forment par l'association d'acides aminés de charges opposées (qu'il s'agisse des chaînes  $\alpha$  et  $\delta$  du TCR ou des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du CMH-II). Néanmoins, les ectodomains du TCR peuvent s'associer et stabiliser le complexe multimérique évitant sa dégradation dans le RER (Wileman et al 1993).

### B) Protection par le substrat.

La dégradation dans le RER peut être évitée lorsque la glycoprotéine à dégrader est protégée par son substrat :

Dans le cas du cytochrome P450-2E1, système enzymatique inductible par l'éthanol et intervenant dans la détoxification (Eliasson et al 1992), l'entrée dans une voie catabolique est déterminée par la présence ou non de substrat. En se liant au substrat, l'enzyme est protégé d'une dégradation dans le réticulum endoplasmique et est orienté vers une dégradation lysosomique plus lente. En absence de substrat, la phosphorylation AMPc dépendante du cytochrome P450 le conduit à perdre son hème. Cette régulation hormonale qui s'additionne donne lieu à une dégradation rapide localisée dans le RER ; cette dégradation est activée par les complexes Mg/ATP. C'est donc à la fois le routage de la protéine (dégradation dans le lysosome ou dans le RER) qui est concerné mais aussi la durée de vie de l'enzyme ( $t_{1/2}$  de 7 heures dans le RER, de 37 heures dans le lysosome) qui est conditionnée par la présence ou non de substrat et/ou d'hormone.

Un autre exemple de dégradation régulée au sein du RER est celle de l'HMG-CoA réductase décrite par Meigs et Simoni (1992) ; Roitelman et Simoni (1992). Cette dégradation est le témoin d'une régulation par le produit final, en l'occurrence ici, le mévalonate.

#### γ) Orientation vers une voie de dégradation en fonction de l'état de différenciation cellulaire.

L'orientation des protéines nouvellement synthétisées vers un processus de dégradation dépendrait des capacités d'une cellule à réaliser une synthèse fonctionnelle. En effet, l'expression de la chaîne  $\alpha$  du récepteur des cellules T (TCR) dans une souche de fibroblastes conduit à une dégradation pré-golgienne. La transfection des lymphocytes T par le gène du TCR- $\alpha$  conduit par contre à une dégradation de type lysosomique. Cette dégradation, pH sensible est inhibée par la leupeptine, la monensine et les ionophores. Lorsqu'on inhibe ce processus de dégradation, on révèle une deuxième voie, masquée jusqu'alors. Il s'agit d'une voie de dégradation RER/Pré-Golgienne (Lippincott et al 1988).

### δ) Influence du potentiel redox du RER sur la dégradation des protéines dans ce compartiment.

La lumière du RER se révèle être un environnement oxydant comparativement au cytosol, créant des conditions compatibles avec la structuration secondaire des néoglycoprotéines. Le tétrapeptide Asn-Tyr-Thr-Cys, utilisé comme substrat de la N-glycosylation, s'associe d'ailleurs au glutathion, principal partenaire des réactions redox du RER. L'environnement redox du RER joue un rôle important dans la mise en conformation et l'exportation des protéines (Tatu et al 1993) et influence la dégradation des protéines. Les agents réducteurs tels que le dithiothréitol (DTT) peuvent induire une dégradation en provoquant la formation d'agrégats des protéines en voie de maturation. A l'inverse, des agents oxydants comme le diamide bloque la dégradation *in vivo* de l'HMG-CoA réductase, du TCR- $\alpha$  (Stafford et Bonifacino 1991).

Bien que l'ATP n'ait pas été détecté dans le RER, plusieurs arguments plaident pour sa présence dans ce compartiment cellulaire :

- Le transport d'ATP vers la lumière du RER a été mis en évidence dans des vésicules isolées de foie de Rat et de pancréas de Chien (Clairmont et al 1992), vraisemblablement via un transporteur membranaire spécifique.
- La formation du complexe peptide/CMH-I dans le RER nécessite de l'ATP.
- Le complexe Bip/protéine se dissocie *in vitro* lors de l'addition d'ATP, l'affinité élevée de Bip pour l'ATP ainsi que son activité ATPasique sont en faveur de la présence d'ATP dans le RER.

### 3) Rôles attribués à la dégradation des protéines.

#### 3-1 Contrôle de la conformité avant l'exportation

La dégradation des protéines sur leur lieu même de synthèse représenterait un point de régulation visant à contrôler l'état de conformité de la protéine néosynthétisée. Le

"contrôle qualité" qu'exerce le RER détermine l'exportation dans la voie de sécrétion de la glycoprotéine ou l'orienté vers une voie de dégradation dont les signaux restent inconnus. Des protéines, regroupées sous le terme de protéines chaperonnes, interviennent dans l'acquisition de la conformation par un jeu d'interactions transitoires avec la protéine néosynthétisée. C'est ainsi que la protéine Bip ("Binding immunoglobuline protein") aurait un rôle de protection/déprotection, puisqu'en s'associant avec les séquences peptidiques dénaturées, elle empêche l'engagement de protéines dans des assemblages incorrects ou les dissocient, mais surtout, elle permet l'acquisition de la conformation adéquate des protéines immatures (Gething et Sambrook 1992 ; Ou et al 1993).

### 3-2 Régulation du taux d'expression d'une sous-unité

Le récepteur des lymphocytes T (TCR) est un heptamère constitué des chaînes  $\alpha$ - $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\zeta$ ,  $\epsilon$  et  $\Sigma$ . La dégradation de la sous-unité  $\alpha$  ou d'oligomères incomplets a été décrite par Lippincott-Schwartz et al (1988). La dégradation de la chaîne  $\alpha$  peut correspondre à une synthèse en excès de cette sous-unité par rapport à l'ensemble de l'heptamère du TCR.

### 3-3 Présentation de peptides antigéniques.

Chez les Vertébrés supérieurs, un des rôles de la dégradation des protéines néosynthétisées serait de permettre un contrôle permanent de l'intégrité de la cellule. En effet, au cours de la synthèse d'une protéine, une fraction serait hydrolysée dans le cytosol (dégradation envisagée dans la discussion).

Les peptides obtenus sont ensuite transportés à l'intérieur du RER, grâce à un transporteur récemment caractérisé (Harding et Geuze 1993). Il s'agit d'un Transporteur Associé au "Processing" antigénique localisé dans un compartiment pré-golgien (TAP1 / TAP2) (Bahram 1993) pour être y associés aux molécules de CMH-I (Fig.25). Les complexes peptides / CMH-I ainsi formés migrent à la surface cellulaire où ils vont faire

d'une reconnaissance spécifique par les lymphocytes T cytotoxiques, porteurs du récepteur CD8. La liaison CMH/peptide protège le peptide d'une dégradation supérieure avant la présentation au récepteur des cellules T (TCR).

Deux conséquences surviennent alors :

- si le peptide associé au CMH-I est reconnu comme un constituant normal de la cellule (molécule du soi), le lymphocyte T se dissocie de la cellule.
- s'il n'est pas reconnu (molécule du non soi), la cellule est alors détruite par le lymphocyte T cytotoxique.

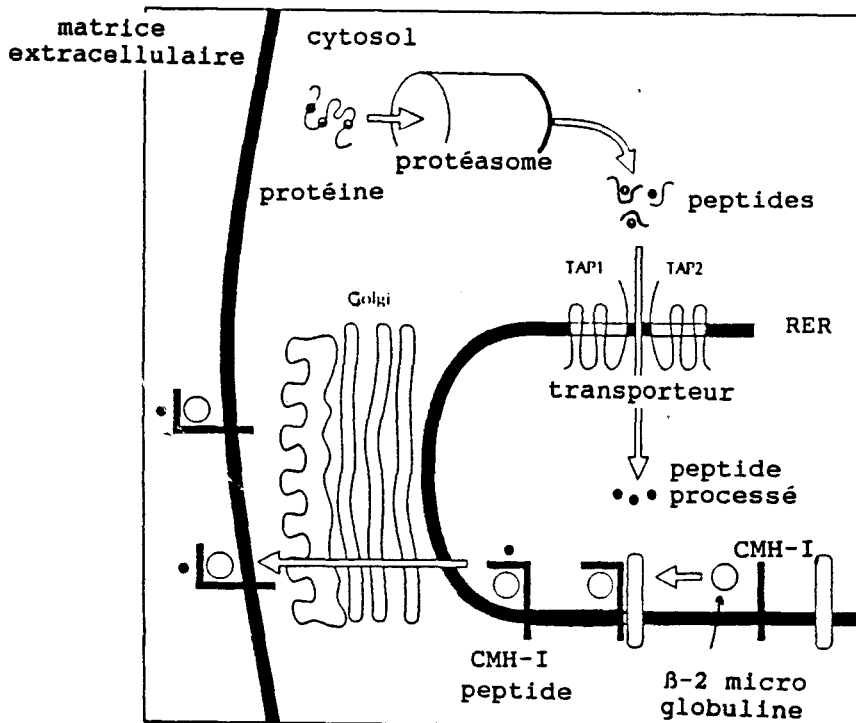


Fig.25 : Présentation de peptides associés au CMH-I d'après Harding et Geuze (1993).

Les néoglycoprotéines synthétisées dans le RER et dégradées dans ce compartiment pourraient emprunter cette voie de

présentation à la surface cellulaire dont le rôle reste un véritable contrôle de la conformité au soi (Sette et Grey 1992 - Murray et McMichael 1992).



## **CONCLUSION DES GENERALITES**

L'information déterminant la destinée d'une N-glycosylprotéine est présente dans sa séquence primaire ; elle est donc définie dès sa synthèse. Lorsque la glycoprotéine est synthétisée, s'exerce au niveau du RER un véritable "contrôle qualité" attestant de la conformation correcte de la glycoprotéine. Si elle est jugée apte à rejoindre le compartiment où elle assurera sa fonction biologique, la glycoprotéine est alors exportée hors du RER. Elle utilise le trafic intracellulaire mais peut être séquestrée dans les organites cellulaires qu'elle traverse grâce à des signaux de rétention spécifiques, présents soit sur la partie protéique (cas de la séquence KDEL), soit sur la partie glycanne (signal Man-6-P). La sécrétion dans le milieu extracellulaire apparaît alors comme la voie par défaut témoignant de l'absence de signaux de rétention.

Lorsque la protéine ou la glycoprotéine est jugée inadéquate par le "contrôle qualité" du RER, un mécanisme de dégradation peut se mettre en place. Comment s'explique la dégradation d'une néoglycoprotéine puisque l'on attribue au glycanne un rôle protecteur face à la protéolyse ? Deux hypothèses peuvent expliquer cette dégradation :

- les sites de glycosylation ne sont pas occupés ; l'accès facilité des protéases leur permet d'agir.

- la glycoprotéine est parfaitement glycosylée ; la dégradation nécessite dans ce cas l'élimination préalable des glycanes.

Les questions qui m'ont été posées concernent :

- \* la mise en évidence d'une dégradation des néoglycoprotéines.
- \* l'existence d'un témoin de cette dégradation.
- \* la localisation subcellulaire de ces événements.

C'est à l'ensemble de ces questions que nous avons voulu répondre.

# **TRAVAUX PERSONNELS**

MISE EN EVIDENCE DE POINTS POTENTIELS DE REGULATION DE LA  
SYNTHESE DES N-GLYCOSYLPROTEINES.

DESTINEES DES GLYCANNES DES INTERMEDIAIRES LIPIDIQUES.

Si le cycle des dolichols est soumis à un rétrocontrôle, chaque étape de la synthèse peut représenter un point de régulation. Comme nous l'avons développé, les précurseurs, les enzymes impliqués mais aussi la quantité de protéines à glycosyler sont autant de facteurs de régulation.

Un matériel oligosaccharidique soluble est libéré lors du processus de N-glycosylation. Nous avons voulu comprendre le rôle de ces oligosaccharides, mis en évidence dans de nombreux systèmes. Servent-ils à ajuster quantitativement le donneur glycanique à l'accepteur protéique? Afin de vérifier cette hypothèse, nous nous sommes, dans un premier temps, attachés à caractériser ce matériel oligosaccharidique soluble.

Ce travail a fait l'objet de la publication :

"Different fates of oligosaccharide moieties of lipid intermediates." paru dans Glycobiology (1992) 2, 127-136.

## Different fates of the oligosaccharide moieties of lipid intermediates

René Cacan<sup>1</sup>, Corinne Villers<sup>1</sup>, Michel Bélard<sup>1</sup>,  
Adina Kaiden<sup>2</sup>, Sharon S.Krag<sup>2</sup> and André Verbert<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Chimie Biologique, UMR no. 111 du CNRS, Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois, 59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France and <sup>2</sup>Department of Biochemistry, School of Hygiene and Public Health, The Johns Hopkins University, Baltimore, MD 21205, USA

<sup>3</sup>Author to whom correspondence should be addressed

We have previously described that the *N*-glycosylation process was accompanied by the release of oligosaccharide-phosphates and neutral oligosaccharides. The relationship between oligosaccharide-P-P-dolichol and its metabolic products (glycoproteins, oligosaccharide-phosphates and neutral oligosaccharides) was investigated by analysing the structure of the oligosaccharide moieties and the kinetic behaviour of the various species in pulse and pulse/chase experiments. For these studies, a glycosylation mutant of Chinese hamster ovary cells (B3F7) which does not synthesize mannosylphosphoryldolichol was utilized. Evidence was obtained for the presence of two pools of oligosaccharide-P-P-dolichol which have different fates. One pool is not glucosylated, is rapidly labelled and immediately chased by mannose, and generates the oligosaccharide-phosphate species. The second pool is glucosylated, exhibits a lag time (5–10 min) prior to being labelled, and is utilized in the glycosylation of proteins and in the production of neutral oligosaccharides. We postulate that the cleavage of non-glucosylated lipid intermediates generating oligosaccharide-phosphates represents a 'bypass' in the dolichol cycle which allows direct regeneration of dolichyl phosphate. The other metabolic fate of non-glucosylated oligosaccharide-lipids, glucosylation, results in their use as effective substrates for the glycosylation of proteins or in the generation of neutral oligosaccharides.

**Key words:** Chinese hamster ovary cells/dolichyl phosphate/glycosylation mutant/HPLC/kinetics

### Introduction

The co-translational addition of carbohydrate to an Asn-X-Ser(Thr) sequence in a protein (*N*-glycosylation) is at the intersection of two separate metabolic pathways—the biosynthesis and translocation of the acceptor protein, and the formation of the donor oligosaccharide-lipid via the dolichol cycle. The main question we are addressing is how the quantity and the quality of lipid intermediates are regulated for the optimal glycosylation of a variable amount of nascent proteins.

Regulation of oligosaccharide-lipid levels may be accomplished by hydrolysis to free oligosaccharide. The release of free oligosaccharide associated with glycoprotein synthesis has been observed in a number of biological systems, including mouse myeloma microsomes (Hsu *et al.*, 1974), pig liver

microsomes (Oliver *et al.*, 1974), rat liver (Richard *et al.*, 1978), rat splenocytes (Cacan *et al.*, 1980), hen oviduct microsomes (Hanover and Lennarz, 1982), thyroid slices and microsomes (Anumula and Spiro, 1983; Spiro and Spiro, 1991) and yeast membranes (Bélard *et al.*, 1988). Structural analyses of the free oligosaccharides revealed both neutral and charged species (Cacan *et al.*, 1980, 1987).

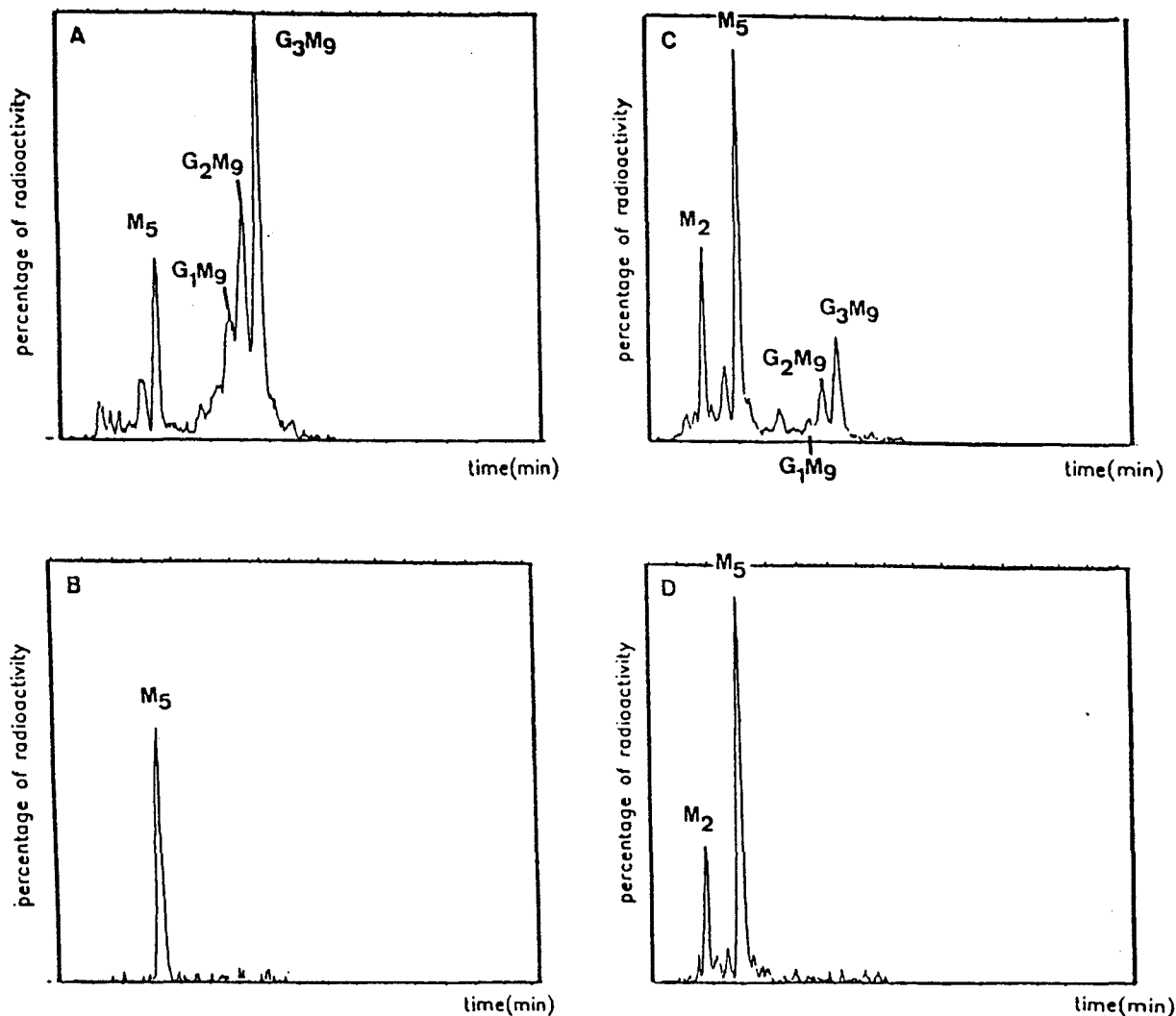
In mouse splenocytes, the neutral material was a mixture of oligosaccharides of the oligomannosidic type, glucosylated or non-glucosylated, with variable numbers of mannose residues ranging from 9 to 3 and with one or two *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) residues at their reducing end (Cacan *et al.*, 1987). Degradation of the released material could be slowed by adding mannosidase and glucosidase inhibitors (Cacan *et al.*, 1989). The early work with mouse splenocytes (Cacan *et al.*, 1987) suggested that neutral oligosaccharides could be derived from phosphorylated species by dephosphorylation, but other origins of the neutral oligosaccharides were not excluded by the data.

The charged material was demonstrated to be phosphorylated oligosaccharides originating from the splitting of the pyrophosphate bond of lipid intermediates (Cacan *et al.*, 1980) by a specific pyrophosphatase (Bélard *et al.*, 1988). It was suggested that this cleavage was a first step in the degradation of lipid intermediates. *In vitro* assays with rat splenocytes indicated that most of the charged material was not glucosylated (Hoflack *et al.*, 1981).

In order to better understand the relationship between oligosaccharide-P-P-dolichol and its metabolic products (*N*-linked glycoproteins, oligosaccharide-phosphates and neutral oligosaccharides), we investigated the synthesis and fate of lipid intermediates in wild-type Chinese hamster ovary (CHO) cells and in B3F7 cells, a glycosylation mutant of CHO cells which does not synthesize mannosylphosphoryldolichol. Use of this mutant reduced the number of possible oligosaccharide structures synthesized and thus simplified the structural and kinetic analyses. We show in this report that both neutral and phosphorylated oligosaccharides are released during *N*-glycosylation in CHO cells. Moreover, we demonstrate that oligosaccharide-phosphate is generated from non-glucosylated oligosaccharide-lipid and that the neutral oligosaccharides are all glucosylated.

### Results

We first ascertained whether free oligosaccharides were released during *N*-glycosylation in CHO cells, as had been previously described in other biological systems. Cells were incubated with [2-<sup>3</sup>H]mannose for 1 h, leading to the formation of labelled oligosaccharide-lipids, proteins and free oligosaccharides. In some experiments, processing inhibitors were added to the incubations to block subsequent degradation of the labelled oligosaccharides. We had previously shown with mouse splenocytes (Cacan *et al.*, 1987) that both released oligosaccharides and protein-associated oligosaccharides undergo processing by the action of rough endoplasmic reticulum (ER) glucosidases and mannosidases. We found that



**Fig. 1.** Comparison of glycans of oligosaccharide-lipids and oligosaccharide-phosphates labelled in wild-type cells. Wild-type CHO cells were grown and incubated with [ $^3\text{H}$ ]mannose and 0.5 mM glucose in the presence (panels A and B) or absence (panels C and D) of processing inhibitors, as described in Materials and methods. Oligosaccharide-lipids were extracted and treated with mild acid to release the oligosaccharides. Oligosaccharide-phosphates were extracted and isolated using P2 and QAE-Sephadex chromatography, and the neutral glycan released with *E. coli* phosphatase. The glycans were separated by HPLC and the radioactivity monitored by a continuous-flow detection system. Glycans of oligosaccharide-lipids are shown in panels A and C, and glycans of oligosaccharide-phosphates in panels B and D.

the combination of castanospermine (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and deoxymannojirimycin (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) was optimal for the recovery of glycosylated species on protein.

Oligosaccharide-lipids and proteins were recovered in chloroform/methanol/water (10/10/3) extracts and as a pellet after sequential lipid extractions, respectively. The aqueous phase from the lipid extraction was examined by gel filtration chromatography and contained labelled oligosaccharides. This material was separated on QAE-Sephadex into neutral oligosaccharides and charged oligosaccharides, eluted with 70 mM NaCl.

#### *Synthesis of oligosaccharide-phosphates in CHO cells*

As previously described for rat splenocytes (Cacan *et al.*, 1987), charged oligosaccharides (two negative charges based on its elution from QAE-Sephadex) were converted into neutral oligomannosides possessing chitobiose at the reducing

end by treatment with *Escherichia coli* phosphatase (data not shown). The size of the oligosaccharide moieties of the oligosaccharide-phosphates (after phosphatase digestion), as well as of oligosaccharide-P-P-dolichol (after acid hydrolysis) was determined by HPLC analysis.

Incubation of wild-type CHO cells for 1 h with [ $^3\text{H}$ ]mannose in the presence of 0.5 mM glucose and processing inhibitors led to the synthesis of labelled oligosaccharide-lipids, primarily  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Glc}_2\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ , and  $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -P-P-dolichol, as shown in Figure 1A. A small proportion (10%) were non-glycosylated intermediates,  $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$  and  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ -P-P-dolichol. Analysis of oligosaccharide-phosphates revealed only a  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ -P species (Figure 1B), suggesting that it was released from the non-glycosylated pool of oligosaccharide-P-P-dolichol.

In order to vary the nature of the oligosaccharide-lipids produced, an incubation was performed in the absence of processing inhibitors. As described by Romero and Herscovics

## Oligosaccharides of lipid intermediates have different fates

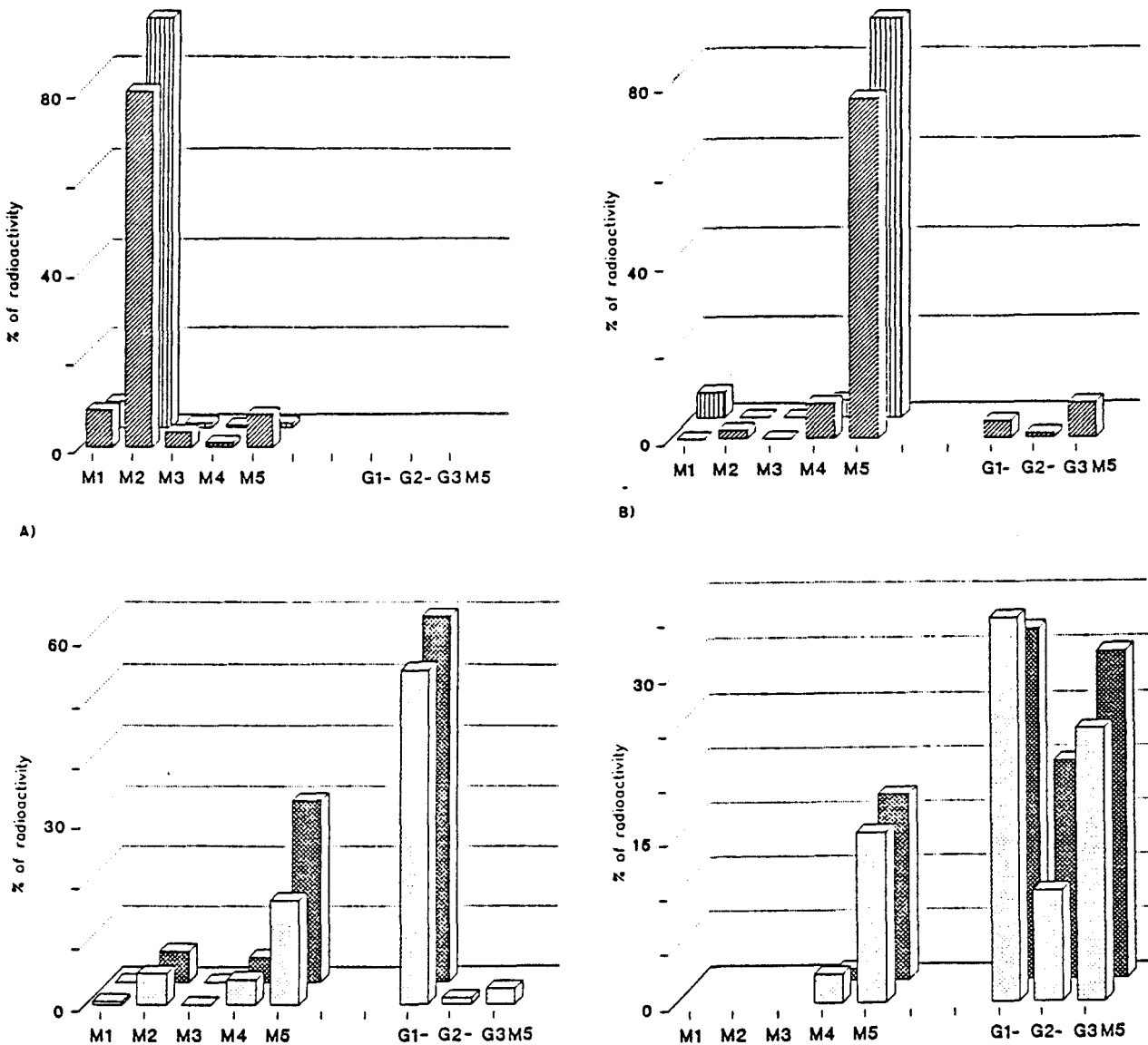


Fig. 2. Comparison of the glycan moieties of oligosaccharide-lipids, oligosaccharide-phosphates, proteins and neutral oligosaccharides labelled in B3F7 cells. B3F7 cells were grown and incubated with  $[2\text{-}^3\text{H}]\text{mannose}$  with processing inhibitors in the absence (panel A) or presence (panel B) of 0.5 mM glucose, as described in Materials and methods. Oligosaccharide-lipids were extracted and the glycans released by mild acid hydrolysis. Oligosaccharide-phosphates were extracted and isolated using P2 and QAE-Sephadex chromatography, and neutral oligosaccharides released by treatment with *E. coli* phosphatase. Neutral oligosaccharides were extracted and isolated using P2 and QAE-Sephadex chromatography. Mixtures of neutral oligosaccharides were obtained after HPLC and treated with chitobiase as described in Materials and methods. Subsequent HPLC analysis allowed assignment of the structures. Proteins were isolated after sequential extractions and the glycans released by *N*-glycanase. The glycans of each fraction, oligosaccharide-lipid [▨], protein [▩], oligosaccharide-phosphate [▧] and neutral oligosaccharide [▦], were separated by HPLC. M1, M2, M3, M4 and M5 represent oligomannoside populations with 1, 2, 3, 4 and 5 mannose residues, respectively. G1-, G2- and G3M5 represent oligomannoside populations with 1, 2 and 3 glucose residues and 5 mannose residues, respectively.

(1986) for F9 cells, the population of oligosaccharide-lipids in CHO cells was considerably affected, leading to 90% non-glycosylated lipid intermediates under these conditions, the major species being  $\text{Man}_2\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-dolichol}$  and  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-dolichol}$  (Figure 1C). The fact that these oligosaccharides were not released from the lipid after incubation with endo- $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase H demonstrated that they have the oligomannosidic structures of precursor lipid intermediates with an unsubstituted  $\alpha$ -1,6 mannose residue.

The accumulation of  $\text{Man}_2\text{GlcNAc}_2\text{-P}$  and  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-dolichol}$  in the oligosaccharide-lipid pool led to a 2-fold

increase in the formation of oligosaccharide-phosphates which were the  $\text{Man}_2\text{GlcNAc}_2\text{-P}$  and  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P}$  species (Figure 1D). In addition, these oligosaccharides were not hydrolysed by endo- $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase H, indicating that the structures of the oligosaccharide-phosphates were similar to those of the non-glycosylated oligosaccharide-lipids labelled under these conditions (i.e. having an unsubstituted  $\alpha$ -1,6 mannose residue).

For further analysis of the derivation of oligosaccharide-phosphates, another CHO cell line, B3F7, was used. These cells were derived from a well-characterized CHO cell line,

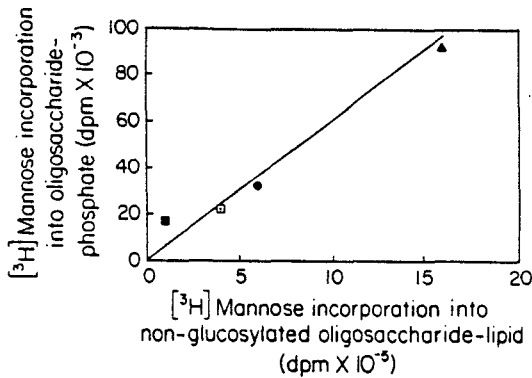


Fig. 3. Relationship of radioactivity in non-glucosylated oligosaccharide-lipids and in oligosaccharide-phosphates. Wild-type and B3F7 cells were grown and incubated with radioactive mannose as described in the legends to Figures 1 and 2. The amounts of radioactivity present in non-glucosylated oligosaccharide-lipids and oligosaccharide-phosphates were determined as described in Materials and methods for the following: wild-type CHO cells incubated with 0.5 mM glucose and processing inhibitors (■); wild-type CHO cells incubated with 0.5 mM glucose without processing inhibitors (●); B3F7 cells incubated with 0.5 mM glucose with processing inhibitors (□); B3F7 cells incubated without glucose and with processing inhibitors (▲).

B4-2-1, which is deficient in mannosylphosphoryldolichol synthase activity (Stoll *et al.*, 1982). Although [ $^{35}\text{S}$ ]methionine and [ $2\text{-}^3\text{H}$ ]mannose incorporation into protein are reduced 2-fold in B3F7 cells compared to B4-2-1 cells, the amounts of GDP-mannose and oligosaccharide-lipid are identical for the two cell types. The nature of the oligosaccharide on both protein and oligosaccharide-lipid is identical for the two cell types.

Two characteristics of B3F7 cells were useful in examining the origin of oligosaccharide-phosphates. First, since these cells are deficient in mannosylphosphoryldolichol synthase activity, the analysis of the oligosaccharide species was simplified, as structures containing more than five mannoses are not synthesized. Second, the amount of oligosaccharide-phosphates released in B3F7 cells was higher than that seen in other CHO cell lines, i.e. wild-type and B4-2-1 cells.

The nature of the oligosaccharide-lipid structures could also be manipulated in B3F7 cells by varying the incubation conditions. As shown in Figure 2, the major oligosaccharide-lipid of B3F7 cells was  $\text{Man}_2\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-dolichol}$  when the incubation was performed with labelling medium containing processing inhibitors, but without glucose (Figure 2A), and  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-dolichol}$  when the incubation was performed in the presence of processing inhibitors and 0.5 mM glucose (Figure 2B).

As observed above for wild-type CHO cells, the oligosaccharide pattern of oligosaccharide-phosphates in B3F7 cells mirrored the pattern of non-glucosylated oligosaccharide-lipids.  $\text{Man}_2\text{GlcNAc}_2$  was seen when cells were labelled in the absence of glucose (Figure 2A) and  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  was seen when cells were labelled in the presence of 0.5 mM glucose (Figure 2B).

Figure 3 illustrates that the release of oligosaccharide-phosphates is linearly proportional to the radioactivity in the non-glucosylated pool of lipid intermediates for the two CHO cell lines (wild-type and B3F7) studied under various incubation conditions, with or without 0.5 mM glucose (B3F7) and with or without processing inhibitors (wild-type). The structural

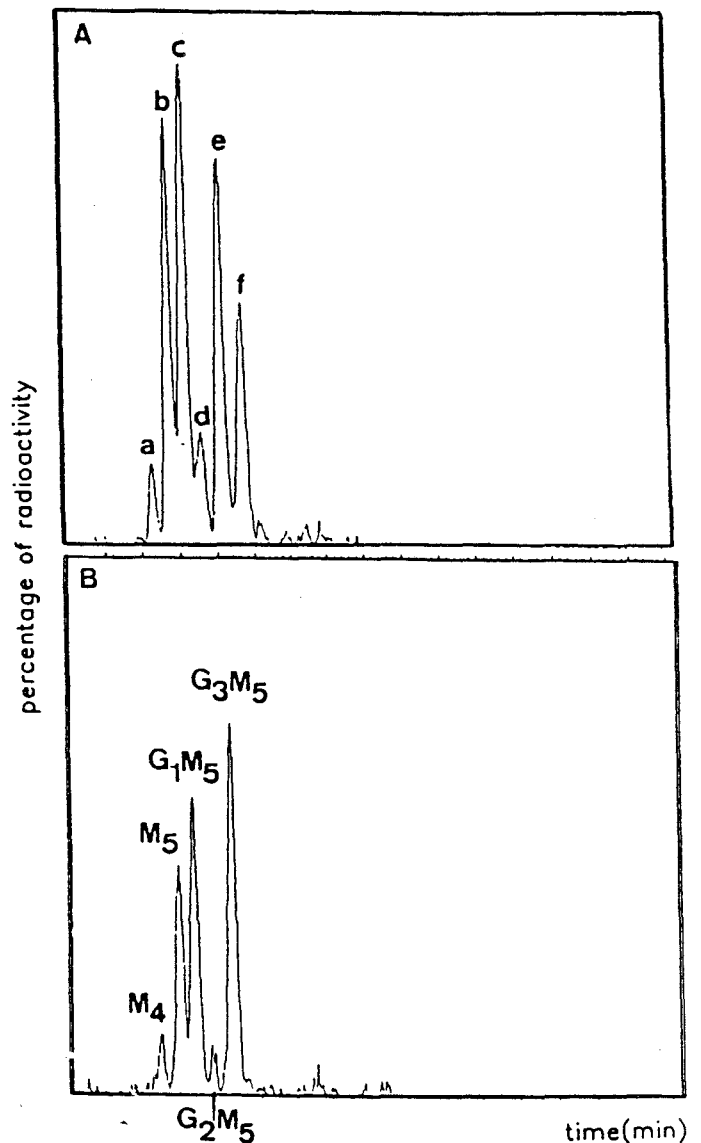


Fig. 4. Analysis of the reducing termini of neutral oligosaccharides of B3F7 cells. B3F7 cells were grown and incubated with [ $2\text{-}^3\text{H}$ ]mannose in the presence of 0.5 mM glucose and processing inhibitors, as described in Materials and methods. Neutral oligosaccharides were extracted and isolated by P2 and QAE-Sephadex chromatography. These glycans were then separated by HPLC either directly (panel A) or after treatment with lysosomal rat liver chitinase (panel B). The composition of peaks a, b, c, d, e and f is given in Table I.  $\text{M}_4$  and  $\text{M}_5$  represent oligomannosides with 4 and 5 mannose residues and 1 GlcNAc residue at the reducing end.  $\text{G}_1\text{M}_5$ ,  $\text{G}_2\text{M}_5$  and  $\text{G}_3\text{M}_5$  represent oligomannosides with 1, 2 or 3 glucose residues, 5 mannose residues and 1 GlcNAc residue at the reducing end.

identity and the quantitative relationship between oligosaccharide-phosphates and non-glucosylated oligosaccharide-P-P-dolichol suggests that oligosaccharide-phosphates are generated directly from non-glucosylated oligosaccharide-P-P-dolichol.

#### Synthesis of neutral oligosaccharides in CHO cells

The neutral oligosaccharides isolated from the QAE-Sephadex columns were further analysed by HPLC. In the presence of glucose, six peaks of oligosaccharide were detected (Figure 4A). Several of these peaks were mixtures of two species as the



**Table I.** Composition of neutral oligosaccharides released in B3F7

Peaks of Figure 4*	Oligosaccharide	Percentage of radioactivity
a	Man <sub>2</sub> GlcNAc <sub>1</sub>	3.8
b	Man <sub>2</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	0.8
	Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>1</sub>	21
c	Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	2.5
	Glc <sub>1</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>1</sub>	25
d	Glc <sub>1</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	6.6
	Glc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>1</sub>	ND
e	Glc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	5
	Glc <sub>3</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>1</sub>	20
f	Glc <sub>3</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	15.3

\*The composition of peaks a–f from panel A of Figure 4 is given above. ND indicates not detected.

HPLC does not resolve oligosaccharides of similar monosaccharide number which differ only in the identity of one of the monosaccharides (glucose or GlcNAc). We therefore digested the samples with chitobiase (Figure 4B) so that all species would have GlcNAc<sub>1</sub> at the reducing end. From this analysis, we determined that the major labelled neutral oligosaccharide species were Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>1</sub>, Glc<sub>1</sub>Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>1</sub>, Glc<sub>3</sub>Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>1</sub> and Glc<sub>3</sub>Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> (Table I).

We then compared the neutral oligosaccharide structures to the glycans attached to protein. Although glucosylated oligosaccharide–lipids represented only a minor proportion of the total oligosaccharide–P–P–dolichol population (<1% in the absence of glucose and 19% in the presence of 0.5 mM glucose), size analysis of the glycan moieties N-linked to protein gave a different pattern, namely Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> and Glc<sub>1</sub>Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> when cells were labelled in the absence of glucose (Figure 2C), and Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, Glc<sub>1</sub>Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, Glc<sub>3</sub>Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> and Glc<sub>3</sub>Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> in the presence of glucose (Figure 2D). This indicates that *in vivo* the glucosylated Man<sub>5</sub> species were preferentially transferred to proteins, as has been shown *in vitro* previously for the larger Man<sub>9</sub> species (Turco *et al.*, 1977; Liu *et al.*, 1979).

A comparison of the neutral oligosaccharides of B3F7 cells with the oligosaccharide moiety attached to protein indicated that the same species were present in each incubation condition: minus glucose (Figure 2C) or plus glucose (Figure 2D). The structural similarity of the neutral oligosaccharides and the glycan moieties of the glycoproteins indicated that neutral oligosaccharides are, at some step, related to protein glycosylation.

#### Pulse experiments

Our oligosaccharide analysis of the various fractions indicated that oligosaccharide–phosphates originated from non-glucosylated oligosaccharide–lipids, while neutral oligosaccharides originated from glucosylated oligosaccharide–lipids or newly glycosylated protein. In order to examine this further, we followed the appearance of label in oligosaccharide lipids, neutral oligosaccharides, oligosaccharide–phosphates and proteins during a pulse experiment. The incorporation of label into oligosaccharide–lipids (Figure 5A) increased linearly for the first 15 min and then reached a plateau. In contrast, protein glycosylation (Figure 5A) and the release of neutral oligosaccharides

(Figure 5B) increased over a 60 min period after a lag period of 10 min. This lag period may indicate that linear incorporation into protein and neutral oligosaccharides depends on obtaining a sufficient amount or type of oligosaccharide–lipid. In contrast, the appearance of oligosaccharide–phosphates (Figure 5C) linearly increased from 2.5 to 60 min, suggesting they are formed from oligosaccharide–lipids which are labelled from the beginning of the incubation.

#### Chase experiments

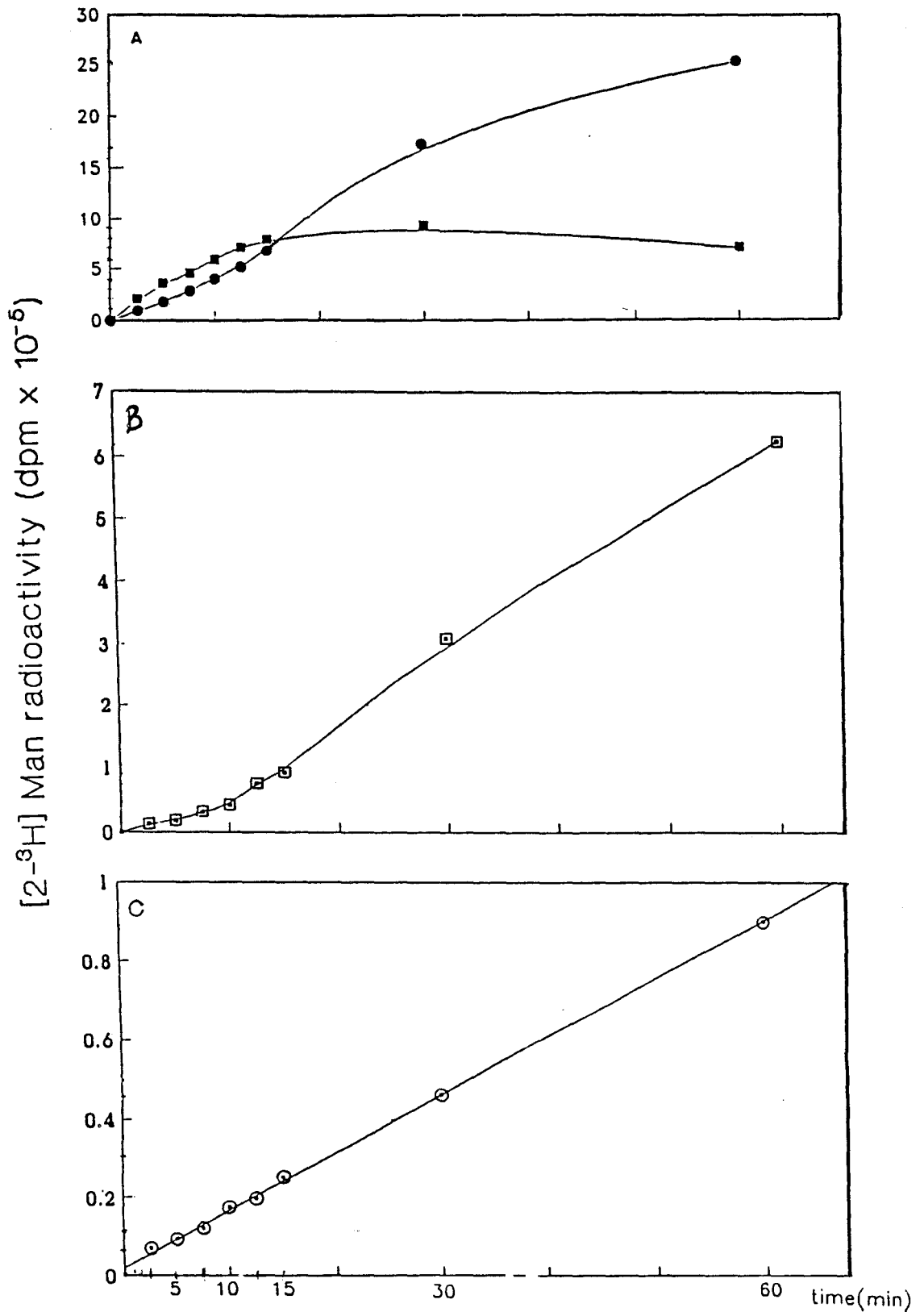
From the pulse labelling experiments and the product analysis, it appeared that lipid intermediates had different fates during the *N*-glycosylation process. First, oligosaccharide–P–P–dolichol could be degraded into oligosaccharide–phosphates, this degradation process occurring from non-glucosylated oligosaccharide–P–P–dolichol. Glucosylated lipid intermediates could be utilized in two ways: either for *N*-glycosylation or for the formation of neutral oligosaccharides. Since these investigations indicate that CHO cells have the potential for regulating the level of oligosaccharide–P–P–dolichol by degradative mechanisms, namely the formation of oligosaccharide–phosphates and neutral oligosaccharides, the quantitative importance of these degradative pathways compared to the *N*-glycosylation process remained to be determined.

Figure 6 shows a typical chase experiment in which a large excess (1000-fold) of unlabelled mannose was added after 15 min of incubation of B3F7 cells with [2-<sup>3</sup>H]mannose in the presence of processing inhibitors. During the 45 min of chase, the radioactivity associated with oligosaccharide–P–P–dolichol decreased with a  $t_{1/2}$  of 20 min, and was recovered in glycoproteins (80%) and as soluble neutral oligosaccharide (20%). The rate of appearance of the label in neutral oligosaccharides was the same as in protein, suggesting that 'en bloc' transfer to protein and the release of neutral oligosaccharide proceed from the same substrate and/or from the same mechanism. Interestingly, the radioactivity chased into oligosaccharide–phosphate material increased, reached a plateau and then decreased ( $t_{1/2}$  of 30 min), demonstrating that oligosaccharide–phosphates are further degraded. Thus, it cannot be excluded that part of the radioactivity lost from oligosaccharide–phosphates was recovered as neutral oligosaccharides by dephosphorylation.

#### Discussion

The *N*-glycosylation process proceeds via transfer of the oligosaccharide moiety from an oligosaccharide–P–P–dolichol to an asparagine residue of a nascent protein. The regulation mechanisms controlling the size and availability of the donor oligosaccharide–lipid pool are not yet understood. In the present study, we have demonstrated two degradative mechanisms of lipid intermediates which could allow a constant adjustment of the nature and level of lipid donors for glycosylation of nascent proteins.

A comparison of the oligosaccharide structures of the oligosaccharide–lipids and the oligosaccharide–phosphates in wild-type and B3F7 cells under different incubation conditions indicated that oligosaccharide–phosphates were derived from non-glucosylated oligosaccharide–lipids. In addition, Figure 3 indicated that the amount of incorporation into oligosaccharide–phosphates was proportional to the amount of incorporation into non-glucosylated oligosaccharide–lipids,



**Fig. 5.** Pulse labelling of B3F7 cells. B3F7 cells were incubated with radioactive mannose in the absence of glucose and in the presence of processing inhibitors for various times from 2.5 to 60 min, as described in Materials and methods. The amount of incorporation of radioactive mannose into oligosaccharide-lipids [■] and proteins [●] (panel A), and into oligosaccharide-phosphates [○] (panel C) and neutral oligosaccharides [□] (panel B) was determined as described in Materials and methods. Each value is the mean of three incubations normalized for  $5 \times 10^6$  cells.

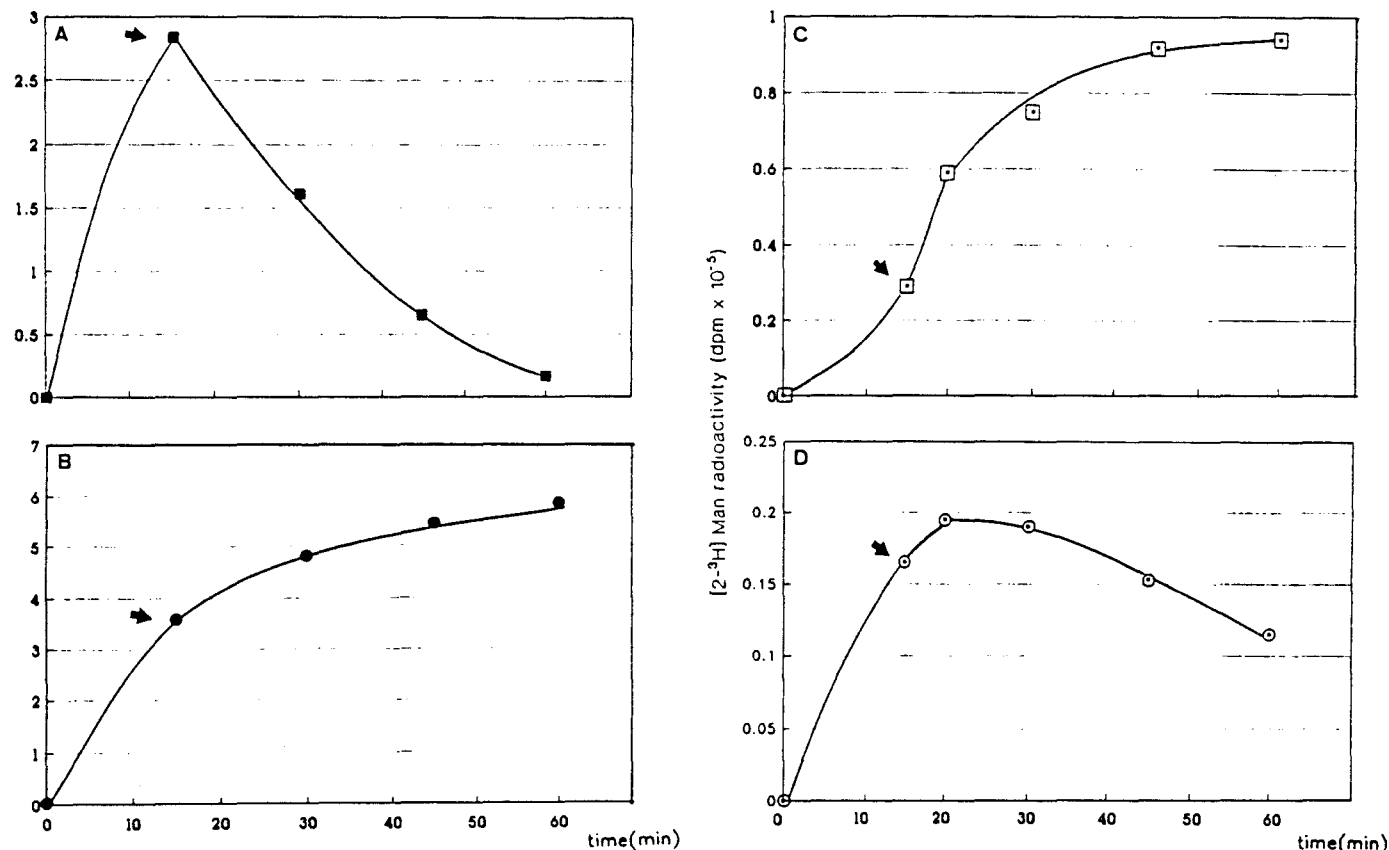


Fig. 6. Pulse/chase labelling of B3F7 cells. B3F7 cells were incubated with  $[2\text{-}^3\text{H}]\text{mannose}$  for 15 min in the absence of glucose and in the presence of processing inhibitors. At that point, unlabelled mannose was added to the incubation medium to give a final concentration of 5 mM (indicated by the arrow on the figure). At that point and at three subsequent times, the amount of incorporation into oligosaccharide-lipids (panel A), proteins (panel B), neutral oligosaccharides (panel C) and oligosaccharide-phosphates (panel D) was determined as described in Materials and methods. The values represent means from four experiments and were normalized for  $5 \times 10^6$  cells.

again indicating that oligosaccharide-phosphates arose from non-glucosylated oligosaccharide-lipids.

B3F7 cells, which synthesize a more limited number of oligosaccharide-lipids than wild-type cells because they lack mannosylphosphoryldolichol synthase activity, were used for kinetic analyses. Pulse experiments (Figure 5) clearly indicate that the initial rate of oligosaccharide-phosphates formation parallels that of oligosaccharide-lipid formation. There was no lag time for incorporation into oligosaccharide-phosphates, as there was for incorporation into protein. We interpret this to mean that initially mannose is incorporated primarily into non-glucosylated species which are either glucosylated and transferred to protein or are hydrolysed forming oligosaccharide-phosphates. Our pulse/chase data indicate that the primary reaction path is into protein under these conditions. In addition, our data indicate that this is a mechanism for degrading non-glucosylated lipid intermediates in cells. Oligosaccharide-phosphates are themselves degraded in the presence of processing inhibitors, presumably by dephosphorylation (Figure 6). The mechanism and location of this degradation is unclear.

The formation of oligosaccharide-phosphates from a non-glucosylated pool of oligosaccharide-lipids might function to regenerate dolichyl phosphate using a 'bypass' of the dolichol cycle, as depicted in Figure 7. This 'bypass' mechanism may control the availability and structural suitability of lipid intermediates for protein glycosylation.

This hydrolytic 'bypass' reaction could be catalysed by a specific oligosaccharide-P-P-dolichol pyrophosphatase described previously by our laboratory in yeast membranes (Bélaré *et al.*, 1988). This enzyme requires divalent cations and is inhibited by pyrophosphate,  $\text{NAD}^+$  and bacitracin. *In vitro* generated  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-dolichol}$  and  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-dolichol}$  were shown previously to be substrates for this enzyme, generating  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2\text{-P}$  and  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P}$ . The analysis of the structure of oligosaccharide-phosphates in this current work (Figures 1 and 2) clearly shows that  $\text{Man}_2\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-dolichol}$  and  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-dolichol}$  can also be cleaved by a pyrophosphatase.

The second hydrolytic reaction is the release of neutral oligosaccharides, primarily glucosylated, during *N*-glycosylation. Our pulse experiments indicated that both the incorporation of mannose into protein and into neutral oligosaccharides occurred only after a 10 min lag time (Figure 5), consistent with neutral oligosaccharides being formed from glucosylated oligosaccharide-lipid and/or newly glycosylated protein. In pulse/chase experiments in the presence of processing inhibitors, these neutral oligosaccharides accumulated, as did protein-linked oligosaccharides. No subsequent degradation was detected using mannose as the label.

We found heterogeneity of the reducing end of the neutral material. As shown in Figure 4 and Table I, neutral oligosaccharides with either one or two GlcNAc at the reducing end were detected. These neutral oligosaccharides could originate

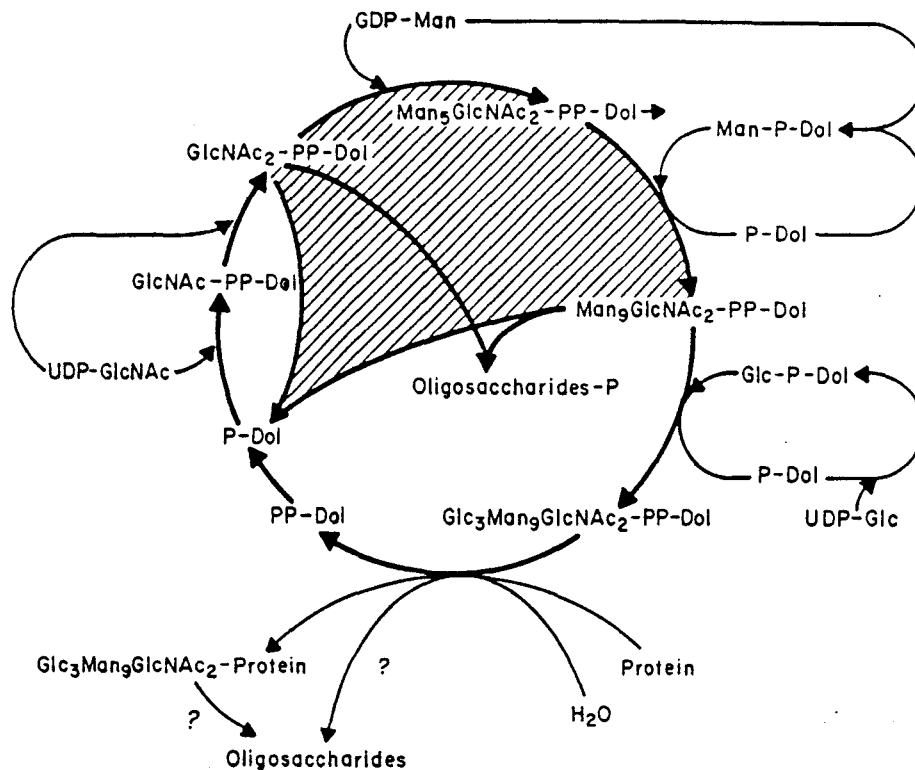


Fig. 7. Schematic representation of the dolichol cycle of N-linked glycosylation showing the proposed 'bypass' reactions which directly regenerate dolichyl phosphate.

from the hydrolysis of glycosylated oligosaccharide-lipids, from an endoglycosidase acting upon newly glycosylated proteins, or by the combined action of a hydrolase of oligosaccharide-lipids and a chitobiase. Regardless of whether glycosylated oligosaccharide-lipid is hydrolysed before or during transfer to protein or protein is first glycosylated and then deglycosylated by the action of an endoglycosidase, these reactions could regulate the level of glycosylated protein and also generate dolichyl phosphate, allowing the formation of new oligosaccharide-P-P-dolichol.

According to Spiro and Spiro (1991), glycosylated oligosaccharides with GlcNAc<sub>2</sub> at the reducing end could derive from the hydrolysis of oligosaccharide-lipids by the oligosaccharidyl transferase in the absence of a peptide acceptor. They found that the release of neutral oligosaccharides by thyroid vesicles was inhibited in the presence of exogenous peptide acceptor. Previously, Anumula and Spiro (1983) presented data suggesting that thyroid membranes contained an endoglycosidase which could generate neutral oligosaccharides containing one GlcNAc at their reducing end.

Two other observations were of interest. First we found, as had Romero and Herscovics (1986) in F9 cells, that without processing inhibitors, most of the lipid intermediates in wild-type CHO cells labelled in 0.5 mM glucose and trace amounts of radioactive mannose were non-glycosylated. When processing inhibitors were present, glycosylated lipid intermediates were detected. According to Spiro and Spiro (1991), the action of castanospermine is to maintain oligosaccharide-lipids in a glycosylated form by inhibiting the glucosidase reaction of a glucosyltransferase-glucosidase shuttle acting on lipid intermediates. It may be that this shuttle is only active in substrate- or glucose-limiting conditions, since we have previously

shown that wild-type CHO cells labelled in 0.1 mM mannose and 0.1 mM glucose (Rosenwald *et al.*, 1989), 0.1 mM mannose and 5 mM pyruvate (Krag, 1979), or 0.7 mM mannose (Krag, 1979) synthesized primarily glycosylated oligosaccharide-lipid intermediates without inclusion of processing inhibitors.

Second, we find a suggestion of endomannosidase activity in CHO cells. This activity (Lubas and Spiro, 1987), reported in HepG2 and calf thyroid slices, generates Glc<sub>1-3</sub>Man from newly glycosylated protein, generating a protein-bound Man<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub> species even in the presence of processing inhibitors. Presumably, in B3F7 cells a Man<sub>4</sub>GlcNAc<sub>2</sub> species could be generated from a transferred Glc<sub>3</sub>Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> species by the action of this enzyme (Moore and Spiro, 1990). As shown in Figure 2, a small amount of the expected glycan was detected.

Our investigation supports the idea that degradative mechanisms (formation of oligosaccharide-phosphates and neutral oligosaccharides) could be a way of adjusting the level of oligosaccharide-lipid donors to the amount of protein acceptors. The physiological importance of these reactions in regulating N-glycosylation remains to be determined.

## Materials and methods

### Cells and cell culture

The wild-type cell line used in these experiments was the proline-auxotrophic clone Pro 5 (Stanley *et al.*, 1975). Mutant cell line B3F7 was isolated as described previously (Stoll and Krag, 1983, 1988; Stoll, 1986). B4-2-1 cells were mutagenized and colonies grown on polyester discs. Colonies were screened under low-hexose conditions (0.1 mM mannose) for reduced incorporation of mannose into protein. One isolated clone, B3F7, incorporated

1-fold less methionine and 2-fold less mannose into protein than B4-2-1 cells under low-hexose conditions. Incorporation of methionine and mannose were identical in the two cell types in normal growth medium.

Cells were routinely cultured in monolayers in  $\alpha$  minimal essential medium (MEM) with 10% fetal bovine serum (Gibco Laboratories, Grand Island, NY) at 34°C in 10 cm culture dishes, under 5% CO<sub>2</sub>. Cells were routinely checked for Mycoplasma contamination (Becker and Levine, 1976) and found to be negative.

#### Labelling and extraction

Before reaching confluency ( $5-7 \times 10^6$  cells/dish), cells were labelled for 1 h with [<sup>3</sup>H]mannose (429 GBq/mmol) from Amersham International (Bucks., UK), 50  $\mu$ Ci/ml in  $\alpha$  MEM without or with 0.5 mM glucose and 10% dialysed fetal bovine serum. When used, castanospermine and 1-deoxymannojirimycin (Boehringer Mannheim, Mannheim, FRG) were added 25 min before labelling and were present throughout the incubation period at final concentrations of 50 and 100  $\mu$ g/ml, respectively. Incubations were at 34°C, except for B3F7 cells which were transferred to 39°C 8 h before labelling and kept at this temperature during labelling (Stoll, 1986).

At the end of the labelling period, the medium was removed and the cell layer washed rapidly three times with ice-cold phosphate-buffered saline. The reaction was terminated by adding to the dish 1.1 ml of a mixture of 8 vols methanol, 3 vols of 0.1 M Tris-HCl (pH 7.4) and 4 mM MgCl<sub>2</sub> containing 3 mg/ml of immunoglobulin G as carrier protein (Ronin and Bouchilloux, 1976). The cell extracts were scraped from the plates, poured into a conical tube and 1.2 ml of chloroform was added to obtain a final mixture of chloroform/methanol/water (3/2/1 by volume; the volume of the cells being estimated as 0.1 ml), as described by Behrens and Leloir (1970). The sequential lipid extraction procedure was described earlier (Cacan *et al.*, 1980). Briefly, the lower organic phase contained the labelled mannosylphosphoryldolichol. The upper aqueous phase contained labelled metabolic precursors, mannose, mannose-1-P and GDP-mannose and soluble oligosaccharide material as demonstrated earlier (Cacan *et al.*, 1980). The remaining interphase was washed five times with theoretical upper phase (chloroform/methanol/4 mM MgCl<sub>2</sub> in water; 3/48/47, by volume) and then extracted three times with a mixture of chloroform/methanol/water (10/10/3 by volume). This extract contained oligosaccharide-lipids and the remaining pellet contained newly glycosylated proteins.

The incorporation of radioactivity into oligosaccharide-lipids was measured by liquid scintillation counting. The protein pellet was digested overnight at room temperature with 0.2 mg of TPCK-treated trypsin (Sigma, St. Louis, MO) in 0.1 M ammonium bicarbonate (pH 7.9) in a final volume of 0.2 ml, and an aliquot was counted for radioactivity. The oligosaccharide material contained in the upper aqueous phase was separated from GDP-mannose, mannose 1-P and mannose by gel filtration on Biogel P2. This material eluted a few fractions after the void volume as reported earlier (Cacan *et al.*, 1980). The fractions containing the oligosaccharide material were pooled and the radioactivity determined by scintillation counting. The radioactivity of each fraction was standardized for  $5 \times 10^6$  cells.

#### Analysis of oligosaccharide material

In experiments with B3F7 cells, the size of the oligosaccharide moieties of each fraction was analysed. The oligosaccharide moiety of the oligosaccharide-lipids was released by mild acid treatment (0.1 N HCl in tetrahydrofuran, 50°C for 2 h), as described by Stoll and Krag (1988). The susceptibility of oligosaccharide-lipids to endo-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase H was tested in the presence of 0.1% Triton X-100 according to Chalifour and Spiro (1984) with 10 mU of enzyme from *Streptomyces plicatus* (Boehringer Mannheim, Mannheim, FRG).

The glycan moiety linked to protein was cleaved by peptide N-glycanase F. The trypsin obtained previously was boiled for 10 min to destroy the trypsin, and the tryptic peptides were dried and dissolved in 20 mM sodium phosphate (pH 7.5), 50 mM EDTA, 50% glycerol and 0.02% sodium azide. Peptide N-glycanase F (Boehringer Mannheim, Mannheim, FRG) was then added for an overnight incubation.

For further analysis, the oligosaccharide released in the aqueous phase of the lipid extraction was first purified on a Biogel P2 column and then passed through a 1 ml QAE-Sephadex column equilibrated with 10 mM Tris base (Belard *et al.*, 1988). The neutral material eluted with the first 2 ml of 10 mM Tris base. The column was washed stepwise with increasing concentrations of NaCl (20, 70 and 100 mM) in 10 mM Tris base (10 ml of each). Charged material was eluted with 70 mM NaCl. For treatment with phosphatase, the charged material was desalted on a Biogel P2 column equilibrated with 0.1 M acetic acid, dried down and incubated with 5 U *E. coli* phosphatase overnight at 37°C.

Size analysis of the glycan moieties and oligosaccharide material was achieved by HPLC on an amino-derivatized column Supelcosil LC-NH<sub>2</sub>, 5  $\mu$ m (Supelco, Bellefonte, PA) with a solvent system of acetonitrile/water from 70/30 to 50/50 by volume, at a flow rate of 1 ml/min during 80 min. The separation of the labelled oligosaccharides was followed by continuous-flow detection of the radioactivity with a Flow-one beta detector (Flotec, France) using Luma Flow II (Lumac, the Netherlands) as scintillation fluid.

#### Hydrolysis of oligosaccharide material by chitobiase

Oligomannoside material possessing a chitobiosyl unit at the reducing end was converted into oligomannoside with one GlcNAc residue by incubation with rat liver lysosomal chitobiase.

Rat liver chitobiase was prepared according to Jonas (1986). Briefly, five rat livers were homogenized in the following buffer: 20 mM Hepes (pH 7.4), 250 mM sucrose and 5 mM MgCl<sub>2</sub>. A crude mitochondrial pellet (18 000 g, 30 min) was resuspended in 10 ml of the same buffer containing 4.5% Percoll. After centrifugation (40 000 g, 90 min), the lysosomal fraction was submitted to the following hypotonic buffer: 1 mM citrate/phosphate (pH 5), 1 mM EDTA and 0.1 mM mercaptoethanol. After centrifugation (10 000 g, 5 min), the proteins of the supernate were precipitated at pH 3.5 by adding 0.2 M citric acid. The soluble fraction was used as a chitobiase-enriched fraction contaminated with  $\alpha$ -glucosidase activity which was fully inhibited with 50  $\mu$ g/ml castanospermine.

Incubations with the oligosaccharide material were in the following buffer: 200 mM citrate/phosphate (pH 3.5) and 50  $\mu$ g/ml castanospermine. The incubations were with 100  $\mu$ l of enzyme preparation at 37°C overnight in a final volume of 0.2 ml.

#### Acknowledgements

The authors are indebted to Anne Rosenwald, Jane Scocca and Jun Zou for helpful discussions and advice, and to Helen Lei, Odette Labiau and Anne-Marie Mir for expert technical assistance. They are also indebted to Dr J.C. Michalski for advice in preparing rat liver chitobiase. This work was supported in part by the Centre National de la Recherche Scientifique (UMR no. 111, director Professor A. Verbert), by the Ministère de l'Éducation Nationale, by the Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois and by NIH grant CA 20421 to S.S.K. A.V. was a recipient of a NATO fellowship (95C88FR) for his sabbatical stay in the laboratory of S.S.K. at the School of Hygiene and Public Health, The Johns Hopkins University, Baltimore, MD, where part of this work was performed.

#### Abbreviations

CHO, Chinese hamster ovary cell; ER, endoplasmic reticulum; GlcNAc, N-acetylglucosamine; MEM, minimal essential medium.

#### References

- Anumula, K.R. and Spiro, R.G. (1983) Release of glucose containing poly-mannose oligosaccharide during glycoprotein biosynthesis. Studies with thyroid microsomal enzymes and slices. *J. Biol. Chem.*, **258**, 15274-15282.
- Becker, B.G. and Levine, E.M. (1976) A simple, rapid method for detecting Mycoplasma contamination. In Evans, V.J., Perry, V.P. and Vincent, M.M. (eds), *Tissue Culture Association Manual*. Tissue Culture Association, Rockville, MD, pp. 305-308.
- Behrens, N.H. and Leloir, L.F. (1970) Dolichol monophosphate glucose: an intermediate in glucose transfer in liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **66**, 153-159.
- Bélar, M., Cacan, R. and Verbert, A. (1988) Characterization of an oligosaccharide-pyrophosphodolichol pyrophosphatase in yeast. *Biochem. J.*, **255**, 235-242.
- Cacan, R., Hoflack, B. and Verbert, A. (1980) Fate of oligosaccharide-lipid intermediates synthesized by resting rat spleen lymphocytes. *Eur. J. Biochem.*, **106**, 473-479.
- Cacan, R., Cecchelli, R. and Verbert, A. (1987) Catabolic pathway of oligosaccharide-diphosphodolichol. Study of the fate of the oligosaccharidic moiety in mouse splenocytes. *Eur. J. Biochem.*, **166**, 469-474.
- Cacan, R., Lepers, A., Bélar, M. and Verbert, A. (1989) Catabolic pathway of oligosaccharide-diphospho-dolichol. Subcellular sites of the degradation of the oligomannoside moiety. *Eur. J. Biochem.*, **185**, 173-179.
- Chalifour, R.J. and Spiro, R.G. (1984) Cleavage of dolichyl pyrophosphoryl oligosaccharides by endo-beta-N-acetylglucosaminidase H: comparison of

DISCUSSION DE L'ARTICLE ICARACTERISATION DU MATERIEL OLIGOSACCHARIDIQUE SOLUBLE.

1) Les oligosaccharides phosphates et les oligosaccharides neutres sont les témoins de voies de dégradation.

Nous avons pu déterminer l'origine du matériel oligosaccharidique soluble neutre (OS) et phosphorylé (POS), à la fois sur la base de données cinétiques et structurales. La comparaison des glycannes des intermédiaires lipidiques et des glycoprotéines avec le matériel oligosaccharidique soluble établit que :

\* les oligosaccharides pyrophosphodolichols non glucosylés sont à l'origine des POS. La structure des POS est majoritairement non glucosylée. En effet, quelles que soient les conditions d'incubation (avec ou sans inhibiteurs de processing, avec ou sans glucose, avec ou sans cycloheximide), les POS sont exclusivement de type  $\text{Man}_2$ - et  $\text{Man}_5\text{GlcNAC}_2$ -P. Or, le donneur lipidique non glucosylé est formé majoritairement de  $\text{Man}_2\text{GlcNAC}_2$ -PP-Dol et  $\text{Man}_5\text{GlcNAC}_2$ -PP-Dol (Fig. 1, 2 et 3 de l'article I p57-59 ). Le cycle des dolichols présenterait une voie "court-circuit" permettant la régénération du P-dolichol. Les POS seraient le témoin d'une telle réaction (voir la figure n°7 de l'article I p63).

\* Les oligosaccharides pyrophosphodolichols glucosylés seraient, quant à eux, à l'origine des oligosaccharides neutres (Fig.2 de l'article I page 58).

Un modèle à deux compartiments avec d'une part, les oligosaccharides pyrophosphodolichols non glucosylés, d'autre part, les oligosaccharides pyrophosphodolichols glucosylés représente cette situation (Fig.26). Le premier compartiment, comprenant les donneurs  $\text{Man}_{1,2,3,9}\text{GlcNAC}_2$ -PP-Dol, serait à l'origine des oligosaccharides phosphates. Les composés  $\text{Man}_2$ -P et  $\text{Man}_5$ -P reflètent l'action d'une pyrophosphatase sur les oligosaccharides pyrophosphodolichols accumulés. La formation de ces oligosaccharides phosphates au cours d'une cinétique

est linéaire. Les donneurs  $\text{Glc}_{1\alpha 3}\text{Man}_{5/9}\text{GlcNAC}_2\text{-PP-Dol}$  constituant le second compartiment seraient utilisés préférentiellement pour le transfert sur la protéine naissante. Ils pourraient également être à l'origine des oligosaccharides neutres, puisque ces derniers sont essentiellement de type  $\text{Glc}_{1\alpha 3}\text{Man}_{5/9}\text{GlcNAC}_{1/2}$ .

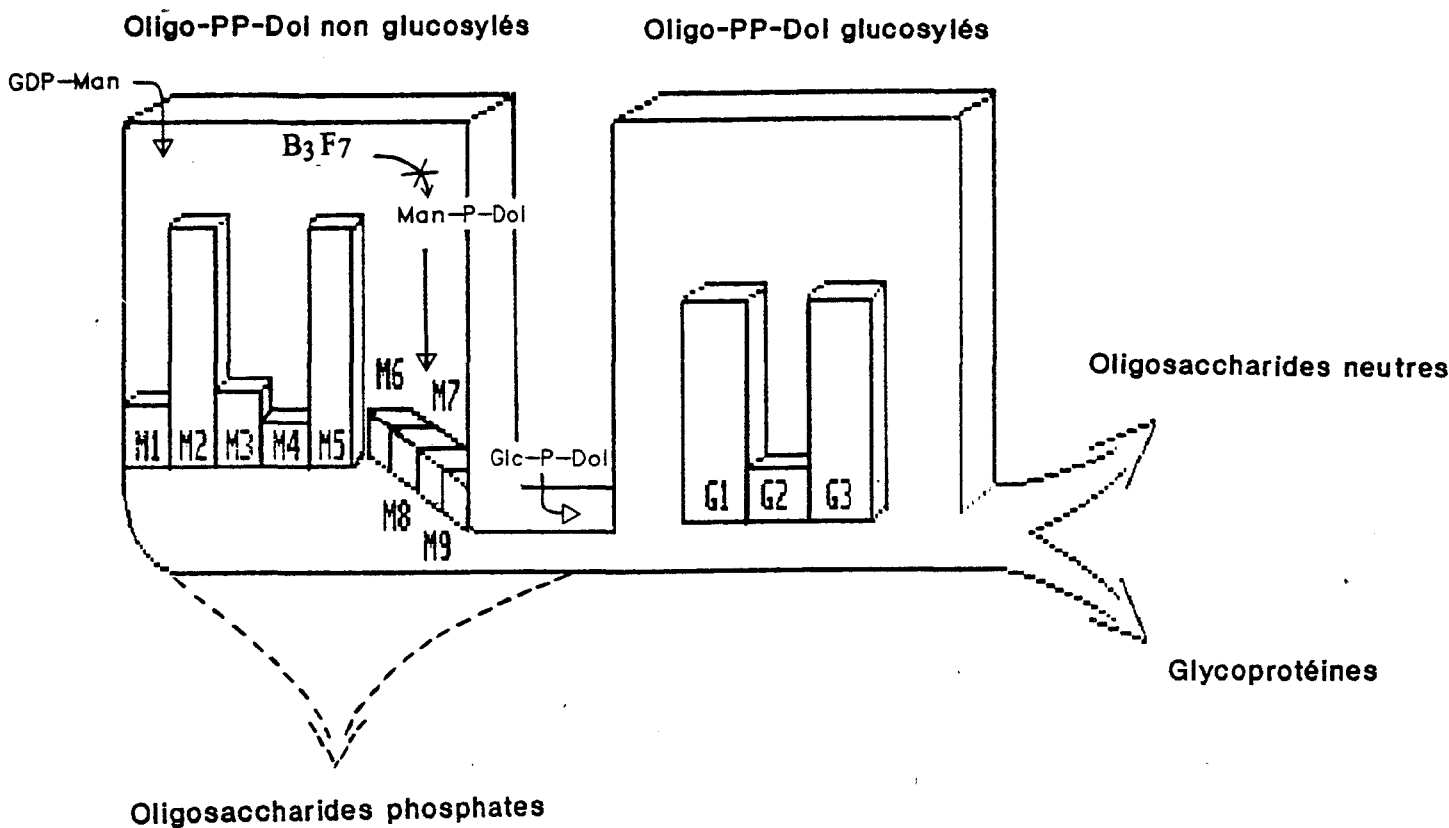


Fig.26 : Schéma de l'origine du matériel oligosaccharidique soluble.

Dans ce modèle, l'étape de glucosylation serait une étape limitante, contrôlée par le Glc-P-dol permettant le passage d'un compartiment non glucosylé servant de réserve à un compartiment donneur contenant des espèces glucosylées. La synthèse d'une néoglycoprotéine ou la formation des oligosaccharides neutres présente une latence de dix minutes. Elle témoigne du temps nécessaire à la formation des oligosaccharides pyrophosphodolichols glucosylés. Le contrôle de la glucosylation serait assuré par une navette glucosyltransférase / glucosidase du type de celle décrite par Spiro et Spiro (1991). Elle modulerait la quantité d'oligosaccharides pyrophosphodolichols à utiliser en conditionnant le taux de donneurs glucosylés.

## 2) Hétérogénéité des oligosaccharides neutres : origines respectives.

Nous avons mis en évidence deux types d'oligosaccharides neutres, constitués d'OS-Gn1 et d'OS-Gn2 en fonction de leur extrémité réductrice possédant une ou deux N-acétylglucosamine(s). Ces oligosaccharides issus d'oligosaccharides pyrophosphodolichols glucosylés peuvent dériver directement du cycle ou provenir de la glycoprotéine. Cette dernière éventualité implique la libération du glycanne de la glycoprotéine. Celle-ci pourrait être schématiquement résumée par la figure 27.

Première hypothèse : dégradation de la protéine (1) suivie par l'action d'une amidase (2) et d'une chitobiase (3). Si l'on se limite aux cellules animales, les amidases décrites sont:

\* une aspartamidase agissant sur le chaînon isolé GlcNAc  $\beta$ -1-N Asn ou sur des structures oligosaccharidiques où l'asparagine est libre (Kaartinen 1992) ce qui implique une hydrolyse totale de la protéine.

\* Une peptide N-glycanase comme celle récemment mise en évidence chez des embryons d'*Orizias latipes* (Inoue et al 1993).



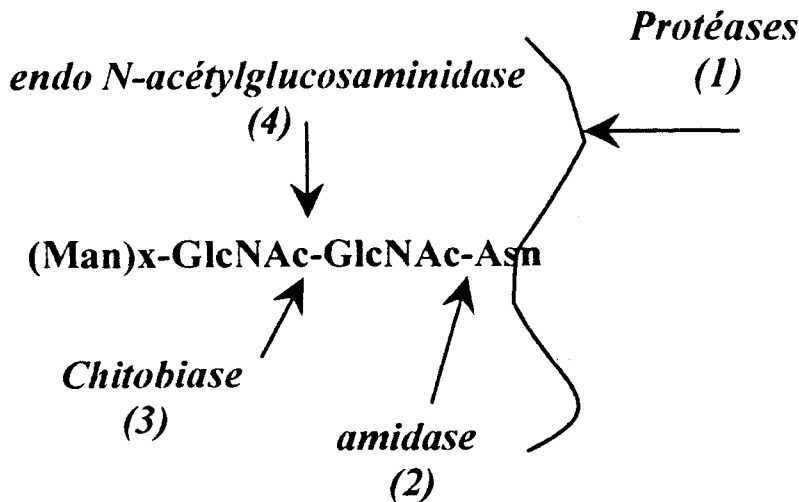


Fig.27 : Voies de dégradation d'une néoglycoprotéine.

Deuxième hypothèse : action d'une endo N-acétylglucosaminidase (4).

Deux enzymes sont capables d'hydrolyser la liaison chitobiosyle et présentent donc une activité endo N-acétylglucosaminidasique pouvant être à l'origine de la formation des OS-Gn1 (Fig.28):

\* la chitobiase, enzyme (3) de la première hypothèse, qui est restreinte au seul substrat oligosaccharidique OS-Gn2, de type oligomannosidique ou hybride.

\* l'endo N-acétylglucosaminidase vraie (4), agissant à la fois sur une glycoprotéine (avec toutefois une plus grande spécificité sur les oligosaccharides de type oligomannosidique que sur le type hybride) que sur des OS-Gn2.

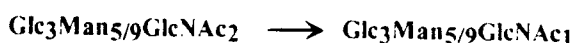
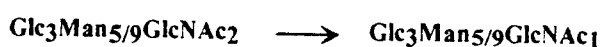
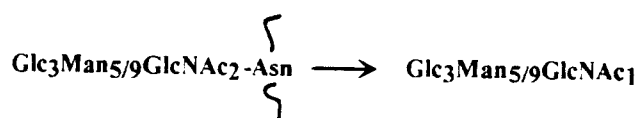
*Chitobiase**endo N-acétylglucosaminidase*

Fig.28 : Enzymes possédant une activité endo N-acétylglucosaminidase.

Une activité endo N-acétylglucosaminidasique fut mise en évidence pour la première fois dans les hépatocytes humains par Stirling en 1974, elle s'est révélée masquer deux enzymes, une chitobiase et une endo N-acétylglucosaminidase lors des travaux de De Gasperi et al en 1989.

La libération d'OS-Gnl à partir de la glycoprotéine laisse sur l'asparagine du point d'attache un seul résidu de N-acétylglucosamine comme cela a été décrit dans le cas de l'amylase salivaire.

L'amylase salivaire humaine (Human Salivary  $\alpha$ -Amylase HSA-A) est déglycosylée sous l'action d'une endo N-acétylglucosaminidase libérant un oligosaccharide possédant une seule N-acétylglucosamine et une protéine HSA-B portant un résidu GlcNAc terminal. Or, seulement 20% d'HSA-B sont retrouvées avec le GlcNAc lié à la protéine suggérant l'existence d'un enzyme "amidase like" dans la salive sur les 80% restants (Ito et al 1993).

Trois localisations ont été décrites concernant cette activité, une localisation lysosomique : il s'agit en fait de l'action séquentielle de l'aspartamidase suivie de la chitobiase décrite par Brassart et al en 1987. Son rôle concerne la dégradation de glycoprotéines exogènes dirigées vers le lysosome.

\* une localisation cytosolique : une endo N-acétylglucosaminidase a été mise en évidence par Pierce et al (1979 et 1980) dans le Foie de Rat et en 1981 par Overdjik et al chez l'Homme mais son expression varie en fonction des tissus.

\* une localisation dans le RER : ce sont les travaux d'Anumula et Spiro (1983) sur les microsomes de thyroïde qui établissent une corrélation entre la synthèse d'une glycoprotéine et la formation des OS-Gn1.

Ainsi, les deux hypothèses concernant l'origine des oligosaccharides neutres sont :

une origine double :

O-PP-Dol ---> OS-Gn2 , par transfert de l'oligosaccharide sur l'eau, comme suggéré par Anumula et Spiro (1983).

glycoprotéines ---> OS-Gn1

une origine unique :

O-PP-Dol ---> OS-Gn2 ---> OS-Gn1

Chacune de ces deux hypothèses fait intervenir une activité endo N-acétylglucosaminidase dans la formation des OS-Gn1, endo N-acétylglucosaminidase vraie dans le premier cas, chitobiase dans le second cas.

LIBERATION D'OS-GN1 MARQUEURS DE LA DEGRADATION DES  
NEOGLYCOPROTEINES.

Nous nous sommes alors intéressés à l'origine respective des oligosaccharides neutres. Dérivent-ils l'un de l'autre ou reflètent-ils chacun un niveau de régulation différent, adaptant le taux d'intermédiaire lipidique et celui des glycoprotéines néosynthétisées.

Ce travail a fait l'objet de l'article accepté dans Biochemical Journal "Release of oligomannoside type glycans as a marker of the degradation of newly synthesized glycoproteins." (1994) 297.

## **ARTICLE II**

## Release of oligomannoside-type glycans as a marker of the degradation of newly synthesized glycoproteins

Corinne VILLERS, René CACAN, Anne-Marie MIR, Odette LABIAU and André VERBERT

Laboratoire de Chimie Biologique (U.M.R. no. 111 du C.N.R.S.), Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq, Cedex, France

The N-glycosylation of proteins is accompanied by the release of soluble oligosaccharide material. Besides oligosaccharide phosphates originating from the cleavage of lipid intermediates, neutral free oligosaccharides represent the major part of this material and are heterogeneous depending on whether the reducing end has one or two *N*-acetylglucosamine residues. The present study focuses on the intracellular origin of neutral free oligosaccharides in a CHO cell line. Kinetic and pulse-chase experiments clearly indicate that oligosaccharides possessing a chitobiosyl unit are derived from oligosaccharide pyrophosphodolichol, whereas oligosaccharides possessing one *N*-acetylglucosamine residue are derived from newly synthesized glycoprotein. This relationship is confirmed by comparing the

glycosylation pattern of lipid donors and glycoproteins with those of neutral free oligosaccharides under various incubation conditions (inhibition of protein synthesis, presence of processing inhibitors, presence or absence of glucose). Degradation of newly synthesized glycoprotein and formation of neutral oligosaccharides with one *N*-acetylglucosamine residue are inhibited at 16 °C but not affected by lysosomotropic agents such as leupeptin or NH<sub>4</sub>Cl. Together with the fact that the degradation of newly synthesized glycoproteins and the subsequent release of the glycan are recovered in permeabilized cells, these results suggest that this phenomenon occurs in the rough endoplasmic reticulum or in a closely related compartment.

### INTRODUCTION

Glycoprotein biosynthesis results from two separate metabolic pathways which are localized in the rough endoplasmic reticulum (ER), i.e. the dolichol cycle for the lipid donor and protein synthesis for the acceptor. The fate of the glycan moieties of the lipid intermediates is not always linked to protein, as the release of soluble oligosaccharide material associated with glycoprotein synthesis has been demonstrated in various biological models, for example splenocytes [1], thyroid gland [2] and fibroblasts [3]. The latter studies support the idea that degradative mechanisms generating free oligosaccharide phosphates and neutral free oligosaccharides may be a way of adjusting the level of lipid donor to the amount of protein acceptor.

Although the origin of the oligosaccharide phosphates has been clearly elucidated [3], that of the neutral free oligosaccharide material is not yet established. In order to obtain a better insight into the relationships between the lipid donors, newly synthesized glycoproteins and neutral free oligosaccharides, we have chosen the B3F7 cell line as a biological model. This cell line is a glycosylation mutant of Chinese hamster ovary (CHO) cells which does not synthesize mannose phosphodolichol [4]. At low glucose concentration (0.5 mM), we observed that the amount of neutral free oligosaccharide released was higher than in wild-type CHO cells. Furthermore, as previously published [3], the nature of the glycan moieties of glycoproteins can be manipulated by varying the incubation conditions (with or without 0.5 mM glucose).

Recent studies have revealed that the ER is a site at which newly synthesized proteins can be degraded (for general reviews, see refs. [5] and [6]). Degradation of newly synthesized proteins in the rough ER is distinct from lysosomal degradation, as misfolded proteins or overexpressed subunits of oligomeric

complexes are in most cases degraded without being released from the rough ER.

In the present report, we demonstrate that newly synthesized glycoproteins can also be degraded at the rough ER level generating free oligosaccharides with one GlcNAc at the reducing end (OS-Gn1). In contrast, the free oligosaccharides terminating in a chitobiosyl unit at the reducing end (OS-Gn2) originate from the hydrolase activity of the oligosaccharyltransferase. Studies based on temperature-dependence and effects of lysosomotropic agents show that this degradation is not localized in the lysosomes but occurs in the rough ER or a closely related compartment.

### MATERIALS AND METHODS

#### Cells and cell culture

Mutant cell line B3F7, which does not synthesize mannose phosphodolichol, was a gift from Dr. S. S. Krag (The Johns Hopkins University, Baltimore, MD, U.S.A.). In these cells, the nature of the glycan moiety bound to the glycoprotein can be manipulated according to the incubation conditions (absence or presence of 0.5 mM glucose and processing inhibitors [3]). Cells were routinely cultured in monolayers in  $\alpha$ -minimum essential medium with 10% fetal calf serum (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, U.S.A.) at 34 °C in 10 cm culture dishes, under 5% CO<sub>2</sub> [4].

#### Metabolic labelling and extraction

Before reaching confluency ( $5 \times 10^6$ – $7 \times 10^6$  cells/dish), cells were labelled with [2-<sup>3</sup>H]mannose (429 GBq/mmol) from Amersham International (Amersham, Bucks., U.K.) (50  $\mu$ Ci/ml in  $\alpha$ -minimal essential medium) with or without 0.5 mM glucose; 10% dialysed fetal calf serum was present. When used, castano-

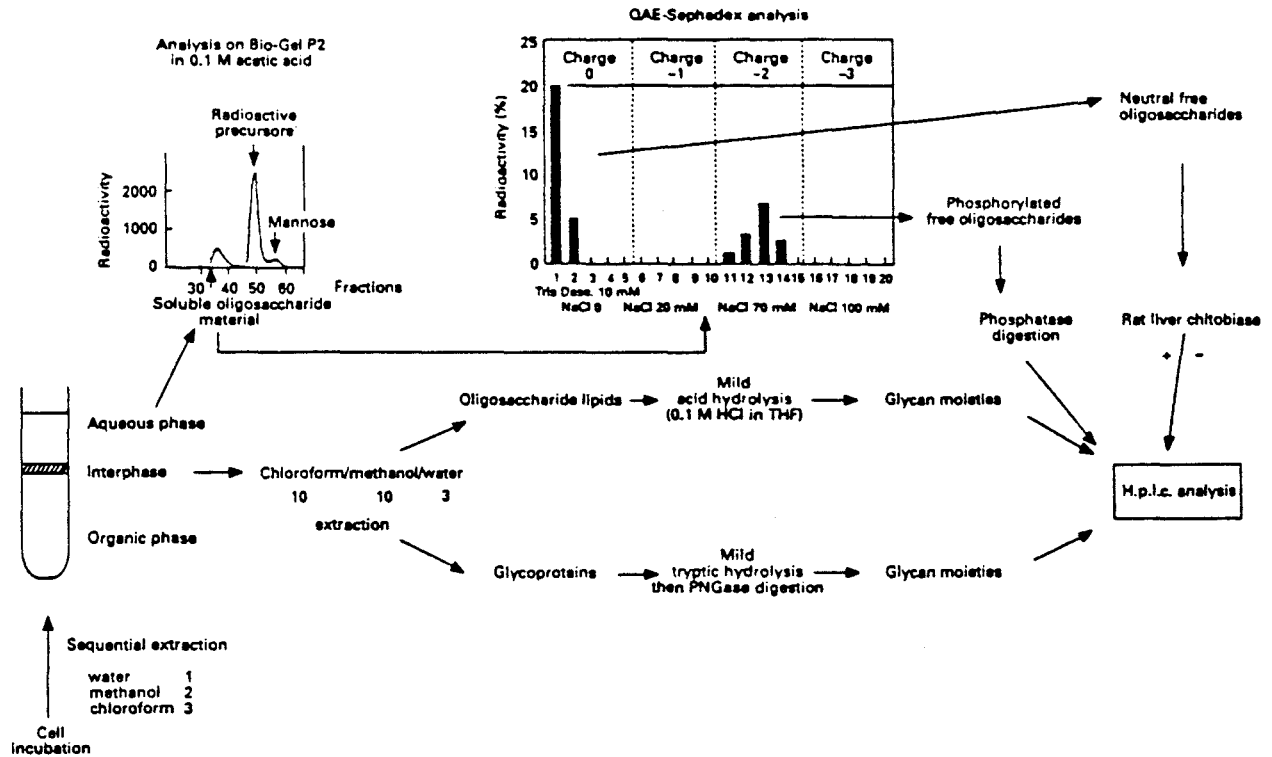


Figure 1 Flow diagram explaining the isolation procedure for oligosaccharide fractions

Free oligosaccharide material was isolated from the aqueous phase of the sequential lipid extraction. Glycan moieties of lipid intermediates and glycoproteins are liberated by mild acid hydrolysis with 0.1 M HCl in tetrahydrofuran (THF) and peptide *N*-glycanase F (PNGase F) treatment respectively.

spermine (Cst) and 1-deoxymannojirimycin (dMM) (Boehringer-Mannheim, Mannheim, Germany) were added 30 min before labelling and were present throughout the incubation period at final concentrations of 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  respectively. B3F7 cells were transferred to a temperature of 39 °C 8 h before labelling and kept at this temperature during incubation [4].

For incubations in the presence of a protein-synthesis inhibitor, a 30 min preincubation was performed with 1 mM cycloheximide. For incubations in the presence of leupeptin, a 30 min preincubation was carried out with 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptin. The effect of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  was studied after an overnight preincubation of the cells in 20 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in the culture medium. This concentration was maintained during the incubation with radioactive mannose.

At the end of the labelling period, the medium was removed and the cell layer washed rapidly three times with ice-cold PBS. Sequential extraction was then achieved as previously described [3].

Incorporation of radioactivity into oligosaccharide lipids was measured by liquid-scintillation counting. The protein pellet was digested overnight at room temperature with 0.2 mg of Tos-Phe- $\text{CH}_2\text{Cl}$ -treated trypsin (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.) in 0.1 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , pH 7.9, in a final volume of 0.2 ml, and a sample was counted for radioactivity. The soluble oligosaccharide material contained in the upper aqueous phase was separated from GDP-mannose, mannose 1-phosphate and mannose by gel filtration on a Bio-Gel P2 column. This material was eluted a few fractions later than the void volume, as reported previously [1]. The fractions containing the soluble oligosaccharide material were pooled, and the radioactivity was determined by liquid-scintillation counting.

Protein neosynthesis was evaluated by incubation with 2.5  $\mu\text{M}$  L-[ $^{35}\text{S}$ ]methionine (37 TBq/mmol) from Amersham International. After incubation, cells were scraped, precipitated by 2 vol. of 10% trichloroacetic acid, filtered and washed on glass-fibre filters.

#### Preparation and incubation of permeabilized cells

Cells were allowed to swell for 10 min in a hypotonic buffer containing 15 mM KCl and 10 mM HEPES, pH 7.2, at 4 °C, then scraped [7]. Permeabilization was checked by the Trypan Blue exclusion test. Incubations of  $5 \times 10^6$  semi-intact cells were carried out in an isotonic buffer containing 90 mM KCl and 50 mM HEPES, pH 7.2, in the presence of 5  $\mu\text{Ci}$  of GDP-[ $^{14}\text{C}$ ]mannose (11.4 GBq/mmol) from Amersham International, 50  $\mu\text{M}$  UDP-GlcNAc, 1 mM ATP, 2 mM  $\text{MnCl}_2$ , and 5 mM  $\text{MgCl}_2$  in a final volume of 100  $\mu\text{l}$  during 1 h at 37 °C. The extraction procedure was as described previously [3].

#### Release and h.p.l.c. analysis of glycan moieties from oligosaccharide lipids and glycoproteins

The glycan moiety of the oligosaccharide lipids was released by mild acid treatment (0.1 M HCl in tetrahydrofuran, 50 °C for 2 h). The glycan moiety linked to protein was cleaved by peptide *N*-glycanase F (EC 3.2.2.18) as follows: the trypsin-treated protein obtained previously was boiled for 10 min to destroy the trypsin activity and the tryptic peptides were dried and dissolved in 20 mM sodium phosphate (pH 7.5) containing 50 mM EDTA, 50% glycerol and 0.02%  $\text{NaN}_3$ . Peptide *N*-glycanase F (Boeh-

ringer-Mannheim) was then added (0.5 unit) for an overnight incubation at 37 °C. All the preparation and analytical steps are summarized in Figure 1.

Size analysis of the glycan moieties was by h.p.l.c. on an amino-derivatized column: Supelcosil LC-NH<sub>2</sub>, 5 μm (Supelco, Bellefonte, PA, U.S.A.) with a solvent system of acetonitrile/water from 70:30 (v/v) to 50:50 (v/v), at a flow rate of 1 ml/min over 80 min. The separation of the labelled oligosaccharides was followed by continuous-flow detection of the radioactivity with a Flo -one β detector (Flotec) using Luma Flow II (Lumac) as scintillation liquid.

#### Purification and h.p.l.c. analysis of free oligosaccharide material released into the aqueous phase

For further analysis, the free oligosaccharide material released into the aqueous phase of the lipid extraction after purification on a Bio-Gel P2 column was passed through a 1 ml QAE-Sephadex column equilibrated with 10 mM Tris base [8]. The neutral free oligosaccharides were eluted in the first 2 ml of 10 mM Tris base. Phosphorylated oligosaccharides were eluted with 70 mM NaCl [3]. After QAE-Sephadex chromatography, phosphorylated oligosaccharides were incubated with 5 units of alkaline phosphatase overnight at 37 °C in 100 mM Tris/HCl, pH 8.8. The neutral free oligosaccharides are heterogeneous depending on the number of GlcNAc residues at their reducing end [3]. Oligosaccharides with one GlcNAc residue are designated OS-Gn1 in this study and oligosaccharides with a chitobiosyl unit are designated OS-Gn2. The relative proportions of OS-Gn1 and OS-Gn2 were deduced from a comparison between two h.p.l.c. profiles before and after rat liver chitobiose treatment of soluble material. Chitobiose prepared as described previously [9] converts the neutral free oligosaccharide populations into OS-Gn1. Incubations with rat liver chitobiose were in the following buffer: 200 mM citrate/phosphate (pH 3.5), 100 μl of enzyme preparation at 37 °C overnight in a final volume of 0.2 ml [3]. All the preparation and analytical steps are summarized in Figure 1. H.p.l.c. analyses were performed under the conditions described for the analysis of glycan moieties (a representative h.p.l.c. profile and an example of the calculation are presented in Figure 3).

## RESULTS

#### Time course of the liberation of free neutral oligosaccharides in B3F7 cells

B3F7 cells were labelled with [2-<sup>3</sup>H]mannose in the presence of 0.5 mM glucose for 2 h. At various incubation times, the neutral free oligosaccharide material was analysed to discriminate between OS-Gn1 and OS-Gn2. The radioactivity incorporated into OS-Gn1 increased over 100 min after a lag period of 20 min. This was in contrast with the formation of OS-Gn2 (Figure 2). The lag period indicated that OS-Gn1 formation required previous synthesis of a sufficient amount of a precursor. The higher proportion of OS-Gn2 formed in short incubation times is illustrated in Figure 3, which shows h.p.l.c. profiles of neutral free oligosaccharides after 10 min of incubation. The only oligosaccharide possessing one GlcNAc is Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>1</sub> (9% of the radioactivity). The major part (91%) is composed of OS-Gn2 (mainly Glc<sub>3</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>1</sub>, 78%). As previously reported, phosphorylated free oligosaccharides are liberated during incubation [3]. Analysis of this material after phosphatase treatment confirmed, as demonstrated in [3], that this material (10%

of the labelled soluble oligosaccharide material) is composed of Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>1</sub>-P (90% of the radioactivity of the charged material) and Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>1</sub>-P (10% of the radioactivity of the charged material). Thus this material cannot generate neutral free oligosaccharides by dephosphorylation, as they are mainly glucosylated, as shown in Figure 3. Thus neutral free oligosaccharides must originate from either a lipid donor or a glycoprotein. To investigate this, we began by examining the origin of OS-Gn2, by inhibiting glycoprotein formation with cycloheximide, a protein-synthesis inhibitor.

#### Effect of protein-synthesis inhibition on neutral oligosaccharide formation

Incubation of B3F7 cells with 1 mM cycloheximide caused protein-synthesis inhibition (98% inhibition of [<sup>35</sup>S]methionine incorporation into acid-precipitable material). Table 1 shows that mannose incorporation into protein was reduced in the presence of cycloheximide as expected. In contrast, the incorporation into OS-Gn2 was concomitantly increased. The total amount of radioactivity in glycoproteins plus OS-Gn2 was constant (1 822 000 d.p.m. in the control, 1 805 000 d.p.m. in the presence of cycloheximide). This indicates competition between transfer of the glycan moiety to protein and the formation of OS-Gn2, supporting the hypothesis that oligosaccharide pyrophosphodolichol is a precursor of both glycoprotein and OS-Gn2. In addition, as shown in Table 2, analysis of the neutral free oligosaccharides formed in the presence of the cycloheximide revealed that they are mainly glucosylated (Glc<sub>3</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>1</sub>), i.e. identical with the glycan moiety bound to oligosaccharide pyrophosphodolichol from which they originate (not shown).

As previously indicated (Figure 2), the formation of OS-Gn1 requires the synthesis of a precursor. This precursor could be either OS-Gn2 or glycoprotein (Scheme 1). During protein-synthesis inhibition, the amount of radioactivity bound to OS-Gn1 was decreased 3-fold (Table 1) which is of the same order of magnitude as the observed inhibition of mannose incorporation into glycoprotein (2.7). This favours hypothesis 2. However,

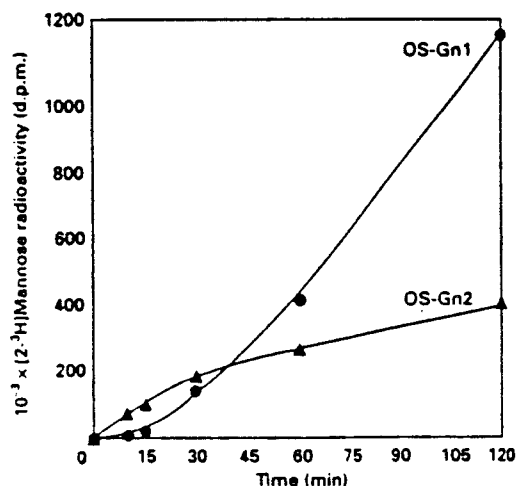


Figure 2 Kinetics of formation of neutral free oligosaccharides

B3F7 cells were incubated in the presence of 0.5 mM glucose with 200 μCi of [2-<sup>3</sup>H]mannose for 10, 15, 30, 60 and 120 min. At each time, the relative proportions of OS-Gn1 (●) and OS-Gn2 (▲) were measured as described in the Materials and methods section and illustrated in Figure 3 for a 10 min incubation.



C. Villers and others

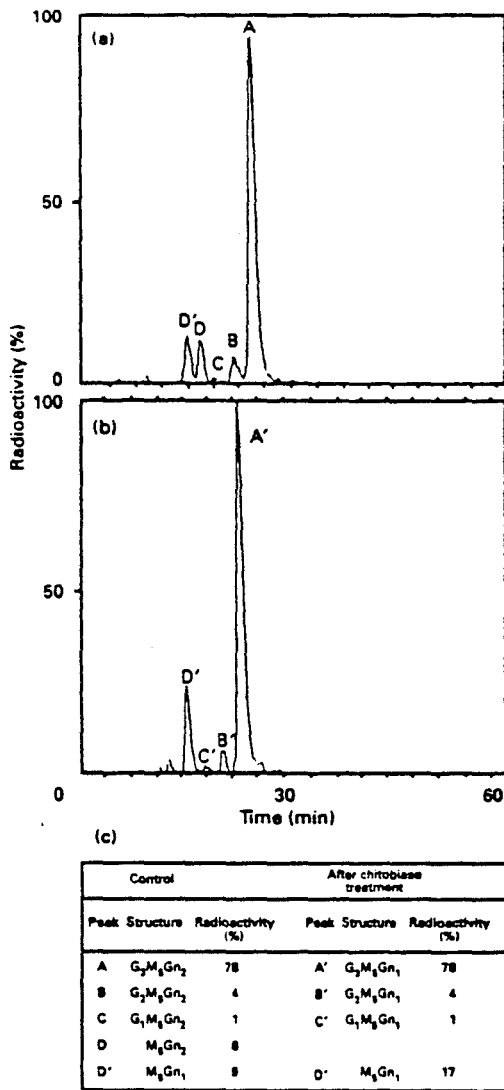
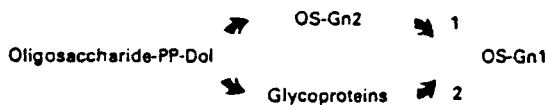


Figure 3 H.p.l.c. analysis of neutral free oligosaccharides and determination of the relative proportions of OS-Gn2 and OS-Gn1

B3F7 cells were incubated in the presence of 0.5 mM glucose with 200 µCi of [2-<sup>3</sup>H]mannose for 10 min. After incubation, the neutral free oligosaccharides were isolated and a fraction was treated with rat liver chitobiase as described in the Materials and methods section. H.p.l.c. profiles of the control (a) and the chitobiase-treated fraction (b) are shown. Peaks A, B, C and D of control are OS-Gn2 populations, as they are converted into A', B', C' and D' after rat liver chitobiase treatment. Peak D' of the control is not affected (OS-Gn1). The nature of the peaks and the relative percentages of OS-Gn2 and OS-Gn1 are indicated in (c). G, Glucose; M, mannose; Gn, N-acetylglucosamine.



Scheme 1 Synthesis of OS-Gn1

Oligosaccharide-PP-Dol, oligosaccharide pyrophosphodolichol.

Table 1 Influence of cycloheximide on mannose incorporation into glycoproteins and neutral free oligosaccharides

B3F7 cells were incubated for 1 h with 200 µCi of [2-<sup>3</sup>H]mannose in 4 ml of culture medium without glucose in the absence (control) or presence of 1 mM cycloheximide.

	10 <sup>-3</sup> × Mannose incorporation (d.p.m./10 <sup>7</sup> cells)	
	Control	+ Cycloheximide
Glycoproteins	1725	640
OS-Gn2	97	1165
OS-Gn1	492	150

Table 2 Influence of cycloheximide on neutral free oligosaccharide composition

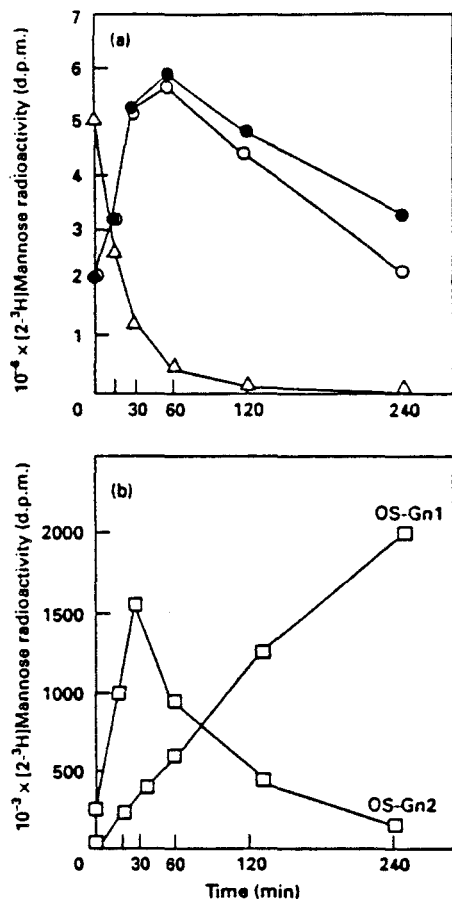
B3F7 cells were incubated in the absence of glucose with 200 µCi of [2-<sup>3</sup>H]mannose in the absence (control) or presence of 1 mM cycloheximide as described in the Materials and methods section. Values in parentheses indicate percentages of the radioactivity associated with neutral free oligosaccharides.

	Composition (d.p.m./10 <sup>7</sup> cells)	
	Control	+ Cycloheximide
Man <sub>2</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	18750 (2.7%)	17540 (1.1%)
Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	41670 (6.0%)	131580 (8.0%)
GlcMan <sub>2</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	22220 (3.2%)	-
Glc <sub>2</sub> Man <sub>2</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	13890 (2.0%)	61400 (3.7%)
Glc <sub>3</sub> Man <sub>2</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	18750 (2.7%)	1307020 (78.2%)
Total OS-Gn2	116670 (16.6%)	1517540 (91.0%)
Man <sub>2</sub> GlcNAc	51390 (7.4%)	-
Man <sub>3</sub> GlcNAc	316665 (45.6%)	147630 (9.0%)
GlcMan <sub>2</sub> GlcNAc	211111 (30.4%)	-
Glc <sub>2</sub> Man <sub>2</sub> GlcNAc	-	-
Glc <sub>3</sub> Man <sub>2</sub> GlcNAc	-	-
Total OS-Gn1	579170 (83.4%)	147630 (9.0%)

cycloheximide is a non-specific protein-synthesis inhibitor which affects all cell proteins especially those with a high turnover rate. According to hypothesis 1, OS-Gn1 would be generated by degradation of OS-Gn2 by the action of a hypothetical chitobiase. The synthesis of this enzyme could be inhibited by cycloheximide leading to the observed result, i.e. accumulation of the substrate, OS-Gn2. To resolve this, the fates of OS-Gn2 and newly synthesized glycoproteins were followed in a pulse-chase experiment.

Pulse-chase experiment

Figure 4 shows a 240 min chase experiment after a 10 min pulse with [2-<sup>3</sup>H]mannose. During the 240 min chase, the radioactivity associated with the lipid donor decreased with a t<sub>1/2</sub> of 15 min and was recovered in cellular and secreted glycoproteins (Figure 4a) and in soluble oligosaccharide material (Figure 4b). As previously suggested, lipid donors are precursors of OS-Gn2 as its formation strictly depends on the chase of the lipid donor. In contrast, the radioactivity associated with OS-Gn1 increased linearly throughout the chase period (Figure 4b). After a 60 min chase, the radioactivity bound to glycoprotein decreased with a t<sub>1/2</sub> of 150 min. This decrease in radioactivity can be explained by either the action of mannosidases at the Golgi level or degradation of



**Figure 4** Pulse-chase experiment

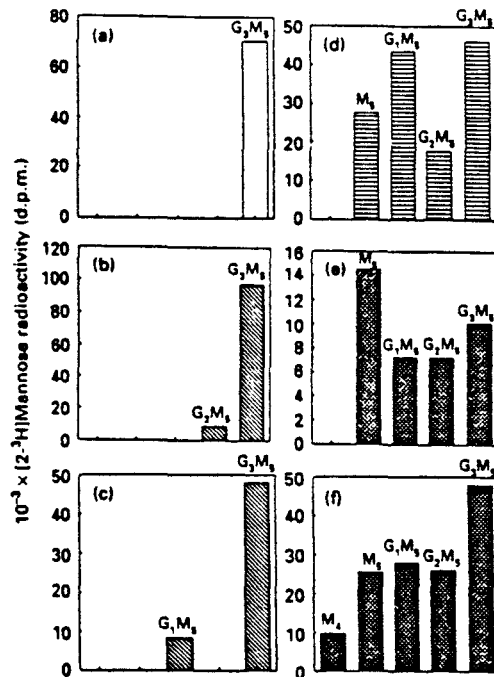
B3F7 cells were labelled for 10 min in the presence of 0.5 mM glucose with 200  $\mu$ Ci of [2- $^3$ H]mannose and then chased for the indicated times. (a) Radioactivity associated with lipid donors ( $\Delta$ ), intracellular glycoproteins ( $\circ$ ) and total glycoproteins (intracellular + secreted) ( $\square$ ); (b) formation of neutral free oligosaccharide OS-Gn1 ( $\square$ ) and OS-Gn2 ( $\blacksquare$ ).

the glycoproteins synthesized in the first 60 min chase. To check this, a chase experiment was performed in the presence of processing inhibitors Cst and dMM.

#### Pulse-chase experiment in the presence of processing inhibitors

The pulse-chase experiment was performed in the presence of 0.5 mM glucose, and Cst (50  $\mu$ g/ml) and dMM (100  $\mu$ g/ml) in order to inhibit glucosidase and mannosidase respectively. Using these incubation conditions, the lipid donor synthesized after the 10 min pulse was only of the  $\text{Glc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  family (Figure 5a), and glycoproteins exhibited a pattern of mainly glucosylated populations (80%) (Figure 5d). Analysis of the OS-Gn2 population synthesized during the pulse showed a pattern which was almost identical with that observed for the lipid donor, i.e.  $\text{Glc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  (Figure 5b), whereas analysis of OS-Gn1 revealed a pattern similar to that of glycoproteins (i.e. 70% of species glucosylated) (Figure 5e). After a 240 min chase in the presence of inhibitors, a decrease in radioactivity associated with glycoprotein was observed similarly to previously reported in

#### Degradation of newly synthesized glycoproteins



**Figure 5** Structural pattern of glycan moieties of lipid intermediates, glycoproteins and free OS-Gn2 and OS-Gn1 during a pulse-chase experiment performed in the presence of processing inhibitors and 0.5 mM glucose

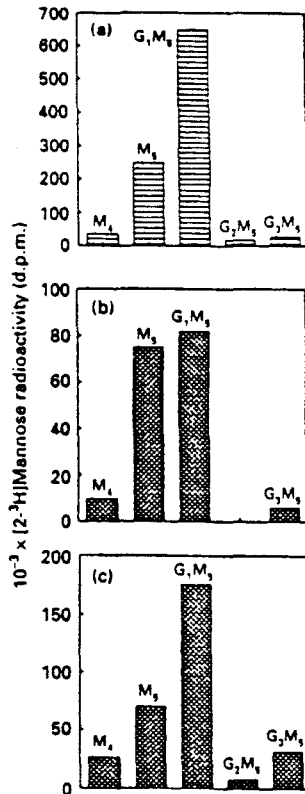
Pulse-chase of B3F7 cells was performed in the presence of 0.5 mM glucose and 50  $\mu$ g/ml Cst and 100  $\mu$ g/ml dMM. Cells were pulsed for 10 min with 200  $\mu$ Ci of [2- $^3$ H]mannose (a, b, d, e) and then chased for 240 min (c, f).  $\square$ , glycan moieties isolated from lipid donors (a);  $\blacksquare$ , glycan moieties isolated from glycoproteins (d);  $\square$ , neutral free oligosaccharides OS-Gn2 (b, e);  $\blacksquare$ , neutral free oligosaccharides OS-Gn1 (e, f).  $M_1$  and  $M_2$  represent oligomannosides with four and five mannose residues respectively.  $G_1M_1$ ,  $G_2M_1$  and  $G_3M_1$  represent oligomannosides with one, two and three glucose residues (and five mannose residues) respectively.

Figure 4(a). However, under these conditions, as glucosidases and mannosidases are inhibited, the observed loss of radioactivity can only be explained by degradation of newly synthesized glycoprotein and not by loss of radioactive mannose due to processing. Analysis of oligosaccharide material after the 240 min chase indicated that the OS-Gn2 exhibited the same pattern as observed during the pulse, i.e. mainly  $\text{Glc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  (Figure 5c), demonstrating that this material was released into the lumen of rough ER from the lipid donor and remained glycosylated, as rough ER glucosidases were inhibited. The population pattern of OS-Gn1 after the 240 min chase (Figure 5f) was in agreement with a glycoprotein origin. These results clearly demonstrate that the radioactivity lost from glycoprotein during the chase was recovered associated with soluble free oligosaccharides of the OS-Gn1 family.

#### Influence of glycosylation on glycoprotein degradation in monolayer cells

When the pulse-chase experiment was performed in the absence of glucose and in the presence of processing inhibitors, the main species transferred to protein was  $\text{Glc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  (Figure 6a). The  $\text{Glc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  was recovered in the OS-Gn1 family after either a 10 min pulse (Figure 6b) or a 240 min chase (Figure 6c). These results paralleled those obtained in the presence of 0.5 mM glucose and processing inhibitors in which the glyco-

C. Villers and others



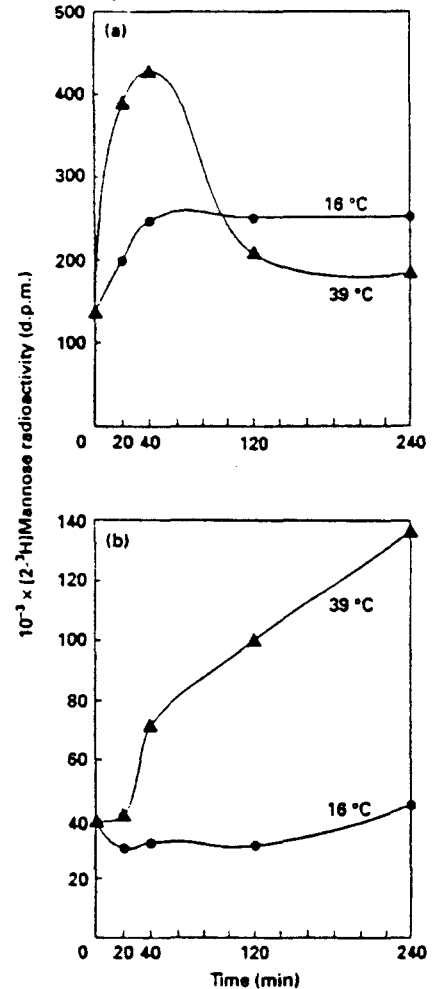
**Figure 6** Structural pattern of glycan moieties of glycoproteins and free OS-Gn2 and OS-Gn1 during pulse-chase experiments performed in the presence of processing inhibitors and without glucose

Pulse-chase of B3F7 cells was performed in the absence of glucose and the presence of 50  $\mu\text{g/ml}$  Cst and 100  $\mu\text{g/ml}$  dMM. Cells were pulsed for 10 min with 200  $\mu\text{Ci}$  of  $[2\text{-}^3\text{H}]\text{mannose}$  (a, b) and then chased for 240 min. (c) Glycan moieties isolated from glycoproteins (a);  $\square$ , neutral free oligosaccharides OS-Gn1 (b, c).  $M_1$  and  $M_2$  represent oligomannosides with four and five mannose residues respectively.  $G_1M_1$ ,  $G_2M_1$  and  $G_3M_1$  represent oligomannosides with one, two and three glucose residues (and five mannose residues) respectively.

proteins and OS-Gn1 were mainly glucosylated (Figures 5d, 5e and 5f). Glycoprotein degradation seems to be independent of the number of glucose residues linked to the glycan moiety.

#### Importance of intracellular trafficking in glycoprotein degradation

Three major sites for intracellular protein degradation are known: (i) the lysosome, where leupeptin and lysosomotropic agents such as  $\text{NH}_4\text{Cl}$  can be used as inhibitors; (ii) the cytosolic pathway, where ubiquitin can be used as end-life signal for the protein; (iii) a non-lysosomal degradation pathway in a poorly defined post-ER compartment described in various systems [10]. In each case, the degradation depends on the intracellular traffic. When cells were incubated at low temperature (16  $^\circ\text{C}$ ), intracellular traffic was blocked or greatly slowed down. Figure 7 shows a comparison between two chase experiments, one performed at 39  $^\circ\text{C}$ , the other at 16  $^\circ\text{C}$ . The decrease in radioactivity associated with glycoprotein at 39  $^\circ\text{C}$  after 40 min can be correlated with the increase in radioactivity associated with OS-Gn1. When the chase was performed at 16  $^\circ\text{C}$ , the level of OS-



**Figure 7** Effect of temperature on the degradation of glycoproteins and formation of OS-Gn1

B3F7 cells were incubated at 39  $^\circ\text{C}$  with 200  $\mu\text{Ci}$  of  $[2\text{-}^3\text{H}]\text{mannose}$  for 10 min in the presence of 0.5 mM glucose and processing inhibitors (50  $\mu\text{g/ml}$  Cst and 100  $\mu\text{g/ml}$  dMM). The cells were then chased at either 16  $^\circ\text{C}$  ( $\bullet$ ) or 39  $^\circ\text{C}$  ( $\blacktriangle$ ) for various times from 0 to 240 min. The fate of labelled glycoproteins (a) or OS-Gn1 (b) was followed during the chase.

Gn1 remained constant and no degradation of glycoprotein was observed. This allows correlation of glycoprotein degradation with OS-Gn1 production. The inhibition of glycoprotein degradation at 16  $^\circ\text{C}$  is reminiscent of the temperature-dependence of membrane transport processes.

#### Properties of the degradation process

Non-lysosomal degradative mechanisms of newly synthesized proteins have recently been highlighted in different biological models: in 2B4 T-cell hybridoma, degradation is not affected by lysosomotropic agents ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ , leupeptin) [10], whereas degradation is recovered in permeabilized cells [11], providing evidence for the ER as the site of degradation. Another degradative mechanism has been described in HT29 cells [12], in which ER oligomannoside-type glycoproteins are degraded in a lysosome-like compartment avoiding the secretory pathway via the Golgi apparatus. In the present case, neither leupeptin nor  $\text{NH}_4\text{Cl}$  inhibited glycoprotein degradation (not shown) and, as demon-

**Table 3** Influence of lysosomotropic agents and cell permeabilization on the relative percentages of OS-Gn2 and OS-Gn1

B3F7 intact cells were incubated for 60 min with 200  $\mu$ Ci of [ $^3$ H]mannose. The relative percentages of OS-Gn2 and OS-Gn1 were measured as described in the Materials and methods section. Incubations were performed without (control) or with lysosomotropic agents: 100  $\mu$ g/ml leupeptin or 20 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Permeabilized cells were incubated with 5  $\mu$ Ci of GDP-[ $^{14}$ C]Man and 50  $\mu$ M UDP-GlcNAc. The relative percentages of OS-Gn1 and OS-Gn2 were determined after 20 min incubation. Results are expressed as percentage of radioactivity associated with neutral free oligosaccharides.

	Amount (%)	
	OS-Gn2	OS-Gn1
Intact cells		
Control	38.5	61.5
+ Leupeptin	37.0	63.0
+ 20 mM $\text{NH}_4\text{Cl}$	52.3	47.4
Permeabilized cells	60.0	40.0

strated in Table 3, did not strongly affect the formation of OS-Gn1. When permeabilized B3F7 cells were incubated with GDP-[ $^{14}$ C]mannose and UDP-GlcNAc, release of OS-Gn1 was observed (Table 3), demonstrating that the degradative mechanism is not inhibited by the permeabilization process.

## DISCUSSION

During the membrane-bound synthesis of a *N*-glycosylprotein, soluble material is produced containing free neutral and phosphorylated oligosaccharides. The origin of the phosphorylated oligosaccharides has been clearly demonstrated [3,8]. They represent a by-pass of the dolichol cycle which may control the availability and structural suitability of lipid intermediates for protein glycosylation. The present study focuses on cellular aspects of the origin of the free neutral oligosaccharides.

The relationship between protein glycosylation and release neutral oligosaccharides has already been demonstrated *in vitro* using thyroid rough ER [2]. These oligosaccharides were also found by metabolic labelling in B3F7 cells [3].

Synthesis of a glycoprotein requires the adjustment of two different metabolic pathways: the formation of a lipid donor and protein synthesis. Degradation of either one to neutral oligosaccharides could be a reflection of this adjustment. In order to test this hypothesis, we have studied conditions in which one of the metabolic pathways was abolished. Using cycloheximide to inhibit protein synthesis, we have shown that the combined mannose incorporation into glycoprotein and OS-Gn2 is constant, suggesting that they are both derived by the action of oligosaccharyltransferase. This enzyme uses the lipid donor pool at a constant rate, generating OS-Gn2 when the protein acceptor is deficient. Thus oligosaccharyltransferase could possess two enzymic activities: the well-known 'en bloc' transferase activity and a hydrolase activity that liberates OS-Gn2. The competition between these two functions is revealed when the protein level is lowered. A decreased liberation of OS-Gn1 is also observed during cycloheximide treatment as previously described for puromycin-treated thyroid slices by Spiro and Spiro [13]. This favours a glycoprotein origin for the OS-Gn1 family, but can be questioned as cycloheximide and puromycin are non-specific protein-synthesis inhibitors and could affect the

synthesis of a hypothetical chitobiase which could cleave one GlcNAc from OS-Gn2, generating OS-Gn1.

In fact, if OS-Gn1 originates from glycoprotein, a degradative mechanism for newly synthesized glycoprotein must be demonstrated. Such a degradative mechanism has been examined *in vitro* in thyroid microsomal vesicles [2]. In B3F7 cells, a decrease in the radioactivity associated with glycoprotein was observed after 40 min of chase following a 10 min pulse. Some of the radioactivity was recovered in the medium as secreted glycoprotein but an overall loss of glycoprotein radioactivity was observed. This decrease was not affected when the chase experiment was performed in the presence of Cst and dMM, demonstrating that liberation of the glycan moiety rather than processing is responsible for this loss of radioactivity. With regard to the neutral oligosaccharide material, the time progress curve during the chase (Figure 4b) may suggest a substrate/product relationship between OS-Gn2 and OS-Gn1. Labelled lipid donors were no longer formed between 120 and 240 min of the chase. During the same period, the formation of OS-Gn2 was completely abolished, confirming that lipid donors are precursors of OS-Gn2. During this chase period, the loss of the radioactivity associated with OS-Gn2 was 200 000 d.p.m./h, whereas, during the same period, the radioactivity associated with OS-Gn1 increased by 400 000 d.p.m./h. Thus, even if some OS-Gn2 generates OS-Gn1, at least half of the OS-Gn1 originates from glycoprotein, as glycoprotein-associated radioactivity is decreasing during this period. Furthermore, it should be noted that some of the oligosaccharide material was recovered in the incubation medium after the chase. This radioactivity could explain the decrease in intracellular OS-Gn2.

Secretion of oligosaccharides by cultured cells has been described by Lubas and Spiro [14]. This secretory process is rapid as it depends on the bulk flow rate [15]. The nature of such extracellular oligosaccharide material released during the chase period is under investigation.

In order to demonstrate unambiguously that OS-Gn1 originates from degradation of newly synthesized glycoprotein, we analysed oligosaccharide populations from neutral free oligosaccharides and from glycoproteins under various incubation conditions. To avoid any processing during the chase period, experiments were performed in the presence of processing inhibitors (Cst and dMM). In previous work [3], we have demonstrated that, whatever the glucose concentration, the neutral free oligosaccharides and glycan moieties of glycoprotein are similar and mostly glucosylated. During these chase experiments, whatever the incubation conditions (presence or absence of glucose), whereas OS-Gn2 remains identical with the lipid donor, OS-Gn1 has a similar structural pattern to glycan moieties of glycoprotein. This reinforces the hypothesis that glycoprotein degradation leads to release of OS-Gn1 and that the number of glucose residues linked to the glycoprotein moieties does not affect this degradative mechanism.

Glucosyl residues attached to the glycan of glycoproteins have been implicated in the retention of these molecules in the rough ER. This glycosylation is achieved via a glucosyltransferase/glucosidase shuttle [13] or via a specific UDP-glucose glucosyltransferase [16]. It has been speculated that, during protein folding or subunit assembly, glucosylation is a means of preventing incompletely folded or unassembled protein complexes from being channelled into the secretory pathway. The presence of glucosyl residues on OS-Gn1 thus indicates that their release occurs in the subcellular compartment where glycoproteins are retained.

Furthermore, the patterns of OS-Gn2 and OS-Gn1 observed after the 10 min pulse remain glucosylated during the chase

period. This indicates that the neutral oligosaccharides are released in a subcellular compartment that contains Cst-sensitive glucosidases, i.e. ER or a compartment closely related to ER.

Pre-Golgi or rough ER degradation of newly synthesized proteins has already been observed [5,6,10,11]. In these studies, two observations were reported that suggest the possibility that some transport takes place between synthesis and degradation of these newly synthesized proteins. First, degradation proceeds after a variable lag period (5–20 min) after synthesis; second, the degradation is inhibited at temperatures below 20 °C (temperatures at which membrane transport processes are slowed down). In the present case, OS-Gn1 formation exhibited a lag period of 20 min (Figure 2), and we demonstrated that its appearance was strictly temperature-dependent (Figure 7b), as well as glycoprotein degradation (Figure 7a). This allows correlation of the release of OS-Gn1 with a glycoprotein-catabolic pathway, suggesting that some transport is involved between the synthesis of glycoproteins and their degradation. Degradation of newly synthesized proteins via a lysosomal proteolytic pathway has also been described [12,17]. In these models, the use of leupeptin or acidotropic agents (NH<sub>4</sub>Cl) prevented protein degradation. In the present case, these agents did not prevent the formation of OS-Gn1. The fact that the degradation occurs in permeabilized cells, in which a total absence of transport between the rough ER and the Golgi has been reported [11], strongly supports the idea that, in our model, ER or a closely related compartment is the site of glycoprotein degradation and OS-Gn1 formation.

Recent observations indicate that OS-Gn1 is also generated in the wild-type CHO cell line. Thus the release of oligomannoside-type oligosaccharides can be considered as a marker of degradation of newly synthesized glycoproteins. In mammalian cells, two pathways are known to generate OS-Gn1 from glycoproteins: a two-step hydrolysis by an aspartamidase followed by a chitobiase as described in the lysosome [18] and a one-step hydrolysis by endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase [19] without pro-

tein degradation. The precise subcellular localization and nature of the enzyme(s) involved in the degradative pathway described here for newly synthesized glycoproteins remain to be determined.

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (U.M.R. no. 111, director Professor A. Verbert), by the Ministère de l'Éducation Nationale, by the Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois and by an EEC grant no. BIOT-CT 92-0304 (Bridge contract on 'Control of recombinant protein glycosylation under defined cultivation conditions'). We are indebted to Dr. Sharon S. Krag from the School of Hygiene and Public Health (The Johns Hopkins University, Baltimore, MD, U.S.A.) for her precious gift of 83F7 cells and to Steven G. Ball for his careful reading of the manuscript.

## REFERENCES

- 1 Cacan, R., Hoffack, B. and Verbert, A. (1980) *Eur. J. Biochem.* **108**, 473–479
- 2 Anumula, K. R. and Spiro, R. G. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 15274–15282
- 3 Cacan, R., Villers, C., Béland, M., Kaiden, A., Krag, S. and Verbert, A. (1992) *Glycobiology* **2**, 127–136
- 4 Stoll, J. (1986) PhD. Thesis, School of Hygiene and Public Health, The Johns Hopkins University
- 5 Bonifacino, J. S. and Lippincott-Schwartz, J. (1991) *Curr. Opin. Cell Biol.* **3**, 592–600
- 6 Klausner, R. D. and Silia, R. (1990) *Cell* **62**, 611–614
- 7 Beckers, C. J., Keller, D. S. and Balch, W. E. (1987) *Cell* **50**, 523–534
- 8 Béland, M., Cacan, R. and Verbert, A. (1988) *Biochem. J.* **255**, 235–242
- 9 Jonas, A. J. (1986) *Biochem. J.* **236**, 671–677
- 10 Lippincott-Schwartz, J., Bonifacino, J. S., Yuan, L. C. and Klausner, R. D. (1988) *Cell* **54**, 209–220
- 11 Stafford, F. J. and Bonifacino, J. S. (1991) *J. Cell Biol.* **115**, 1225–1236
- 12 Trugnan, G., Oger-Denis, E., Sapin, C., Darmoul, D., Bauvy, C., Aubery, M. and Codogno, P. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 20849–20855
- 13 Spiro, M. J. and Spiro, R. G. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 5311–5317
- 14 Lubas, W. A. and Spiro, R. G. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 3990–3998
- 15 Wieland, F. T., Gleason, M. L., Serafini, T. A. and Rothman, J. E. (1987) *Cell* **50**, 289–300
- 16 Sousa, M. C., Ferrero-Garcia, M. A. and Parodi, A. J. (1991) *Biochemistry* **31**, 97–105
- 17 Dunn, W. A. (1990) *J. Cell Biol.* **110**, 1935–1945
- 18 Haeuw, J. F., Michalski, J. C. and Strecker, G. (1992) *Regard Bioch.* **4**, 26–34
- 19 De Gasperi, R., Li, Y. T. and Li, S. C. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 9329–9334

## DISCUSSION DE L'ARTICLE II

### I/ MISE EN EVIDENCE D'UNE COMPETITION ENTRE LE TRANSFERT SUR LA PROTEINE ET LA FORMATION DES OLIGOSACCHARIDES NEUTRES.

La synthèse d'une glycoprotéine coordonne deux métabolismes : le glycanne porté par l'intermédiaire lipidique et la protéine en cours de synthèse. Pour comprendre comment sont liés ces métabolismes, nous avons choisi des conditions dans lesquelles une des voies métaboliques est supprimée afin de suivre ce qu'il advient des oligosaccharides neutres.

Nous avons, dans un premier temps, inhibé la synthèse protéique par l'utilisation de cycloheximide. Cet antibiotique entre en compétition avec le GTP pour le même site de fixation sur la grande sous-unité du ribosome.

La déficience du mécanisme de traduction des cellules B3F7 s'exprimant lorsque les cellules sont incubées à basse concentration en hexose, associée à l'utilisation de la cycloheximide, nous a permis d'atteindre jusqu'à 97% d'inhibition de la synthèse protéique.

Les conclusions des expériences de chasse métabolique en présence de cycloheximide sur des cellules B3F7 indiquent que:

- le cycloheximide supprime l'hétérogénéité du matériel oligosaccharidique neutre. En effet, les oligosaccharides neutres sont essentiellement terminés par deux résidus de N-acétylglucosamines (91%) (Tableau II de l'article II page 75 ). Lorsque l'accepteur protéique est présent, ces OS-Gn2 ne représentent que 16,6%. L'accumulation de  $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$  quand le transfert est empêché accorde une origine lipidique aux OS-Gn2 favorisant vraisemblablement une activité endoglycosidasique de l'oligosaccharidyltransférase. Cette activité prédomine lorsque l'accepteur protéique est absent. Une compétition s'opère entre le transfert du glycanne du précurseur lipidique sur la protéine et sa dégradation en oligosaccharides à deux GlcNAc.

Une première corrélation peut être effectuée entre l'absence d'OS-Gn1 en présence de cycloheximide et l'absence de néoglycoprotéines.

- En outre, la qualité des populations oligosaccharidiques solubles est différente selon que le transfert est permis ou non. En absence de cycloheximide, les cellules B3F7 libèrent 83.4% d'OS-Gn1, constitués de 73% de  $\text{Glc}_1\text{Man}_5\text{GlcNAC}_1$ . En présence de cycloheximide, les pourcentages s'inversent et la qualité du glycanne est modifiée : 91% d'OS-Gn2 représentent les oligosaccharides neutres, constitués de 76%  $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAC}_2$ . Ces résultats évoquent une situation où l'intermédiaire lipidique, ne pouvant céder son glycanne à un accepteur protéique en voie de synthèse, s'accumule sous la forme  $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAC}_2\text{-PP-Dol}$ . Cet intermédiaire lipidique devient la cible d'une dégradation sous l'action endoglycosidasique supposée de l'oligosaccharidyltransférase à l'origine de  $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAC}_2$ .

Dans le même ordre d'idée, l'étude de Spiro et Spiro (1991) traduit la compétition qui s'engage pour la réserve d'oligosaccharides pyrophosphodolichols glucosylés entre le transfert sur la protéine et la dégradation en composés solubles. Dans ce cas en effet, l'addition d'accepteur protéique exogène lors de l'incubation de microsomes de thyroïde augmente le transfert du glycanne et réduit la formation d'oligosaccharides neutres.

Concernant l'inhibition de la synthèse protéique, nous avons bénéficié d'un modèle plus physiologique où la réduction observée du taux de synthèse protéique permet de tirer des conclusions analogues au sujet des oligosaccharides neutres. Il s'agit de cellules en suspension.

Des cellules CHO cultivées en boîte de pétri mises en suspension spontanément après avoir atteint la confluence ou par action du mélange trypsine/EDTA, voit leur taux de synthèse protéique diminué par un facteur 10 (Fig.29).

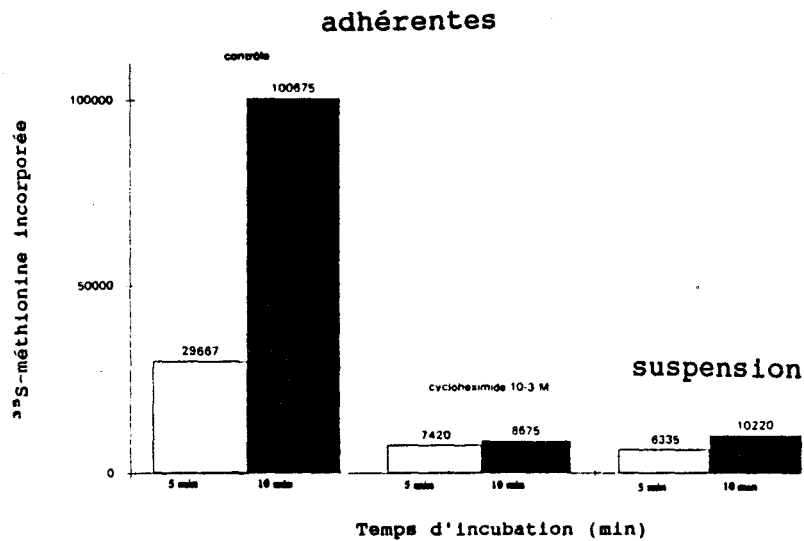


Fig.29 : Inhibition de la synthèse protéique.

Ce système est néanmoins viable et réversible : les cellules CHO en suspension peuvent adhérer de nouveau à la boîte de pétri. Elles retrouvent alors leur taux initial de synthèse protéique. Nous avons donc à notre disposition un moyen de limiter la N-glycosylation des protéines sans ajouter d'inhibiteur chimique. Un marquage métabolique au [2-<sup>3</sup>H] mannose réalisé dans ces conditions permet d'observer le même phénomène, c'est à dire une disparition des OS-Gn1 (Fig.30).

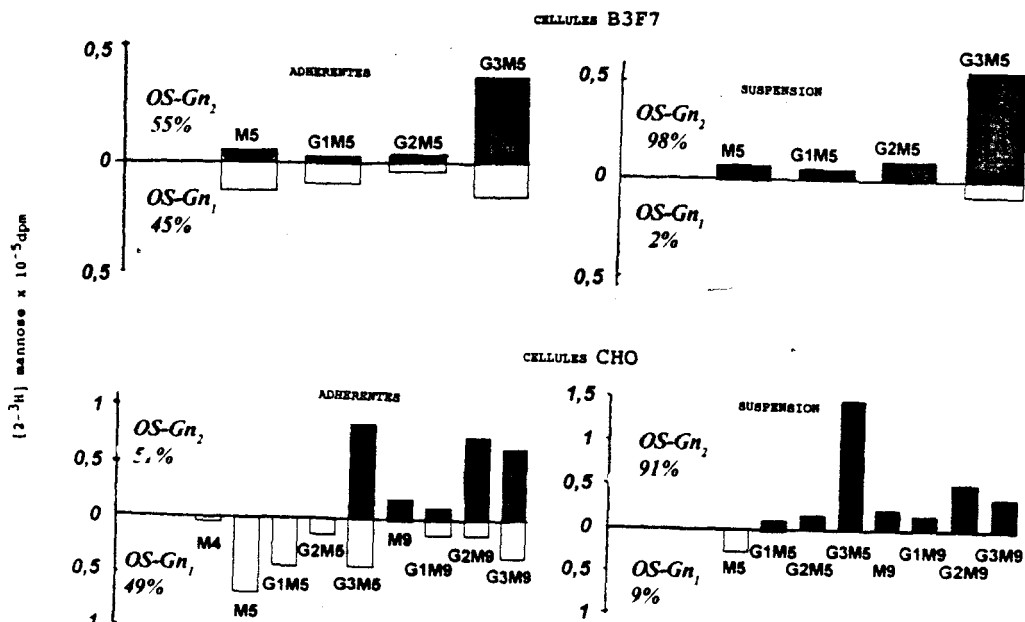


Fig.30 : Populations comparées d'oligosaccharides neutres de cellules CHO et B3F7 adhérentes et en suspension.



Selon la figure 31, l'inhibition du transfert conduit à l'accumulation des oligosaccharides pyrophosphodolichols sous leur forme glucosylée  $\text{Glc}_3\text{Man}_{5,9}\text{GlcNac}_2\text{-PP-Dol}$ , qui sont alors dégradés en OS-Gn2. Par contre, si l'on reprend la figure 25 où l'accepteur protéique est présent, dès qu'un glucose est greffé sur l'oligosaccharide pyrophosphodolichol, le transfert catalysé par l'oligosaccharidyltransférase peut s'effectuer rendant le donneur peu accessible à la dégradation.

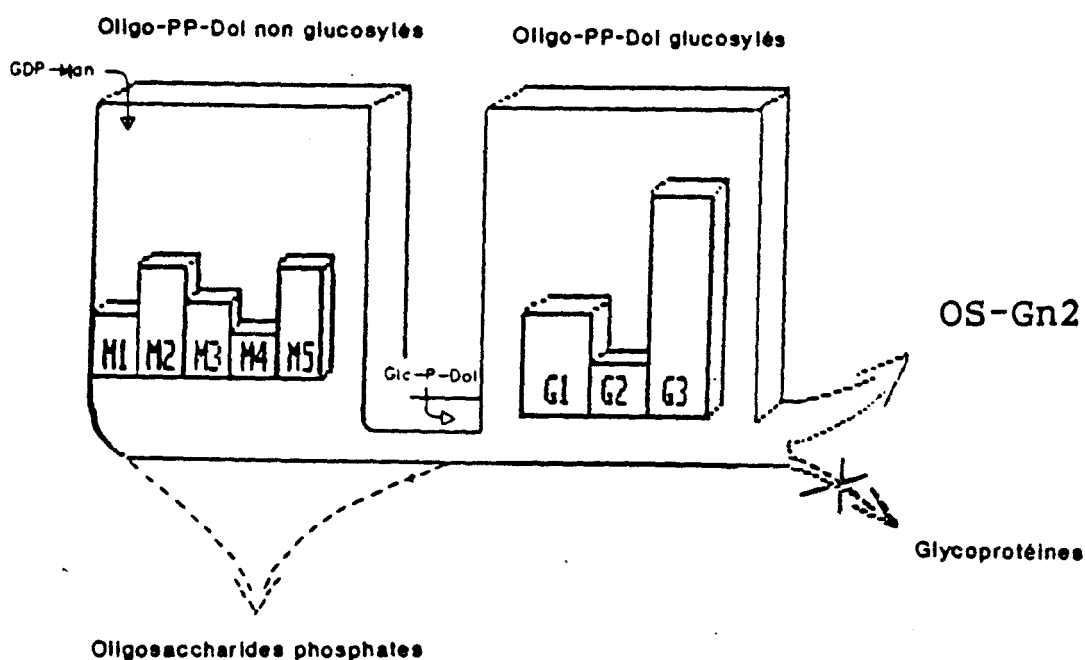


Fig.31 : Schéma du devenir du matériel oligosaccharide soluble lorsque la synthèse protéique est inhibée.

## II/ DEGRADATION DES NEOGLYCOPROTEINES.

Notre étude a mis en évidence une dégradation des néoglycoprotéines lors de chasses métaboliques au  $[2\text{-}^3\text{H}]$  mannose dans les souches de fibroblastes (sauvages et mutantes) (Fig.4 de l'article II p 76).

Nous avons vu que le transport intracellulaire des protéines est réalisé chez les cellules eucaryotes par un transfert séquentiel entre compartiments successifs. Il nécessite des événements de fusion des vésicules avec les compartiments cibles, ces fusions membranaires se déroulant à des températures supérieures à 16°C. La figure 7 de l'article II (page 77) montre que le mécanisme de dégradation des néoglycoprotéines est température-dépendant. De plus, dans le cas d'un marquage effectué au [2-<sup>3</sup>H] mannose à 16°C durant 2 heures, seuls des oligosaccharides neutres possédant deux GlcNAc à leur extrémité réductrice sont mis en évidence. Une deuxième corrélation peut ainsi être établie entre l'absence de dégradation des glycoprotéines et l'absence d'OS-Gn1.

Préciser la localisation subcellulaire de la dégradation des néoglycoprotéines dans notre système consistait à déterminer, par ces incubations à basse température, si la formation des OS-Gn1 nécessitait un changement de compartiment ou si elle avait lieu au site de traduction, c'est à dire dans le RER. Lorsqu'une chasse métabolique est réalisée à 39°C après un marquage à 16°C, des OS-Gn1 sont formés.

La formation des OS-Gn1 est donc la conséquence de l'évolution d'un précurseur formé pendant le marquage à 16°C. Ce précurseur pourrait être :

- soit les OS-Gn2 générés pendant le pulse sous l'action de l'oligosaccharidyltransférase par un transfert sur l'eau, qui deviendrait le substrat d'une chitobiase, agissant sur le di-N,N'-acétylchitobiose. Cet enzyme libèrerait des OS-Gn1 d'un côté et N-acétylglucosamine libre de l'autre. Néanmoins, quantitativement, les OS-Gn2 ne peuvent expliquer la formation des OS-Gn1, donnant peu de poids à leur rôle de précurseur supposé.

De plus, l'utilisation de cellules dépourvues de chitobiase lysosomique a permis d'exclure la chitobiase dans la formation des OS-Gn1. En effet, la souche bovine (MDBK) est dépourvue d'activité chitobiasique acide comparée aux cellules CHO (Song et al 1987). Cependant, les cellules MDBK génèrent, comme les

CHO, des OS-Gn1 (Dengremont 1993). La chitobiase lysosomique n'intervient donc pas dans leur formation ce qui favorise la seconde hypothèse de l'origine des OS-Gn1 à partir des néoglycoprotéines plutôt que des OS-Gn2.

- soit les glycoprotéines néosynthétisées : dans ce cas, une endo N-acétylglucosaminidase libèrerait également des OS-Gn1, laissant sur la glycoprotéine un seul résidu de N-acétylglucosamine au niveau de l'asparagine du point d'attache. Les cellules MDBK, comme les cellules CHO, révèlent une activité endo N-acétylglucosaminidase de pH optimum 6 (Fig.32).

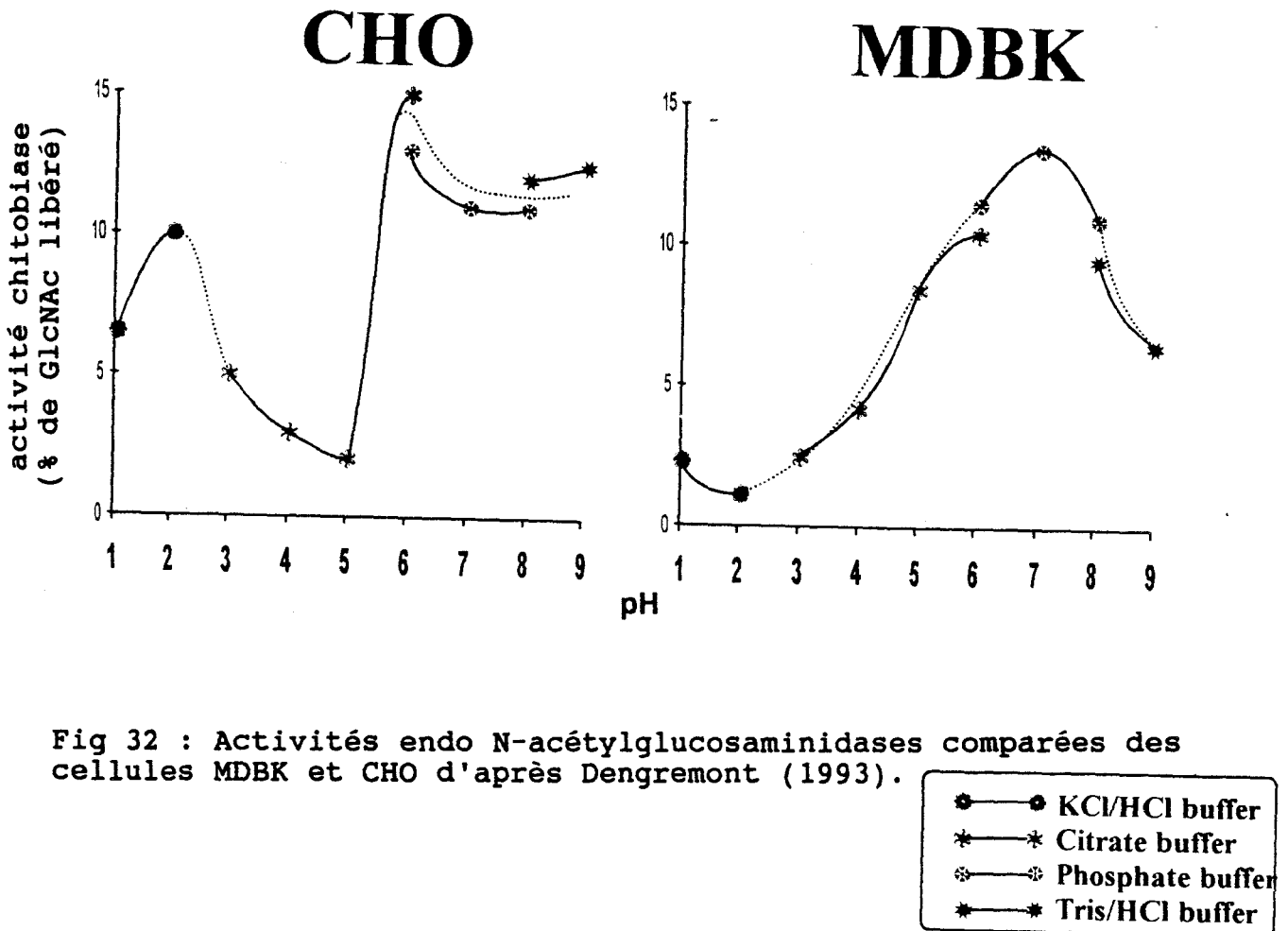


Fig 32 : Activités endo N-acétylglucosaminidases comparées des cellules MDBK et CHO d'après Dengremont (1993).

La dégradation de néoglycoprotéines ayant également été observée dans la lignée cellulaire MDBK, les néoglycoprotéines pourraient être un substrat potentiel de cette activité.

De toute façon, la température de 39°C permet l'accès du précurseur (OS-Gn2 ou glycoprotéine) dans un compartiment où le mécanisme de dégradation génère des OS-Gn1 via une des deux activités.

L'analyse HPLC des populations glycaniques liées aux protéines et des OS-Gn1 révèle une similitude (voir les figures 5 et 6 de l'article II page 76-77). Elle apporte de nouveaux arguments en faveur de la corrélation entre néoglycoprotéines et formation des OS-Gn1 et penche pour l'hypothèse de l'action d'une endo N-acétylglucosaminidase à l'origine de ces OS-Gn1.

### III/ LOCALISATION SUBCELLULAIRE DU PROCESSUS DE DEGRADATION DES NEOGLYCOPROTEINES.

Lorsqu'une glycoprotéine est dégradée, il existe vraisemblablement une séquence déterminée d'événements. La dégradation de la glycoprotéine débute-t-elle par l'élimination du glycanne ou par une protéolyse? En effet, comme nous en avons déjà discuté, l'un des rôles fondamentaux des glycanes est de stabiliser la glycoprotéine et de la protéger contre la protéolyse.

Tous les travaux portant sur la dégradation des protéines nouvellement synthétisées sont fondés sur le suivi de la partie protéique marquée à la <sup>35</sup>S-méthionine après immunoprécipitation. La disparition du marquage au <sup>35</sup>S témoigne de la dégradation de la protéine ou de la glycoprotéine en question. L'étude de la dégradation d'une glycoprotéine par le biais de son glycanne permet d'aborder la question d'un autre point de vue.

Nous avons vu que la dégradation des néoglycoprotéines à l'origine des OS-Gn1 peut s'effectuer via l'action combinée de protéases, amidase et chitobiase ou via l'action d'une endo N-acétylglucosaminidase. Ces activités hydrolytiques sont décrites dans le lysosome, le cytosol et le RER. Nous avons donné dans l'article II des arguments permettant d'éliminer le

lysosome. L'utilisation d'inhibiteurs et de perturbants du trafic nous a permis d'obtenir des preuves indirectes pour localiser le phénomène de dégradation (Tableau III de l'article II page 78).

### 1) Utilisation d'inhibiteurs de protéases.

En supposant que la dégradation débute par une protéolyse générant des glycopeptides, quel peut-être leur devenir? Subissent-ils l'action d'une endo N-acétylglucosaminidase du RER ou sont-ils envoyés dans un autre compartiment? La mise en évidence chez la Levure, d'un transport actif dépendant de l'ATP et spécifique des glycopeptides dans les membranes du RER pourrait expliquer l'envoi de ces peptides ou glycopeptides issus de la dégradation RER vers le cytosol afin qu'ils y poursuivent leur dégradation (Römish et Schekman 1992). Mais, ce système d'exportation, présent chez la Levure, existe-t-il chez les Mammifères? La généralisation de l'existence d'une fuite des glycopeptides du RER vers le cytosol mettrait en doute les résultats de Wieland et al (1987) sur le trafic intracellulaire. Ces auteurs ont montré que des tripeptides glycosylés suivaient la voie de sécrétion en traversant l'appareil de Golgi. La présence d'un tel transport vers le cytosol détournerait les glycopeptides de la voie de sécrétion.

Afin d'évaluer une éventuelle présence de glycopeptides et leur dégradation dans le cytosol, nous avons tenté d'inhiber ce mécanisme. L'inhibition de ce processus de dégradation peut être envisagée en empêchant la reconnaissance spécifique entre la ligase E3 permettant la fixation de l'ubiquitine et l'acide aminé N-terminal déstabilisant de la protéine. L'utilisation de dipeptides induit une compétition et évite la dégradation de la protéine.

Des deux dipeptides utilisés (Ala-Leu et Leu-Ala), inhibiteurs de ligases à résidus hydrophobes ou neutres, seul le dipeptide Leu-Ala empêche la dégradation de protéines dans des cellules neuronales PC12 (Hondermarck et al 1992). Une chasse

métabolique de fibroblastes en absence et en présence de ces dipeptides montre qu'ils n'ont aucun effet sur la dégradation des néoglycoprotéines et la formation des OS-Gn1. Il semble donc que les protéases cytosoliques ne seraient pas impliquées dans ce phénomène.

## 2) Utilisation de la Bréfeldine A.

Comme nous l'avons vu dans la première partie (page 35), la Bréfeldine A provoque la fusion des compartiments du RER et de l'appareil de Golgi. L'addition de Bréfeldine A (5  $\mu\text{g/ml}$ ) lors d'une chasse métabolique réalisée sur des cellules CHO accélère l'acquisition de la résistance à l'endo- $\beta$ -D-N-acétylglucosaminidase H des glycoprotéines néosynthétisées (Fig.33a). Cette résistance à l'endo-H est une mesure de la maturation des glycoprotéines. Le déversement des enzymes golgiens sur le lieu de synthèse de ces glycoprotéines fait disparaître la phase de latence supprimant toute distinction entre synthèse et dégradation.

Les OS-Gn1, témoin de la dégradation des néoglycoprotéines, sont formés en présence de Bréfeldine A. Leur formation ne peut s'expliquer uniquement par la disparition des OS-Gn2 (Fig.33b).

L'expérience utilisant la Bréfeldine A suggère une dégradation sur le lieu même ou dans un compartiment proche de la synthèse des néoglycoprotéines. La dégradation protéique associée au RER recouvre une dégradation localisée dans le RER lui-même, ou se déroulant dans un compartiment pré-golgien, cette différence pouvant être aussi fonction des protéines dégradées ou du type cellulaire.

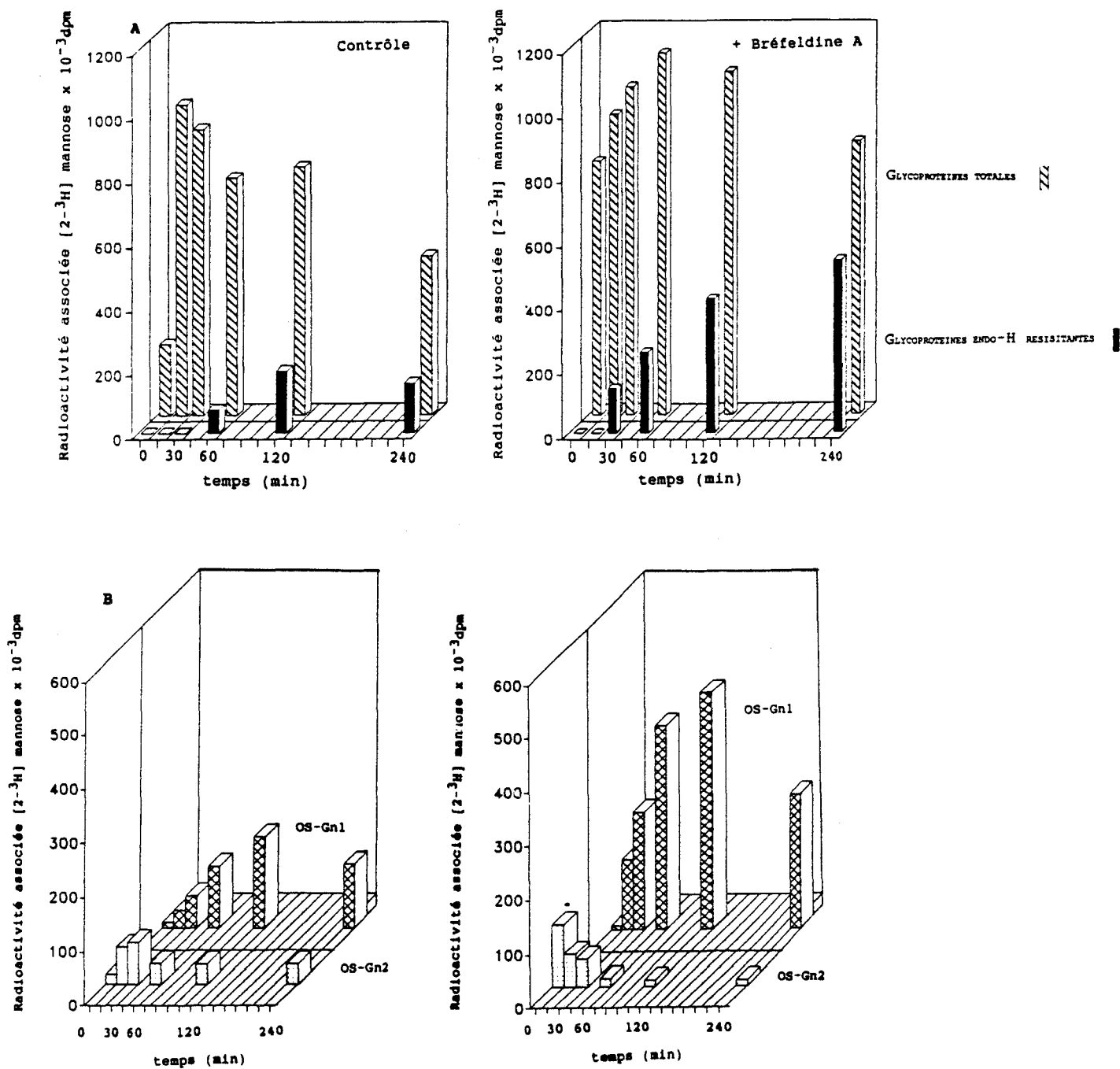


Fig.33 : Action de la Bréfeldine A

A/ sur la maturation des glycoprotéines déterminée par action de l'endo N-acétylglucosaminidase H.

B/ sur la formation d'oligosaccharides neutres.

### 3) Caractéristiques de la dégradation des néoglycoprotéines dans notre modèle.

Les caractéristiques de la dégradation glycoprotéique observée dans notre système sont les suivantes :

- \* il s'agit d'une dégradation non lysosomique.
- \* la dégradation présente une phase de latence reflétant sans doute le temps nécessaire pour atteindre un compartiment subcellulaire spécifique.

\* de plus, cette dégradation subsiste en absence de transport vésiculaire. Des cellules perméabilisées ou traitées à la Bréfeldine A ne réalisent plus aucun trafic intracellulaire. Cependant, des OS-Gn1 sont formés dans ces conditions et permettent de corréliser la dégradation des glycoprotéines et la libération des OS-Gn1.

\* De façon contradictoire, l'inhibition du transport à 16°C, qui bloque le trafic intracellulaire, supprime la dégradation des néoglycoprotéines ainsi que la formation des OS-Gn1.

Ces propriétés sont proches de celles qui caractérisent un compartiment intermédiaire entre RER et Golgi.

### 4) Le compartiment intermédiaire.

#### a) Description

Ce compartiment semble hétérogène du point de vue fonctionnel puisque diverses fonctions lui sont attribuées dont la dégradation protéique RER/Pré-Golgienne (Schweizer et al 1991). Une des preuves pour la mise en évidence de ce compartiment fut l'accumulation à basse température de protéines membranaires virales (Saraste et al 1984). Il présente aussi une hétérogénéité structurale, preuve de la difficulté à distinguer les entités rassemblées sous des dénominations diverses (Tableau III).



Tableau III: Caractéristiques du Compartiment Intermédiaire entre le Reticulum Endoplasmique et l'appareil de Golgi.

APPELLATION (AUTEUR)	MARQUEUR	MISE EN EVIDENCE	ROLE
15°C compartiment (Saraste 1984)	basse température	blocage du transport de protéines membranaires virales à 15°C	-
ERGIC (Schweizer <i>et al</i> 1991) (Vaux et Fuller 1992)	p53 p58 p63	immunolocalisation isolement à partir de cellules de Singe	tri des protéines résidentes du RER
cis Golgi Network (CGN) (Pelham 1987)	rab 2	oligomérisation de protéines multimériques	tri des protéines résidentes du RER

Concernant l'ERGIC, il s'agit d'un compartiment de transition, des caractéristiques propres ont pu lui être assignées, permettant son identification. Il est stable, c'est-à-dire qu'il garde son identité au cours du trafic intracellulaire. Différents marqueurs sont rattachés à ce compartiment, les protéines p53 (ou ERGIC-53) (Schweizer 1988) et p58 (Saraste et Svenson 1991), lui sont associées. Elles sont localisées dans des membranes tubulovésiculaires bordant le côté cis du Golgi (Saraste et Svenson 1991). La complexité du système est liée à son état dynamique, les localisations de p53 et p58 variant en fonction de la température laissant penser que ces marqueurs sont recyclés entre l'ERGIC et le cis Golgi.

Deux autres marqueurs ont été reliés à ce compartiment : la protéine p63, peu recyclée, serait plutôt associée aux structures réticulaires. Egalement la protéine CaBP1, une des protéines fixant le calcium appelées "Calcium Binding Protéins" aurait une distribution cellulaire différente de

celle d'ERGIC-53 en fonction de la température d'incubation des cellules. Une incubation à 15°C situe ERGIC-53 dans une région proche du Golgi tandis que CaBP1 reste associé à l'ERGIC (tout comme p63) confirmant la nature mobile d'ERGIC-53 (Schweizer et al 1993).

b) Fonctions potentielles de l'ERGIC.

Les fonctions attribuées à ce compartiment pré-golgien sont:

- \* le transfert du GalNAc, première étape de la O-glycosylation. (Tooze et al 1988)

- \* le transfert du GlcNAc-1-P sur un résidu mannose des enzymes lysosomiques. Le Man-6-P généré par élimination du GlcNAc est un signal de ciblage des enzymes lysosomiques pour le récepteur du trans golgi network.

- \* la palmitoylation (Bonatti et al 1989), bien que dans ce cas, cette réaction aurait lieu dans un compartiment en aval du "compartiment 15°C" puisqu'elle est bloquée à basse température.

- \* la réaction catalysée par la mannosidase I, enzyme golgienne.

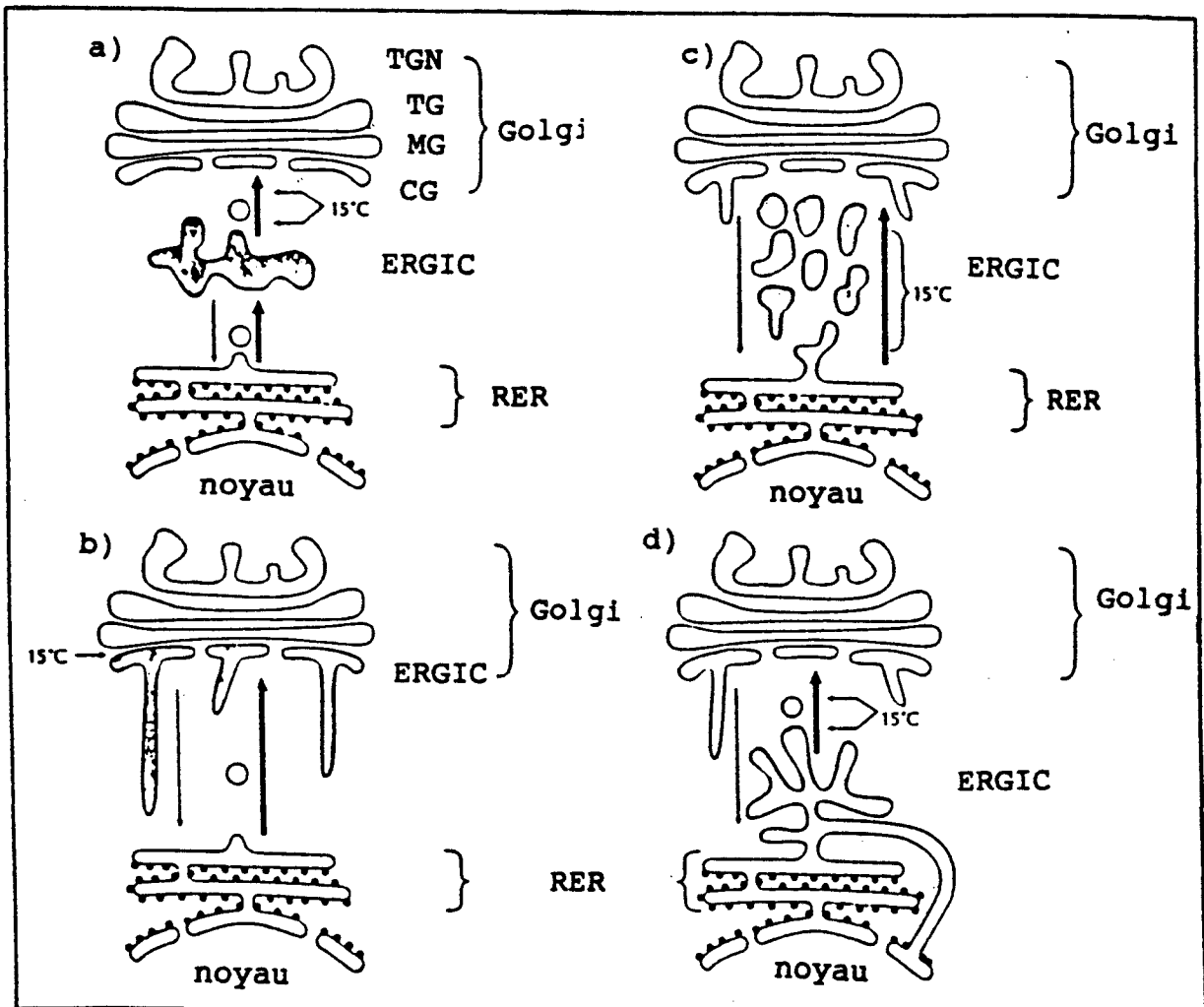
c) Modèles

Quatre modèles sont proposés par Hauri et Schweizer (1992) pour décrire l'ERGIC (Fig.34).

Dans le cas d'un compartiment séparé physiquement du RER et du Golgi, deux cas se présentent :

cas a) le compartiment communique avec le RER et l'appareil de Golgi par l'intermédiaire de vésicules, véritables navettes assurant la liaison entre les deux compartiments.

cas b) le compartiment, constitué d'une citerne vésiculotubulaire distincte des compartiments cis, median et trans Golgiens est appelé le cis Golgi Network (CGN).



CGN cis Golgi Network  
 CG cis Golgi  
 MG median Golgi  
 TG Trans Golgi  
 TGN Trans Golgi Network

Fig.34 : Modèles représentant l'ERGIC ("ER-Golgi Intermediate Compartment") proposés par Hauri et Schweizer (1992).

Dans le cas d'un compartiment non individualisé :

cas c) il s'agit d'un intermédiaire dynamique (pléomorphe).

cas d) ou d'éléments transitionnels, sortes d'extensions tubulaires assurant une continuité avec le RER (également appelé Trans ER Network, bien que non différencié par rapport au Trans Golgi Network).

Le modèle d) permet d'envisager une dégradation localisée dans le RER puisque l'ERGIC communique avec ce compartiment. La

# **MATERIELS ET METHODES**

## I/ MATERIEL CELLULAIRE

### 1) Choix du modèle cellulaire

#### a) Cellules CHO

Il s'agit de cellules d'Ovaire de Hamster Chinois (CHO) sélectionnées pour leur auxotrophie à la proline (Pro<sup>-5</sup>). Ces cellules sont des fibroblastes et nous permettent d'étendre les résultats obtenus à une lignée sauvage. De plus, l'étude de la localisation subcellulaire de ce processus peut être réalisée en s'appuyant sur l'acquisition de la résistance des glycanes à l'hydrolyse par l'endoglycosidase H acquise lors de la maturation.

#### b) Les cellules B3F7

b-1 Origine : La lignée B3F7 a été isolée après mutagénèse de cellules B421 dérivant elles-mêmes de cellules CHO dans le but d'obtenir une souche déficiente en Man-P-Dol synthétase. La sélection du clone a été réalisée à 39°C dans un milieu contenant une concentration réduite d'hexose (0:1 mM mannose).

#### b-2 Carte d'identité des cellules :

\*\*\* Les cellules B3F7, déficientes en Man-P-Dol synthétase, ne peuvent élaborer de structure glycanique complète. L'absence de Man-P-Dol leur interdit la synthèse de précurseur glycanique au delà du Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>. Ce précurseur est néanmoins glucosylé (Fig.35).

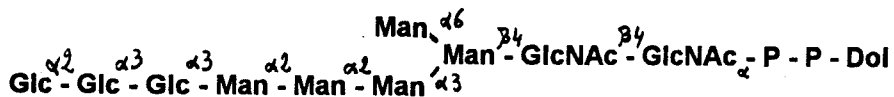


Fig.35 : Structure glycanique tronquée des glycoprotéines de cellules B3F7.

Le Glc<sub>3</sub>Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-PP-Dol élaboré est un intermédiaire lipidique fonctionnel puisque ce glycanne "tronqué" est transféré sur la protéine naissante. Il peut également donner naissance à des structures de type N-acétyllactosaminique.

\*\*\* Les cellules B3F7 présentent une incorporation réduite de mannose dans les glycoprotéines lorsque la concentration d'hexose dans le milieu de culture est abaissée. En effet, elles incorporent deux fois moins de méthionine et deux fois moins de mannose dans les protéines par rapport aux cellules parentales B421. Cette incorporation est identique dans les B3F7 et les B421 à concentration normale en hexose dans le milieu d'incubation (Stoll 1986).

\*\*\* L'intérêt que représente l'utilisation des cellules B3F7 dans l'étude de la régulation de la N-glycosylation des protéines porte sur deux points. Premièrement, une libération importante de matériel oligosaccharidique soluble par ces cellules. Le second point concerne la réaction de tranfert puisque ces cellules synthétisent deux fois moins de protéines, donc de glycoprotéines, par rapport aux cellules sauvages. Le transfert du N-glycane étant réduit, l'étude du devenir de l'oligosaccharide pyrophosphodolichol donneur est donc particulièrement intéressant.

## 2) Culture cellulaire.

Les cellules CHO et B3F7 sont cultivées en monocouche sur boîte de pétri de 10 cm de diamètre. Elles sontensemencées à raison de  $10^6$  cellules par boîte et arrivent à confluence en trois jours, ce qui représente 5 à  $7 \cdot 10^6$  cellules. Les cultures sont effectuées à  $34^\circ\text{C}$  sous atmosphère enrichie par 5% de  $\text{CO}_2$ . Le milieu de culture est l' $\alpha$ -MEM ("Minimum Essential Medium") supplémenté de 10% de Sérum de Veau foetal.

## II/ METHODOLOGIE

### 1) Marquage métabolique.

Les cellules CHO et B3F7 sont utilisées à confluence (72 heures). Les cellules B3F7 sont placées une nuit à  $39^\circ\text{C}$  avant leur utilisation afin d'exprimer la déficience en Man-P-Dol synthétase. Le marquage métabolique est également réalisé à  $39^\circ\text{C}$ .

Pour les deux types de cellules, le milieu est retiré et les cellules sont lavées dans l' $\alpha$ -MEM sans glucose. Si nécessaire, une préincubation de 30 minutes est réalisée dans 3 ml de milieu en présence d'inhibiteurs (de synthèse protéique, de processing ou de trafic intracellulaire).

L'incubation proprement dite démarre par l'addition du précurseur radioactif dans 1 ml de ce même milieu. Le [2- $^3$ H] mannose est utilisé à la concentration de 200  $\mu$ Ci par boîte (Amersham International Bucks, GB : 429 GBq/mmol ; 50  $\mu$ Ci/ml). L'incorporation est stoppée par lavage des cellules dans un tampon PBS froid, l'extraction des différentes fractions est immédiatement réalisée.

## 2) Extraction séquentielle des intermédiaires lipidiques.

L'extraction des intermédiaires lipidiques est réalisée par addition dans la boîte de culture de 1,1 ml du mélange constitué de 8 volumes de méthanol et 3 volumes de mélange d'arrêt. Ce mélange contient du cacodylate de sodium 100 mM, du  $MgCl_2$  4 mM et des immunoglobulines G à 10% dans les proportions respectives de : 88/7/5 par volume. Les cellules sont détachées par grattage mécanique et récupérées dans un tube d'extraction où est ajouté 1,2 ml de chloroforme. Les proportions de l'extraction d'après Folch sont ainsi respectées, à savoir Chloroforme/Méthanol/Eau 3/2/1 (par volume). On considère que le volume cellulaire est de 100  $\mu$ l. L'extraction lipidique séquentielle décrite par Cacan et al (1980) d'après Oliver et al (1975) conduit à quatre phases majeures. Elle est résumée dans la figure 36. La phase inférieure (monosaccharide-P-Dol, monosaccharide-PP-Dol et trisaccharide-PP-Dol), la phase supérieure (matériel oligosaccharidique soluble neutre et phosphorylé) et l'interphase qui est à l'origine des oligosaccharides pyrophosphodolichols et des glycoprotéines nouvellement synthétisées.

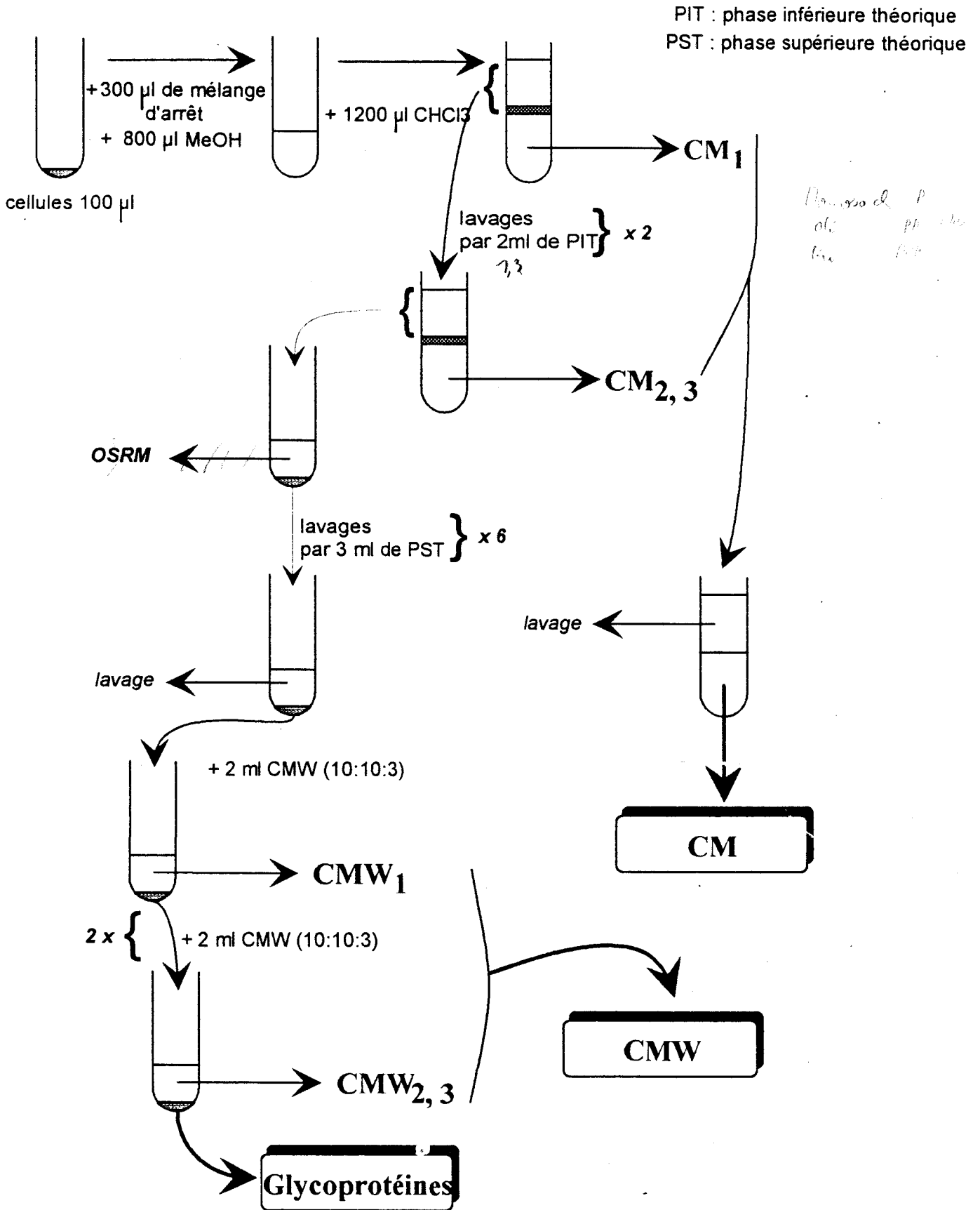


Fig.36 : Extraction séquentielle des intermédiaires lipidiques.



### 3) Préparation des échantillons.

#### a) Obtention d'oligosaccharides à partir d'oligosaccharides pyrophosphodolichols (O-PP-Dol).

Les glycanes des oligosaccharides pyrophosphodolichols sont libérés par une hydrolyse acide douce : deux heures d'incubation à 50°C dans 1 ml de tétrahydrofurane/HCl 0,1M libère le glycanne de son attache lipidique ; il possède deux N-acétylglucosamines terminales.

#### b) Obtention des glycanes des néoglycoprotéines.

Les glycoprotéines sont digérées par la trypsine bovine (1 mg/ml) dans 300 µl d'un tampon bicarbonate d'ammonium 100 mM pH=7,9 en une nuit à température ambiante. Les glycopeptides obtenus, après avoir été portés à ébullition dix minutes pour détruire la trypsine, sont dissous dans 200 µl du tampon suivant : NaHPO<sub>4</sub> 20 mM pH=7,5 ; EDTA 50 mM ; 50% de glycérol et 0,02% d'azide de sodium auquel est ajoutée 0,5 unité de Peptide N-Glycanase F (PNG-ase F) (Boeringher Mannheim, Mannheim, Allemagne). Le clivage des glycoprotéines par l'endo-β-N-acétylglucosaminidase H génère par contre des oligosaccharides à une N-acétylglucosamine terminale. L'incubation est dans ce cas réalisée une nuit dans un tampon phosphate de sodium 50 mM pH 5,5 en présence de 10 mU d'endo-H (Boeringher, Mannheim, Allemagne).

#### c) Purification du matériel oligosaccharidique soluble.

La phase supérieure de l'extraction est débarrassée des précurseurs monosaccharidiques par gel filtration sur Biogel P2 dans l'acide acétique 0,1 M. Le matériel oligosaccharidique hétérogène, constitué de matériel neutre (OS) et phosphorylé (POS), est alors séparé sur résine échangeuse d'anions QAE-Sephadex (Pharmacia). L'élution est réalisée par du Tris-base 10 mM sur lequel on applique un gradient discontinu de NaCl de 20, 70 et 100 mM. Cinq fractions de 2 ml sont récupérées à



chacune des quatre étapes (0, 20, 70 et 100 mM). Les OS sont élués avant le démarrage du gradient, les POS sont élués par le 70 mM NaCl, ce qui correspond à une charge -2. Les deux fractions sont dessalées sur Biogel P2.

Les POS sont déphosphorylés par traitement une nuit à 37°C par la phosphatase alcaline d'*Escherichia coli* (5 unités) placée dans un tampon Tris 100 mM pH=8,8. Un nouveau dessalage est nécessaire avant l'analyse HPLC des fractions. Toutes ces étapes sont résumées dans le schéma de la figure 1 de l'article II page .

#### 4) Utilisation d'inhibiteurs.

Les cellules sont préincubées 30 minutes en présence de l'inhibiteur. Sa présence est maintenue pendant le marquage et/ou la chasse métabolique qui suivent la préincubation.

##### a) Inhibiteurs de la synthèse protéique :

\* le cycloheximide, utilisé à 1 mM final, bloque la synthèse protéique à 97%.

##### b) Inhibiteurs de processing :

Nous avons utilisé deux inhibiteurs de processing :

\* la castanospermine, inhibiteur de la glucosidase I, est utilisée à la concentration de 50 µg/ml. Cet inhibiteur bloque l'élimination du glucose terminal en  $\alpha$  1-2. C'est un alcaloïde isolé de *Castanospermum australe* (le 1,6,7,8 tétrahydroxyoctahydroindolizine) inhibant également les  $\alpha$  et  $\beta$  glucosidases lysosomiques.

\* la 1-désoxymannojirimycine (dMM), inhibiteur de la mannosidase I, utilisé à 100 µg/ml. La dMM est spécifique des  $\alpha$  1-2 mannosidases impliquées dans le processing. A côté de la mannosidase I golgienne inhibée, la mannosidase du RER ainsi qu'une mannosidase calcium et phospholipides dépendantes purifiée de microsomes de foie de Lapin sont également inhibées (Elbein 1988).

c) Inhibiteurs de protéases lysosomiques.

\* la leupeptine, utilisée à 100 µg/ml, inhibe fortement les cathepsines mais également la trypsine et la papaïne.

\* l'ALLN (N-acétyl Leu Leu NorLeucinal), utilisé à la concentration de 150 µg/ml, inhibe les calpaines, protéases fixant le calcium rencontrées essentiellement dans le cytosol.

d) Inhibiteurs du trafic intracellulaire.

\* par la température : le blocage du trafic intracellulaire a été réalisé par incubation des cellules à 16°C (cette température n'affecte pas la viabilité des cellules mais empêche les fusions entre vésicules de sécrétion et compartiments accepteurs).

\* par la Bréfeldine A (BfA) : La BfA est utilisée à la concentration de 5 µg/ml.

\* par la perméabilisation : les cellules sont placées 10 minutes dans le tampon hypotonique Hépès 10 mM pH=7,2, KCl 15 mM, opération réalisée sur la glace et qui provoque le gonflement des cellules. Elles sont ensuite grattées mécaniquement dans le milieu suivant : Hépès 50 mM pH=7,2, KCl 90 mM. L'état de perméabilisation des cellules est contrôlé par coloration au Bleu Trypan. (les cellules sont diluées au demi par le Bleu Trypan et laissées 5 minutes avant lecture). Le pourcentage des cellules colorées, c'est-à-dire perméabilisées, est ainsi déterminé.

III/ ANALYSE HPLC DU MATERIEL OLIGOSACCHARIDIQUE.

1) Chromatographie Liquide Haute Performance.

L'analyse du glycanne issu des glycoprotéines ou des intermédiaires lipidiques ainsi que l'analyse des oligosaccharides solubles est réalisée par HPLC. La colonne utilisée est de type supelcosil LC-NH<sub>2</sub>, 5 micromètres (Supelco, PA, USA). Le gradient permettant l'élution passe du mélange acétonitrile:eau dans les proportions 70:30 au même

mélange dans les proportions 50:50 en 80 minutes. La séparation est fondée sur le nombre de résidus glycaniques. La séparation des oligomannosides à une et deux N-acétylglucosamines par HPLC a été entreprise sur colonne amino. Elle nécessite cependant une étape supplémentaire. En effet, le pouvoir séparateur de la colonne amino ne permet pas de distinguer deux oligosaccharides ayant le même nombre de résidus monosaccharidiques (par exemple  $\text{Man}_4\text{GlcNAC}_2$  et  $\text{Man}_5\text{GlcNAC}_1$ ). L'échantillon est alors traité par la chitobiase lysosomique préparée à partir de Foie de Rat. La chitobiase convertit les oligosaccharides terminés par deux résidus N-acétylglucosamines en composés à une seule N-acétylglucosamine terminale. L'analyse comparée du mélange d'oligosaccharides neutres et de la fraction traitée à la chitobiase (OS-Gn1 seuls) permet de déduire le pourcentage relatif des deux constituants.

## 2) Chromatographie d'Echange Anionique à pH élevé (HPAEC)

### a) Principe

L'analyse par HPAEC (High pH Anion Exchange Chromatography) est une technique chromatographique de séparation des glycanes à pH élevé. A pH supérieur à 12, les glycanes, partiellement ionisés, peuvent être séparés sur colonne d'échange d'anions. La colonne utilisée pour leur séparation est une colonne Carbowac PA-100 (4.6x250 mm). L'élution est réalisée par de la soude à 100 mM additionnée d'acétate de sodium à raison de 1 mM/min échelonné sur 100 minutes.

L'intérêt de cette technique, comparée aux techniques amino utilisées pour la séparation d'oligosaccharides, est multiple:

- \* la grande reproductibilité (très faible dérive des temps de rétention) et la qualité de la séparation.

- \* la non réactivité entre la fonction hémiacétalique réductrice et le support chromatographique (non formation de base de schiff).

L'analyse du matériel oligosaccharidique soluble évite le traitement à la chitobiase décrit dans le cas d'HPLC amino. C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés à la technique de

High pH Anion Exchange Chromatography (HPAEC). Les résultats obtenus permettent de séparer efficacement en une seule étape les oligomannosides à une ou deux N-acétylglucosamine(s), essentiellement lorsqu'ils sont glucosylés.

b) Mise en évidence de la voie alterne de glycosylation.

Cependant, l'utilisation de cette technique chromatographique nous a permis de mettre en évidence la voie alterne de N-glycosylation dans notre lignée de cellules CHO.

Ce travail a fait l'objet de la publication "RAPID DETECTION OF THE ALTERNATIVE N-GLYCOSYLATION PATHWAY USING HIGH pH ANION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY." acceptée dans Glycoconjugate Journal (1993) 10.

## **ARTICLE III**

## Rapid detection of the alternative N-glycosylation pathway using high pH anion exchange chromatography

C. VILLERS, Y. PLANCKE, R. CACAN and A. VERBERT

*Laboratoire de Chimie Biologique, U.M.R. no. 111 du C.N.R.S., Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq, Cedex, France*

Received 30 July 1993, revised 19 October, 1993

An alternative N-glycosylation pathway using  $\text{Glc}_{1-3}\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  as a donor to be transferred to a protein acceptor is found either in Man-P-Dol synthase deficient cells or in wild type CHO cells grown in energy deprivation conditions. Discrimination between oligomannosides of this alternative pathway and oligomannosides of the major one containing the same number of sugar residues  $\text{Man}_{n-8}\text{GlcNAc}_2$  required structural studies. Taking advantage of the specific chromatographic behaviour of glucosylated oligomannosides, in pellicular high pH anion exchange chromatography, we developed a one-step method for the identification of the alternative N-glycosylation pathway compounds differing from those of the major one.

**Keywords:** HPAEC; alternative N-glycosylation pathway

**Abbreviations:** HPAEC, high pH anion exchange chromatography; endo H, endo beta N-acetylglucosaminidase H; PNGaseF, peptide N-glycosidase F; M2,  $\text{Man}_2\text{GlcNAc}_2$ ; M4,  $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$ ; M5,  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ ; G1M5,  $\text{Glc}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ ; G2M5,  $\text{Glc}_2\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ ; G3M5,  $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ ; M6,  $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ ; M8,  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ ; M9,  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ; G1M9,  $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ; G2M9,  $\text{Glc}_2\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ; G3M9,  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ .

### Introduction

N-Glycosylation comprises the transfer *en bloc* of the oligosaccharide moiety linked to a lipid carrier onto a protein acceptor. This reaction is catalysed by an oligosaccharidyltransferase and occurs in the endoplasmic reticulum membrane system. It involves the kinetic adjustment of two metabolic pathways: synthesis of the glycan moiety afforded by the lipid donor ( $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -PP-Dolichol) and protein acceptor biosynthesis. In addition to the major pathway of glycoprotein biosynthesis ( $\text{Glc}_{1-3}\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Man}_{3-9}\text{GlcNAc}_2$ ), the existence of an alternative pathway adding three species ( $\text{Glc}_{1-3}\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ ) has been demonstrated. This alternative pathway has been observed in cells deficient in the synthesis of Man-P-Dol, such as  $\text{Thy}^{-1}$  [1] or, in our case, B3F7 cells [2, 3]. There remains the problem of the rapid discrimination between glucosylated oligomannosides and non-glucosylated ones possessing the same number of sugar residues; for example,  $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  and  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ . Amino bonded phase chromatography of oligomannose type oligosaccharides [4] does not allow clear identification of glycan moieties from the alternative pathway. Identification of these glycan moieties involves either the structural deter-

mination or the use of endo N-acetylglucosaminidase H for releasing N-glycans from protein, since  $\text{Glc}_{1-3}\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  is endo H resistant in contrast to  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$  [5].

Pellicular anion exchange chromatography is becoming increasingly popular in the field of glycan analysis [6-8]. This powerful tool of investigation may be useful for monitoring metabolic events, as for example, the stepwise formation of mannose type oligosaccharides of the dolichol pathway. In this report, using pellicular anion exchange chromatography, we show that the chromatographic behaviour of glucosylated oligomannosides allows their rapid discrimination from non-glucosylated ones possessing the same number of sugar residues. Thus, a one-step chromatography demonstrates the presence or the absence of an alternative pathway in the cell line under study.

### Materials and methods

#### Cells, cell culture and metabolic labelling

Chinese hamster ovary cells (wild type cells) and a mutant cell line (B3F7) were routinely cultured in monolayer in alpha minimum essential medium (MEM) with 10% fetal calf serum (Gibco laboratories, Grand Island, NY, USA) at

\* To whom correspondence should be addressed.

34 °C using 10 cm culture dishes under 5% CO<sub>2</sub>. The mutant cell line was a gift from Dr Sharon S. Krag (Johns Hopkins University, Baltimore, USA); these B3F7 cells are deficient in mannosyl pyrophosphodolichol synthase and they use an alternative glycosylation pathway involving a smaller mannosyl core residue with only five mannoses [2, 3]. This allows the preparation of alternative pathway standards.

Madin Darby bovine kidney (MDBK) cells were cultured in monolayer in alpha minimum essential medium with 10% fetal horse serum (Gibco laboratories, Grand Island, NY, USA) at 34 °C using 10 cm culture dishes under 5% CO<sub>2</sub>. MDBK and wild type CHO cells possess the mannosyl pyrophosphodolichol synthase activity allowing the synthesis of Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> derivatives.

Cells were labelled 3 days after subculture (90% of confluency: 5–7 × 10<sup>6</sup> cells per dish) with 200 μCi [2-<sup>3</sup>H] mannose (429 GBq mmol<sup>-1</sup>) from Amersham International (Bucks, UK), 50 μCi ml<sup>-1</sup> in alpha MEM containing 0.5 mM glucose and 10% dialysed fetal calf serum. Incubations were performed at 34 °C for the wild type CHO and MDBK cells and at 39 °C for the mutant B3F7 cells [9] in the presence of processing inhibitors. Castanospermine and 1-deoxymannojirimycin (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) were added 30 min before labelling and were present throughout the incubation period at a final concentration of 50 and 100 μg ml<sup>-1</sup> for castanospermine and 1-deoxymannojirimycin, respectively. After 1 h, the incubation medium was removed and the cell layer washed with ice-cold phosphate buffer saline. The sequential extraction was then achieved as previously described [9].

#### Preparation of the oligosaccharide standards

Radioactive standards were prepared after metabolic labelling of cells from lipid intermediates for non-glycosylated oligosaccharides and from glycoproteins for glycosylated oligosaccharides [9]. Wild type or mutant CHO cells and MDBK cells (5–7 × 10<sup>6</sup> cells per dish) were pulsed for 10 min with 200 μCi [2-<sup>3</sup>H] mannose in the presence of 50 μg ml<sup>-1</sup> castanospermine and 100 μg ml<sup>-1</sup> 1-deoxymannojirimycin to avoid any processing.

After the extraction procedure, lipid donors were submitted to a mild acid hydrolysis by 0.1 N HCl in tetrahydrofuran for 2 h at 50 °C.

Glycoproteins obtained after sequential lipid extraction were digested overnight at room temperature with 0.3 mg of TPCK-treated trypsin (Sigma, St Louis, MO, USA), in 0.1 M ammonium bicarbonate pH 7.9 in a final volume of 0.3 ml. The glycan moiety linked to protein was cleaved by peptide N glycosidase F (Boehringer Mannheim, Germany) 0.5 U for an overnight incubation in 20 mM sodium phosphate pH 7.5, 50 mM EDTA, 50% glycerol, 0.02% sodium azide. The released oligosaccharide standards possess two *N*-acetylglucosamine residues at the reducing end.

Oligosaccharide moieties obtained from lipid inter-

mediates or glycoproteins were desalted on a Bio-Gel P-2 column using 0.1 M acetic acid as solvent before HPLC analysis.

#### HPLC analysis

The amino derivatized column: Supelcosil LC-NH<sub>2</sub>, 5 μm, was purchased from Supelco (Bellefonte, PA, USA). The gradient was acetonitrile:water from 70:30 to 50:50 at 1 ml min<sup>-1</sup> for 80 min.

The HPLC system used for high pII separations consisted of a Dionex Bio-LC gradient pump and a CarboPac PA-100 column (4.6 × 250 mm). Elutions were carried out in 100 mM sodium hydroxide under gradient conditions using from 0 to 100 mM sodium acetate over 100 min at a flow rate of 1 ml min<sup>-1</sup>. As the radiolabelling detection is about a hundred-fold more sensitive than the pulsed amperometric detection and, as we were interested in studying newly synthesized glycoproteins, detection has been achieved by in-line radioactivity detection rather than by pulsed amperometric detection. The detection of the radioactivity was followed with a continuous Flo-one beta detector (Flotec, France) using Luma flow II (Lumac, Netherlands) as the scintillation liquid with a ratio of scintillation liquid versus HPLC flow of 2:1.

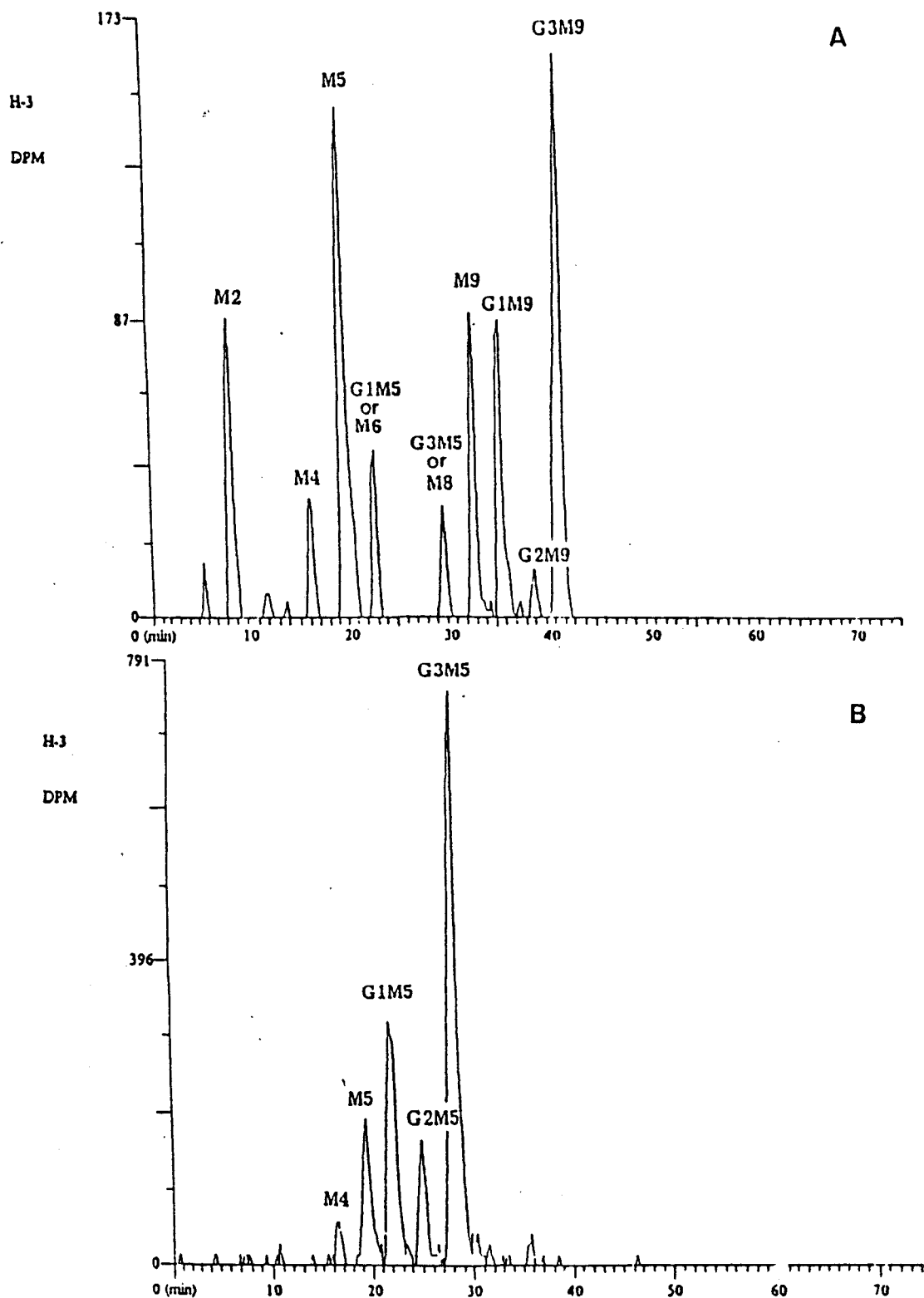
#### Results

Figure 1 shows HPLC analysis of glycan moieties released by PNGase F digestion of short-time pulsed glycoproteins from wild type and mutant CHO cell lines. The separation obtained on an amino bonded column relied on the number of sugar residues rather than on a structural basis. Indeed, the identification of glycan moieties from wild type cell glycoproteins (panel a) is undetermined between Glc<sub>1</sub>Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> and Man<sub>6</sub>GlcNAc<sub>2</sub> as well as between Glc<sub>3</sub>Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> and Man<sub>6</sub>GlcNAc<sub>2</sub>. Incubation of wild type CHO cells has been achieved at low glucose concentration (0.5 mM). In glucose depleted culture conditions, the alternative *N*-glycosylation pathway was also observed smaller oligosaccharides are transferred to protein acceptors and the cells are viable [10, 11]. Thus, we checked whether wild type cells (CHO and MDBK) use the alternative pathway in the presence of 0.5 mM glucose.

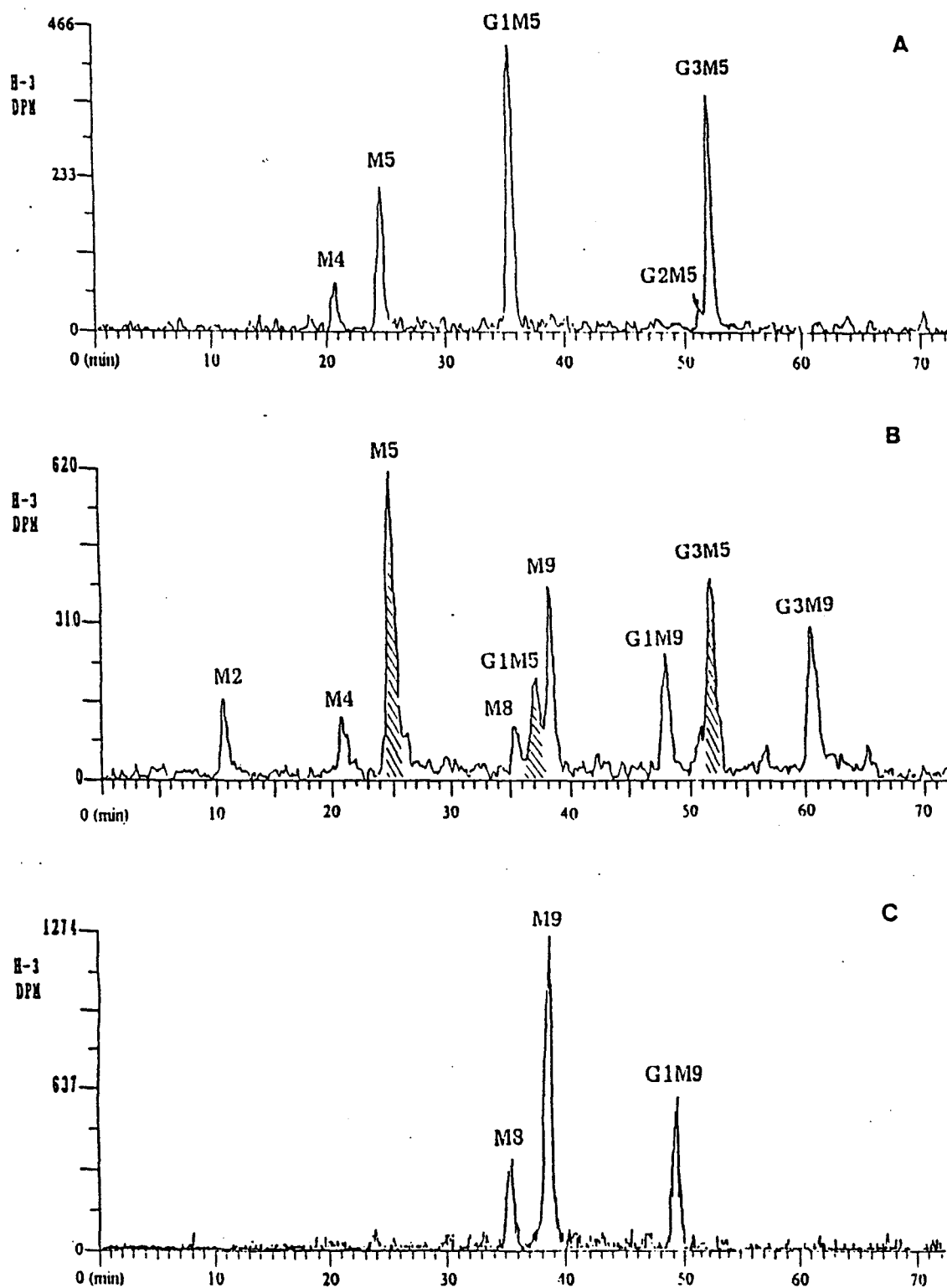
The oligosaccharide material obtained by metabolic labelling of wild and mutant CHO cells and of MDBK cells was analysed in HPAEC. As shown in Fig. 2a, the HPAEC analysis of glycan moieties from B3F7 glycoproteins reveals structures which correspond respectively to Man<sub>4</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, Glc<sub>1</sub>Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, Glc<sub>2</sub>Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> and Glc<sub>3</sub>Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>. In contrast to the amino bonded column for which the separation is based on the number of sugar residues (Fig. 1), in HPAEC, glycosylation affects the retention time of oligomannosides suggesting a possible resolution of glycosylated oligomannosides from non-glycosylated ones.



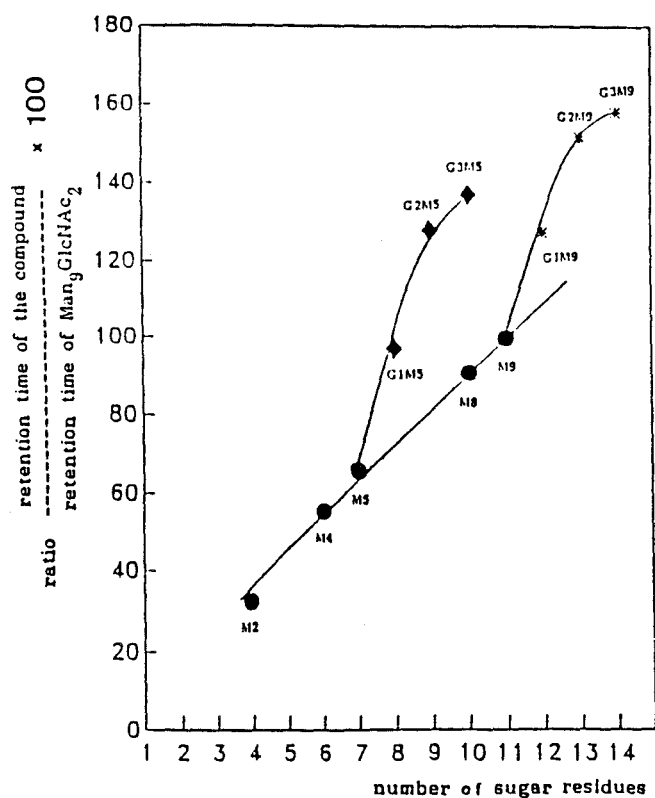
## Detection of the alternative N-glycosylation pathway



**Figure 1.** Amino bonded chromatography of glycan moieties from newly synthesized glycoproteins from CHO cell lines. Cells were incubated with  $[2\text{-}^3\text{H}]$  mannose in the presence of 0.5 mM glucose and processing inhibitors (castanospermine  $50\ \mu\text{g ml}^{-1}$  and 1-deoxymannojirimycin  $100\ \mu\text{g ml}^{-1}$ ). Glycoproteins from wild type (panel A) and mutant B3F7 (panel B) cell lines were digested with PNGase F and glycans were analysed by amino bonded phase chromatography using a continuous detection of the radioactivity as described in the Materials and methods section. See abbreviations for details of  $M_2$ ,  $M_4$ ,  $M_5$ ,  $M_6$ ,  $M_8$ ,  $M_9$ ,  $G_1M_5$ ,  $G_2M_5$ ,  $G_3M_5$ ,  $G_1M_9$ ,  $G_2M_9$  and  $G_3M_9$ .



**Figure 2.** HPAEC of glycans from newly synthesized glycoproteins from CHO and MDBK cell lines. Cells were incubated with  $[2\text{-}^3\text{H}]$  mannose in the presence of 0.5 mM glucose and processing inhibitors (castanospermine  $50\ \mu\text{g ml}^{-1}$  and 1-deoxymannojirimycin  $100\ \mu\text{g ml}^{-1}$ ). Glycoproteins were extracted and digested by PNGase F. HPAEC analysis and detection mode of the radioactivity were as described in the Materials and methods section. *Panel A:* Mutant B3F7 cells. *Panel B:* Wild type CHO cells. Peaks from the alternative pathway of *N*-glycosylation are represented as hatched area. *panel C:* MDBK cells. See Abbreviations for details of  $M_2$ ,  $M_4$ ,  $M_5$ ,  $M_8$ ,  $M_9$ ,  $G_1$ -,  $G_2$ - and  $G_3M_5$ ,  $G_1$ -,  $G_2$ - and  $G_3M_9$ .



**Figure 3.** Influence of glucose residues on high mannose oligosaccharides retention time using HPAEC. The diagram represents data from the library constituted by glycan moieties from mutant and wild type cells. The plot is the ratio of retention time of high oligo mannose oligosaccharide ( $\times 100$ ) ( $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  taken as a reference) versus the number of sugar residues. (●)  $\text{M}_2$ ,  $\text{M}_4$ ,  $\text{M}_5$  are produced from oligosaccharides isolated from lipid intermediates and  $\text{M}_8$ ,  $\text{M}_9$  are derived from wild type CHO glycoproteins. (◆)  $\text{G}_{1-3}\text{M}_5$  are derived from B3F7 glycoproteins. (☆)  $\text{G}_{1-3}\text{M}_9$  are derived from wild type CHO glycoproteins. See Abbreviations for details of  $\text{M}_2$ ,  $\text{M}_4$ ,  $\text{M}_5$ ,  $\text{M}_6$ ,  $\text{M}_8$ ,  $\text{M}_9$ ,  $\text{G}_1\text{M}_5$ ,  $\text{G}_3\text{M}_5$ ,  $\text{G}_1\text{M}_9$ ,  $\text{G}_2\text{M}_9$  and  $\text{G}_3\text{M}_9$ .

Figure 2b shows an analysis of wild type CHO cell glycoproteins obtained after metabolic labelling at low glucose concentration. We observed the alternative way of glycosylation together with the major one. HPAEC allows the discrimination of the alternative pathway derivatives from  $\text{Man}_5$ - to  $\text{Glc}_{1-3}\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  among the major derivatives from  $\text{Man}_9$ - to  $\text{Glc}_{1-3}\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ . This indicates that donor oligosaccharides from the two pathways can be simultaneously transferred to cellular proteins. Thus, the composition of glycans of glycoproteins obtained after incubation at low glucose concentration has to be checked since it depends on culture conditions and also on cell type. For example, Fig. 2c shows an analysis obtained with MDBK cells glycoproteins when incubated with [ $2\text{-}^3\text{H}$ ] mannose in the presence of 0.5 mM glucose and processing inhibitors as described in the Materials and methods section. With MDBK cells, no derivatives from the

alternative pathway of *N*-glycosylation were obtained:  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$  instead of  $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  is recovered on glycoproteins.

Figure 3 shows the chromatographic behaviour of glycan moieties of lipid intermediates and glycoproteins from mutant and wild type cells. This gives data showing the influence of glucose residues on oligomannose oligosaccharide retention times. The two curves distinguish clearly the two metabolic pathways: the  $\text{Glc}_{1-3}\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  series which parallels the  $\text{Glc}_{1-3}\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  series. The glucosylation of the  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  and  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  compounds induces a well-defined shift of the retention times.

## Discussion

The main feature of the mapping method proposed here is the clear separation of the oligomannosides involved in the dolichol pathway in one single chromatographic run. This allows method of quantifying clearly any one of more than fifteen compounds from the glycosylation pathway.

The alternate *N*-glycosylation pathway was observed as the only way of *N*-glycosylation for cells such as  $\text{Thy}^{-1}$  or B3F7 which are deficient in  $\text{Man-P-Dol}$  synthase [1, 9]. This alternative pathway has been described in CHO cells lines when incubated in energy deprivation conditions such as low glucose concentration [10, 11]. The identification of  $\text{Glc}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  to  $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  in wild type CHO cells using amino bonded phase chromatography requires the action of endo *N*-acetylglucosaminidase H to be differentiated from  $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$  to  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ . HPAEC allowed us to demonstrate the presence of such a pathway in wild type CHO cells with only one run.

It is interesting to note that glycosylation affects the retention times of both  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  and  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  compounds. It has been reported that the three glucose residues bound to oligosaccharide lipids could modulate the activity of the oligosaccharidyltransferase [12]. In addition, it has been observed that the removal of the two external glucose residues by glucosidases I and II is easier than that of the internal glucose residue although it requires the action of the same glucosidase II. This difference could be due to a change in the conformation. It has been reported that the two glucose residues added to  $\text{Glc}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  lead to the  $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  structure which adopts an helical configuration [13] which could modify the glucosidase action. This conformational change induced by glycosylation could involve a stronger interaction with the pellicular exchange resin. This indicates that, in contrast to amino bonded chromatography, conformational changes can be detected by HPAEC.

Moreover, this chromatography may be useful to check a mutant reversion or any change in cell differentiation, especially for cell batch and continuous large scale production. Using this potential, it is possible to study the

metabolism of the cell during kinetic or pulse-chase experiments in different culture conditions, as is required for monitoring the glycosylation of recombinant glycoproteins.

#### Acknowledgements

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (U.M.R. no. 111, director, Professor A. Verbert), by the Ministère de l'Education Nationale, by the Université des Sciences et Technologies de Lille and by an E.E.C. grant no. BIOT-CT 92-0304 (Bridge contract on 'Control of recombinant protein glycosylation under defined conditions'). The authors are indebted to A. M. Mir and O. Labiau for cell cultures.

#### References

1. Chapman A, Fujimoto K, Kornfeld S (1980) *J Biol Chem* **255**:4441-46.
2. Stoll J, Krag SS (1983) *J Cell Biol* **97**:443a.
3. Stoll J (1986) PhD Thesis. School of Hygiene and Public Health, The Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland, USA.
4. Turco SJ (1981) *Anal Biochem* **118**:278-83.
5. Turco SJ, Stetson B, Robbins PW (1977) *Proc Natl Acad Sci USA* **74**:4411-14.
6. Hernandez LM, Ballou L, Ballou CE (1990) *Carbohydr Res* **203**:1-11.
7. Hermentin P, Witzel R, Vliegenthart JFG, Kamerling JP, Nimtz M, Conradt HS (1991) *Anal Biochem* **203**:281-89.
8. Nimtz M, Martin W, Wray V, Kloppel KD, Augustin J, Conradt HS (1993) *Eur J Biochem* **213**:39-56.
9. Cacan R, Villers C, Bélard M, Kaiden A, Krag S, Verbert A (1992) *Glycobiology* **2**:127-36.
10. Rearick JJ, Chapman A, Kornfeld S (1981) *J Biol Chem* **256**:6255-61.
11. Chapman AE, Cathoun JC (1988) *Arch Bioch Biophys* **260**:320-33.
12. Maley F, Trimble RB, Tarentino AL, Plummer TS, Jr (1989) *Anal Biochem* **180**:195-204.
13. Alvarado E, Nukada T, Ogawa T, Ballou CE (1991) *Biochemistry* **30**:881-86.

## **CONCLUSIONS GENERALES**

Lors du processus de N-glycosylation, on observe la libération de matériel oligosaccharidique soluble. Nous nous sommes attachés dans un premier temps, à caractériser ce matériel oligosaccharidique dans des cellules CHO (lignée B3F7) déficientes en Man-P-Dol synthétase et caractérisées par une libération importante de ce matériel soluble.

Le matériel oligosaccharidique est hétérogène, comportant des oligosaccharides phosphorylés et neutres.

\* Les oligosaccharides phosphorylés sont constituées, quelles que soient les conditions d'incubation, de Man<sub>2</sub>-P et de Man<sub>3</sub>-P. Ils dérivent vraisemblablement d'un "by-pass" du cycle des dolichols visant à régénérer rapidement le P-dolichol.

\* Les oligosaccharides neutres sont, eux, glucosylés et possèdent, selon les conditions d'incubation de 1 à 3 résidus de glucose. Leur extrémité réductrice à une (OS-Gn1) ou deux (OS-Gn2) N-acétylglucosamine(s) augmente encore la diversité de ce matériel.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes attachés à déterminer l'origine du matériel oligosaccharidique neutre.

Nous avons montré que les oligosaccharides à deux N-acétylglucosamines proviennent des intermédiaires lipidiques donneurs grâce à une action hydrolytique de l'oligosaccharidyltransférase. Cette activité endoglycosidasique est en compétition avec l'activité de transfert.

Par contre, certains arguments indiquent que les oligosaccharides à une N-acétylglucosamine dérivent de la dégradation des néoglycoprotéines selon les arguments suivants:

- Leur disparition lors de l'inhibition de la synthèse protéique (par utilisation de cycloheximide ou mise en suspension des cellules)

- De plus, l'analyse de ces OS-Gn1 reflète celle des populations glycaniques liées aux protéines quelque soient les conditions d'incubation.

Dans un troisième temps, nous avons précisé les caractéristiques cellulaires du mécanisme de dégradation des néoglycoprotéines à l'origine des OS-Gn1.

Ces caractéristiques sont les suivantes :

- il s'agit d'une dégradation non lysosomique.
- la dégradation présente une phase de latence reflétant vraisemblablement le temps nécessaire pour atteindre un compartiment subcellulaire spécifique.

- de plus, cette dégradation subsiste en absence de transport vésiculaire. Des cellules perméabilisées ou traitées à la Bréfeldine A ne réalisent plus aucun trafic intracellulaire. Cependant, des OS-Gn1 sont formés dans ces conditions et permettent de corréler la dégradation des glycoprotéines et la libération des OS-Gn1.

- De façon contradictoire, l'inhibition du transport vésiculaire lors d'incubation à 16°C, supprime la dégradation des néoglycoprotéines ainsi que la formation des OS-Gn1.

Bien que nous n'ayons pas caractérisé plus avant le compartiment subcellulaire, notre hypothèse est que les caractéristiques de cette dégradation se rapprochent de celles d'un compartiment intermédiaire entre le RER et l'appareil de Golgi, compartiment appelé par certains auteurs ERGIC. Ces caractéristiques observées pour les cellules mutantes ont été retrouvées avec la lignée CHO sauvage.

Dans le cadre de notre travail, nous avons mis au point une méthode rapide de séparation des glycanes de type oligomannosidique utilisant l'HPAEC (High pH Anion Exchange Chromatography). Cette technique nous a permis de mettre en évidence dans les cellules CHO sauvages l'utilisation de la voie alterne de N-glycosylation qui s'exprime en même temps que la voie majeure.

# **BIBLIOGRAPHIE**



## A

**Abeijon, C. et Hirschberg, C.B. (1992)** "Topography of glycosylation reactions in the ER."  
Trends in Biochem. Sci. 17, 32-36.

**Adair, W.L. et Keller, R.K. (1982)** "Dolichol metabolism in Rat Liver : determination of the subcellular distribution of dolichyl phosphate and its site and rate *de novo* biosynthesis."  
J. Biol. Chem. 257, 8990-8996.

**Ahnert-Hilger, G., Mach, W., Förh, K.J. et Gratzi, M. (1989)** "Poration by  $\alpha$ -toxin and streptolysine O : an approach to analyse intracellular processes."  
Methods in Cell Biol. 31, 63-90.

**Amara, J.F., Lederkremer, G. et Lodish, H.F. (1989)** "Intracellular degradation of unassembled asialo glycoprotein receptor subunits : a pregolgi non lysosomic endoproteolytic cleavage."  
J. Cell. Biol. 109, 3315-3324.

**Anumula, R.K. et Spiro, R.G. (1983)** "Release of glucose containing polymannose oligosaccharides during glycoprotein biosynthesis."  
J. Biol. Chem. 258, 15274-15282.

**Aubert, J.P., Biserte, G. et Loucheux-Lefebvre, M.H. (1976)** "Carbohydrate-peptide linkage in glycoproteins."  
Arch. Biochem. Biophys. 175, 410-418.

## B

**Bahram, S. (1993)** "Transporteurs de peptides et présentation de l'antigène."  
Médecines et Sciences 9, 1204-1213.

**Banerjee,, D.K., Kouslevari, E.E. et Baum, B.J. (1987)** "cAMP-mediated protein phosphorylation of microsomal membranes increases mannosylphosphodolichol synthase activity."  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 6389-6393.

**Beckers, C.J., Keller, D.S. et Balch, W.E. (1987)** "Semi-intact cells permeable to macromolecules : use in reconstitution of protein transport from the Endoplasmic reticulum to the Golgi complex."  
Cell 50, 523-534.

**Bélard, M., Cacan, R. et Verbert, A. (1988)** "Characterization of an oligosaccharide-pyrophosphodolichol pyrophosphatase activity in yeast."  
Biochem. J. 255, 235-242.

**Ben-Zeev, O., Doolittle, M.H., Davis, R.C., Elovson, J. et Schotz, M.C. (1992)** "Maturation of lipoprotein lipase : expression of full activity requires glucose trimming but not translocation to the cis Golgi compartment."

J. Biol. Chem. 267, 6219-6227.

Beynon, R.J. et Bond, J.S. (1989) "Proteolytic enzymes, a practical approach." Practical approach series-Rickwood, D. et Hames, B.D.-IRL Press.

Bonatti, S., Migliaccio, G. et Simons, K. (1989) "Palmitoylation of viral membrane glycoproteins takes place after exit from the ER."  
J. Biol. Chem. 264, 12590-12595.

Bonifacino, J.S., Suzuki, C.K., Lippincott-Schwartz, J., Weissman, A.M. et Klausner, R.D. (1989) "Pre Golgi degradation of newly synthesized T-cell Antigen Receptor chains : intrinsic sensitivity and the role of subunit assembly."  
J. Cell. Biol. 109, 73-83.

Bonifacino, J.S., Suzuki, C.K. et Klausner, R.D. (1990) "A peptide sequence confers retention and rapid degradation in the ER."  
Science 247, 79-82.

Bonifacino, J.S. et Lippincott-Schwartz, J. (1991) "Degradation of proteins within the ER."  
Curr. Opin. Cell Biol., 3, 592-600.

Brassart, D., Baussant, T., Wieruszeski, J-M., Strecker, G., Montreuil, J. et Michalski, J-C. (1987) "Catabolism of N-glycosylprotein glycans : evidence for a degradation pathway of sialylglyco-asparagines resulting from the combined action of lysosomal aspartylglucosaminidase and endo-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase."  
Eur. J. Biochem. 169, 131-136.

Burgoyne, R.D. (1992) "Trimeric G proteins in Golgi transport."  
Trends in Biochem. Sci. 17, 87-88.

### C

Cacan, R., Hoflack, B. et Verbert, A. (1980) "Fate of oligosaccharide-lipid intermediates synthesized by resting rat-spleen lymphocytes."  
Eur. J. Biochem. 105, 473-479.

Cacan, R., Cecchelli, R. et Verbert, A. (1987) "Catabolic pathway of oligosaccharide-diphospho-dolichol : study of the fate of the oligosaccharidic moiety in mouse splenocytes."  
Eur. J. Biochem. 166, 469-474.

Cacan, R., Lepers, A., B elard, M. et Verbert, A. (1989) "Catabolic pathway of oligosaccharide-diphospho-dolichol : subcellular sites of the degradation of the oligomannoside moiety."  
Eur. J. Biochem. 185, 173-179.

Carroll, R., Ben-Zeev, O., Doolittle, M.H. et Severson, D.L. (1992) "Activation of lipoprotein lipase in cardiac myocytes

by glycosylation requires trimming of glucose residues in the ER."

Biochem. J. 285, 693-696.

Cechelli, R., Cacan, R., Hoflack, B. et Verbert, A. (1983) "Glycosylation of proteins from sugar nucleotide by whole cells."

Biochem. J. 216, 681-686.

Chapman, A.E. et Calhoun, J.C. (1988) "Effects of glucose starvation and puromycin treatment on lipid-linked oligosaccharide precursors and biosynthetic enzymes in Chinese Hamster Ovary cells *in vivo* and *in vitro*."

Arch. Bioch. Biophys. 260, 320-333.

Chawla, D. et Hughes, R.C. (1991) "Effects of Brefeldine A on oligosaccharide processing."

Biochem. J. 279, 159-165.

Ciccarelli, E., Alonso, M.A., Cresteil, D., Bollen, A., Jacobs, P. et Alvarez, F. (1993) "Intracellular retention and degradation of human mutant variant of a  $\alpha$ -1-antitrypsin in stably transfected Chinese Hamster Ovary cell lines."

Eur. J. Biochem. 213, 271-276.

Clairmont, C.A., De Maio, A. et Hirschberg, C.B. (1992) "Translocation of ATP into the lumen of RER-derived vesicles and its binding to luminal proteins including Bip (grp 78) and Grp94."

J. Biol. Chem. 267, 3983-3990.

Colley, K.J., Lee, E.U. et Paulson, J.C. (1992) "The signal anchor and stem regions of the  $\beta$ -galactoside  $\alpha$ 2-6 sialyltransferase may each act to localize the enzyme to the Golgi apparatus."

J. Biol. Chem. 267, 7784-7793.

Cosson, P., Lankford, S.P., Bonifacino, J.S. et Klausner, R. (1991) "Membrane protein association by potential intramembrane charge pairs."

Nature 351, 414-416.

Cotner, T. (1992) "Unassembled HLA-DR  $\beta$  monomers are degraded rapidly by a non lysosomal mechanism."

J. Immunol. 148, 2163-2168.

#### D

De Gasperi, R., Li, Y.T. et Li, S.C. (1989) "Presence of two endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidases in Human kidney."

J. Biol. Chem. 264, 9329-9334.

Delahunty, M.D., Stafford, F.J., Yuan, L.C., Shaz, D. et Bonifacino, J.S. (1993) "Uncleaved signals for GPI anchoring cause retention of precursor protein in the ER."

J. Biol. Chem. 268, 12017-12027.

Dengremont, C. (1993) "Rôle de la chitobiase lysosomique dans

la dégradation des N-glycosylprotéines." Diplôme d'Etudes Approfondies.

Doms, R.W., Russ, G. et Yewdell, J.W. (1989) "Brefeldine A redistributes resident and itinerant Golgi proteins to ER." J. Cell. Biol. 109, 61-72.

Donaldson, J.S. Lippincott-Schwartz, J. et Klausner, R.D. (1991) "Guanine nucleotide modulate the effects of Brefeldine A in semi-permeable cells : regulation of the association of a 110 kDa peripheral membrane protein with the Golgi apparatus." J. Cell Biol. 112, 579-588.

Duden, R., Allan, V. et Kreis, T. (1991) "Involvement of  $\beta$ -COP in membrane traffic through the Golgi complex." Trends in Cell Biol. 1, 14-19.

Dunn, W.A. (1990) "Studies on the mechanisms of autophagy : maturation of the autophagic vacuole." J. Cell. Biol. 110, 1935-1945.

## E

Elbein, A.D. (1988) "Glycoprotein processing and glycoprotein processing inhibitors." Plant Physiol. 87, 291-295.

Eliasson, E., Mkrtchian, S. et Sundberg, M.I. (1992) "Hormone and substrate regulated intracellular degradation of cytochrome P450 (2E1) involved Mg-ATP activated rapid proteolysis in the ER membranes." J. Biol. Chem. 267, 15765-15769.

## F

Furukawa, S., Sakata, N., Ginsberg, H.N. et Dixon, J.L. (1992) "Studies of the sites of intracellular degradation of apolipoprotein B in Hep G2 cells." J. Biol. Chem. 267 22630-22638.

## G

Gabathuler, R. et Kvist, S. (1990) "The endoplasmic reticulum retention signal of the E3/19K protein of adenovirus type 2 consists of three separate amino acid segments at the carboxyl-terminus." J. Cell Biol. 111, 1803-1810.

Ganan, S., Cazzulo, J.J. et Parodi, A.J (1991) "A major proportion of N-glycoproteins are transiently glucosylated in the Endoplasmic Reticulum." Biochem. 30, 3099-3104.

Geetha-Habib, M., Noiva, R., Kaplan, H.A. et Lennarz, W.J. (1988) "Glycosylation site binding protein, a component of oligosaccharidyltransferase, is highly similar to three other 57 kD luminal proteins of the ER."

Cell 54, 1053-1060.

Gething, M.J. et Sambrook, J. (1992) "Protein folding in the cell."  
Nature 355, 33-45.

Goud, B. et Mc Caffrey, M. (1991) "Small GTP binding proteins and their role in transport."  
Current Opinion in Cell Biology 3, 626-633.

Grabenhorst, E., Hofer, B., Nimitz, M., Jäger, V. et Conradt, H.S. (1993) "Biosynthesis and secretion of human interleukin 2 glycoprotein variants from baculovirus-infected Sf21 cells."  
Eur. J. Biochem. 215, 189-197.

Gruenberg, J. et Clague, M.J. (1992) "Regulation of intracellular membrane transport."  
Current Opinion in Cell Biology 4, 593-599.

Gruenberg, J. (1993) "Mécanismes de la régulation du trafic membranaire."  
Médecines et Sciences 9, 141-147.

#### H

Hannover, J.A. et Lennarz, W.J. (1982) "Transmembrane assembly of N-linked glycoproteins. Studies on the topology of saccharide-lipid synthesis."  
J. Biol. Chem. 257, 2787-2794.

Harding, C.V. et Geuze, H.J. (1993) "Antigen processing and intracellular traffic of antigens and MHC molecules."  
Current Opinion in Cell Biology 5, 596-605.

Hart, G.W., Brew, K., Grant, G.A., Bradshaw, R.A. et Lennarz, W.J. (1979) "Primary structural requirements for the enzymatic formation of the N-glycosyl bond in glycoproteins."  
J. Biol. Chem. 254, 9747-9753.

Haselbeck, A. et Tanner, W. (1982) "Dolichyl phosphate-mediated mannosyl transfer through liposomal membranes."  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 1520-1524.

Hauri, H-P. et Schweizer, A. (1992) "The endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment."  
Current Opinion in Cell Biology 4, 600-608.

Hemming, F.W. (1982) "Control and manipulation of the phosphodolichol pathway of protein N-glycosylation."  
Bioscience reports 2, 203-221.

Hondermarck, H., Sy, J., Bradshaw, R.A. et Arfin, S.M. (1992) "Dipeptide inhibitors of ubiquitin-mediated protein turnover prevent growth factor-induced neurite outgrowth in Rat pheochromocytoma PC12 cells."  
Biochem. Biophys. Res. Com. 189, 280-288.

Houri, J.J., Ogier-Denis, E., Bauvy, C., Aubery, M., Sapin,

C., Trugnan, G. et Codogno, P. (1992) "Swainsonine is a useful tool to monitor the intracellular traffic of N-linked glycoprotein as a function of the state of enterocytic differentiation of HT29 cells."  
Eur. J. Biochem. 205, 1169-1174.

Hsu, A.F., Baynes, J.W. et Heath, E.C. (1974) "The role of a dolichol-oligosaccharide as an intermediate in glycoprotein biosynthesis."  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 2390-2395.

Hughes, C. (June 28 to 30 1990) "Processing et re-processing of asparagine-linked oligosaccharides." in Protein Glycosylation : cellular, biotechnological and analytical aspects. Contributions to the International Workshop on Protein glycosylation, Braunschweig, Germany.

Humphrey, J.S., Peters, P.J., Yuan, L.C. et Bonifacino, J.S. (1993) "Localization of the TGN38 to the trans Golgi Network : involvement of a cytoplasmic tyrosine-containing sequence."  
J. Cell Biol. 120, 1123-1135.

Huovila, A-P.J., Eder, A.M. et Fuller, S.D. (1992) "Hepatitis B surface Antigen assembles in a post-ER, pre-Golgi compartment."  
J. Cell Biol. 118, 1305-1320

## I

Inoue, S., Iwasaki, M., Seko, A., Kitajima, K. et Inoue, Y. (1993) "Identification and developmentally regulated expression of acid and alkaline peptide-N<sub>4</sub> (N-acetyl- $\beta$ -glucosaminyl) asparagine amidases (PNGase) in *Oryzias latipes* embryos : the first demonstration of the occurrence of an enzyme responsible for de-N-glycosylation in animal origin."  
Glycoconjugates J. 10, abstracts of the 12<sup>th</sup> International Symposium on Glycoconjugates.

Ito, K., Okada, Y., Ishida, K. et Minamiura, N. (1993) "Human salivary endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase HS specific for complex type sugar chains of glycoproteins."  
J. Biol. Chem. 268, 16074-16081.

## K

Kaartinen, V., Mononen, T., Laatikainen, R. et Mononen, I. (1992) "Substrate specificity and reaction mechanism of Human glycoasparaginase."  
J. Biol. Chem. 267, 6855-6858.

Kaushal, G.P. et Elbein, A.D. (1993) "The use of glycoprotein processing inhibitors to distinguish various mannosidases."  
Trends in Glycoscience and Glycotechnology 5, 209-218.

Kean, E.L. (1991) "Topographical orientation in microsomal vesicles of the N-acetyl glucosaminyl transferase which catalyses the biosynthesis of N-acetyl glucosaminyl pyrophosphoryl dolichol and N-acetyl glucosaminyl-N-acetyl

glucosaminyl dolichol."  
J. Biol. Chem. 266, 942-946.

Kelleher, D.J., Kreibich, G. et Gilmore, R. (1992)  
 "Oligosaccharidyltransferase activity is associated with a  
 protein complex composed of ribophorins I and II and a 48 kD  
 protein."  
Cell 69, 55-65.

Klausner, R.D. et Sitia, R. (1990) "Protein degradation in the  
 endoplasmic reticulum."  
Cell 62, 610-614.

Kreis, T.E. (1992) "Regulation of vesicular and tubular  
 membrane traffic of the Golgi complex by coat proteins."  
Current Opinion in Cell Biology 4, 609-615.

## J

Jackson, M.R., Nilsson, T. et Peterson, P.A. (1990) "Retrieval  
 of transmembrane proteins to the endoplasmic reticulum."  
J. Cell Biol. 121, 317-333.

## L

Lankford, S.P., Cosson, P., Bonifacino, J.S. et Klausner, R.D.  
 (1993) "Transmembrane domain length affects charge-mediated  
 retention and degradation of proteins within the Endoplasmic  
 Reticulum."  
J. Biol. Chem. 268, 4814-4820.

Lederkremer, G.Z. et Lodish, H.F. (1991) "An alternative  
 spliced minixon alters the subcellular fate of the Human  
 asialoglycoprotein receptor H2 subunit. Endoplasmic reticulum  
 retention and degradation or cell surface expression."  
J. Biol. Chem. 266, 1237-1244.

Lerhman, M.A. (1991) "Biosynthesis of N-acetylglucosamine-PP-  
 dolichol, the committed step of asparagine linked  
 oligosaccharide assembly."  
Glycobiology 1, 553-562.

Lippincott-Schwartz, J., Bonifacino, J.S., Yuan, L.C. et  
 Klausner, R.D. (1988) "Degradation from endoplasmic reticulum  
 : disposing of newly synthesized proteins."  
Cell 54, 209-220.

Lippincott-Schwartz, J., Yuan, L., Tipper, C., Amherdt, M.,  
 Orci, L. et Klausner, R.D. (1991) "Frefeldine's effects on  
 endosomes, lysosomes and TGN suggest a general mechanism for  
 regulating organelle structure and membrane traffic."  
Cell 67, 601-616.

Loch, N., Tauber, R., Becker, A., Hartel-Schenk, S. et  
 Reutter, W. (1992) "Biosynthesis and metabolism of  
 dipeptidylpeptidase IV a primary cultured rat hepatocytes and  
 Morris hepatoma 7777 cells."  
Eur. J. Biochem. 210, 161-168.

**Lodish, H.F.** (1988) "Transport of secretory and membrane glycoproteins from ER to Golgi."  
J. Biol. Chem. 263, 2107-2110.

**Lubas, W.A. et Spiro, R.G** (1988) "Evaluation of the role of Rat liver Golgi endo- $\alpha$ -D-mannosidase in processing N-linked oligosaccharides."  
J. Biol. Chem. 263, 3990-3998.

## M

**Machamer, C.E** (1993) "Targeting and retention of Golgi membrane proteins."  
Current Opinion in Cell Biology 5, 606-612.

**Masuno, H., Blanchet-Machie, E.J., Schultz, C.J., Spaeth, A.E., Scow, R.O. et Okuda, H.** (1992) "Retention of glucose by N-linked oligosaccharides chains impedes expression of lipoprotein lipase activity : effects of castanospermine."  
J. Lipid Research 33, 1343-1349.

**Meigs, T.E. et Simoni, R.D.** (1992) "Regulated degradation of 3-HMG-CoA reductase in permeabilized cells."  
J. Biol. Chem. 267, 13547-13552.

**Méresse, S., Bauer, U., Ludwig, T., Mauxion, F., Schmidt, A. et Hoflack, B.** (1993) "Bases moléculaires du transport vers les lysosomes."  
Médecines et Sciences 9, 148-156.

**Montreuil, J.** (1984) "Spatial conformation of glycans and glycoproteins."  
Biol. Cell 51, 115-132.

**Munro, S.** (1991) "Sequences within and adjacent to the trans membrane segment of  $\alpha$ 2-6 sialyltransferase specify Golgi retention."  
EMBO J. 10, 3577-3588.

**Munro, S. et Pelham, H.R.B.** (1987) "C-terminal signal prevents the secretion of luminal ER proteins."  
Cell 48, 899-907.

**Murray, N. et McMichael, A.** (1992) "Antigen presentation in virus infection."  
Current Opinion in Immunology 4, 401-407.

## N

**Noda, T. et Farquhar, M.G.** (1992) "A non autophagic pathway for diversion of ER secretory proteins to lysosome."  
J. Cell. Biol. 119, 85-97.

**Nilsson, T., Lucocq, J.M., Mackay, D. et Warren, G.** (1991) "The membrane spanning domain of B1-4 galactosyltransferase specifies trans Golgi localization."  
EMBO J. 10, 1367-1375.



## O

Oliver, G.J.A., Harrison, J. et Hemming, F.W. (1975) "The mannosylation of dolichol-diphosphate-oligosaccharides in relation to the formation of oligosaccharides and glycoproteins in Pig liver endoplasmic reticulum." Eur. J. Biochem. 58, 223-229.

Ou, W-J., Cameron, P.H., Thomas, D.Y. et Bergeron, J.J.M. (1993) "Association of folding intermediates of glycoproteins with calnexin during protein maturation." Nature 364, 771-776.

Overdijk, B., Van der Kroef, W.M.J., Lisman, J.J.W., Pierce, R.J., Montreuil, J. et Spik, G. (1981) ". ." FEBS Lett. 128, 364-366.

## P

Pan, Y.T. et Elbein, A.D. (1990) "Control of N-linked oligosaccharide synthesis : cellular levels of dolichyl phosphate are not the only regulatory factor." Biochem. J. 29, 8077-8084.

Paulson, J.C. et Colley, K.J. (1989) "Glycosyltransferases : structure, localization and control of cell type-specific glycosylation." J. Biol. Chem. 264, 17615-17618.

Pelham, H.R.B. (1988) "Evidence that luminal ER proteins are sorted from secreted proteins in a post-ER compartment." EMBO J. 7, 913-918.

Pelham, H.R.B. (1991a) "Recycling of proteins between ER and Golgi complex." Current Opinion in Cell Biology 3, 585-591.

Pelham, H.R.B. (1991b) "Multiple targets for Brefeldine A." Cell 67, 449-451.

Pierce, R.J., Spik, G. et Montreuil, J. (1979) "Cytosolic location of an endo-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase activity in Rat liver and kidney." Biochem. J. 180, 673-676.

Pierce, R.J., Spik, G. et Montreuil, J. (1980) "Demonstration and cytosolic location of an endo-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase activity towards an asialo-N-acetyl lactosamine type substrate in Rat liver." Biochem. J. 185, 261-264.

Pless, D.D. et Lennarz, W.J. (1977) "Enzymatic conversion of proteins to glycoproteins." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 134-138.

## Q

Quaroni, A., Paul, E.C.A. et Nichols, B.L. (1993) "Intracellular degradation and reduced cell surface expression of sucrase isomaltase in heat-shocked Caco2 cells." Biochem. J. 292, 725-734.

## R

Richard, M., Tytgat, F. et Louisot, P. (1978) "Study of nuclear mannosyltransferase : lipids intermediates." Biochimie 60, 593-599.

Roitelman, J. et Simoni, R.D. (1992) "Distinct sterol and nonsterol signals for the regulated degradation of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reductase." J. Biol. Chem. 267, 25264-25273.

Römisch, K. et Schekman, R. (1992) "Distinct processes mediate glycoprotein and glycopeptide export from the ER in *Saccharomyces cerevisiae*." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 7227-7231.

Rosenwald, A.G., Stoll, J. et Krag, S.S. (1990) "Regulation of glycosylation : three enzymes compete for a common pool of dolichyl-phosphate *in vivo*." J. Biol. Chem. 265, 14544-14553.

Rothman, J.E. et Orci, L. (1992) "Molecular dissection of the secretory pathway." Nature 335, 409-415.

## S

Sampath, D., Varki, A. et Freeze, H.H. (1992) "The spectrum of incomplete N-linked oligosaccharides synthesized by endothelial cells in the presence of Brefeldine A." J. Biol. Chem. 267, 4440-4455.

Saraste, J. et Kuismanen, E. (1984) "Pre- and Post-Golgi vacuoles operate in the transport of Semliki Forest virus membrane glycoproteins to the cell surface." Cell 38, 535-549.

Saraste, J. et Svensson, K. (1991) "Distribution of the intermediate elements operating in ER to Golgi transport." J. Cell Sci. 100, 415-430.

Schachter, H. (1991) "Enzymes associated with glycosylation." Curr. Opin. Struc. Biol. 1, 755-765.

Schmitt, J.W. et Elbein, A.D. (1979) "Inhibition of protein also inhibits synthesis of lipid linked oligosaccharides." J. Biol. Chem. 254, 12291-12294.

Schwartz, A.L. et Ciechanover, A. (1992) "Ubiquitin-mediated protein modification and degradation." Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 7, 463-468.

Schweizer, A., Fransen, J.A.M., Baechli, T., Ginsel, L. et

Hauri, H-P. (1988) "Identification, by a monoclonal antibody, of a 53 kDa protein associated with a tubulovesicular compartment at the cis-side of the Golgi apparatus." J. Cell Biol. 107, 1643-1653.

Schweizer, A., Matter, K., Ketcham, C.M. et Hauri, H-P. (1991) "The isolated ER-Golgi intermediate compartment exhibits properties that are different from ER and cis-Golgi." J. Cell Biol. 113, 45-54.

Schweizer, A., Peter, F., Van, P.N., Söling, H-D. et Hauri, H-P. (1993) "A luminal calcium binding protein with a KDEL endoplasmic reticulum retention motif in the ER-Golgi intermediate compartment." Eur. J. Cell Biol. 60, 366-370.

Sette, A. et Grey, H.M. (1992) "Chemistry of peptide interactions with MHC proteins." Current Opinion in Immunology 4, 79-86.

Shachar, I., Amitay, R., Rabinovich, E., Haimovich, J. et Bar-Nun, S. (1992) "Polymerization of secretory IgM in B lymphocytes is prevented by a prior targeting to a degradation pathway." J. Biol. Chem. 267, 24241-24247.

Shakin-Eshleman, S.H., Wunner, W.H. et Spitalnik, S.L. (1993) "Efficiency of N-linked core glycosylation at asparagine-319 of Rabies virus glycoprotein is altered by deletions C-terminal to the glycosylation sequon." Biochemistry 32, 9465-9472.

Shaper, J.H. et Shaper, M.L. (1992) "Enzymes associated with glycosylation." Current Opinion in Struc. Biol. 2, 701-709.

Snider, M.D. et Rogers, O.C. (1984) "Transmembrane movement of oligosaccharide-lipids during glycoprotein synthesis." Cell 36, 753-761.

Song, Z., Li, S.C. et Li, Y.T. (1987) "Absence of endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase activity in the kidneys of Sheep, Cattle and Pig." Biochem. J. 248, 145-149.

Sousa, M.C., Ferrer-Garcia, M.L. et Parodi, A.J. (1991) "Recognition of the oligosaccharide and protein moieties by UDP-Glc : glycoprotein glucosyltransferase." Biochem. 31, 97-105.

Spiro, M.J. et Spiro, R.G. (1991) "Potential regulation of N-glycosylation precursors through oligosaccharid-lipid hydrolase action and glucosidase shuttle." J. Biol. Chem. 266, 5311-5317.

Stafford, F.J. et Bonifacino, J.S. (1991) "A permeabilized cell system identifies the Endoplasmic Reticulum as a site of protein degradation."

J. Cell. Biol. 115, 1225-1236.

**Stirling, J.L.** (1974) "Human N-acetyl- $\beta$ -hexosaminidases : hydrolysis of N,N'-diacetylchitobiose by a low molecular weight enzyme."

Febs Letts, 39, 171-175.

**Stoll, J.** (1986) Ph D thesis, School of Hygiene and Public Health, The Johns Hopkins University, Baltimore, MD, USA.

**Su, K., Stoller, T., Rocco, J., Zemsky, J. et Green, R.** (1993) "Pre-Golgi degradation of yeast prepro- $\alpha$ -factor expressed in a mammalian cell. Influence of cell-type oligosaccharide processing on intracellular fate."

J. Biol. Chem. 268, 14301-14309.

**Suh, K., Bergmann, J.E. et Gabel, C.A.** (1989) "Selective retention of monoglucosylated high mannose oligosaccharides by a class of mutant vesicular stomatitis virus G proteins."

J Cell Biol. 108, 811-819.

**Suzuki, C.K., Bonifacino, J.S., Lin, A.Y., Mark, M.D. et Klausner, R.D.** (1991) "Regulating the retention of T-cell receptor  $\alpha$  chain variants within the Endoplasmic reticulum : Ca<sup>++</sup> dependent association with Bip."

J. Cell Biol. 114, 189-205.

**Sweet, D.J. et Pelham, H.R.B.** (1992) "The *Saccharomyces cerevisiae* SEC20 gene encodes a membrane glycoprotein which is sorted by the HDEL retrieval system."

EMBO J. 11, 423-432.

**Swift, A.M. et Machamer, C.E.** (1991) "A Golgi retention signal in a membrane spanning domain of coronavirus E1 protein."

J. Cell Biol. 115, 19-30.

#### T

**Tang, B.L., Wong, S.H., Low, S.H. et Hong, W.** (1992) "The transmembrane domain of N-glucosaminyltransferase I contains a Golgi retention signal."

J. Biol. Chem. 267, 10122-10126.

**Tartakoff, A.M.** (1983) "Perturbation of vesicular traffic with the carboxylic ionophore monensin."

Cell 32, 1026-1028.

**Tatu, U. Braakman, I. et Helenius, A.** (1993) "Membrane glycoprotein folding, oligomerization and intracellular transport : effects of dithiothreitol in living cells."

EMBO J. 12, 2151-2157.

**Tooze, S.A., Tooze, J. et Warren, G.** (1988) "Site of addition of N-acetylgalactosamine to the E1 glycoprotein of a mouse hepatitis virus-A59."

J. Cell Biol. 106, 1475-1487.

**Trowbridge, I.S. et Hyman, R. (1979)** "Abnormal lipid-linked oligosaccharides in class E Thy-1-negative mutant lymphomas." Cell 17, 503-508.

**Trugnan, G., Ogier-Denis, E., Sapin, C., Darmoul, D., Bauvy, C., Aubery, M. et Codogno, P. (1991)** "The N-glycan processing in HT29 cells is a function of their state of enterocytic differentiation."

J. Biol. Chem. 266, 20849-20855.

**Tsao, Y.S., Ivessa, N.E., Adesnik, M., Sabatini, D.D. et Kreibich, G. (1992)** "Carboxy terminally truncated forms of ribophorin I are degraded in pre-Golgi compartments by a calcium-dependent process."

J. Cell Biol. 116, 57-67.

**Tsuji, E., Misumi, Y., Fujiwara, T., Takami, N., Ogata, S. et Ikehara, Y. (1992)** "An active site mutation (Gly<sup>633</sup>-Arg) of dipeptidyl peptidase IV causes its retention and rapid degradation in the ER."

Biochemistry 31, 11921-11927.

## U

**Urade, R., Nasu, M., Moriyama, T., Wada, K. et Kito, M. (1992)** "Protein degradation by the phosphoinositide-specific phospholipase C- $\alpha$  family from Rat liver endoplasmic reticulum."

J. Biol. Chem. 267, 15152-15159.

## V

**Vaux, D.J. et Fuller, S.D. (1992)** "The receptor-mediated retention of resident proteins in the endoplasmic reticulum." Antonie van Leeuwenhoek 61, 123-131.

**Vertel, B.M., Walters, L.M., Grier, B., Maine, N. et Goetinck, P.F. (1993)** "Nanomelic chondrocytes synthesize, but fail to translocate, a truncated aggrecan precursor."

J. Cell Sci. 104, 939-948.

## W

**Waters, M.G., Griff, I.C. et Rothman, J.E. (1991)** "Proteins involved in vesicular transport and membrane fusion." Current Opinion in Cell Biology 3, 615-620.

**Wieland, F.T., Gleason, M.L., Serafini, T.A. et Rothman, J.E. (1987)** "The rate of bulk flow from the endoplasmic reticulum to the cell surface."

Cell 50, 289-300.

**Wikström, L. et Lodish, H.L. (1993)** "Unfolded H2b asialo glycoprotein receptor subunit polypeptides are selectively degraded within the ER."

J. Biol. Chem. 268, 14412-14416.

**Wileman, T., Kane, L.P., Young, J., Carson, G.R. et Terhost,**

C. (1993) "Associations between subunit ectodomains promote T Cell antigen Receptor assembly and protect against degradation in the ER."  
J. Cell Biol. 122, 67-78.

Wilcox, C.A., Redding, K., Wright, R. et Fuller, R.S. (1992) "Mutation of a tyrosine localization signal in the cytosolic tail of yeast Kex2 protease disrupts Golgi retention and results in default transport to the vacuole."  
Mol. Biol. Cell 3, 1353-1371.

Wilson, D.W., Lewis, M.J. et Pelham, H.R.B. (1993) "pH-dependent binding of KDEL to its receptor *in vitro*."  
J. Biol. Chem. 268, 7465-7468.

## Y

Ye, S.K., Reardan, C.A. et Getz, G.S. (1993) "Inhibition of apolipoprotein E degradation in a post-Golgi compartment by a Cysteine protease inhibitor."  
J. Biol. Chem. 268, 8497-8505.

