

50376
1994
173

50376
1994
173

N° d'ordre :

Université des Sciences et Technologies de Lille

Thèse



présentée par

Thierry GRARD

pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université

Spécialité : Biochimie

**Purification et caractérisation
d'une nouvelle glycosidase :
l' α -D-mannosidase cytosolique de foie de Rat**

Soutenue le 10 juin 1994 devant la commission d'examen

Président :	Professeur André VERBERT
Rapporteurs :	Docteur Patrice CODOGNO Docteur Jean-Pierre ZANETTA
Examineurs :	Professeur René CACAN Docteur Jean-Claude MICHALSKI

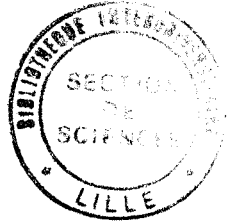
SCD LILLE 1



D 030 292049 8

50376
1994
173

50376
1994
173



A mes parents et beaux-parents

A Annick et Pauline



Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Technologies de Lille (Relations structure-fonction des constituants membranaires, Unité Mixte de Recherche n° 111 du C.N.R.S., Directeur : Professeur André VERBERT) sous la direction de Monsieur Jean-Claude MICHALSKI, Directeur de Recherches à l'I.N.S.E.R.M..

Il a bénéficié d'une aide du Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur (contrat d'allocataire n° 1087).

Monsieur le Docteur Patrice CODOGNO,

Monsieur le Docteur Jean-Pierre ZANETTA,

j'ai l'honneur de vous compter parmi les membres de ce jury. Je tiens à vous exprimer ma reconnaissance pour avoir consenti à juger ce travail.

Messieurs les Professeurs André VERBERT et René CACAN,

ces travaux ont en partie été effectués dans votre laboratoire. Je vous remercie de m'y avoir accueilli aussi chaleureusement. Et, je suis heureux et honoré que vous ayez accepté de juger cette thèse.

Monsieur le Docteur Jean-Claude MICHALSKI,

je pense que ta conception du travail est basée sur l'entière confiance en tes collaborateurs. J'entends par là que tu m'as toujours laissé carte blanche. C'est parfois difficile, quand ça va mal, mais au bout du compte, le résultat n'en est que meilleur. Et pour m'y faire parvenir, j'ai surtout apprécié ton ouverture d'esprit, au fil de nos nombreuses discussions à bâtons rompus.

Jean-Michel WIERUSZESKI, Catherine ALONSO, Gérard STRECKER, Florence DELPLACE et Yves PLANCKE : nous avons passé un peu plus de quatre ans ensemble. Je vous remercie d'avoir contribué, chacun à votre façon, à l'élaboration de cette thèse.

Agnès SAINT-POL : tu as toujours répondu présente, même quand je poussais le bouchon un peu loin. Et, au bout du compte, tu as fait beaucoup plus que m'épauler. Indescriptiblement, tu m'as apporté le courage et la motivation de mener la barque à bon port.

Merci, et gardes-en un peu pour Thierry, je lui dois bien ça...

Olivier CUVILLIER : nous n'avons jamais travaillé ensemble, mais nous avons toujours suivi un chemin parallèle. Et, je crois qu'au cours de nos quatre années de troisième cycle, nous nous sommes toujours stimulés l'un l'autre. Merci pour ça.

Christophe MARILLER et Fabrice ALLAIN : « Purification ?, vous avez dit purification ? ». Merci d'avoir répondu à toutes mes questions de néophyte en la matière, et de m'avoir accordé votre temps pour me mettre sur la voie...

Catherine DENGREMONT, Corinne VILLERS, Odette LABIAU, Anne-Marie MIR et Daniel KMIECIK, merci de votre accueil. J'espère n'avoir pas trop perturbé le calme et la sérénité de votre laboratoire. En tout

cas, je garde un excellent souvenir des quelques séjours au sein de votre équipe.

Bernadette CODDEVILLE, Michel BELARD, vous m'avez été d'un précieux secours, à différents titres, dans la recherche bibliographique. Je vous en remercie.

Je tiens, d'autre part, à souligner les conditions dans lesquelles ma thèse s'est déroulée. Il est difficile de rendre compte de la vie quotidienne d'un laboratoire de 100 personnes au travers d'un mémoire de thèse. Cependant, l'ambiance et le climat dans lesquels j'ai travaillé ont énormément conditionné mes résultats. Il n'est pas une équipe qui n'ait été mise à contribution : là, une cellule Amicon (merci Colette, et surtout, ne désespère pas pour tes chocolats...), ici, l'ensemble de la verrerie (je crois que les équipes de l'ex-103, voire de l'ex-107 se seront reconnues) ou encore mille autres petits détails qui font que chaque groupe a apporté sa pierre à l'édifice. Et cela traduit véritablement l'état d'esprit du C9.

Merci à tous.

Enfin, je ne peux clore ce chapitre de congratulations sans remercier mon beau-père, à qui je dois la « colorisation » des figures.

L'ensemble des travaux menés au laboratoire a fait l'objet des communications et publications suivantes :

Communications :

Orale :

Grard T., Haeuw J.F., Wieruszeski J.M., Michalski J.C. et Strecker G.
Properties and substrate specificity of cytosolic α -D-mannosidases
Joint meeting of the Nederlandse Vereniging voor de bestudering van glycoconjugaten and the studien glykoconjugate den Gesellschaft für biologische chemie, Villeneuve d'Ascq, 26-27 septembre 1991.

Ecrites :

Haeuw J.F., Grard T., Wieruszeski J.M., Alonso C., Montreuil J., Michalski J.C. et Strecker G.
Catabolic pathways of oligomannosidic and N-acetyllactosaminic type glycans by the lysosomal and cytosolic glycosidases of rat liver. A 400 MHz ^1H -NMR study
11th International Symposium on Glycoconjugates, Toronto, 30 juin - 5 juillet 1991.

Grard T., Wieruszeski J.M., Strecker G. et Michalski J.C.
Catabolisme lysosomique des glycanes de type N-acétyllactosaminique possédant une N-acétyl- β -D-glucosamine en position intercalaire
XVIII^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs de la Société Française de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Tours, 3-6 septembre 1991.

Grard T., Wieruszeski J.M., Strecker G. et Michalski J.C.
Catabolisme lysosomique des glycanes de type N-acétyllactosaminique
Congrès de la Société Française de Biochimie et de Biologie Moléculaire (SFBBM), Villepinte, 2-4 décembre 1991.

Grard T., Haeuw J.F., Wieruszeski J.M., Strecker G. et Michalski J.C.

Catabolisme lysosomique des glycannes de type N-acétyl-lactosaminique. Spécificité d'hydrolyse par les N-acétyl- β -D-hexosaminidases de foie de Rat

XIX^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs de la Société Française de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Caen, 7-10 juillet 1992.

Grard T., Saint-Pol A., Alonso C., Haeuw J.F., Wieruszeski J.M., Strecker G. et Michalski J.C.

Characterisation and purification of cytosolic α -D-mannosidases isoforms from rat liver

First Summerschool on Glycobiology and Glycochemistry, Lausanne, 3-4 juin 1993.

Grard T., Saint-Pol A., Alonso C., Haeuw J.F., Wieruszeski J.M., Strecker G. et Michalski J.C.

Soluble forms of α -D-mannosidases from rat liver. Separation and characterization of two enzymatic forms with different substrate specificities

Joint meeting of the Nederlandse Vereniging voor de bestudering van glycoconjugaten and the studien glykoconjugate den Gesellschaft für biologische chemie, Münster (Allemagne), 15-16 octobre 1993.

Saint-Pol A., Grard T., Delannoy P., Mir A.M. et Michalski J.C.

Characterization of cytosolic rat liver glycoproteins

Joint meeting of the Nederlandse Vereniging voor de bestudering van glycoconjugaten and the studien glykoconjugate den Gesellschaft für biologische chemie, Münster (Allemagne), 15-16 octobre 1993.

Publications

Haeuw J.F., Grard T., Alonso C., Strecker G. et Michalski J.C.

The core specific lysosomal $\alpha(1-6)$ -mannosidase activity depends on aspartamidohydrolase activity *Biochem. J.* (1994) 297, 463-466

Grard T., Saint-Pol A., Haeuw J.F., Alonso C., Wieruszeski J.M., Strecker G. et Michalski J.C.

Soluble forms of α -D-mannosidases from rat liver. Separation and characterization of two enzymatic forms with different substrate specificities.

Eur. J. Biochem. (soumis pour publication).

Grard T., Saint-Pol A., Cacan R., Strecker G., Verbert A. et Michalski J.C.

Evidence for the hydrolysis of oligosaccharide-diphosphodolichol by the cytosolic α -D-mannosidase from rat liver. A possible alternative route for the biosynthesis of N-glycosylproteins.

Febs Lett. (soumis pour publication).

Bourgerie S., Karamanos Y., Grard T. et Julien R.

Purification and characterization of an endo-N-acetyl- β -D-glucosaminidase from the culture medium of *Stigmatella aurantiaca* DW4

Biochem. J. (soumis pour publication).

Abréviations

Asn	Asparagine
ATCA	Acide trichloracétique
CMP	Cytidine monophosphate
dMM.....	Désoxymannojirimycine
EDTA.....	Acide éthylène diamine tétra-acétique
Fuc	L-fucose
Gal	D-galactose
GDP	Guanosine diphosphate
Glc.....	D-glucose
GlcNAc.....	<i>N</i> -acétyl-D-glucosamine
Hepes	Acide-2-hydroxy-éthylpipérazine- <i>N'</i> -2-éthane sulfonique
Man.....	D-mannose
NeuAc	Acide <i>N</i> -acétylneuraminique
P-P-Dol.....	Pyrophosphodolichol
PMSF	Phenylméthane-sulfonyl fluoride
RMN.....	Résonance magnétique nucléaire
Ser.....	Sérine
Sw	Swainsonine
Thr	Thréonine
UDP	Uridine diphosphate
WGA.....	Wheat germ agglutinin

Sommaire

Abréviations	10
Index des figures.....	15
Index des tableaux.....	18
INTRODUCTION.....	19
GENERALITES.....	22
I. Les glycosylprotéines.....	23
A. Les O-glycosylprotéines.....	24
B. Les N-glycosylprotéines.....	24
II. Les α-D-mannosidases.....	26
A. Les α -D-mannosidases impliquées dans la biosynthèse des gly- cannes des N-glycosylprotéines.....	27
1) Les α -D-mannosidases du <i>reticulum</i> endoplasmique.....	28
a) L' α -1,2-mannosidase du <i>reticulum</i> endoplasmique.....	28
b) La <i>Man₉</i> -mannosidase.....	32

c) <i>L'α-D-mannosidase kifunensine résistante</i>	35
2) Les α-D-mannosidases de l'appareil de Golgi	37
a) <i>Les α-D-mannosidases IA et IB</i>	38
b) <i>L'α-D-mannosidase II</i>	42
c) <i>L'endo-α-D-mannosidase</i>	46
3) Intervention dans les phénomènes de maturation des glycanes des N-glycosylprotéines.....	48
B. Les α-D-mannosidases particulières	53
1) <i>L'α-1,2/α-1,3/α-1,6-mannosidase</i>	53
2) Les α-D-mannosidases de la membrane plasmique et soluble de spermatozoïde de Rat	55
3) <i>L'α-1,2 mannosidase phospholipidique et calcium dépendante</i>	56
C. Les α-D-mannosidases impliquées dans le catabolisme des glycanes des N-glycosylprotéines	58
1) Les α-D-mannosidases du lysosome	59
a) <i>Les α-D-mannosidases lysosomiques A et B</i>	61

b) <i>L'</i> α -1,6-mannosidase lysosomique	66
2) <i>L'</i> α -D-mannosidase cytosolique	68
D. Les inhibiteurs des α -D-mannosidases.....	73
1) Les inhibiteurs spécifiques.....	73
a) <i>La swainsonine</i>	73
b) <i>La désoxymannojirimycine</i>	76
c) <i>Le didésoxyiminomannitol</i>	77
d) <i>La kifunensine</i>	77
2) Les inhibiteurs non spécifiques	78
a) <i>La manostatine A</i>	78
b) <i>La D-mannonolactame amidrazone</i>	78
III. Les substrats potentiels de l' α -D-mannosidase cytosolique ...	79
A. Les mannosyl-diphospho-dolichol	79
B. Les glycoprotéines mannosylées	82
1) Les protéoglycannes à mannose liés O-glycosidiquement.....	86

2) Les protéines à Glc-1P-mannosides liés O-glycosidiquement.....	87
TRAVAUX PERSONNELS	89
I. Matériels et méthodes.....	90
<i>A. Fractionnement cellulaire</i>	<i>90</i>
II. Purification de l'α-D-mannosidase cytosolique.....	91
III. Spécificité de substrat de l'α-D-mannosidase cytosolique vis-à-vis d'oligosaccharides-diphospho-dolichols	115
IV. Discussion	129
CONCLUSION.....	133
BIBLIOGRAPHIE.....	136

Index des figures

Figure 1 : Les trois types fondamentaux de glycanes liés <i>N</i> -glycosidiquement aux protéines	25
Figure 2 : Réaction catalysée par l' α -1,2-mannosidase du <i>reticulum</i> endoplasmique.....	30
Figure 3 : Réaction catalysée par la <i>Mans</i> ₉ -mannosidase du foie de Porc	32
Figure 4 : Réaction catalysée par l' α -D-mannosidase kifunensine-résistante	35
Figure 5 : Hydrolyse des résidus de mannose réalisée par l' α -D-mannosidase IA de l'appareil de Golgi.....	40
Figure 6 : Hydrolyse des résidus de mannose A et B réalisée par la mannosidase II de l'appareil de Golgi	43
Figure 7 : Spécificité de substrat de l'endo- α -D-mannosidase de l'appareil de Golgi	46
Figure 8 : Structure du dolichol.....	48
Figure 9 : Le cycle des dolichols.....	50
Figure 10 : Les différentes étapes de la maturation des glycanes des <i>N</i> -glycosylprotéines	52
Figure 11 : Spécificité de substrat de l' α -1,2/ α -1,3/ α -1,6-mannosidase	55
Figure 12 : Catabolisme lysosomique d'oligosaccharides de type oligomannosidique dans le foie de Rat	60

Figure 13 : Spécificité de substrat de l' α -1,6-mannosidase lysosomique vis-à-vis de glycanes de type oligomannosidique.....	62
Figure 14 : Hydrolyse du core des glycanes des <i>N</i> -glycosylprotéines par l' α -1,6-mannosidase lysosomique.....	64
Figure 15 : Catabolisme cytosolique d'oligosaccharides de type oligomannosidique dans le foie de Rat	69
Figure 16 : Le mannofuranose, le mannopyranose et leurs différents analogues structuraux.....	74
Figure 17 : Topographie de la biosynthèse des précurseurs de la <i>N</i> -glycosylation des protéines	81
Figure 18 : Purification of α -D-mannosidase by affinity chromatography on a column of cobalt chelating sepharose	101
Figure 19 : Chromatography of cytosolic α -D-mannosidase on a column of DEAE trisacryl M.....	103
Figure 20 : Electrophoretic behaviour of the purified α -D-mannosidase	106
Figure 21 : Effect of pH on "unbound" and Tris-eluted α -D-mannosidase activities	108
Figure 22 : HPLC elution profile on spheri-5 NH ₂ column of the degradation of the oligosaccharides formed after a 4 h incubation time of Man ₉ GlcNAc with the "unbound" (A) and Tris-eluted (B) mannosidase activities	110
Figure 23 : ¹ H-NMR spectrum of Man ₅ GlcNAc oligosaccharide resulting from the digestion of Man ₉ GlcNAc by the Tris-eluted mannosidase activity.	113
Figure 24 : HPLC analysis of the Man ₉ GlcNAc ₂ -P-P-Dol degradation by the cytosolic α -D-mannosidase activity	121
Figure 25 : HPLC analysis of the Man ₅ GlcNAc ₂ -P-P-Dol degradation by the cytosolic α -D-mannosidase activity	123

Figure 26 : Potential role of the cytosolic α -D-mannosidase in the trimming of oligosaccharide-diphospho-dolichol 127

Figure 27 : Complémentarité d'action entre les α -D-mannosidases cytosolique et lysosomique..... 130

Index des tableaux

Tableau I : α -D-mannosidases localisées dans le <i>reticulum</i> endoplasmique.....	36
Tableau II : Localisation de l' α -D-mannosidase I suivant le type cellulaire	41
Tableau III : Localisation de l' α -D-mannosidase II suivant le type cellulaire	44
Tableau IV : α -D-mannosidases localisées dans l'appareil de Golgi.....	47
Tableau V : α -D-mannosidases particulières	57
Tableau VI : α -D-mannosidases localisées dans le lysosome	67
Tableau VII : α -D-mannosidases localisées dans le cytosol	72
Tableau VIII : Glycoprotéines à Ser(Thr)-O-GlcNAc orienté vers le cytosol	84
Tableau IX : Enzymatic characterization of the cytosolic fraction.....	99
Tableau X : Purification of cytosolic α -D-mannosidase from rat liver.....	105
Tableau XI : Kinetic properties of the α -D-mannosidase activities	111
Tableau XII : Substrate specificity of "unbound" fraction and Tris-eluted fraction α -D-mannosidase activity	111
Tableau XIII : Substrate specificity of the α -D-mannosidase activity on Man ₉ GlcNAc ₂ -P-P-Dol	125
Tableau XIV : Substrate specificity of the α -D-mannosidase activity on Man ₅ GlcNAc ₂ -P-P-Dol	125

INTRODUCTION

Les glycosidases, enzymes principalement localisées dans le lysosome, sont capables d'hydrolyser la plupart des enchaînements osidiques rencontrés dans les glycoconjugués.

L'étude de la chronologie d'intervention des différentes glycosidases dans les processus cataboliques, ainsi que leur spécificité vis-à-vis de substrats naturels, a été facilitée par le développement de méthodes physico-chimiques comme la résonance magnétique nucléaire (RMN) ou la spectrométrie de masse par bombardement d'atomes accélérés (FAB-MS). Ces méthodes sont, en effet, des outils de choix pour l'analyse des métabolites formés lors de réactions enzymatiques. Elles permettent en particulier, de déterminer la nature des différents isomères susceptibles de se former au cours des réactions, ainsi que la cinétique et la chronologie de ces mêmes réactions.

Ces techniques appliquées, dans notre laboratoire, à l'étude de la dégradation des glycannes liés *N*-glycosidiquement de type oligomannosidique par les α -D-mannosidases du lysosome et du cytosol, ont permis de définir clairement l'étroite spécificité de substrat de chacune de ces enzymes et d'émettre l'hypothèse d'une complémentarité d'action entre les α -D-mannosidases des compartiments lysosomique et cytosolique.

Bien que la spécificité de l' α -D-mannosidase neutre soit particulière et différente de celle de toute autre α -D-mannosidase cellulaire, le problème de sa localisation au sein du compartiment cytosolique reste entier, car l' α -D-mannosidase soluble est préparée par fractionnement cellulaire.

Afin d'apporter des arguments quant à la localisation intracellulaire

précise de cette activité enzymatique soluble, nous avons entrepris de purifier cette α -D-mannosidase. Au cours de ce travail, nous avons mis en évidence la présence de deux activités mannosidasiques neutres au sein de la fraction cytosolique, possédant chacune une spécificité de substrat différente.

Nous avons alors étudié l'activité de l' α -D-mannosidase cytosolique purifiée vis-à-vis de substrats naturels potentiels, constitués par les oligosaccharides-diphospho-dolichols mis en jeu au cours de la biosynthèse des *N*-glycosylprotéines.

Nous ferons précéder l'exposé de ces travaux par une revue présentant les propriétés des α -D-mannosidases cellulaires décrites à ce jour, ainsi que par un état des lieux de la glycosylation cytosolique avec, en particulier, la description des substrats potentiels de l' α -D-mannosidase cytosolique.

GENERALITES

Le cytosol est le siège du métabolisme de nombreuses macromolécules, dont les glycoprotéines. Nous nous intéresserons tout particulièrement au métabolisme de la partie glycanique de ces composés. Depuis quelques années déjà, il devient de plus en plus évident que le cytosol prend une part très importante dans l'anabolisme mais aussi le catabolisme des glycannes.

Notre travail a consisté à purifier une glycosidase neutre cytosolique, l' α -D-mannosidase, impliquée dans le métabolisme des glycoconjugués.

Nous nous efforcerons dans ce chapitre, après avoir fait un bref rappel sur la structure des glycannes des glycosylprotéines, de décrire les α -D-mannosidases cellulaires caractérisées à ce jour et de faire un état des lieux de la glycosylation cytosolique.

I. Les glycosylprotéines

Les glycosylprotéines résultent de l'association covalentielle d'un glucide appelé glycanne et d'une protéine. D'une manière générale, les glycoprotéines sont classées en fonction de la nature de la liaison glycanne-protéine (Strecker et Montreuil (1979)). On distingue ainsi deux classes de glycoprotéines :

1. Les *O*-glycosylprotéines dans lesquelles la liaison de type *O*-glycosidique s'effectue entre un monosaccharide et un résidu de sérine ou de thréonine.
2. Les *N*-glycosylprotéines où l'unique liaison de type *N*-glycosidique s'effectue entre la *N*-acétylglucosamine et l'asparagine.

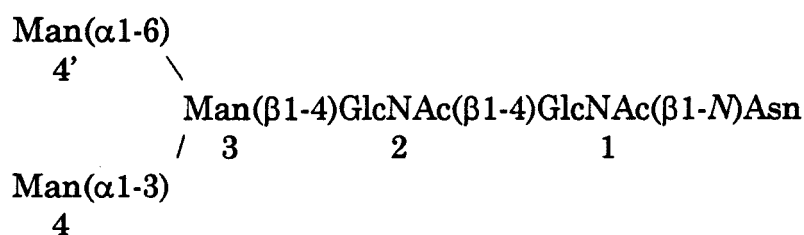
A. Les O-glycosylprotéines

On distingue plusieurs types de noyaux (Montreuil (1987)), en fonction du monosaccharide conjugué à la chaîne peptidique :

- ✓ Le type protéoglycane : un résidu de xylose est conjugué par une liaison β sur un résidu séryle. Le noyau Gal(β 1-3)Gal(β 1-4)Xyl est substitué par une répétition de motifs disaccharidiques définissant ainsi le chondroïtine sulfate, le kératane sulfate, le dermatane sulfate ou l'héparane sulfate.
- ✓ Le type mucine : un résidu de *N*-acétylgalactosamine est lié sur une sérine ou une thréonine. Quatre types principaux de noyau sont décrits. Ils sont substitués par des chaînons oligosaccharidiques acides ou neutres de longueur variable.
- ✓ Le type collagène : un résidu de galactose est lié sur le groupement hydroxyle d'un résidu d'hydroxylysine en β .

B. Les N-glycosylprotéines

Les glycanes liés *N*-glycosidiquement possèdent en commun une fraction invariable (*inv.*), le noyau trimannosyl-*N-N'*-diacétylchitobiose (Montreuil (1975)) :



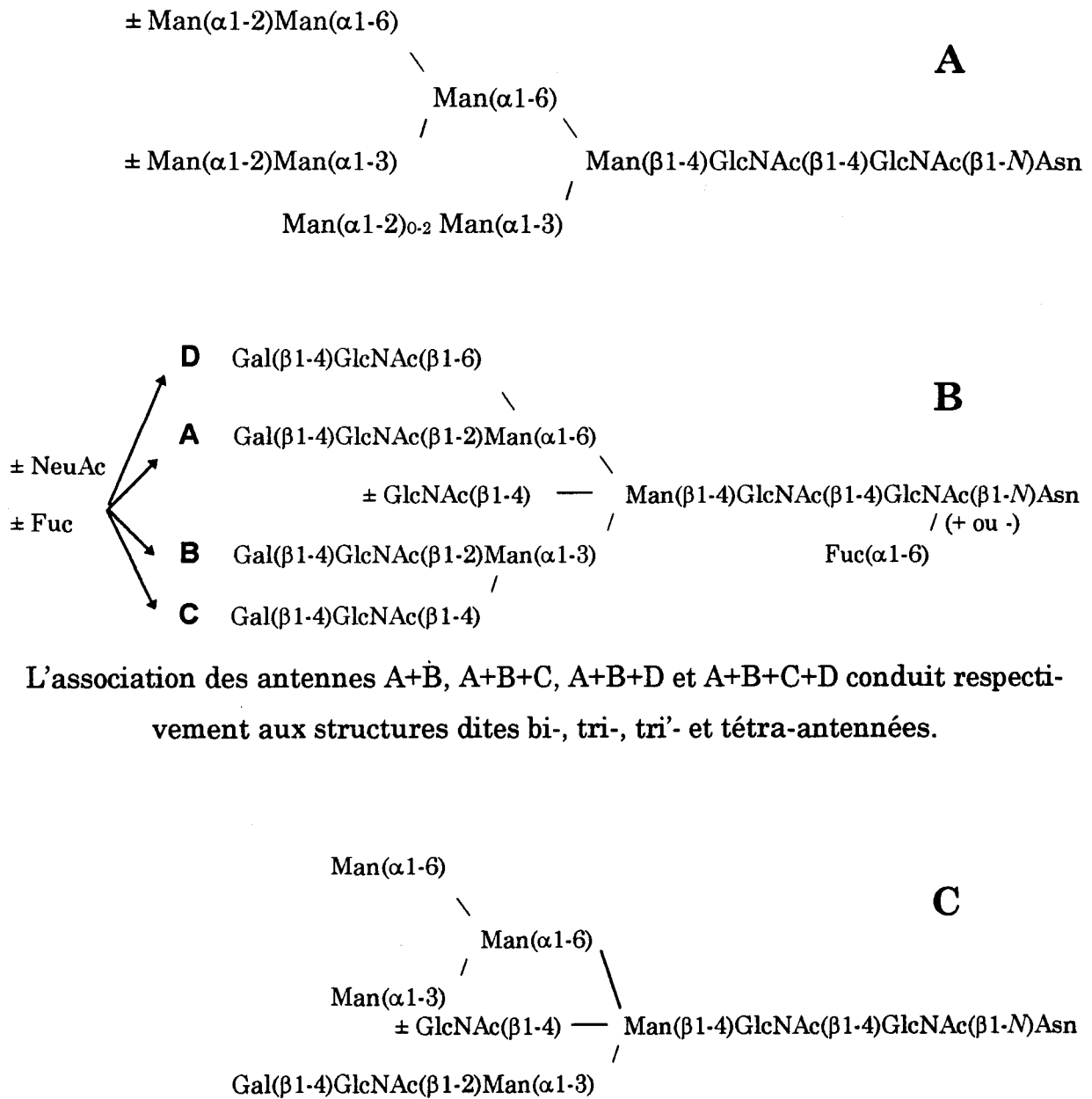


Figure 1 : Les trois types fondamentaux de glycannes liés N-glycosidiquement aux protéines

A : Glycanne de type oligomannosidique

B : Glycanne de type N-acétyllactosaminique

C : Glycanne de type hybride

Cette fraction oligosaccharidique commune est substituée par des motifs oligosaccharidiques variables (*var*) : les antennes qui sont le support de la spécificité des glycanes des *N*-glycosylprotéines (Figure 1 page 25).

En fonction de la nature des chaînes oligosaccharidiques *var*, trois types fondamentaux caractérisent ces glycanes :

1. le type oligomannosidique (Montreuil (1975))
2. le type *N*-acétyllactosaminique (Montreuil (1975))
3. le type hybride (Tai *et al.* (1977))

II. Les α -D-mannosidases

Différentes α -D-mannosidases (EC 3.2.1.24) capables d'hydrolyser tous les types de liaison des glycanes de type oligomannosidique ont été décrites dans de nombreux tissus animaux (Winchester (1984), Moremen et Touster (1988)). Ces enzymes, caractérisées et différenciées sur la base de leurs propriétés physico-chimiques, diffèrent principalement par leur localisation cellulaire et leur intervention dans le métabolisme des chaînes glycaniques des *N*-glycosylprotéines. Elles sont classiquement divisées en deux groupes :

1. les α -D-mannosidases impliquées dans la biosynthèse des glycanes liés *N*-glycosidiquement, situées dans le *reticulum* endoplasmique et l'appareil de Golgi des eucaryotes.
2. les α -D-mannosidases jouant un rôle dans le catabolisme des glycanes liés *N*-glycosidiquement, localisées dans le lysosome et le cytosol des cellules eucaryotes.

Toutefois, il existe d'autres α -D-mannosidases, dont le rôle et/ou la localisation cellulaire sont différents ou non encore déterminés.

A. Les α -D-mannosidases impliquées dans la biosynthèse des glycanes des N-glycosylprotéines.

La biosynthèse des N-glycosylprotéines débute dans le *reticulum* endoplasmique par le transfert « en bloc » du mégaloglycane $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ lié au pyrophosphodolichol sur la chaîne polypeptidique naissante (Hubbard et Ivatt (1981), Kornfeld et Kornfeld (1985)). Ce transfert est suivi d'une série d'événements conduisant les protéines du *reticulum* endoplasmique jusqu'aux citernes *trans* de l'appareil de Golgi avant leur adressage ultérieur vers la membrane, le lysosome ou le milieu extracellulaire.

Ces événements sont corrélés à l'action de glycosidases spécifiques jouant un rôle majeur dans l'élaboration de la structure des glycanes de type oligomannosidique, N-acétyllactosaminique (Montreuil (1975)), ou hybride (Tai *et al.* (1977)). Après l'action des α -glucosidases I et II (Elting *et al.* (1980), Grinna et Robbins (1979), Ugalde *et al.* (1979)), différentes α -D-mannosidases, situées dans le *reticulum* endoplasmique et l'appareil de Golgi, entrent en jeu au cours de la maturation des glycanes des N-glycosylprotéines. Elles seront classées ici suivant leur localisation cellulaire.

1) Les α -D-mannosidases du *reticulum* endoplasmique

Premières à entrer en jeu dans l'élagage des résidus de mannose des glycanes des *N*-glycosylprotéines, ces α -D-mannosidases sont les suivantes :

- ✓ L' α -1,2-mannosidase du *reticulum* endoplasmique (Bischoff et Kornfeld (1983))
- ✓ La Man₉-mannosidase (Schweden *et al.* (1986))
- ✓ L' α -D-mannosidase kifunensine résistante (Weng et Spiro (1993))

a) L' α -1,2-mannosidase du *reticulum* endoplasmique

i) Mise en évidence

En 1983, alors que la biosynthèse des glycanes des *N*-glycosylprotéines est décrite par le transfert en bloc d'un mégaloglycane sur la protéine dans le *reticulum* endoplasmique, puis par l'élagage des différents résidus de mannose par les mannosidases I et II golgiennes, Bischoff et Kornfeld mettent en évidence une activité α -D-mannosidasique localisée dans le *reticulum* endoplasmique. Ils distinguent cette α -D-mannosidase membranaire, solubilisée par le désoxycholate, des α -D-mannosidases lysosomiques et golgiennes par le fait qu'elle est non retenue sur colonne de concanavaleine A. L' α -D-mannosidase membranaire du *reticulum* endoplasmique hydrolyse des résidus de mannose liés en α -1,2. Elle est inactive vis-à-vis du substrat GlcNAcMan₅GlcNAc₂, spécifique de l' α -D-mannosidase II golgienne (Tabas et Kornfeld (1978)). Contrairement à la mannosidase IA (Tulsiani *et al.* (1982b)), elle est active vis-à-vis du *p*-nitrophényl- α -D-

mannoside. Enfin, l' α -1,2-mannosidase du *reticulum* endoplasmique est relativement insensible à la swainsonine (Tableau I page 36), inhibiteur spécifique de l' α -D-mannosidase lysosomique (Dorling *et al.* (1980)). Ces auteurs ont proposé que l' α -D-mannosidase du *reticulum* endoplasmique soit considérée comme la première à entrer en jeu dans l'hydrolyse des mannoses des glycanes liés *N*-glycosidiquement, avant l'entrée des *N*-glycosylprotéines dans l'appareil de Golgi.

ii) α -1,2-mannosidases membranaire et soluble

Bischoff et Kornfeld (1986) ont purifié une forme soluble qui possède les mêmes propriétés physico-chimiques que l' α -1,2-mannosidase membranaire du *reticulum* endoplasmique préalablement décrite en 1983. Ils ont montré qu'un anticorps polyclonal de Chèvre dirigé contre l' α -D-mannosidase soluble du *reticulum* endoplasmique reconnaissait spécifiquement l' α -1,2-mannosidase membranaire du *reticulum* de foie de Rat. Ils en ont conclu que les deux α -D-mannosidases constituaient deux formes de la même enzyme, et que l' α -D-mannosidase soluble n'était autre que l' α -1,2-mannosidase membranaire du *reticulum* endoplasmique retrouvée dans la fraction cytosolique au cours de l'homogénéisation cellulaire, après protéolyse. Ces travaux sont à l'origine de la controverse liée à l'existence de l' α -D-mannosidase localisée spécifiquement dans le compartiment cytosolique et purifiée par Shoup et Touster en 1976.

Toutefois, Moremen et Robbins (1991) ont montré que trois α -D-mannosidases, ayant une localisation et une spécificité de substrat totalement différentes, possédaient un grand pourcentage d'homologie. Ainsi,

l'étude de la séquence primaire de la mannosidase II a révélé qu'une région de 215 acides aminés présentait une grande similitude avec la région correspondante de l' α -1,2-mannosidase du *reticulum* endoplasmique (Bischoff *et al.* (1990)), et avec la forme vacuolaire de l' α -D-mannosidase de *Saccharomyces cerevisiae* (Yoshihisa et Anraku (1989)). L' α -1,2-mannosidase du *reticulum* endoplasmique montre d'ailleurs un pourcentage d'homologie très important, sur l'ensemble de sa séquence peptidique, avec l' α -D-mannosidase vacuolaire de *Saccharomyces cerevisiae*.

La controverse liée à l'existence de l' α -D-mannosidase cytosolique est ainsi contrecarrée, car ces résultats montrent que des études immunologiques ne suffisent pas à conclure à l'identité de deux α -D-mannosidases.

iii) *Spécificité de substrat*

Afin d'étudier le rôle exact de l' α -1,2-mannosidase du *reticulum* endoplasmique, Bischoff *et al.* (1986) ont travaillé sur des cellules en culture dérivées des cellules CHO, en présence de désoxymannojirimycine, un inhibi-

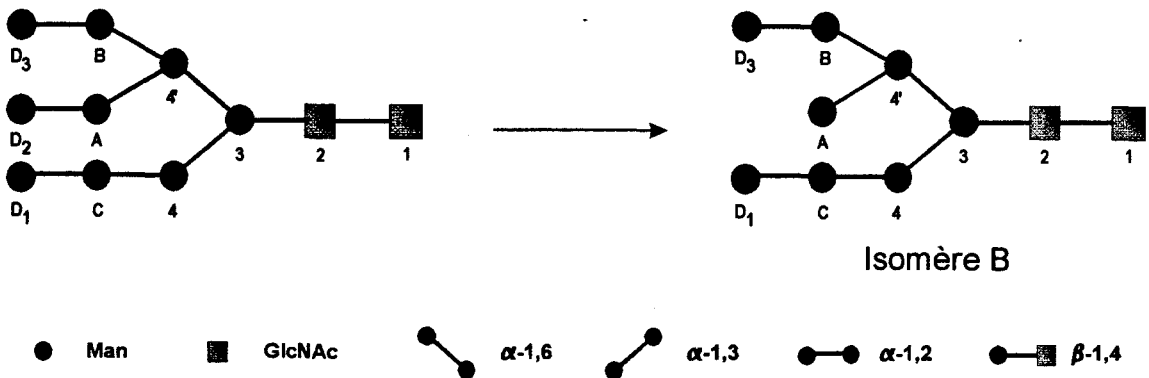


Figure 2 : Réaction catalysée par l' α -1,2-mannosidase du *reticulum* endoplasmique

Bischoff *et al.* (1986)

teur spécifique des mannosidases I golgiennes. Ils ont ainsi mis en évidence que l' α -1,2-mannosidase du *reticulum* endoplasmique hydrolyse le substrat $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ pour libérer l'oligosaccharide $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ (isomère B) (Figure 2 page 30).

De plus, ils ont décrit une deuxième activité mannosidasique sensible à la désoxymannojirimycine localisée dans le *reticulum* endoplasmique qui hydrolyse le substrat $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ pour former l'oligosaccharide $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$. Cette activité correspond très certainement à l' α -D-mannosidase que Schweden *et al.* ont purifié la même année à partir du foie de Bœuf : la Man_9 -mannosidase (voir page 32).

En 1988, Rizzolo et Kornfeld ont décrit dans les cellules COS une α -D-mannosidase possédant la même spécificité de substrat que l' α -1,2-mannosidase du *reticulum* endoplasmique, mais inhibée par la désoxymannojirimycine. Ces auteurs proposent que des α -D-mannosidases possédant des caractéristiques enzymatiques différentes soient ainsi réparties dans des « compartiments interconnectés » du *reticulum* endoplasmique.

iv) Clonage

Bischoff *et al.* (1990) ont isolé, caractérisé et exprimé des ADN complémentaires codant pour l' α -1,2-mannosidase du *reticulum* endoplasmique de foie de Rat. La séquence primaire préfigurée par les 3392 paires de base de l'ADN complémentaire de l' α -1,2-mannosidase du *reticulum* endoplasmique montre que le domaine catalytique de l'enzyme se situe dans la lumière du *reticulum* endoplasmique, ancré à celui-ci *via* un domaine hydrophobe. Toutefois, la séquence primaire ne laisse pas présager d'un domaine hydro-

phobe de longueur suffisante pour constituer un domaine d'ancrage classique des protéines membranaires. De plus, l'extrémité *N*-terminale ne contient pas la séquence signal généralement rencontrée (Verner et Schatz (1988)). Il se peut que l'enzyme soit adressée post-traductionnellement au *reticulum* endoplasmique, en réponse à un éventuel signal métabolique, comme cela a été décrit pour l'inhibiteur 2 des activateurs du plasminogène (Belin *et al.* (1989)). De ce fait, l'ADN complémentaire pourrait très bien coder pour une α -D-mannosidase cytosolique que l'on pourrait retrouver par la suite dans le *reticulum* endoplasmique sous une forme distincte mais très semblable.

b) La *Man₉*-mannosidase

i) *Caractérisation, purification, spécificité de substrat*

En 1986, Schweden *et al.* purifient et caractérisent une α -D-mannosidase localisée dans les microsomes de foie de Veau possédant une masse moléculaire de 56 kDa. Cette enzyme est non retenue sur colonne de

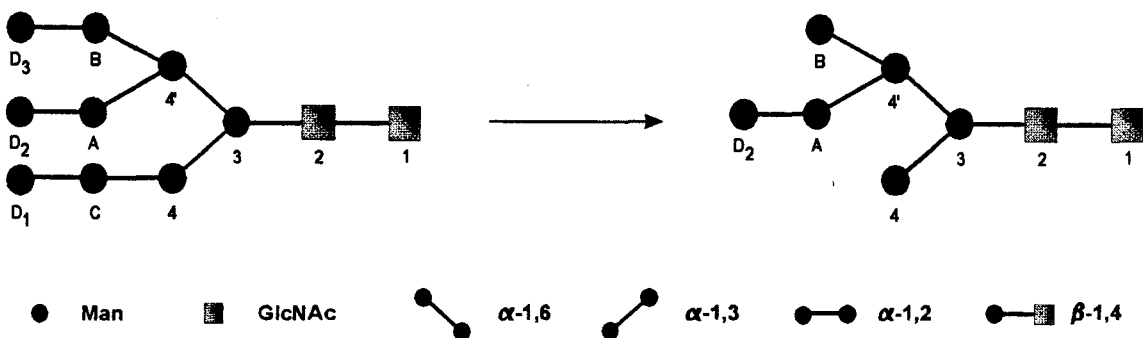


Figure 3 : Réaction catalysée par la *Man₉*-mannosidase du foie de Porc

Bause *et al.* (1992)

concanavalline A. Elle est activée par le calcium et inhibée par la désoxymannojirimycine (Tableau I page 36). Cette α -D-mannosidase a une spécificité de substrat très étroite. Elle hydrolyse 3 des 4 résidus de mannose liés en α -1,2 sur le substrat $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$. Elle est inactive vis-à-vis du produit final $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ formé, d'où son nom de Man_9 -mannosidase. La structure de ce produit final n'a été déterminée qu'en 1992 (Figure 3 page 32).

Ces caractéristiques la différenciaient des autres α -D-mannosidases décrites jusqu'alors. Seuls, Bischoff *et al.*, en 1986, avaient décrit la présence d'une telle activité mannosidasique, sensible à la désoxymannojirimycine et localisée dans le *reticulum* endoplasmique. En 1989, Schweden et Bause purifient de la même façon la Man_9 -mannosidase du foie de Porc. Cette α -D-mannosidase possède exactement les mêmes caractéristiques enzymatiques que la Man_9 -mannosidase du foie de Veau. La Man_9 -mannosidase native de foie de Porc possède une masse moléculaire de 65 kDa (déterminée par des études immunologiques), contrairement au fragment purifié d'une masse de 49 kDa (Tableau I page 36).

L'étroite spécificité de la Man_9 -mannosidase, active uniquement vis-à-vis du substrat de type $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, indique qu'elle intervient immédiatement après les glucosidases I et II (Elting *et al.* (1980), Grinna et Robbins (1979), Ugalde *et al.* (1979)) dans le processus de maturation des glycanes liés *N*-glycosidiquement. De cette spécificité, les auteurs en ont déduit sa localisation dans le *reticulum* endoplasmique.

ii) Clonage et topographie

En 1993, Bause *et al.*, ont cloné le gène codant pour la Man_9 -

mannosidase de rein humain. Ils ont isolé un fragment de 1875 nucléotides codant pour une protéine d'une masse moléculaire d'environ 71 kDa. La masse moléculaire de la Man₉-mannosidase de rein humain avait été évaluée à 73 kDa. L'analyse de la séquence codante indique que la Man₉-mannosidase est une protéine membranaire de type II possédant à l'extrémité *N*-terminale une séquence de 22 à 24 résidus d'acides aminés hydrophobes, à compter du 11^{ème} acide aminé, constituant à la fois le domaine transmembranaire et la séquence signal de localisation dans le *reticulum* endoplasmique.

La topographie globale du fragment *N*-terminal est semblable à celle d'autres enzymes intervenant dans la biosynthèse de glycanes liés *N*-glycosidiquement, telles que la mannosidase II (Moremen et Robbins (1991)), la β -1,4-galactosyltransférase (Russo *et al.* (1992)), l' α -1,3-galactosyltransférase (Joziase *et al.* (1989)), la β -galactoside α -2,6-sialyltransférase (Weinstein *et al.* (1987)) et l' α -D-mannosidase du *reticulum* endoplasmique chez *Saccharomyces cerevisiae* (Camirand *et al.* (1991)). Ces similitudes indiquent une structure commune possible, caractéristique de la partie *N*-terminale des protéines membranaires de type II.

Aucune similitude dans les séquences d'acides aminés correspondant au domaine C-terminal n'a été retrouvée avec l' α -1,2-mannosidase du *reticulum* endoplasmique de foie de Rat (Bischoff *et al.* (1990)) ou avec la mannosidase II de foie de Rat (Moremen et Robbins (1991)). Par contre, 5 régions variant de 8 à 29 résidus d'acides aminés sont similaires à celles retrouvées pour l' α -D-mannosidase du *reticulum* endoplasmique chez *Saccharomyces*

cerevisiae (Camirand *et al.* (1991)). De plus, une séquence consensus à compter de l'acide aminé 120 chez l' α -1,2-mannosidase du *reticulum* endoplasmique (l'acide aminé 240 pour la Man₉-mannosidase), correspondant à l'interaction avec les ions Ca⁺⁺, a été décelée (Strynadka et James (1989)). Ces deux enzymes sont activées par le calcium.

c) L' α -D-mannosidase kifunensine résistante

En 1993, Weng et Spiro ont mis en évidence une nouvelle α -D-mannosidase localisée dans le *reticulum* endoplasmique de foie de Rat (Tableau I page 36).

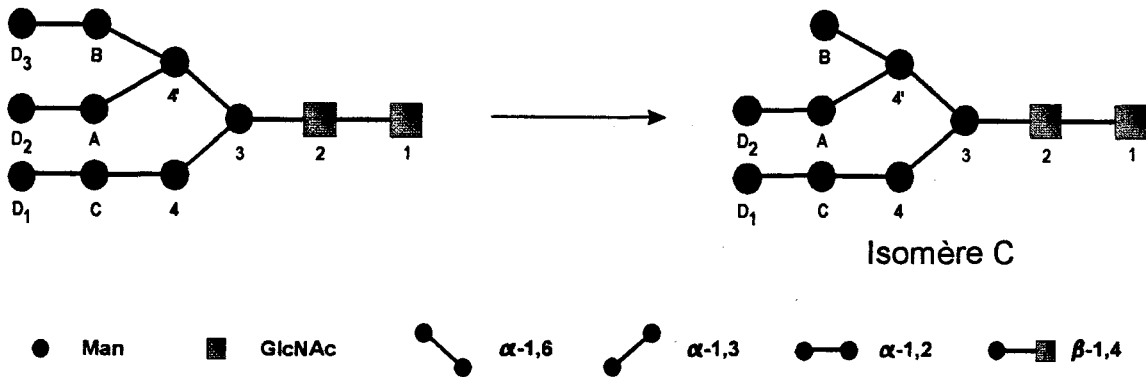


Figure 4 : Réaction catalysée par l' α -D-mannosidase kifunensine-résistante

Weng et Spiro (1993)

Cette enzyme a également une spécificité de substrat très étroite. Elle hydrolyse le mannose D₃ du substrat Man₉GlcNAc en clivant la liaison α -1,2 libérant ainsi l'isomère C de l'oligosaccharide Man₈GlcNAc (Figure 4).

De plus, elle a la particularité d'être résistante à la kifunensine,

Tableau I : α -D-mannosidases localisées dans le *reticulum* endoplasmique

Noms	Références	Masse moléculaire (kDa)	conA retenu	pH optimal	Inhibiteurs	Activateurs	Spécificité de substrat
Mannosidase membranaire (Rat)	Bischoff et Kornfeld (1983)	-	non	6,5	ni Sw, ni dMM	stabilisée par Co^{++}	<i>in vitro</i> , hydrolyse des liaisons α -1,2
Mannosidase soluble (Rat)	Bischoff et Kornfeld (1986)	350 sous unités 107	non	6,5	ni Sw, ni dMM	stabilisée par Co^{++}	<i>in vitro</i> , hydrolyse des liaisons α -1,2
Mannosidases (cellules UT1)	Bischoff <i>et al.</i> (1986)	- -	- -	- -	- dMM	- -	$Man_9GlcNAc_2 \rightarrow Man_8GlcNAc_2$: isomère B $Man_8GlcNAc_2 \rightarrow Man_6GlcNAc_2$
Mannosidase (cellules COS)	Rizzolo et Kornfeld (1988)	-	-	-	dMM	-	$Man_9GlcNAc_2 \rightarrow Man_8GlcNAc_2$: isomère B $GlcMan_9GlcNAc_2 \rightarrow GlcMan_8GlcNAc_2$
Man_9 -mannosidase (Bœuf)	Schweden <i>et al.</i> (1986)	56 (x1)	non	6,0 - 6,2	dMM $K_i = 7 \mu M$	Ca^{++}	$Man_9GlcNAc_2 \rightarrow Man_6GlcNAc_2$ $Glc_3Man_9GlcNAc_2 \rightarrow Glc_3Man_8GlcNAc_2$
Man_9 -mannosidase (Porc)	Schweden et Bause (1989) Bause <i>et al.</i> (1992)	49 (fragment)	non	6,0	dMM $K_i = 5 \mu M$	Ca^{++}	$Man_9GlcNAc_2 \rightarrow Man_6GlcNAc_2$
α -D-mannosidase kifunensine-résistante	Weng et Spiro (1993)	-	-	6,0 à 7,5	dMM, EDTA	-	$Man_9GlcNAc_2 \rightarrow Man_8GlcNAc_2$ Isomère C

jusqu'alors décrite comme étant un inhibiteur de la mannosidase I golgienne (Elbein *et al.* (1990)). Or, Weng et Spiro montrent que la kifunensine inhibe également l' α -1,2-mannosidase membranaire du *reticulum* endoplasmique décrite par Bischoff et Kornfeld en 1983. L' α -D-mannosidase kifunensine résistante et l' α -1,2-mannosidase membranaire du *reticulum* endoplasmique ont en commun de ne pas être inhibées par la désoxymannoji-rimycine.

Ces auteurs ont ainsi mis en évidence une nouvelle voie de dégradation des glycanes de type oligomannosidique dans le *reticulum* endoplasmique, avant le passage des *N*-glycosylprotéines, en voie de maturation, dans l'appareil de Golgi.

2) Les α -D-mannosidases de l'appareil de Golgi

Les premières études mettant en évidence une activité α -D-mannosidasique dans l'appareil de Golgi ont été menées par Dewald et Touster en 1973. Tulsiani *et al.* en 1977 ont purifié et caractérisé cette α -D-mannosidase golgienne du foie de Rat. Parallèlement, Tabas et Kornfeld (1979) ont purifié et caractérisé une deuxième activité α -D-mannosidasique golgienne du foie de Rat. Finalement, c'est en 1982 que Tulsiani *et al.* ont répertorié ces deux mannosidases sous leur nom actuel, suivant leur ordre d'intervention dans la maturation des *N*-glycosylprotéines :

- ✓ La mannosidase I constituée de deux isoformes : les mannosidases IA et IB
- ✓ La mannosidase II

Ces deux types de mannosidase se différencient par leur localisation au sein de l'appareil de Golgi, mais surtout par leur spécificité de substrat.

Une troisième activité mannosidasique golgienne a été mise en évidence par Lubas et Spiro en 1987 :

✓ l'endo- α -D-mannosidase du foie de Rat.

a) Les α -D-mannosidases IA et IB

i) Caractérisation, spécificité de substrat

L' α -D-mannosidase I a été partiellement purifiée et caractérisée par Tabas et Kornfeld (1979). Puis, Tulsiani et *al.* (1982b) montrèrent que l'enzyme pouvait être fractionnée en deux activités différentes :

1. l'enzyme non retenue sur colonne de phosphate de cellulose, inactive vis-à-vis du *p*-nitrophényl- α -D-mannoside; la mannosidase IA.
2. l'enzyme retenue sur cette colonne de phosphate de cellulose, active vis-à-vis du *p*-nitrophényl- α -D-mannoside; la mannosidase IB.

De plus, ces deux enzymes diffèrent par leur thermolabilité : la mannosidase IA étant thermostable, alors que la mannosidase IB est thermolabile.

Toutefois, elles sont similaires du point de vue de leur spécificité de substrat et de leur comportement vis-à-vis d'inhibiteurs. Les mannosidases IA et IB sont spécifiquement inhibées par la désoxymannojirimycine (inhibition non compétitive) (Bischoff et Kornfeld 1984) et elles dégradent toutes deux *in vitro* des substrats de nature Man₉GlcNAc pour former un

produit final de type $\text{Man}_5\text{GlcNAc}$ comme l'ont montré Tulsiani et Touster en 1988 (Figure 5 page 40).

Des études d'immunoprécipitation ont montré que l'anticorps dirigé contre la mannosidase IA réagissait également avec la mannosidase IB. Ces études immunologiques suggèrent que ces enzymes contiennent des sous-unités identiques ou dérivent d'un précurseur commun (Tulsiani et Touster (1988)). D'après ces auteurs, il est concevable d'admettre que les mannosidases IA et IB constituent deux isoformes de la même molécule, comme cela a été précédemment décrit pour les formes A et B de l' α -D-mannosidase lysosomique de foie humain (Cheng *et al.* (1986)) (voir page 61). Ces deux enzymes pourraient avoir un rôle physiologique différent. Elles présentent toutes deux des taux d'activité similaires dans l'appareil de Golgi (Tulsiani *et al.* (1982b)) mais, il est possible que les mannosidases IA et IB soient impliquées différemment dans la biosynthèse des glycanes des *N*-glycosylprotéines. Chaque enzyme serait responsable de l'hydrolyse de résidus de mannose particuliers parmi les quatre possibles provenant des glycanes de type oligomannosidique de la *N*-glycosylprotéine.

ii) *Purification, localisation*

La mannosidase IA a été purifiée et caractérisée par Tulsiani et Touster en 1988 (Tableau IV page 47). Cette enzyme possède une masse moléculaire de 230 kDa et serait constituée de 4 sous-unités (2 x 57 et 2 x 58 kDa). Se référant à ses interactions avec la concanavaline A et à sa sensibilité à l'endoglycosidase H, la mannosidase IA semble être une glycoprotéine constituée d'une à deux chaînes oligosaccharidiques. L'acide sialique, le

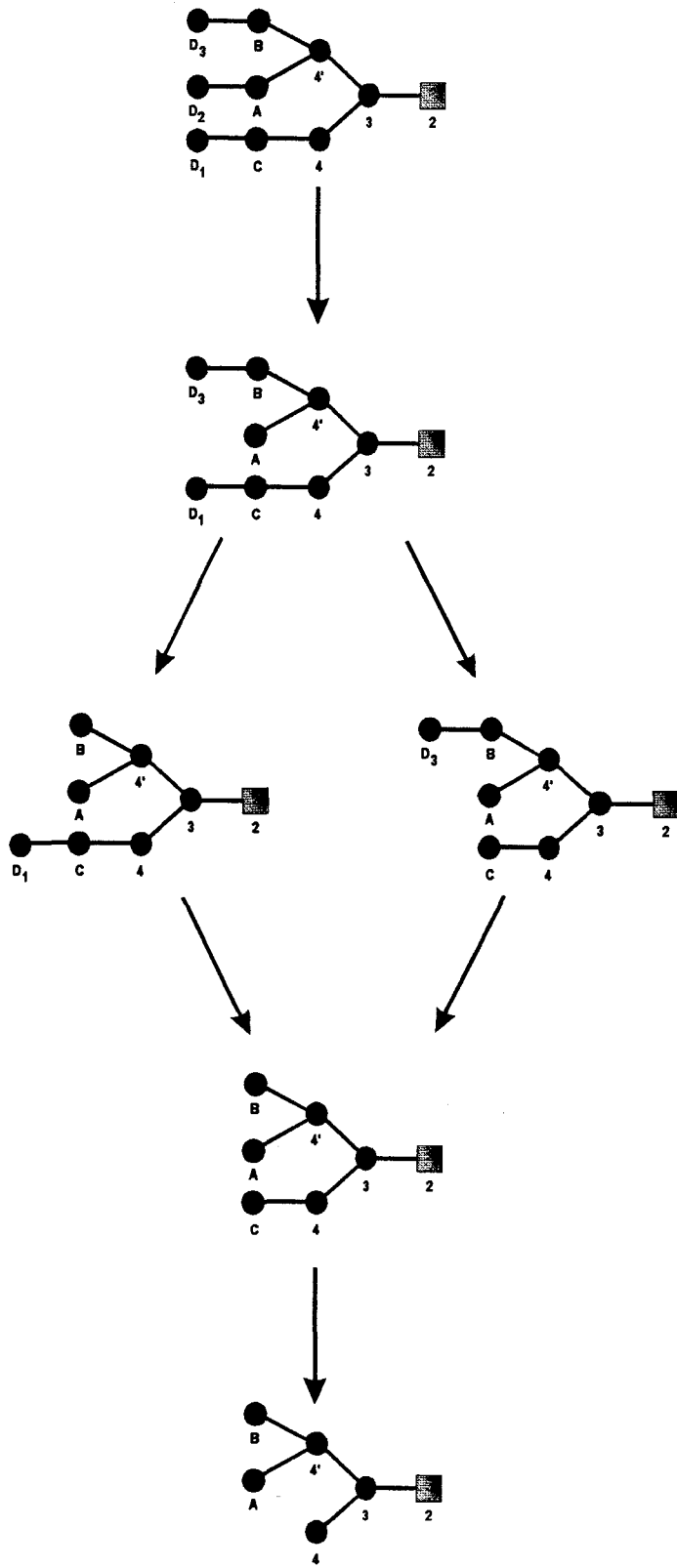


Figure 5 : Hydrolyse des résidus de mannose réalisée par l' α -D-mannosidase IA de l'appareil de Golgi

Tulsiani et Touster (1988)



galactose et la *N*-acétylglucosamine, caractéristiques des glycoprotéines de type *N*-acétyllactosaminique, sont absents des structures glycaniques, ce qui serait en accord avec la localisation subcellulaire de l'enzyme dans la région *cis* de l'appareil de Golgi (Dunphy *et al.* (1981), Pohlmann *et al.* (1982), Rothman (1981)). Néanmoins, des études récentes ont montré que la localisation subcellulaire des α -D-mannosidases I ne se résumait pas uniquement à la région *cis* de l'appareil de Golgi (Velasco *et al.* (1993)). Ces auteurs démontrent, par microscopie électronique et immunofluorescence, que la localisation de l' α -D-mannosidase I varie selon le type cellulaire (Tableau II). Ils décrivent non seulement des variations dans la distribution de l' α -D-mannosidase I dans les différentes citernes de l'appareil de Golgi, mais aussi une localisation de cette enzyme à la surface de la membrane plasmique d'entérocytes et de cellules acineuses pancréatiques. Toutefois, aucune fonction n'ayant été attribuée à l' α -D-mannosidase I liée à la membrane plasmique, il reste à déterminer si cette enzyme est active ainsi localisée.

Tableau II : Localisation de l' α -D-mannosidase I suivant le type cellulaire

Cellules caliciformes	Entérocytes	Cellules acineuses pancréatiques	Hépatocytes
<i>trans</i>	médian, <i>trans</i> et membrane plasmique	médian, <i>trans</i> et membrane plasmique	<i>cis</i> , médian et <i>trans</i>

b) L' α -D-mannosidase II

i) Caractérisation

La mannosidase II constitue une enzyme clef de la biosynthèse des N-glycosylprotéines. Son intervention dans l'hydrolyse des mannoses conduit à la formation de glycannes de type N-acétyllactosaminique. Sa non intervention conduit à la formation de glycannes de type oligomannosidique ou hybride (Tulsiani et Touster (1983)). Décrite pour la première fois en 1973 par Dewald et Touster, cette enzyme a été purifiée dans un premier temps par Tulsiani *et al.* (1977). Il s'agit d'une glycoprotéine membranaire (retenue sur colonne de concanavaleine A et solubilisée par le triton X100 (0,1%)) dont le pH optimal est de 5,5. Elle est activée par le zinc et le cobalt et inhibée par la swainsonine (Tulsiani *et al.* (1982a)) (Tableau IV page 47).

Des études ultérieures ont permis de mieux caractériser la mannosidase II. Moremen et Touster (1985) ont montré que la mannosidase II golgienne de foie de Rat présente en gel de polyacrylamide, une masse moléculaire apparente de 124 kDa. L'activité catalytique de la mannosidase II est localisée sur un domaine hydrophile de 110 kDa, résistant à la protéolyse par la chymotrypsine, la pronase ou la protéinase K (Moremen et Touster (1986)). Ce domaine catalytique hydrophile est maintenu dans la lumière de l'appareil de Golgi par l'intermédiaire d'un domaine hydrophobe N-terminal de 14 kDa (Moremen *et al.* (1991)), sensible à ces mêmes protéases. Baron et Garoff (1990) et Moremen *et al.* (1991), ont démontré que la mannosidase II était constituée d'un dimère relié par un pont disulfure.

ii) Spécificité de substrat

Parallèlement à ces travaux, Tabas et Kornfeld (1978) Opheim et Touster (1978) et Harpaz et Schachter (1980) ont montré que la mannosidase II avait une spécificité de substrat très étroite. Elle n'hydrolyse les résidus de mannose A et B qu'après transfert par la *N*-acétyl-glucosaminyltransférase I d'une glucosamine sur le mannose 4 (Figure 6 page 43).

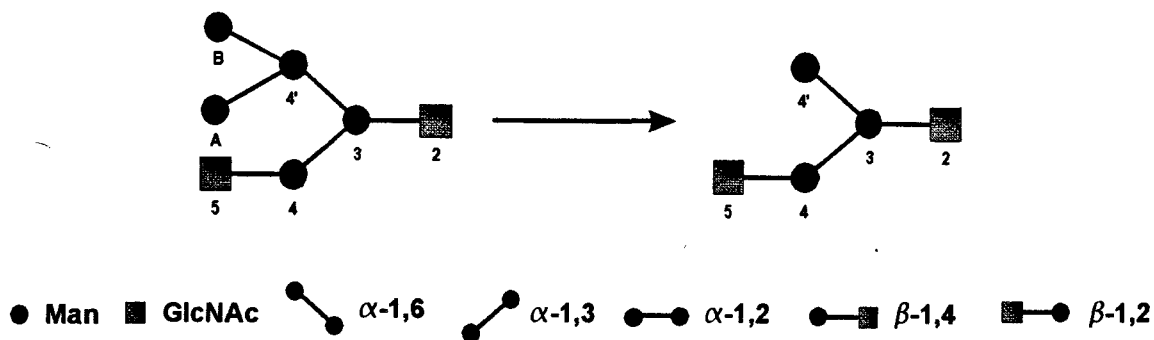


Figure 6 : Hydrolyse des résidus de mannose A et B réalisée par la mannosidase II de l'appareil de Golgi

Tabas et Kornfeld (1978)

Elle tient d'ailleurs son nom de son ordre d'intervention dans la biosynthèse des glycoprotéines dans l'appareil de Golgi et de sa dépendance vis-à-vis de l'activité *N*-acétyl-glucosaminyltransférase de type I : on l'appelle aussi l' α -D-mannosidase II GlcNAc-transférase I dépendante.

Tulsiani *et al.* (1982b) ont démontré que les mannosidases IA et IB étaient les enzymes qui hydrolysaient les substrats de type $\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ pour former les intermédiaires glycaniques de type $\text{Man}_5\text{GlcNAc}$ (Figure 5 page 40), alors que la mannosidase II était celle qui clivait les glycannes de type $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}$. Shao *et al.* (1989) ont démontré par la suite que

la première étape de cette réaction consistait en l'hydrolyse du résidu de mannose lié en α -1,6.

iii) Localisation

La mannosidase II a longtemps été considérée comme un marqueur de la partie médiane de l'appareil de Golgi, suite à la démonstration de la localisation de la *N*-acétylglucosaminyltransférase I dans les citernes *cis* de l'appareil de Golgi des cellules CHO par Dunphy *et al.* (1985). Mais, de même que pour les mannosidases I, la localisation de la mannosidase II au sein de l'appareil de Golgi est encore aujourd'hui discutée. Alors que Goldberg et Kornfeld (1983) ont montré que la mannosidase II se situait plutôt dans la partie médiane de l'appareil de Golgi dans les cellules de lymphome de Souris, Novikoff *et al.* (1983) démontraient que, dans les hépatocytes, par immunolocalisation, la mannosidase II recouvrait l'ensemble des citernes de l'appareil de Golgi, mais aussi le *reticulum* endoplasmique. Plus récemment, Schwaninger *et al.* (1991), en travaillant sur des cellules CHO perméabilisées, ont montré que la mannosidase II et la *N*-acétylglucosaminyltransférase I étaient situées dans le *cis*-Golgi.

Tableau III : Localisation de l' α -D-mannosidase II suivant le type cellulaire

Cellules caliciformes	Entérocytes	Cellules acineuses pancréatiques	Hépatocytes	Cellules CHO
<i>trans</i>	médian, <i>trans</i> et membrane plasmique	médian, <i>trans</i> et membrane plasmique	<i>cis</i> , médian et <i>trans</i>	médian

Enfin, Velasco *et al.* (1993) ont étudié la localisation des mannosidases I et II par immunofluorescence et microscopie électronique pour différents types de cellules. La mannosidase II est largement répartie dans les citernes médianes et *trans* de l'appareil de Golgi, mais des différences de localisation apparaissent suivant qu'il s'agisse de cellules caliciformes, d'entérocytes, de cellules acineuses pancréatiques, d'hépatocytes ou de cellules CHO (Tableau III page 44).

iv) Clonage

Afin de déterminer par quel mécanisme la mannosidase II reste ancrée dans la membrane de l'appareil de Golgi, Moremen (1989) a isolé un fragment du gène codant pour l' α -D-mannosidase II golgienne de foie de Rat. En 1991, Moremen et Robbins ont isolé, caractérisé et exprimé les ADN complémentaires codant pour l' α -D-mannosidase de Souris. La séquence codante préfigure une protéine transmembranaire de type II, composée d'un petit fragment cytoplasmique (5 acides aminés), d'un seul domaine transmembranaire (21 acides aminés) et d'un large domaine catalytique C-terminal (1124 acides aminés). Ceci se rapproche de la description de la plupart des glycosyltransférases de l'appareil de Golgi (Paulson et Colley (1989)).

Fukuda *et al.* (1990) ont d'autre part montré que la déficience du gène codant pour l' α -D-mannosidase II était à l'origine d'une maladie génétique de type autosomal récessif chez l'Homme : l'anémie dysérythropoïétique congénitale de type II (HEMPAS).

c) L'endo- α -D-mannosidase

Lubas et Spiro ont mis en évidence en 1987 une activité mannosidasiqque capable de cliver un substrat de type $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ pour libérer un produit de type $\text{Man}_8\text{GlcNAc}$ (Tableau IV page 47). L'activité spécifique de l'endo- α -D-mannosidase était 70 fois plus élevée dans l'appareil de Golgi que dans le *reticulum* endoplasmique. Afin d'élucider le rôle de l'endo- α -D-mannosidase golgienne, Lubas et Spiro en 1988 ont montré que cette enzyme était également active *in vitro* vis-à-vis d'oligosaccharides de type $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ à $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ (Figure 7). D'autre part, en 1990, Moore et Spiro ont démontré que l'endo- α -D-mannosidase était à l'origine d'une voie de biosynthèse des *N*-glycosylprotéines indépendante de l'intervention des α -glucosidases du *reticulum* endoplasmique.

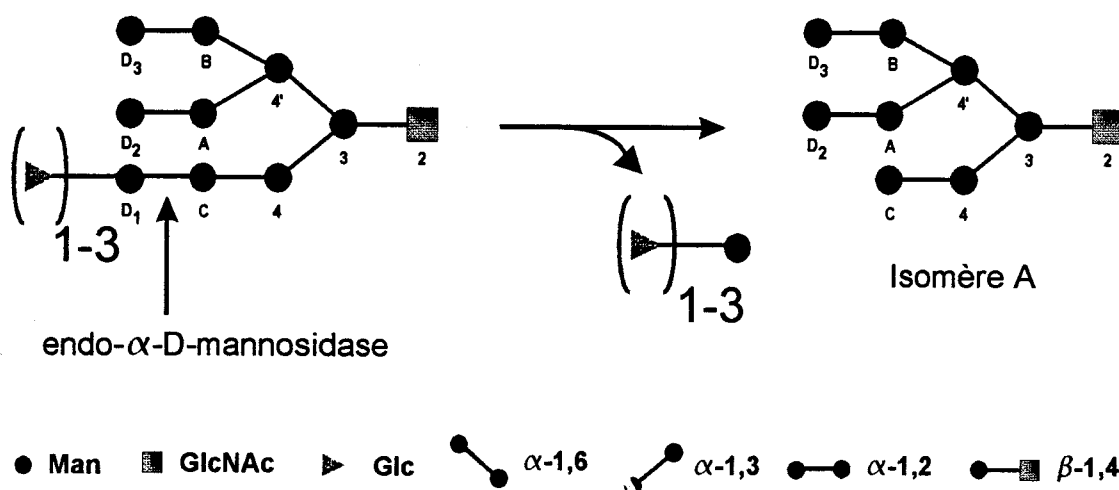


Figure 7 : Spécificité de substrat de l'endo- α -D-mannosidase de l'appareil de Golgi

Lubas et Spiro (1988)

Tableau IV : α -D-mannosidases localisées dans l'appareil de Golgi

Nom	Références	Localisation	Masse moléculaire (kDa)	conA retenu	pH optimal	Inhibiteurs	Activateurs	Spécificité de substrat
Mannosidase IA (foie de Rat)	Tulsiani et Touster (1988)	<i>cis</i>	230 (57x2 et 58x2)	oui	6,0	dMM	-	Man ₉ GlcNAc → Man ₅ GlcNAc
Mannosidase IB (foie de Rat)	Tulsiani et al. (1982b)	<i>cis</i>	-	oui	6,0	dMM	-	Man ₉ GlcNAc → Man ₅ GlcNAc
Mannosidase II (foie de Rat)	Tulsiani et al. (1982b) Novikoff et al. (1983) Moremen et Touster (1986)	<i>cis, médian, trans</i>	124	oui	5,5	Sw	Zn ⁺⁺ , Co ⁺⁺	GlcNAcMan ₅ GlcNAc → GlcNAcMan ₃ GlcNAc
Endo- α -D- mannosidase (foie de Rat)	Lubas et Spiro (1987) Lubas et Spiro (1988) Moore et Spiro (1990)	-	-	retenue sur WGA	~ 7,0	ni dMM, ni Sw	-	Glc ₍₁₋₃₎ Man ₉ GlcNAc → Man ₈ GlcNAc Isomère A

3) Intervention dans les phénomènes de maturation des glycannes des *N*-glycosylprotéines

La maturation des glycannes des *N*-glycosylprotéines fait suite à l'élaboration de l'oligosaccharide précurseur $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ assemblé sur un intermédiaire polyprénolique (Figure 8 page 48) au cours du cycle des dolichols (Parodi et Leloir (1979), Robbins *et al.* (1977), Li *et al.* (1978)) (Figure 9 page 50).

Le dolichol est une famille de lipides polyisopréniques (Beytia et Porter (1976), Hemming (1974)) possédant de 17 à 21 unités d'isoprène chez les eucaryotes. Ces substances peuvent être phosphorylées, estérifiées par un acide gras ou, sous la forme d'un alcool libre. Le dolichol se lie à la fraction glycanique par l'intermédiaire de son dérivé pyrophosphorylé.

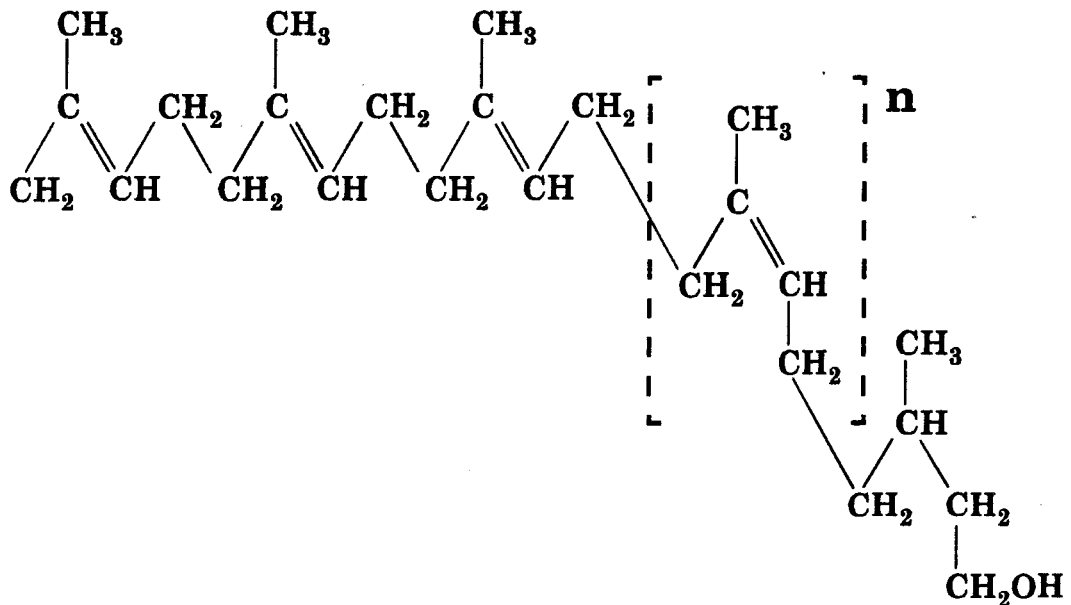


Figure 8 : Structure du dolichol

La synthèse du mégaloglycane s'effectue en deux parties :

- ◆ élaboration du composé $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ (noté M_5 sur la Figure 9 page 50) sur la face cytosolique du *reticulum* endoplasmique.
- ◆ formation du composé $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ (noté G_3M_9 sur la Figure 9) par addition de résidus de mannose et de glucose dans la lumière du *reticulum* endoplasmique.

Les différentes étapes de la maturation des glycanes liés *N*-glycosidiquement et leur localisation subcellulaire schématisées sur la Figure 10 (page 52), font référence aux revues générales de Hubbard et Ivatt (1981), de Kornfeld et Kornfeld (1985) et de Roth (1987).

La maturation débute par la glycosylation des protéines dans la lumière du *reticulum* endoplasmique, par le transfert « en bloc » du mégaloglycane sur un résidu d'asparagine de la chaîne peptidique naissante (réaction 1).

Deux voies de maturation sont alors possibles. Suivant la voie I, le glycanne subit un élagage par les glucosidases et les mannosidases au sein du *reticulum* endoplasmique. Par la voie II, la glycoprotéine transite par un système vésiculaire vers l'appareil de Golgi. Cette voie II affecte des *N*-glycosylprotéines possédant des glycanes à 2 ou 3 glucoses terminaux.

Selon la voie I, au sein du *reticulum* endoplasmique, le résidu de glucose terminal est hydrolysé par l' α -1,2-glucosidase I (réaction 2). Les 2 résidus de glucose suivants sont ensuite hydrolysés (réaction 3) par une seule enzyme, l' α -1,3-glucosidase II. La glycoprotéine subit alors, suivant sa nature, l'hydrolyse par une des trois α -D-mannosidases mises en évidence

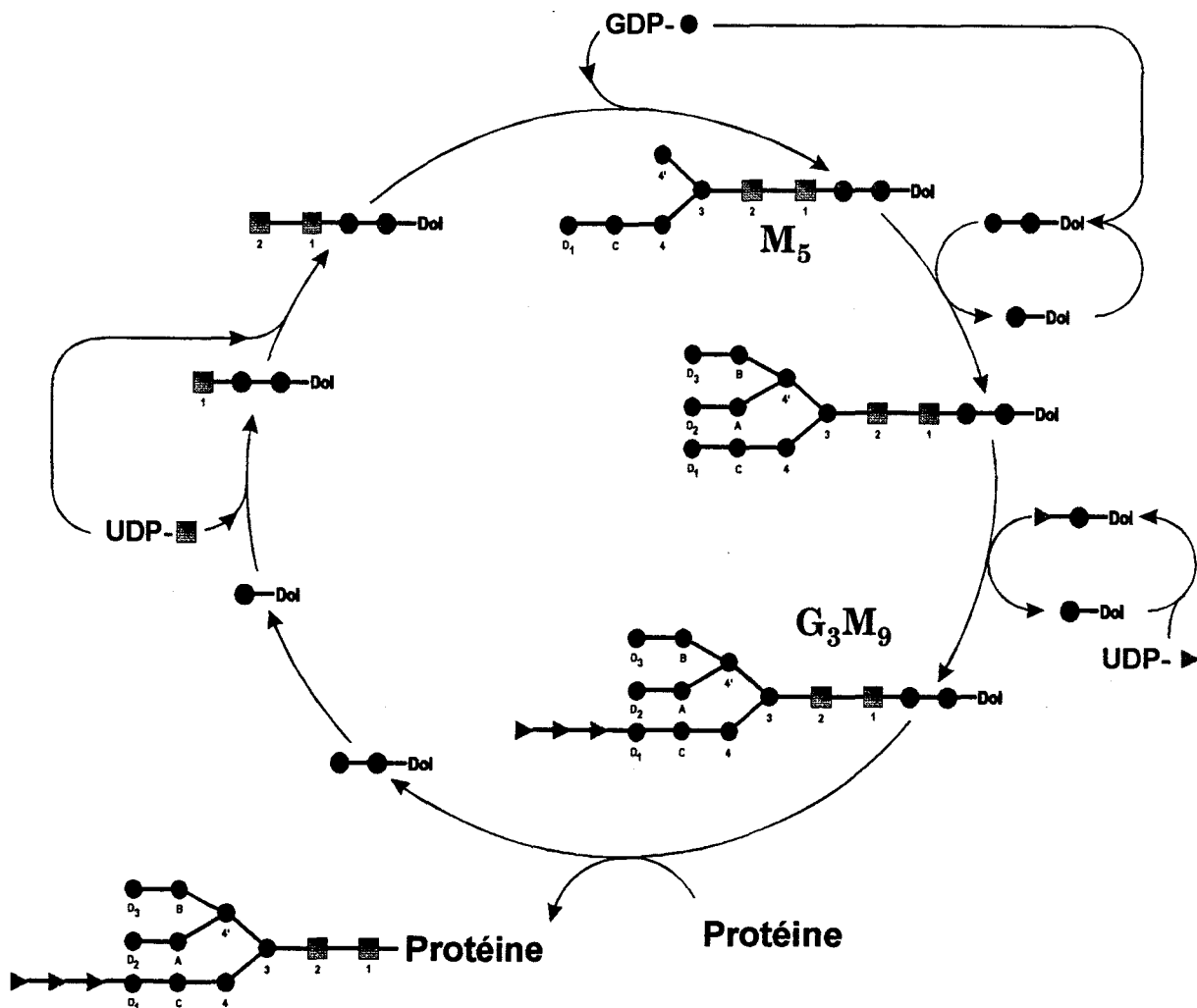


Figure 9 : Le cycle des dolichols

▲, Glc; ■, GlcNAc; ●, Man; ●, phosphoryl; Dol, dolichol.



dans le *reticulum* endoplasmique. L' α -1,2-mannosidase du *reticulum* endoplasmique (voir page 28) libère l'isomère B du composé $\text{Man}_8\text{GlcNAc}$ (réaction 4). L'isomère C de ce même composé est obtenu (réaction 5) après hydrolyse par l' α -D-mannosidase kifunensine résistante (voir page 35). La Man_9 -mannosidase (voir page 32) hydrolyse 3 des 4 résidus de mannose liés en α -1,2 sur le composé de type $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (réaction 6). A l'exception des protéines résidentes dans le *reticulum* endoplasmique, les protéines nouvellement synthétisées transitent alors vers la région *cis* de l'appareil de Golgi de la même façon que les *N*-glycosylprotéines ayant suivi la voie II.

A ce stade, une partie des *N*-glycosylprotéines, les hydrolases adressées au lysosome, subit une phosphorylation spécifique conduisant à la formation d'un composé de type mannose-6-phosphate par l'intermédiaire de deux enzymes; la *N*-acétylglucosaminylphosphotransférase (Reitman et Kornfeld (1981), Waheed *et al.* (1982)) et la *N*-acétylglucosamine-1-phosphodiester α -*N*-acétylglucosaminidase (Varki et Kornfeld (1981), Waheed *et al.* (1981)). Les oligosaccharides de type oligomannosidique des glycoprotéines non lysosomiques ayant suivi la voie II, sont hydrolysés (réaction 8) par l'endo- α -D-mannosidase (voir page 46). Les α -D-mannosidases I (voir page 38) hydrolysent alors l'ensemble des glycoprotéines ayant suivi les voies I et II (réactions 7 et 9). Ces réactions peuvent tout aussi bien se dérouler dans la partie *cis*, médiane ou *trans* de l'appareil de Golgi (voir page 41).

Dans la partie médiane, la *N*-acétylglucosaminyltransférase I greffe un résidu de *N*-acétylglucosamine sur les chaînes oligosaccharidiques destinées

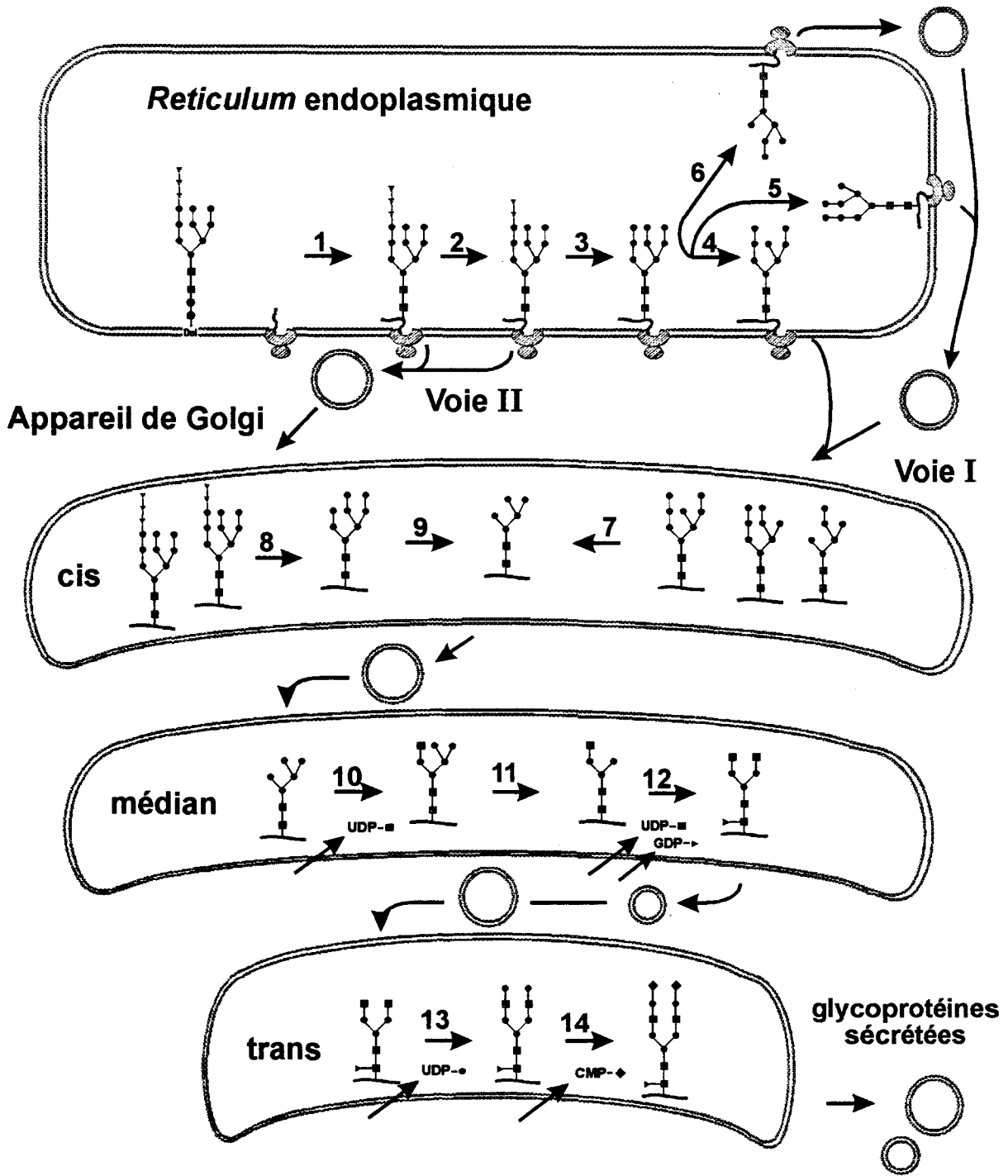


Figure 10 : Les différentes étapes de la maturation des glycanes des N-glycosylprotéines

- | | |
|---|---|
| 1 : oligosaccharyl transférase | 8 : endo- α -mannosidase |
| 2 : α -glucosidase I | 9 : α -mannosidase I |
| 3 : α -glucosidase II | 10 : N-acétylglucosaminyltransférase I |
| 4 : α -1,2-mannosidase du <i>reticulum</i> | 11 : α -mannosidase II |
| 5 : α -mannosidase kifunensine résistante | 12 : fucosyltransférase et N-acétylglucosaminyltransférase II |
| 6 : Man ⁶ -mannosidase | 13 : galactosyltransférase |
| 7 : α -mannosidase I | 14 : sialyltransférase |

► : Fuc ● : Gal ▼ : Glc ■ : GlcNAc ● : Man ◆ : NeuAc ⊙ : phosphoryl Dol : dolichol.



à former des structures de type *N*-acétyllactosaminique ou hybride (réaction 10). En ce qui concerne les futures glycoprotéines de type *N*-acétyllactosaminique, ce transfert est suivi de l'hydrolyse par l' α -D-mannosidase II (voir page 42) des 2 résidus de mannose, liés en α -1,3 et α -1,6 sur le core (réaction 11). Les dernières étapes de la maturation consistent au transfert de résidus de *N*-acétylglucosamine, de fucose et d'acide *N*-acétylneuraminique afin de parfaire l'élaboration des glycanes de type *N*-acétyllactosaminique (réactions 12 à 14).

B. Les α -D-mannosidases particulières

1) L' α -1,2/ α -1,3/ α -1,6-mannosidase

En se basant sur le fait que la swainsonine, un inhibiteur des α -D-mannosidases lysosomiques (Dorling *et al.* (1980)) et de l' α -D-mannosidase II (Tulsiani *et al.* (1982a)), engendrait des troubles neurologiques chez de nombreuses espèces, Tulsiani et Touster, en 1985, ont étudié l' α -D-mannosidase de cerveau de Rat. Ils ont alors été surpris de constater que la swainsonine n'affectait pas le comportement des Rats. D'autre part, ils n'ont pas observé l'accumulation d'oligosaccharides dans leur cerveau. Ils ont ainsi mis en évidence une nouvelle α -D-mannosidase localisée dans les microsomes de cerveau de Rat. Contrairement à l' α -D-mannosidase du *reticulum* endoplasmique (voir page 28) et aux α -D-mannosidases IA et IB (voir page 38), uniquement actives vis-à-vis des résidus de mannose liés en α -1,2, l' α -D-mannosidase microsomale de cerveau de Rat hydrolyse *in vitro* toutes

les liaisons des glycanes de type oligomannosidique. Cette enzyme se distingue aussi de l' α -D-mannosidase II golgienne (voir page 42) car elle est capable de cliver des substrats de type $\text{Man}_5\text{GlcNAc}$ ou $\text{Man}_4\text{GlcNAc}$, sans dépendre au préalable du transfert d'un résidu de *N*-acétylglucosamine sur le mannose 4.

L' α -D-mannosidase microsomale du cerveau de Rat, à elle seule, hydrolyse donc les glycanes liés *N*-glycosidiquement de type oligomannosidique jusqu'à la formation du core $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ qui peut alors se différencier en glycanne de type *N*-acétyllactosaminique suite à l'intervention de différentes glycosyltransférases (Tableau V page 57).

Cette activité enzymatique particulière a par la suite été mise en évidence en utilisant les cellules BHK (Monis *et al.* (1987)). Ces auteurs ont, en effet, caractérisé une α -D-mannosidase qui hydrolyse les substrats de type $\text{Man}_6\text{GlcNAc}$ et $\text{Man}_5\text{GlcNAc}$ pour former un produit final de type $\text{Man}_3\text{GlcNAc}$, d'où son premier nom d' α -1,3/ α -1,6-mannosidase spécifique. Cette activité se retrouvait pleinement en utilisant des souches mutantes déficientes en *N*-acétylglucosaminyltransférase I.

En 1991, Bonay et Hughes ont purifié cette α -D-mannosidase du foie de Rat (Tableau V page 57). Ils ont montré, tout comme Tulsiani et Touster (1985), pour la mannosidase microsomale du cerveau de Rat, que l'enzyme dégrade des substrats de type $\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ jusqu'à la formation du produit final $\text{Man}_3\text{GlcNAc}$ (Figure 11 page 55), d'où son nom définitif d' α -1,2/ α -1,3/ α -1,6-mannosidase.

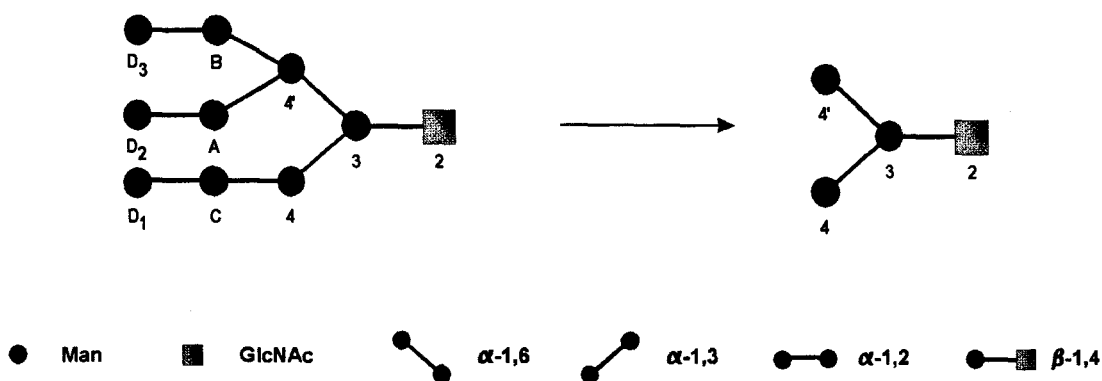


Figure 11 : Spécificité de substrat de l' α -1,2/ α -1,3/ α -1,6-mannosidase

Bonay et Hughes (1991)

Cette dernière est localisée dans le *reticulum* endoplasmique, l'appareil de Golgi et les endosomes (Bonay *et al.* (1992)).

2) Les α -D-mannosidases de la membrane plasmique et soluble de spermatozoïde de Rat

En 1989, Tulsiani *et al.* ont mis en évidence une nouvelle activité mannosidasique ancrée dans la membrane plasmique du spermatozoïde. Cette enzyme est activée par le cobalt et le manganèse, et inhibée par le zinc et le cuivre. De plus, elle possède des caractéristiques bien différentes de l' α -D-mannosidase lysosomique du spermatozoïde préalablement décrite (Tulsiani *et al.* (1988)), vis-à-vis de son pH optimal et de sa spécificité de substrat (Tableau V page 57).

Le rôle physiologique de cette α -D-mannosidase n'est pas encore élucidé. Toutefois, l' α -D-mannosidase de la membrane plasmique de spermatozoïde de Rat pourrait avoir une fonction dans la reconnaissance d'oligosaccharides à mannose présents dans la zone pellucide.

En 1993, Tulsiani *et al.* ont purifié une α -D-mannosidase soluble présente dans les spermatozoïdes localisés dans l'épididyme. Ces auteurs, en se basant sur des études immunologiques, pensent que les mannosidases soluble et liée à la membrane plasmique sont deux isoformes enzymatiques. Deux mécanismes de formation de ces isoformes peuvent être avancés :

1. Les deux α -D-mannosidases pourraient être produites suivant des voies biosynthétiques différentes, suite à l'épissage d'un ARN messenger primaire, ou suite à la transcription de deux gènes différents.
2. Des événements post-traductionnels pourraient être à l'origine de l'obtention de deux isoformes enzymatiques. La protéolyse de l' α -D-mannosidase de la membrane plasmique serait à l'origine de la libération de la forme soluble biologiquement active, tout comme Ehlers et Riordan (1991) ont pu le décrire pour d'autres protéines membranaires.

3) L' α -1,2 mannosidase phospholipidique et calcium dépendante

En 1981, Forsee et Schutzbach ont mis en évidence une α -D-mannosidase microsomale dans le foie de Lapin. Cette enzyme hydrolyse les résidus de mannose liés en α -1,2 du substrat $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ linéaire. Elle est inhibée par l'EDTA, activée par le calcium (Tableau V page 57). L'enzyme partiellement purifiée est plus active en présence de phospholipides spécifiques tels que la phosphatidylcholine ou la phosphatidyléthanolamine. Forsee *et al.*, en 1982, ont démontré que l'activité α -1,2-mannosidasique de foie

Tableau V : α -D-mannosidases particulières

Nom	Références	Localisation	Masse moléculaire (kDa)	conA retenu	pH optimal	Inhibiteurs	Activateurs	Spécificité de substrat
α -1,2/ α -1,3/ α -1,6-mannosidase (cerveau de Rat)	Tulsiani et Touster (1985)	microsomes	-	non	6,0	ni dMM, ni Sw	-	Man ₉ GlcNAc → Man ₃ GlcNAc
α -1,2/ α -1,3/ α -1,6-mannosidase (foie de Rat)	Monis <i>et al.</i> (1987) Bonay et Hughes (1991) Bonay <i>et al.</i> (1992)	<i>reticulum</i> , Golgi et endosomes	220 (2x110)	-	6,1 à 6,5	EDTA, Zn ⁺⁺ et Cu ⁺⁺ ni dMM, ni Sw	stabilisée par le Co ⁺⁺	Man ₉ GlcNAc Man ₃ GlcNAc
Mannosidase de la membrane plasmique du spermatozoïde de Rat	Tulsiani <i>et al.</i> (1989)	site catalytique à la surface du spermatozoïde	-	-	6,2 à 6,5	Cu ⁺⁺ et Zn ⁺⁺	Co ⁺⁺ , Mn ⁺⁺	Man ₉ GlcNAc ou Man ₈ GlcNAc → Man ₃ GlcNAc Man ₅ GlcNAc → Man ₄ GlcNAc
Mannosidase du fluide épидидymal de Rat	Tulsiani <i>et al.</i> (1993)	Enzyme soluble des spermatozoïdes matures	460 (115x4)	-	6,2 à 6,5	mannosamine (1 mM)	-	Man ₉ GlcNAc ou Man ₈ GlcNAc → Man ₃ GlcNAc Man ₅ GlcNAc → Man ₄ GlcNAc
α -1,2 mannosidase phospholipidique et calcium dépendante (Lapin)	Forsee et Schutzbach (1981) Forsee <i>et al.</i> (1989)	microsomes	52 (x1)	oui	5,0 - 6,0	dMM, EDTA	Ca ⁺⁺ phospholipides	<i>in vitro</i> , hydrolyse des liaisons α -1,2

de Lapin était dépendante de la structure des membranes microsomales. En 1989, Forsee *et al.* ont purifié et caractérisé cette activité enzymatique. L' α -1,2-mannosidase microsomale de foie de Lapin est une glycoprotéine (retenue sur colonne de concanavaline A) monomérique de 52 kDa. Elle est inhibée par la désoxymannojirimycine, activée par le calcium (Tableau V page 57). Ces auteurs ont montré que l' α -1,2-mannosidase était active vis-à-vis des substrats de type $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ et $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ linéaire, mais aucun rôle spécifique dans la maturation des glycanes liés *N*-glycosidiquement ne lui a été attribuée.

C. Les α -D-mannosidases impliquées dans le catabolisme des glycanes des *N*-glycosylprotéines

Les α -D-mannosidases du lysosome ont été, jusqu'à ce jour, particulièrement étudiées dans la mesure où elles jouent un rôle important dans la dégradation des *N*-glycosylprotéines possédant des glycanes de type oligomannosidique, mais aussi par le fait que la déficience en α -D-mannosidase est à l'origine, chez de nombreuses espèces, d'une maladie génétique de surcharge lysosomique, la mannosidose (Jolly *et al.* (1981)) décrite pour la première fois par Öckerman en 1967.

Toutefois, le lysosome n'est pas le seul compartiment intervenant dans le catabolisme. Le cytosol pourrait également jouer un rôle dans la dégradation des glycanes des *N*-glycosylprotéines. Ainsi, ces deux compartiments auraient une complémentarité d'action dans le catabolisme des glycanes liés *N*-glycosidiquement.

1) Les α -D-mannosidases du lysosome

Les enzymes lysosomiques sont synthétisées de deux façons différentes :

1. Les hydrolases solubles sont synthétisées sous la forme de précurseurs de haute masse moléculaire (Hasilik et Neufeld (1980a)), possédant certains mannoses de glycannes de type oligomannosidique phosphorylés en 6 (Hasilik et Neufeld (1980b)). Ces glycannes à mannose-6-phosphate constituent des signaux de reconnaissance pour les futures hydrolases lysosomiques. Ces enzymes s'associent à un récepteur à mannose-6-phosphate de 46 kDa cation-dépendant (Hoflack et Kornfeld (1985a et b)) ou de 215 kDa cation-indépendant (Sahagian *et al.* (1981)) dans le *trans* Golgi. Elles sont ensuite adressées au lysosome *via* un des deux compartiments prélysosomiques appelés « early ou late endosome », où elles se dissocient de leur récepteur (Dahms *et al.* (1989)).
2. Un certain nombre de glycoprotéines lysosomiques ne possède pas le signal de reconnaissance de type mannose-6-phosphate. Ces enzymes membranaires ou solubles sont sécrétées puis endocytées (Dahms *et al.* (1989)). La plupart de ces glycoprotéines membranaires lysosomiques possède un signal de reconnaissance constitué du motif peptidique suivant : Gly-Tyr-X-X localisé sur leur domaine cytosolique (Nabi (1993)).

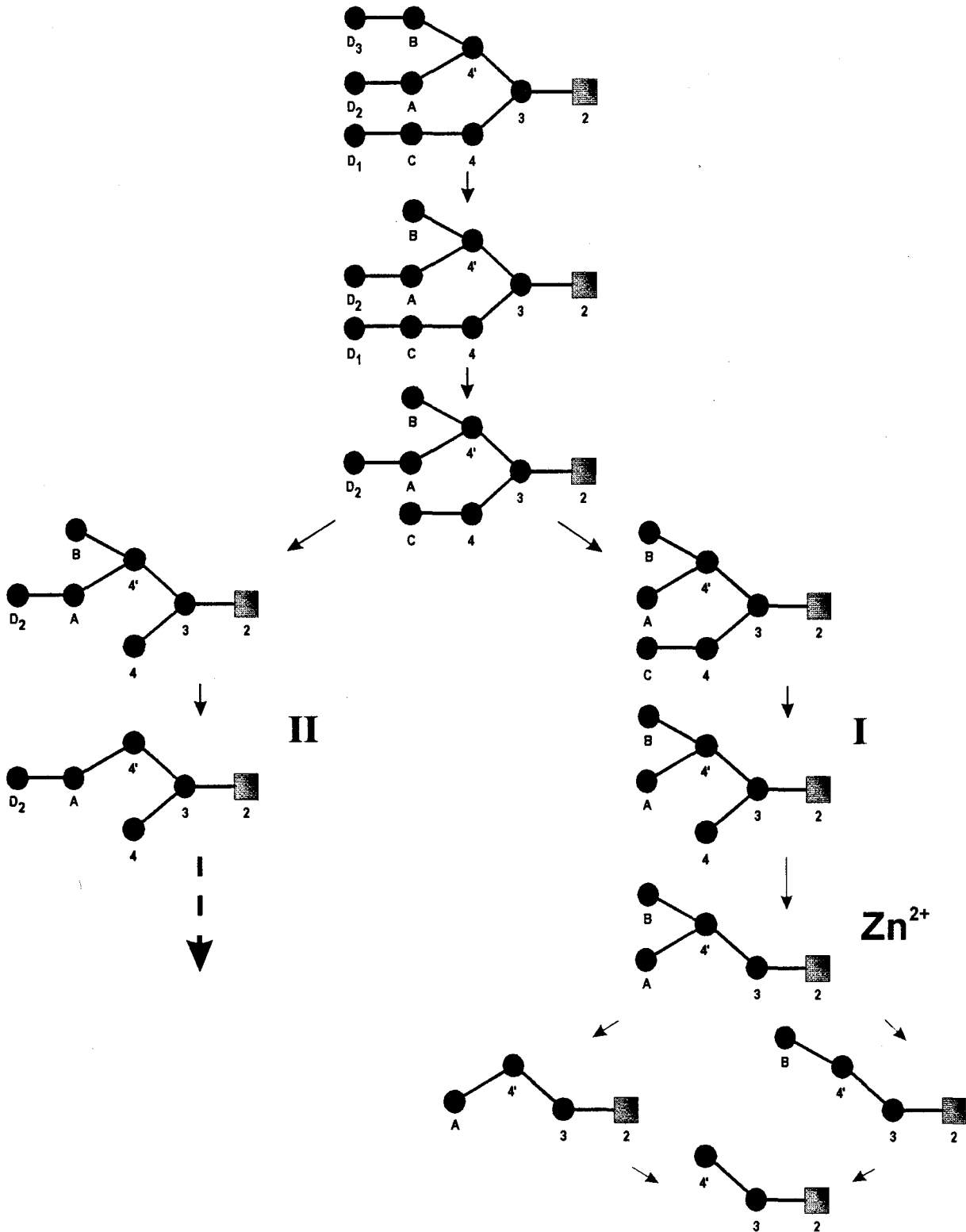


Figure 12 : Catabolisme lysosomique d'oligosaccharides de type oligomannosidique dans le foie de Rat

Michalski *et al.* (1990)



a) Les α -D-mannosidases lysosomiques A et B

i) Caractérisation

Parmi les enzymes lysosomiques, l' α -D-mannosidase a été caractérisée sous deux formes A et B, pouvant être séparées par chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose, à partir de différents tissus humains, bovins et porcins, notamment le foie et le rein (Carroll *et al.* (1972), Okumura et Yamashina (1973), Phillips *et al.* (1974a), Phillips *et al.* (1974b), Phillips *et al.* (1976), Marinkovic et Marinković (1976)). Ces deux iso-enzymes possèdent un pH optimal identique variant de 4,0 à 4,6. Elles sont inhibées par la swainsonine (Dorling *et al.* (1980)), le cobalt et l'EDTA. Elles sont activées par le zinc (Tableau VI page 67).

Chez l'Homme, les deux formes sont déficientes en cas de mannosidose (Carroll *et al.* (1972)) et sont donc génétiquement liées. La mutation affecterait le gène de l'enzyme porté par le chromosome 19 (Champion et Shows (1977)).

Dans les fibroblastes normaux humains, l' α -D-mannosidase lysosomique est synthétisée sous la forme d'un précurseur d'une masse moléculaire de 110 kDa (Pohlmann *et al.* (1983)). La forme mature de l'enzyme est constituée de deux iso-glycosidases qui diffèrent par leur point iso-électrique, leur affinité vis-à-vis du récepteur à mannose-6-phosphate, leur masse moléculaire et leur nombre de sous-unités. La forme A du foie humain serait constituée de deux sous-unités de masse moléculaire 26 et 62 kDa, reliées entre elles par des ponts disulfure, tandis que la forme B

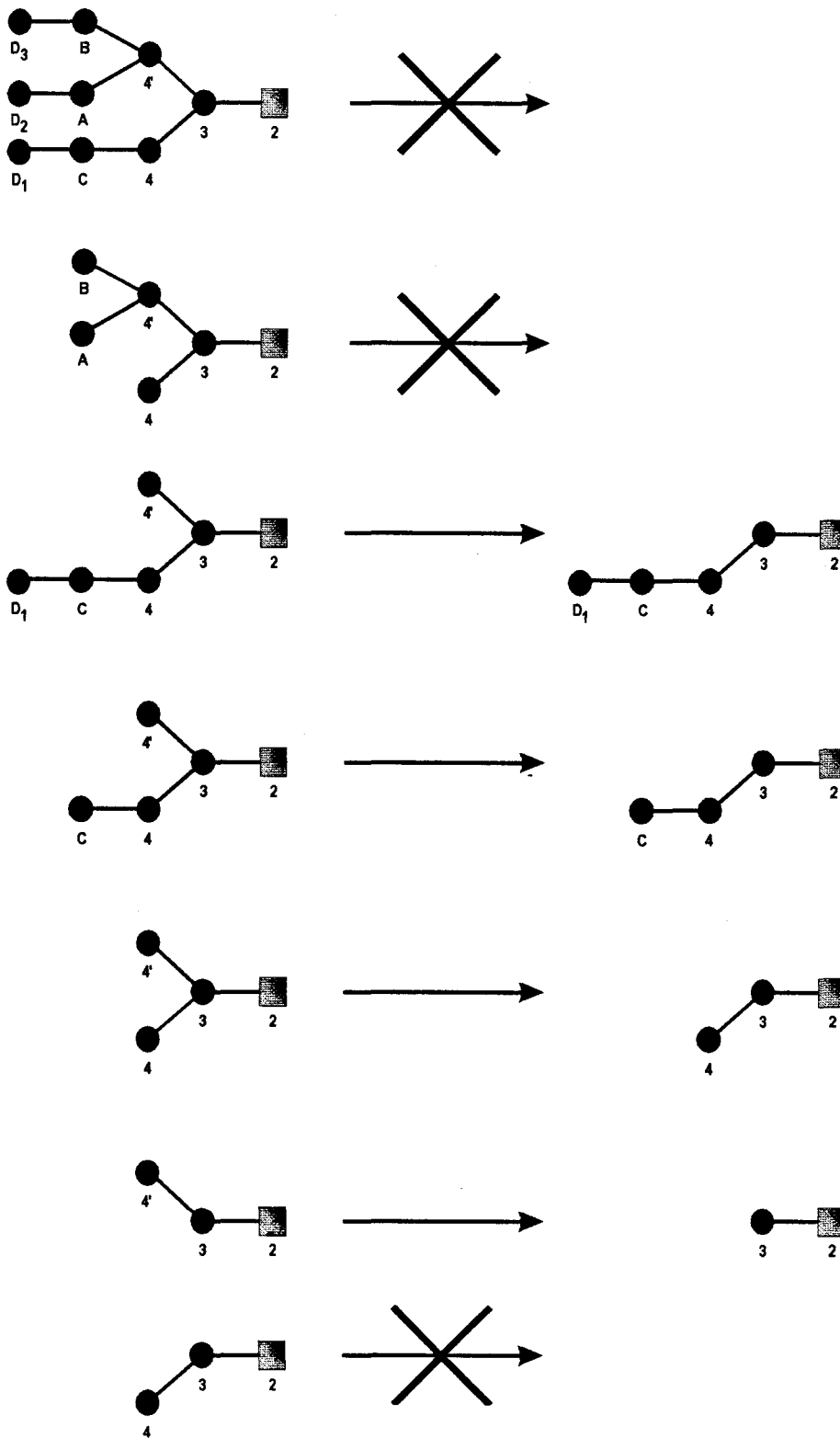
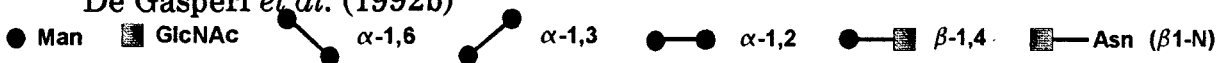


Figure 13 : Spécificité de substrat de l' α -1,6-mannosidase lysosomique vis-à-vis de glycanes de type oligomannosidique

De Gasperi *et al.* (1992b)



LIBRARY

comporterait trois sous-unités de 26, 58 et 62 kDa (Cheng *et al.* (1982), Cheng *et al.* (1986)). Toutefois, les deux α -D-mannosidases sont identiques sur le plan immunochimique (Grabowski *et al.* (1980), Cheng *et al.* (1986)).

A ce jour, seul le gène codant pour l' α -D-mannosidase lysosomique de *Dictyostelium discoideum* a été cloné (Schatzle *et al.* (1992)).

ii) Spécificité de substrat

Les α -D-mannosidases lysosomiques ne semblent pas posséder de spécificité enzymatique liée à la nature de la liaison. Les deux iso-enzymes sont en effet, capables de libérer les résidus de mannose liés en α -1,2, α -1,3 et α -1,6 à partir de différents oligosaccharides isolés d'urine de patients atteints de mannosidose (Hultberg *et al.* (1975)). D'autre part, l'enzyme du foie de Rat est plus active sur des oligosaccharides et glycopeptides que sur des glycoprotéines natives (Opheim et Touster (1978)).

En 1987, Tulsiani et Touster ont montré que l'enzyme de rein humain possédait une plus grande affinité envers les oligosaccharides linéaires.

De Gasperi *et al.* (1989) ont obtenu des résultats similaires avec des enzymes isolées de tissus bovins et félins. Michalski *et al.* (1990) ont étudié, étape par étape, la dégradation de l'oligosaccharide $\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ par les α -D-mannosidases lysosomiques de foie de Rat en utilisant la spectroscopie RMN (Figure 12 page 60). Le substrat de type $\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ est hydrolysé par des activités α -D-mannosidasiques Zn^{2+} -indépendantes jusqu'à l'obtention de deux oligosaccharides à 5 mannoses : $\text{Man}_5\text{GlcNAc}$ I et $\text{Man}_5\text{GlcNAc}$ II. Les α -D-mannosidases qui hydrolysent $\text{Man}_5\text{GlcNAc}$ I

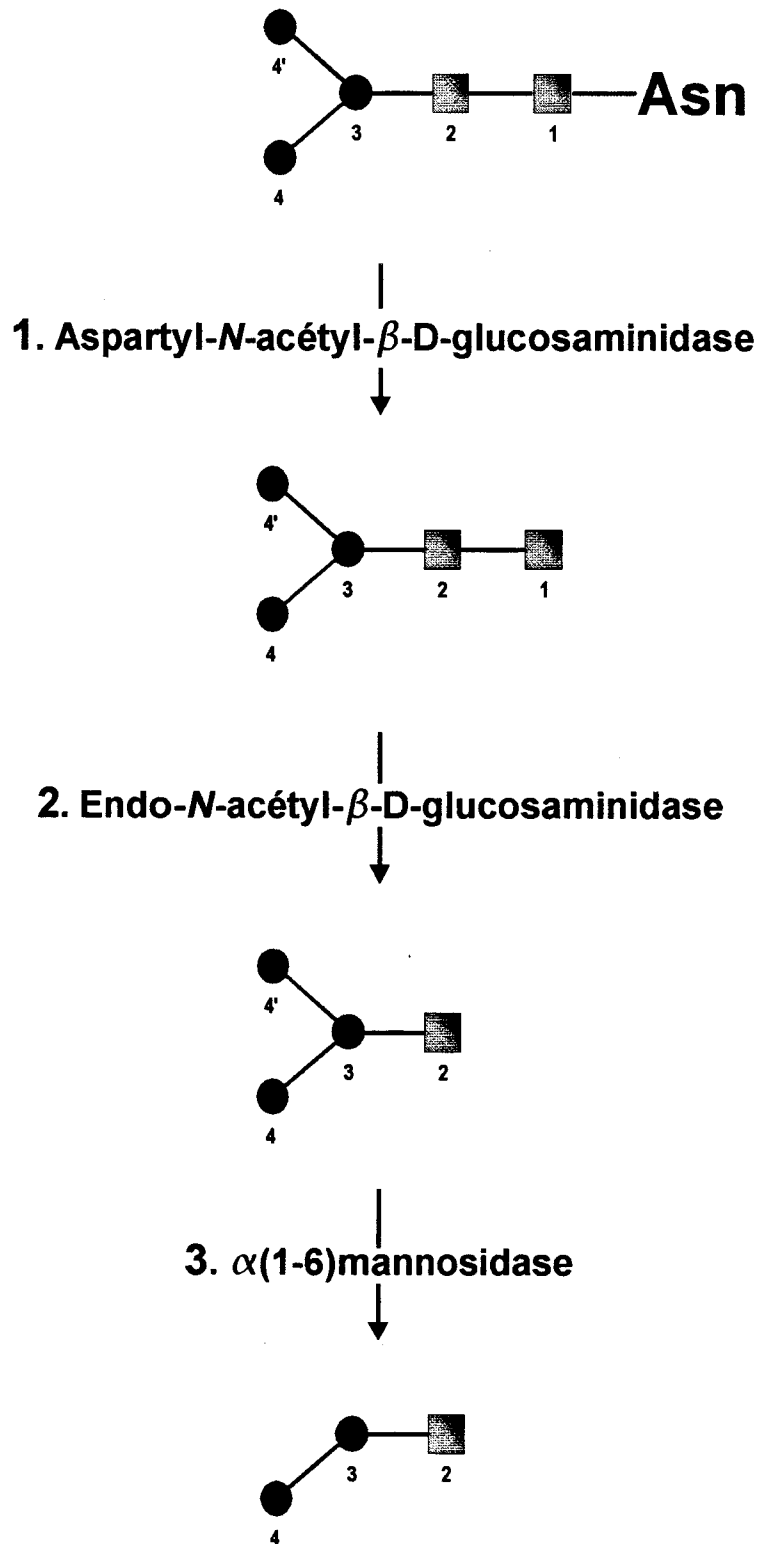
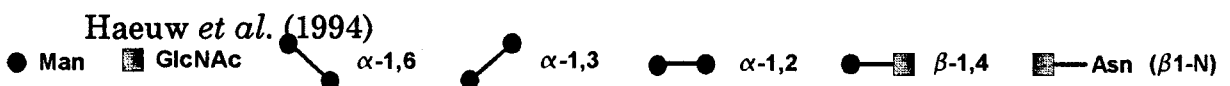


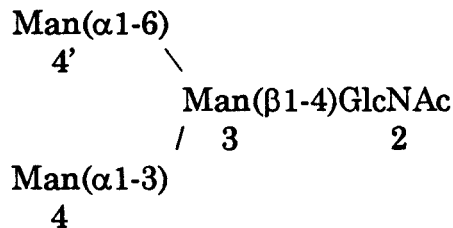
Figure 14 : Hydrolyse du core des glycannes des N-glycosylprotéines par l' α -1,6-mannosidase lysosomique



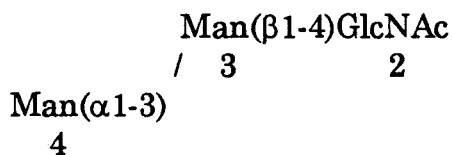
jusqu'à l'obtention de l'oligosaccharide $\text{Man}_2\text{GlcNAc}$ nécessitent la présence d'ions Zn^{2+} .

De Gasperi *et al.* (1991) établissent la même spécificité de substrat pour les α -D-mannosidases lysosomiques issus de tissus bovins et félins. Cependant, les dernières étapes de la dégradation des oligosaccharides à 5 mannoses ne nécessitent pas la présence de zinc.

En cas de mannosidose chez l'Homme, on pourrait s'attendre à ce que le produit majoritaire accumulé au niveau du foie et du cerveau, ou excrété par voie urinaire, soit le tétrasaccharide suivant, dénommé B_2 (issu de la dégradation partielle des glycanes de type *N*-acétyllactosaminique des glycoprotéines endocytées) :



Or, parmi les 17 oligosaccharides isolés de patients atteints de mannosidose (Norden *et al.* (1973), Norden *et al.* (1974), Strecker *et al.* (1976), Yamashita *et al.* (1980), Matsuura *et al.* (1981)), l'oligosaccharide B_2 est pratiquement inexistant, et plus des 2/3 en poids des oligosaccharides sont représentés par le trisaccharide suivant, dénommé A :



Ceci est à corrélér avec la présence d'une activité mannosidasique lysosomique résiduelle, représentant jusqu'à 10% de l'activité normale, détectée dans

les fibroblastes et certains tissus de patients atteints de mannosidose (Hultberg et Masson(1975), Beaudet et Nichols (1976), Mersmann et Buddecke (1977)).

b) L' α -1,6-mannosidase lysosomique

En 1992, De Gasperi *et al.* (1992b) ont mis en évidence une nouvelle activité α -D-mannosidasique lysosomique dont la particularité est de posséder une unique spécificité de substrat. L'enzyme n'hydrolyse que le mannose lié en α -1,6 sur le core des glycanes liés *N*-glycosidiquement (Figure 13 page 62). Elle n'hydrolyse aucun autre résidu de mannose, même lié en α -1,6. Cette nouvelle α -D-mannosidase lysosomique se différencie de celles préalablement décrites, par son incapacité à hydrolyser les substrats synthétiques tels que le *p*-nitrophényl- α -D-mannoside, et par sa forte activation par le cobalt et le zinc (Tableau VI page 67). Par contre, tout comme l' α -D-mannosidase lysosomique majeure, elle est fortement inhibée par la swainsonine (Daniel *et al.* (1992)).

Chez les patients atteints de mannosidose, l' α -D-mannosidase lysosomique majeure est complètement déficiente. Apparemment, l' α -1,6-mannosidase lysosomique n'est pas affectée et la nature des oligosaccharides accumulés reflète son étroite spécificité vis-à-vis du mannose 4' du core. Haeuw *et al.* (1994) ont démontré que l'activité α -1,6-mannosidasique lysosomique spécifique du core des glycanes liés *N*-glycosidiquement dépendait de l'action préalable de l'aspartyl-*N*-acétyl- β -D-glucosaminidase (ou

Tableau VI : α -D-mannosidases localisées dans le lysosome

Noms	Références	Masse moléculaire (kDa)	conA retenu	pH optimal	Inhibiteurs	Activateurs	Spécificité de substrat
Mannosidase A (foie humain)	Cheng <i>et al.</i> (1982) Cheng <i>et al.</i> (1986)	2 sous unités 62 et 26	oui	4,0 à 4,5	Sw, Co ⁺⁺	Zn ⁺⁺	dégrade préférentiellement les substrats linéaires Tulsiani et Touster (1987)
Mannosidase B (foie humain)	Cheng <i>et al.</i> (1982) Cheng <i>et al.</i> (1986)	3 sous unités 62, 58 et 26	oui	4,0 à 4,5	Sw, Co ⁺⁺	Zn ⁺⁺	Man ₉ GlcNAc → Man ₅ GlcNAc en absence de Zn ⁺⁺ Man ₅ GlcNAc → Man ₃ GlcNAc en présence de Zn ⁺⁺ Michalski <i>et al.</i> (1990)
α -1,6-mannosidase (rate humaine)	De Gasperi <i>et al.</i> (1992b)	-	oui	5,0	Sw	Co ⁺⁺ et Zn ⁺⁺	Man(α 1-6)[Man(α 1-3)]Man(β 1-4)GlcNAc → Man(α 1-3)Man(β 1-4)GlcNAc Man(α 1-6)Man(β 1-4)GlcNAc → Man(β 1-4)GlcNAc
α -1,6-mannosidase (foie de Rat)	Haeuw <i>et al.</i> (1994)	-	oui	5,0	Sw	Zn ⁺⁺	Activité aspartyl-N-acétyl- β -D-glucosaminidase et endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase dépendante

aspartamidase) et de l'endo-*N*-acétyl- β -D-glucosaminidase (Figure 14 page 64), (Tableau VI page 67).

2) L' α -D-mannosidase cytosolique

i) *Caractérisation*

En 1971, Marsh et Gourlay mettent en évidence une activité mannosidase dans le compartiment cytosolique des hépatocytes de Rat. Cette enzyme peut être séparée des α -D-mannosidases lysosomiques par chromatographie sur DEAE cellulose (Carroll *et al.* (1972)) ou sur concanavaleine A-sepharose (sur laquelle elle est non retenue, contrairement aux α -D-mannosidases lysosomiques et golgiennes) (Phillips *et al.* (1976)). L'activité mannosidase cytosolique est normale en cas de mannosidose (Phillips *et al.* (1974b, 1976)). D'autre part, elle est thermolabile (Phillips *et al.* (1974a), Grabowski *et al.* (1980)) et activée par les ions Co^{++} , Fe^{++} et Mn^{++} (Snaith (1977)). De plus, l' α -D-mannosidase du foie de Rat possède un K_m vis-à-vis du *p*-nitrophényl- α -D-mannoside beaucoup plus faible que ceux observés pour les α -D-mannosidases du lysosome et de l'appareil de Golgi (Shoup et Touster (1976)). Les liaisons α -1,2, α -1,3 et α -1,6 des résidus de mannose sont hydrolysées par les enzymes du foie humain, bovin et de Rat (Hultberg *et al.* (1975), Opheim et Touster (1978)).

ii) *Purification, localisation*

En 1976, Shoup et Touster caractérisent et purifient à 90% l' α -D-mannosidase cytosolique de foie de Rat. Cette enzyme, constituée de 4 sous-

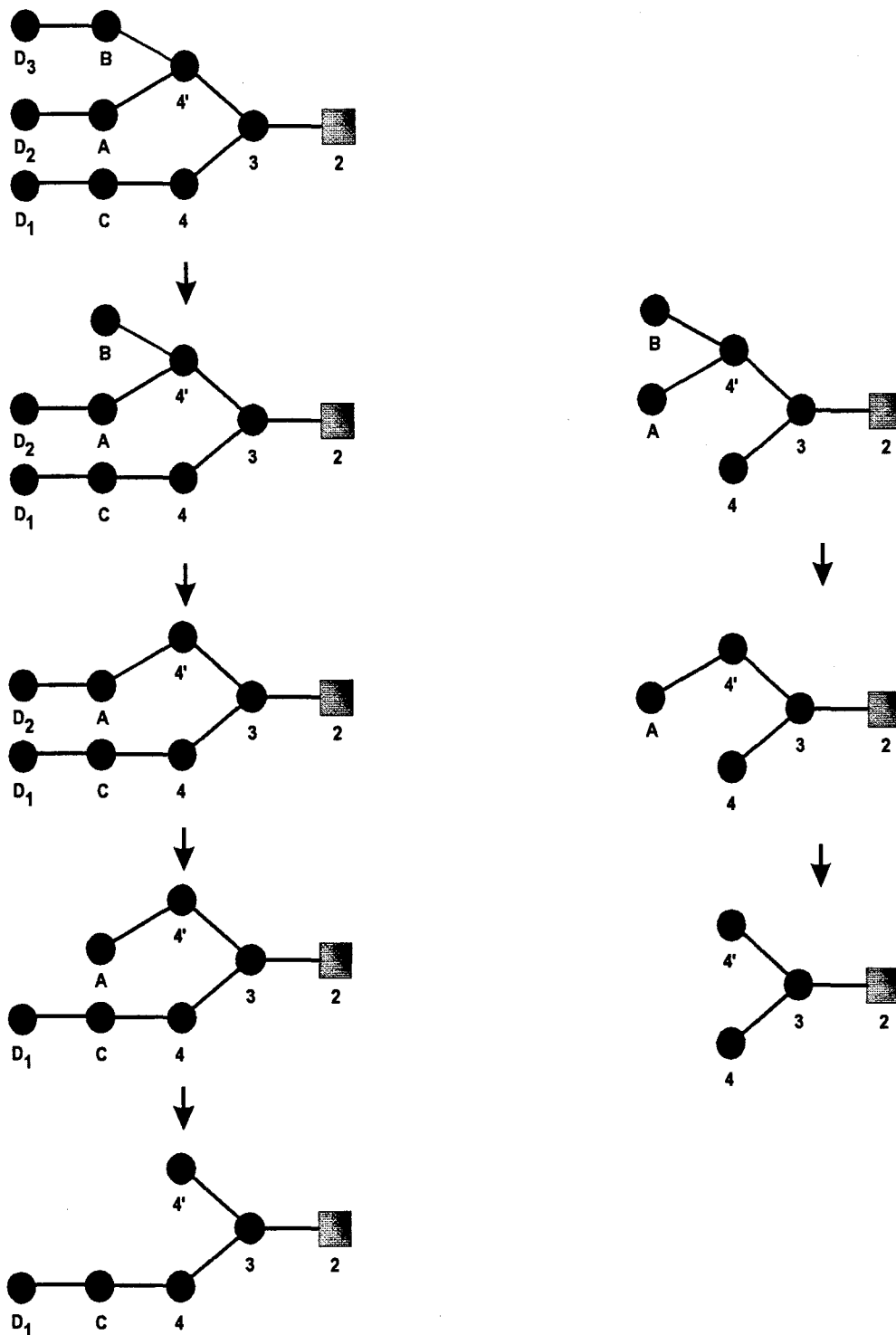


Figure 15 : Catabolisme cytosolique d'oligosaccharides de type oligomannosidique dans le foie de Rat

Haeuw *et al.* (1991c)



unités de 110 kDa chacune, est stabilisée par le cobalt (Tableau VII page 72). D'ailleurs, en 1984, Mathur et Balasubramanian séparent l' α -D-mannosidase cytosolique de cerveau de Singe des α -D-mannosidases lysosomiques et golgiennes en utilisant une colonne de cobalt immobilisé.

Zanetta *et al.* (1982) ont purifié une α -D-mannosidase dans le cerveau de Rat à pH optimal neutre (aux environs de 6,0). Cette enzyme possède une masse moléculaire apparente de 397 kDa et semble être constituée de sous-unités de 120 kDa composée de 2 fragments de 60 kDa chacun, reliés entre eux par un pont disulfure. Zanetta *et al.* (1983) ont localisé cette α -D-mannosidase, de façon immunohistochimique, au sein du cytosol de cerveau de Rat.

Toutefois, la localisation de l' α -D-mannosidase neutre dans le compartiment cytosolique est sujet à controverse, suite aux travaux de Bischoff et Kornfeld en 1986 (voir page 29). Ces auteurs, en se basant sur des études immunochimiques, ont démontré que l' α -D-mannosidase purifiée par Shoup et Touster en 1976 était, en fait, le produit de la dégradation de l' α -1,2-mannosidase du *reticulum* endoplasmique par les protéases, au cours du fractionnement cellulaire.

iii) *Spécificité de substrat*

Les études menées par différentes équipes, sur la spécificité de substrat de l' α -D-mannosidase « neutre », tendent à prouver qu'une α -D-mannosidase localisée dans le compartiment cytosolique joue un rôle crucial dans le catabolisme des glycanes de type oligomannosidique. En effet, Tulsiani et Touster (1987) et De Gasperi *et al.* (1989) ont montré que les α -D-

mannosidases cytosoliques possèdent une activité privilégiée vis-à-vis des composés de type oligomannosidique ramifiés. Ces auteurs suggèrent que le catabolisme des glycanes des *N*-glycosylprotéines de type oligomannosidique débute dans le cytosol et que les produits linéaires formés sont ensuite transférés dans le lysosome avant d'y être dégradés.

Haeuw *et al.* (1991c), puis Daher *et al.* (1992) et De Gasperi *et al.* (1992a) démontrent la spécificité toute particulière de l' α -D-mannosidase cytosolique vis-à-vis de substrats exogènes tels que le Man₉GlcNAc et le Man₅GlcNAc branché. L'hydrolyse du substrat Man₉GlcNAc conduit à la formation d'un produit final de type Man₅GlcNAc linéaire (Figure 15 page 69). Ces résultats acquis pour le foie de Rat, de Bœuf et de l'Homme, ainsi que ceux obtenus pour le rein de Rat par Tulsiani et Touster (1987), montrent que l'activité cytosolique s'exerce préférentiellement sur les substrats branchés tandis que l'activité lysosomique concerne plutôt les substrats linéaires. Cela confirme l'existence possible d'une synergie d'action entre les deux compartiments (Haeuw *et al.* (1991a et b)).

Une autre observation peut être faite au regard de la structure primaire de l'hexasaccharide limite à 5 mannoses agencés de manière linéaire, formé après hydrolyse par l' α -D-mannosidase cytosolique du substrat Man₉GlcNAc. En effet, celui-ci est analogue au glycanne porté par l'intermédiaire polyprénolique situé sur la face cytosolique de la membrane du *reticulum* endoplasmique lors de la synthèse des glycanes liés *N*-glycosidiquement (voir Figure 17 page 81). Un rôle potentiel de l' α -D-mannosidase cytosolique consisterait alors en l'élagage ou la « réparation » des chaînes

Tableau VII : α -D-mannosidases localisées dans le cytosol

Noms	Références	Masse moléculaire (kDa)	conA retenu	pH optimal	Inhibiteurs	Activateurs	Spécificité de substrat
mannosidase cytosolique (foie de Rat)	Shoup et Touster (1976)	~ 450 4 x 110	-	5,5 à 5,9	Man(NH ₂)	stabilisée par Co ⁺⁺	.
mannosidase cytosolique (cerveau de Rat)	Zanetta <i>et al.</i> (1982) Zanetta <i>et al.</i> (1983)	397	-	6,0	-	-	.
mannosidase cytosolique (rein de Rat)	Tulsiani et Touster (1987)	-	-	-	Sw 100 μ M	-	dégrade préférentiellement les substrats oligomannosidiques de type branché
mannosidase cytosolique (foie de Rat)	Haeuw <i>et al.</i> (1991c)	-	non	6,5	Sw	Co ⁺⁺	Man ₉ GlcNAc \rightarrow Man(α 1-2)Man(α 1-2)Man(α 1-3)[Man(α 1-6)]Man(β 1-4)GlcNAc
mannosidase neutre (foie humain)	Daher <i>et al.</i> (1992)	-	non	~ 7,0	-	-	Man ₉ GlcNAc \rightarrow Man(α 1-2)Man(α 1-2)Man(α 1-3)[Man(α 1-6)]Man(β 1-4)GlcNAc
mannosidase neutre (foies de Bœuf et de Chat)	De Gasperi <i>et al.</i> (1992a)	-	non	~ 7,0	ni Sw, ni dMM	-	Man ₉ GlcNAc \rightarrow Man(α 1-2)Man(α 1-2)Man(α 1-3)[Man(α 1-6)]Man(β 1-4)GlcNAc chez le Bœuf Man ₉ GlcNAc \rightarrow Man(α 1-2)Man(α 1-2)Man(α 1-3)[Man(α 1-6)]Man(β 1-4)GlcNAc chez le Chat

oligomannosidiques des dolichols conduisant au dérivé $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-}$ Dolichol seul capable d'intégrer le *lumen* du *reticulum* endoplasmique.

D. Les inhibiteurs des α -D-mannosidases

L'étude du catabolisme et de la biosynthèse des glycanes liés *N*-glycosidiquement a été fortement facilitée par l'utilisation d'inhibiteurs. Ces dix dernières années, de nombreux composés ont été identifiés en tant qu'inhibiteurs d'enzymes intervenant dans la maturation des glycanes des *N*-glycosylprotéines (Elbein (1987), Kaushal et Elbein (1993)).

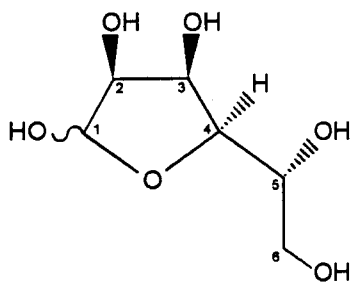
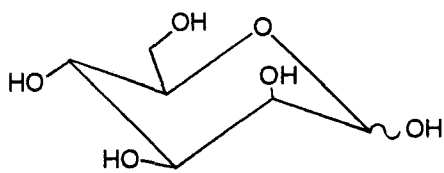
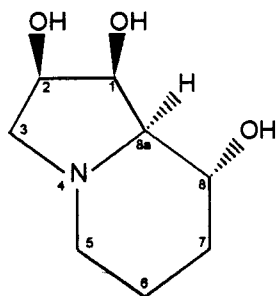
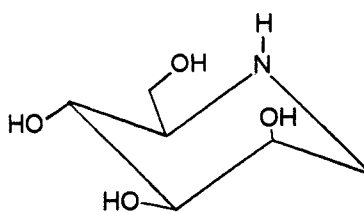
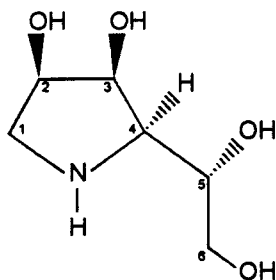
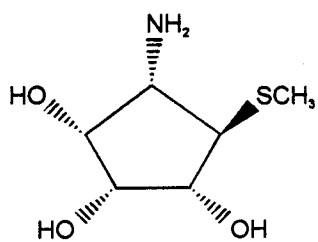
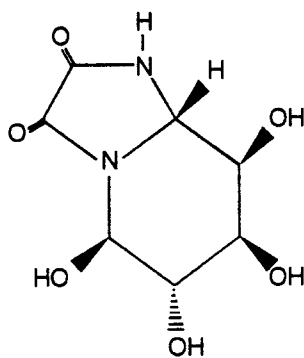
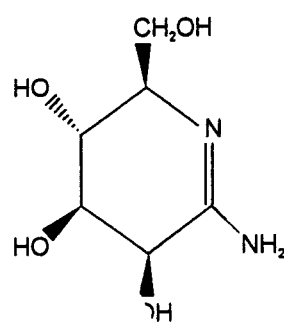
On peut classer les inhibiteurs des α -D-mannosidases cellulaires de deux façons :

1. ceux qui inhibent spécifiquement une des différentes α -D-mannosidases cellulaires.
2. ceux qui inhibent toutes les α -D-mannosidases (leur spectre d'inhibition est large et ne permet pas de discriminer les différentes α -D-mannosidases entre elles), et qui sont inactifs vis-à-vis d'autres glycosidases.

1) Les inhibiteurs spécifiques

a) *La swainsonine*

L'astragale, une plante sauvage que l'on rencontre surtout à l'ouest des Etats-Unis ou en Australie, est notoirement connue des éleveurs dans la mesure où elle cause, chez le bétail qui la consomme, une maladie létale : le « locoïsme » (anglicisme d'origine espagnole signifiant fou ou malade). Le

**Mannofuranose****Mannopyranose****Swainsonine****Désoxymannojirimycine****Didésoxyiminomannitol****Mannostatine A****Kifunensine****D-mannonolactame amidrazone****Figure 16 : Le mannofuranose, le mannopyranose et leurs différents analogues structuraux**

locoïsme se caractérise par une accumulation de composés riches en mannose dans les lysosomes des cellules tubulaires rénales, des cellules de Purkinje et des neurones du système nerveux central (Molyneux et James (1982)). Ces perturbations neurologiques sont similaires à celles produites par la mannosidose, maladie génétique se caractérisant par la déficience de l' α -D-mannosidase lysosomique (voir page 61).

L'alcaloïde responsable de la toxicité, de type indolizidine trihydroxylé, est la swainsonine (Figure 16 page 74). La configuration des groupements hydroxyles secondaires de la swainsonine est identique à celle des groupements hydroxyles du mannose sous sa forme furanique. Les α -D-mannosidases inhibées par la swainsonine utiliseraient donc le mannofuranose comme substrat.

La swainsonine inhibe les α -D-mannosidases lysosomiques (Dorling *et al.* (1980)), d'où les similitudes du locoïsme avec la mannosidose. D'autre part, l'utilisation de la swainsonine a permis d'émettre des hypothèses sur la complémentarité d'action des α -D-mannosidases cytosolique et lysosomiques dans le catabolisme des glycanes de type oligomannosidique (Tulsiani et Touster (1987)).

Cet alcaloïde a été le premier mis en évidence en tant qu'inhibiteur des α -D-mannosidases intervenant dans la maturation des *N*-glycosylprotéines (Elbein *et al.* (1981)). La swainsonine est en effet un inhibiteur de la mannosidase II golgienne. Par contre, elle n'a pas d'effet sur les α -D-mannosidases I de l'appareil de Golgi (Tulsiani *et al.* (1982a)). La swainsonine empêche la formation des oligosaccharides de type *N*-

acétyllactosaminique et provoque l'accumulation de structures de type hybride (Tulsiani et Touster (1983)).

Cet alcaloïde a d'ailleurs été utilisé dans l'étude du trafic intracellulaire des *N*-glycosylprotéines des cellules HT-29 dérivant d'un adénocarcinome de côlon humain. En présence de swainsonine, les cellules HT-29 différenciées produisent des glycanes de type hybride, témoins du transit des *N*-glycosylprotéines par l'appareil de Golgi, alors que les cellules HT-29 indifférenciées accumulent des oligosaccharides de type oligomannosidique, signes du transit des *N*-glycosylprotéines par les lysosomes (Houry *et al.* (1992)).

b) La désoxymannojirimycine

Le succès de la désoxynojirimycine, un analogue structural du glucose, employé comme inhibiteur de la glucosidase I (Saunier *et al.* (1982)), a été à l'origine de la conception d'un analogue structural du mannose, la désoxymannojirimycine (Legler et Jülich (1984)) (Figure 16 page 74). Ce composé s'est révélé être un inhibiteur des α -D-mannosidases intervenant dans le processus de maturation des *N*-glycosylprotéines. La désoxymannojirimycine inhibe en effet les mannosidases I golgiennes (Bischoff et Kornfeld (1984)) et la Man₉-mannosidase (Schweden et Bause (1989)).

Un dérivé de cet inhibiteur, la Glc- α -1,3-désoxymannojirimycine, a été utilisé dans des études d'inhibition de l'endo- α -D-mannosidase (Hiraizumi *et al.* (1993)).

De plus, la désoxymannojirimycine a permis de mettre en évidence un transporteur de mannose dans les cellules intestinales HT-29 dérivant d'un adénocarcinome de côlon humain (Ogier-Denis *et al.* (1990)). En travaillant sur les cellules Caco-2, dérivant également d'un adénocarcinome de côlon humain, Ogier-Denis *et al.* (1994) ont montré que l'incorporation de mannose s'effectue par le biais de deux transporteurs. Le premier, sensible à la désoxymannojirimycine, se situe sur la membrane basolatérale des cellules Caco-2 différenciées, alors que le second, insensible à la désoxymannojirimycine, est localisé sur la membrane de la bordure en brosse.

c) *Le didésoxyiminomannitol*

Le didésoxyiminomannitol est un analogue structural du mannose de type azafuranose (Fleet *et al.* (1984)), tandis que la désoxymannojirimycine est un analogue de type azapyranose (Figure 16 page 74). Le didésoxyiminomannitol est un bon inhibiteur de l' α -D-mannosidase II golgienne et des α -D-mannosidases lysosomiques (Palamarczyk *et al.* (1985)). Toutefois, son taux d'inhibition est plus faible que la swainsonine, qui possède des groupements hydroxyles secondaires identiques au didésoxyiminomannitol et au mannofuranose.

L'utilisation de dérivés du didésoxyiminomannitol conduit aux mêmes résultats (Winchester *et al.* (1993)).

d) *La kifunensine*

La kifunensine, produite par l'actinomycète *Kitasatosporia kifunense* n° 9482, est un alcaloïde cyclique dérivant de l'aminodésoxyman-

nojirimycine (Figure 16 page 74). La kifunensine s'est avérée être un inhibiteur des α -D-mannosidases I golgiennes plus important que la désoxymannojirimycine (Elbein *et al.* (1990)).

D'autre part, elle inhibe l' α -1,2-mannosidase du *reticulum* endoplasmique décrite par Bischoff et Kornfeld (1983), ce qui a permis de mettre en évidence une nouvelle activité α -1,2-mannosidasique kifunensine résistante localisée dans le *reticulum* endoplasmique (Weng et Spiro (1993)).

2) Les inhibiteurs non spécifiques

a) *La mannostatine A*

La mannostatine A est un composé non alcaloïde produit par le micro-organisme *Streptoverticillium verticillus* (Aoyagi *et al.* (1989)) (Figure 16 page 74). Elle a tout d'abord été utilisée comme inhibiteur de l' α -D-mannosidase du fluide épидидymal de Rat. De plus, la mannostatine A bloque la maturation des *N*-glycosylprotéines et cause une augmentation du taux de glycannes de type hybride. En fait, la mannostatine A est un inhibiteur compétitif de l' α -D-mannosidase II et des α -D-mannosidases lysosomiques (Tropea *et al.* (1990)).

b) *La D-mannonolactame amidrazone*

L'amidrazone de la D-mannonolactame a été récemment synthétisé chimiquement dans le but de mimer le comportement du cation mannopyranosyle, un intermédiaire potentiel de l'hydrolyse des mannopyranosides (Figure 16 page 74).

La D-mannonolactame amidrazone a un spectre d'inhibition très large. Elle

inhibe non seulement les α -D-mannosidases I et II de l'appareil de Golgi, mais elle constitue aussi le premier véritable inhibiteur de l' α -1,2-mannosidase du *reticulum* endoplasmique. En culture cellulaire, elle bloque presque complètement la formation des glycanes de type N-acétyllactosaminique, et cause l'accumulation de structures de type $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ et $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ (Pan *et al.* (1992)).

III. Les substrats potentiels de l' α -D-mannosidase cytosolique

L'existence d'une glycosylation au sein du compartiment cytosolique a été établie depuis quelques années (Hart *et al.* (1988), Hart *et al.* (1989), Haltiwanger *et al.* (1992)). Au cours de ce sous-chapitre, nous nous focaliserons plus particulièrement sur les glycoconjugués comportant une structure mannosylée, susceptibles, de ce fait, de constituer d'éventuels substrats pour l' α -D-mannosidase cytosolique.

A. Les mannosyl-diphospho-dolichol

Les études de la topographie de la biosynthèse des précurseurs de la N-glycosylation des protéines ont permis de localiser les différents intermédiaires polyprénoliques mis en jeu, de part et d'autre de la membrane du *reticulum* endoplasmique (Hirschberg et Snider (1987)). Bien qu'il soit clairement établi que le mégaloglycane (voir page 49) se situe sur la face lumineuse du *reticulum* endoplasmique (Katz *et al.* (1977), Lingappa *et al.* (1978), Hanover et Lennarz (1980), Snider et Robbins (1982), Snider et Rogers

(1984)), l'organisation topographique des premières étapes du cycle des dolichols est encore, actuellement, controversée. Ainsi, les sites actifs des enzymes catalysant la synthèse des intermédiaires GlcNAc-P-P-Dol, GlcNAc₂-P-P-Dol et Dol-P-Man ont été, tour à tour, localisés sur la face cytosolique (Snider *et al.* (1980), Haselbeck et Tanner (1982), Spiro et Spiro (1985), Clarke *et al.* (1989), Abeijon et Hirschberg (1990), Kean (1991)) ou luminale de la membrane du *reticulum* endoplasmique (Hanover et Lennarz (1978, 1982), Godelaine *et al.* (1983), Perez et Hirschberg (1986), Deglon *et al.* (1991)). Cependant, des études récentes confirment la localisation de ces intermédiaires lipidiques sur la face cytosolique (Figure 17 page 81) de la membrane du *reticulum* endoplasmique (Bossuyt et Blanckaert (1993)).

La topographie de la biosynthèse des intermédiaires lipidiques mannosylés, semble quant à elle, mieux éclaircie. Forsee *et al.* (1977), Chambers *et al.* (1977) et Schutzbach *et al.* (1980) ont démontré que seuls 5 mannoses étaient transférés par l'intermédiaire de GDP-Man pour former le composé Man₅GlcNAc₂-P-P-Dol. Or, contrairement aux nucléotides-sucres UDP-GlcNAc (Perez et Hirschberg (1985)) et UDP-Glc (Perez et Hirschberg (1986), Vanstapel et Blanckaert (1988)), le composé GDP-Man ne peut franchir la membrane du *reticulum* endoplasmique (Fleischer (1981), Hanover et Lennarz (1982), Perez et Hirschberg (1986)). Ces résultats ont été confirmés par les travaux de Snider et Rogers qui ont montré, en 1984, en utilisant la concanavaleine A, que l'intermédiaire Man₅GlcNAc₂-P-P-Dol était le dernier à être synthétisé sur la face cytosolique de la membrane du *reticulum* endoplasmique, avant de subir une « translocation » au travers de

Cytosol

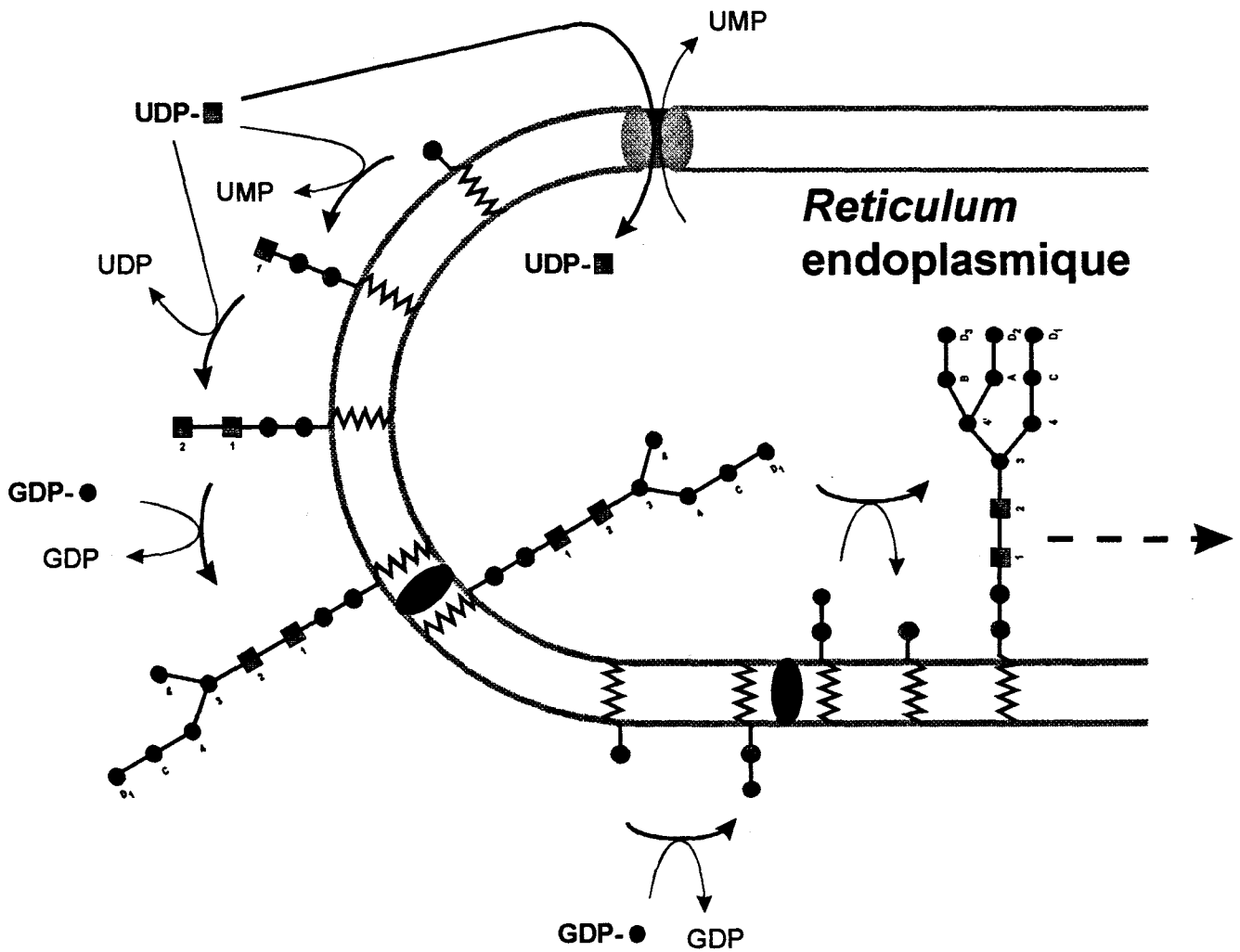


Figure 17 : Topographie de la biosynthèse des précurseurs de la N-glycosylation des protéines

■, GlcNAc; ●, Man; ●, phosphoryl; ●, "flip-flopase"; W, dolichol.



cette membrane, par un mécanisme de « flip-flop » (Figure 17 page 81). Toutefois, le transfert d'une telle structure, de part et d'autre de la membrane du *reticulum* endoplasmique, pose le problème, actuellement non encore résolu, de l'existence d'une « translocase » au sein de cette membrane.

Il est à noter que le transfert de GDP-Man sur les oligosaccharide-diphospho-dolichols situés sur la face cytosolique de la membrane du *reticulum* endoplasmique peut conduire à la formation d'intermédiaires possédant de 7 à 10 monosaccharides (Man₅GlcNAc₂-P-P-Dol à Man₈GlcNAc₂-P-P-Dol), en absence d'EDTA (qui inhibe la formation de Dol-P-man (Chambers *et al.* (1977)) ou d'amphotrycine (inhibiteur du transfert du résidu de mannose du composé GDP-Man au composé Dol-P-Man) (Kang *et al.* (1978), Banerjee *et al.* (1981), Banerjee (1989)).

Notre hypothèse consiste à considérer qu'il se produit le transfert de plus de 5 mannoses sur les intermédiaires lipidiques situés sur la face cytosolique de la membrane du *reticulum* endoplasmique. L' α -D-mannosidase cytosolique interviendrait alors pour élaguer les mannoses des intermédiaires lipidiques comportant de 6 à 9 résidus de mannose. L' α -D-mannosidase du cytosol jouerait ainsi un rôle clef dans la régulation de la biosynthèse des *N*-glycosylprotéines.

B. Les glycoprotéines mannosylées

Pendant longtemps, il a été établi que les glycannes des glycoprotéines étaient exclusivement localisés à la surface cellulaire ou dans la lumière de différents compartiments de la cellule. Cependant, une voie parallèle de gly-

cosylation a été mise en évidence depuis quelques années. En effet, différents travaux témoignent d'une glycosylation spécifiquement cytosolique ou nucléaire. Ainsi, 6 types de glycoprotéines ont été caractérisés dans le cytosol :

- ✓ les protéines à Ser(Thr)-O-GlcNAc (voir Tableau VIII page 84).
- ✓ les protéines à tyrosine-O-glc intervenant dans la synthèse du glycogène (Aon et Curtino (1985), Rodriguez et Whelan (1985), Blumenfeld et Krisman (1986), Pitcher *et al.* (1987), Rodriguez et Fliesler (1988)).
- ✓ les protéines membranaires dont glycannes sont liés N-glycosidiquement et orientés vers le cytosol de rein de Chien (Pedemonte *et al.* (1990)).
- ✓ les protéines fucosylées dans le cytosol de *Dictyostelium discoideum* (Gonzalez-Yanes *et al.* (1992)).
- ✓ les protéoglycannes localisés dans le cytosol de cerveau de Rat, dont un résidu de mannose est lié O-glycosidiquement sur la protéine.
- ✓ les protéines dont le glycanne est constitué de Glc-1P-mannosides liés O-glycosidiquement.

Parallèlement à ces travaux de mise en évidence d'une glycosylation cytosolique, de nombreuses études ont permis de caractériser, au sein du cytosol, l'existence de glycosyltransférases et de glycosidases.

C'est ainsi que Haltiwanger *et al.* (1990), puis Dong et Hart (1991) ont successivement purifié la N-acétylglucosaminyltransférase et la N-acétyl- β -D-

Tableau VIII : Glycoprotéines à Ser(Thr)-O-GlcNAc orienté vers le cytosol

Glycoprotéines spécifiquement cytosoliques	
glycoprotéines d'érythrocyte humain	Holt <i>et al.</i> (1987a), Turner <i>et al.</i> (1990)
glycoprotéines de foie de Rat	Haltiwanger <i>et al.</i> (1990)
glycoprotéines de lymphocytes T de Souris	Kearse et Hart (1991)
Glycoprotéines du cytosquelette	
cytokératine 13	King et Hounsell (1989)
cytokératine 8 et 18	Chou <i>et al.</i> (1992), Chou et Omary (1993)
polypeptides de neurofilaments de Rat	Dong <i>et al.</i> (1993)
Glycoprotéines ancrées au noyau	
glycoprotéines du pore nucléaire	Hanover <i>et al.</i> (1987), Holt <i>et al.</i> (1987b), Park <i>et al.</i> (1987), Snow <i>et al.</i> (1987), Turner <i>et al.</i> (1990)
glycoprotéine de 62 kDa (gp62)	Davis et Blobel (1987), D'onofrio <i>et al.</i> (1988), Starr et Hanover (1990), Cordes et Krohne (1993)
Glycoprotéine ancrée à l'appareil de Golgi	
glycoprotéine membranaire	Capasso <i>et al.</i> (1988)
Glycoprotéine ancrée au <i>reticulum</i> endoplasmique	
glycoprotéine membranaire	Abeijon et Hirschberg (1988)

glucosaminidase intervenant dans le métabolisme des glycoprotéines à Ser(Thr)-O-GlcNAc.

Koro et Marchase (1982) ont caractérisé une glucose-phosphotransférase (voir page 87). Srisomsap *et al.* (1989) ont, quant à eux, caractérisé une glucose-1-phosphate phosphodiesterase (voir page 88). Ces deux enzymes interviennent dans le métabolisme des protéines à Glc-1P-mannosides liés O-glycosidiquement.

D'autres glycosidases ont été caractérisé :

- ✓ Pierce *et al.* (1979, 1980) ont démontré l'existence d'une endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase au sein du cytosol de rein et de foie de Rat.
- ✓ Miyagi et Tsuiki (1985) ont caractérisé et purifié la sialidase cytosolique de foie de Rat avant de cloner le gène codant pour la sialidase cytosolique de muscle squelettique de Rat (Miyagi *et al.* (1993)).
- ✓ Daniels *et al.* (1981), puis Legler et Bieberich (1988) ont caractérisé une β -glucosidase cytosolique, respectivement dans le foie humain et le foie de Veau.

La présence de ces enzymes au sein du compartiment cytosolique est le reflet d'un métabolisme glycannique important. Aussi, la localisation de protéoglycannes et de glycoprotéines à mannose liés O-glycosidiquement dans le cytosol pourrait nous éclairer sur la spécificité de l' α -D-mannosidase cytosolique. En effet, ces glycoconjugués constituent des substrats endogènes potentiels pour l'enzyme.

1) Les protéoglycannes à mannose liés O-glycosidiquement

Le protéoglycanne à chondroïtine sulfate de cerveau de Rat a une masse moléculaire approximative de 300 kDa. Il se situe dans le milieu extra-cellulaire juste après la naissance, puis, progressivement se localise dans le cytosol des neurones (Aquino *et al.* (1984a et b). Le protéoglycanne est constitué de 56% de protéines, 24% de glucosaminoglycannes (essentiellement le chondroïtine 4-sulfate) et de 20% de glycannes liés N- et O-glycosidiquement (Kiang *et al.* (1981), Klinger *et al.* (1985), Krusius *et al.* (1986)).

Aux côtés des glycannes de type Gal(β 1-3)GalNAc et de leurs dérivés mono- et disialylés, Finne *et al.* (1979), puis Krusius *et al.* (1986, 1987) ont mis en évidence un nouveau type de liaison O-glycosidique. Ils ont en effet caractérisé la liaison Man-O-Ser(Thr) dans le cytosol de cerveau de Rat. Les oligosaccharides liés à la protéine par ce type de liaison sont les suivants :

- GlcNAc(β 1-3)Man-O-Ser(Thr).
- Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc(β 1-3)Man-O-Ser(Thr).
- NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-3)Man-O-Ser(Thr).
- [Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-3)]₁₋₂ Man-O-Ser(Thr) et dérivés. Ces derniers tri- et pentasaccharides ont en commun le core GlcNAc(β 1-3)Man-O-Ser(Thr) et ils contiennent un ou deux résidus d'acide sialique ou de sulfate.

Il est à noter que la liaison Man-O-Ser(Thr) s'effectue par le transfert

de mannose directement à partir du donneur GDP-Man, et non à partir du Dol-P-Man.

2) Les protéines à Glc-1P-mannosides liés O-glycosidiquement

Marchase *et al.* (1982) ont caractérisé une liaison osidique particulière en travaillant sur les glycoprotéines reconnues spécifiquement par la ligatine (une protéine membranaire jouant un rôle dans la jonction et la localisation des glycoprotéines orientées vers le milieu extra-cellulaire) (Jakoi *et al.* (1976), Jakoi et Marchase (1979)). Ils décrivent, en effet, l'existence d'une liaison Glc-1P-Man dans les glycoprotéines reconnues par la ligatine. Ils font d'abord le rapprochement avec la liaison GlcNAc-1P-Man décrite au sein des enzymes lysosomiques (Reitman et Kornfeld (1981), Waheed *et al.* (1982)) (voir page 59). Le glycanne étant de plus sensible à l'action de l'endo H, ils en déduisent que l'oligosaccharide est de type oligomannosidique. Ce n'est que plus tard que Srisomsap *et al.* (1988a) et Marchase *et al.* (1990) décrivent le glycanne comme étant constitué de résidus de mannose liés O-glycosidiquement à la protéine.

Ces auteurs ont tout d'abord mis en évidence une glucose-phosphotransférase soluble dans le cytosol qui catalyse le transfert du composé Glc-1P du donneur UDP-Glc sur l'un des résidus de mannose du glycanne décrit ci-dessus (Koro et Marchase (1982)). Ils ont démontré par la suite que la seule protéine acceptrice est une phosphoglycoprotéine cytosolique de 62 à 63 kDa (pgp62) (Hiller *et al.* (1987), Marchase *et al.* (1987), Sattir *et al.* (1990)). Chez la paramécie, cette phosphoglycoprotéine de 62 kDa est la parafusine (impliquée dans la fusion des membranes durant

l'exocytose) (Gilligan et Satir (1982)). Cette même phosphoglycoprotéine de 62 kDa existe chez *Saccharomyces cerevisiae*. Il s'agit de la phosphoglucomutase, qui présente aussi un grand pourcentage d'homologie avec la phosphoglucomutase du muscle de Lapin (Marchase *et al.* (1993)).

La glucose-phosphotransférase est quant à elle, dans le foie de Rat, associée à la membrane plasmique (Srisomsap *et al.* (1988b)), son site actif étant orienté vers le cytosol.

De la même façon, Srisomsap *et al.* (1989) ont mis en évidence une α -glucose-1-phosphate phosphodiesterase dans le cytosol de foie de Rat. Cette enzyme joue un rôle important dans le mécanisme de l'exocytose. Ainsi, chez la paramécie, la parafusine est déphosphorylée et rephosphorylée rapidement, en présence de Ca^{++} , au cours de l'exocytose *in vivo* (Subramanian et Satir (1992)).

Aussi, il est possible de concevoir qu'après déphosphorylation, l'oligosaccharide mannosylé lié *O*-glycosidiquement constitue un substrat endogène pour l' α -D-mannosidase cytosolique.

TRAVAUX PERSONNELS

I. Matériels et méthodes

Au cours de ce paragraphe, nous détaillerons les matériels et méthodes qui ne font pas l'objet d'un commentaire au sein des paragraphes « materials and methods » contenus dans les comptes-rendus des articles « *Soluble forms of α -D-mannosidases from rat liver. Separation and characterization of two enzymatic forms with different substrate specificities* » (page 93) et « *Evidence for the hydrolysis of oligosaccharide-diphospho-dolichol by the cytosolic α -D-mannosidase from rat liver. A possible alternative route for the biosynthesis of N-glycosylproteins* » (page 116).

A. Fractionnement cellulaire

Des Rats femelles (Wistar, 6 à 8 semaines) sont mis à jeun une nuit avant d'être sacrifiés par décapitation. Les foies sont rapidement prélevés et placés en tampon Tris/HCl 20 mM pH 7,4 NaN₃ 0,02 % (tampon I) contenant une solution de saccharose 0,25 M et un cocktail d'antiprotéases composé de PMSF (20 μ g/ml), leupeptine (0,5 μ g/ml), pepstatine A (0,7 μ g/ml) et aprotinine (1 μ g/ml). Les étapes de purification sont dès lors réalisées à 4°C.

Le fractionnement est conduit selon la méthode de De Duve *et al.* (1955). Les foies sont homogénéisés à l'aide des appareils de Fisher et de Potter (600 t/min., 3 allers-retours) puis complétés à 20% (p/v) dans le tampon I, pour former l'homogénat de départ. Cet homogénat est centrifugé à 600 g pendant 10 min. (rotor BECKMAN SW 27, 2000 t/min.). On obtient alors le surnageant post-nucléaire. Ce surnageant est centrifugé à 1500 g

pendant 5 min. (rotor BECKMAN SW 27, 10000 t/min.). On récupère le surnageant post-mitochondrial que l'on centrifuge à 105000 g pendant 60 min. (rotor BECKMAN SW 27, 24000 t/min.). On obtient ainsi le surnageant cytoplasmique soluble, qui constitue le point de départ de la purification enzymatique (voir page 100).

II. Purification de l' α -D-mannosidase cytosolique

Les travaux entrepris au laboratoire depuis de nombreuses années ont permis d'une part, d'élucider le catabolisme lysosomique des glycanes de type *N*-acétyllactosaminique, en déterminant notamment les étapes initiatrices et limitantes de cette dégradation (Baussant *et al.* (1986), Brassart *et al.* (1987)), et d'autre part, d'étudier le catabolisme lysosomique et cytosolique des glycanes de type oligomannosidique (Michalski *et al.* (1990), Haeuw *et al.* (1991c)). Cette étude a permis de mettre en évidence une complémentarité d'action, entre les compartiments cytosolique et lysosomique, dans la dégradation de ces glycanes. Le catabolisme des glycanes de type oligomannosidique débuterait dans le cytosol et s'achèverait dans le lysosome (Haeuw *et al.* (1991b)).

Si la spécificité de l' α -D-mannosidase neutre a ainsi été parfaitement élucidée, la controverse liée à sa localisation purement cytosolique reste entière (Bischoff et Kornfeld (1986)).

L'étude de la spécificité de l'activité α -D-mannosidasique soluble de foie de Rat avait permis de montrer que l'hydrolyse d'un substrat oligosaccharidique de type $\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ conduisait à la formation d'un composé unique de type $\text{Man}_5\text{GlcNAc}$ « linéaire », similaire à l'intermédiaire polyprénologique, situé sur la face cytosolique de la membrane du *reticulum* endoplasmique au cours de la biosynthèse des précurseurs des glycanes liés *N*-glycosidiquement.

Afin d'apporter des arguments supplémentaires quant à la nature du compartiment subcellulaire siège de cette hydrolyse, nous avons entrepris de purifier l' α -D-mannosidase catalysant cette réaction.

Les résultats de cette étude sont rapportés dans le compte-rendu de l'article qui suit cette brève introduction.

Soluble forms of α -D-mannosidases from rat liver. Separation and characterization of two enzymatic forms with different substrate specificities

Thierry GRARD, Agnès SAINT-POL, Jean-François HAEUW, Catherine ALONSO, Jean-Michel WIERUSZESKI, Gérard STRECKER and Jean-Claude MICHALSKI

Laboratoire de Chimie Biologique (Unité mixte de Recherche du Centre National de la Recherche Scientifique n°111)

Université des Sciences et Technologies de Lille, France

Subdivision : Carbohydrates

Corresponding author : J.C. Michalski, laboratoire de Chimie Biologique, UMR du CNRS n°111, Université des Sciences et Technologies de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.

Telephone : 20 43 41 46. Fax : 20 43 65 55.

Abbreviations : deoxymannojirimycin, 1,5-dideoxy-1,5-imino-D-mannitol; swainsonine, 8 α -indolizidine-1 α ,2 α ,8 β -triol; DEAE, diethylaminoethyl; Man₉GlcNAc, Man(α 1-2)Man(α 1-3)[Man(α 1-2)Man(α 1-6)]Man(α 1-6)[Man(α 1-2)Man(α 1-2)Man(α 1-3)]-Man(β 1-4)GlcNAc; Man₅GlcNAc, Man(α 1-2)-Man(α 1-2)Man(α 1-3)[Man(α 1-6)]Man(β 1-4)GlcNAc; Man₉GlcNAc₂-P-P-Dol, Man₉GlcNAc₂-diphospho-dolichol.

Enzymes : α -D-mannosidase (EC 3.2.1.24), β -D-galactosidase (EC 3.2.1.23) glucose-6-phosphatase (EC 3.1.3.9), lactate deshydrogenase (EC 1.1.1.28), sialyltransferase (EC 2.4.99.1).

SUMMARY

We have previously reported the substrate specificity of the rat liver cytosolic α -D-mannosidase [Haeuw J.F., Strecker G., Wieruszeski J.M.,

Montreuil J. and Michalski J.C. (1991) *Eur. J. Biochem.* 202, 1257-1268]. Here, we report the characterization and the purification of this α -D-mannosidase and the presence of two soluble forms of α -D-mannosidases from rat liver. The cytosolic α -D-mannosidase was purified nearly 660-fold with 2.66% recovery to a state approaching homogeneity using : (1) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation; (2) concanavalin A sepharose chromatography; (3) affinity chromatography on a cobalt chelating sepharose column; (4) ion-exchange (DEAE trisacryl M) column chromatography; (5) molecular-size chromatography (Sephacryl S 200). The enzyme was eluted from the final column at an apparent molecular mass of 113 kDa. SDS/PAGE analysis yielded a major protein band at 108 kDa. Moreover, the purification allowed to distinguish two mannosidase activities with different kinetic properties. The first cytosolic activity retained on the cobalt chelating column was optimally active at neutral pH, was activated by Co^{++} , was strongly inhibited by swainsonine ($K_i = 3.7 \mu\text{M}$) but not by deoxymannojirimycin and was active with *p*-nitrophenyl α -D-mannoside ($K_m = 0.072 \text{ mM}$). $\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ was hydrolysed by the purified enzyme down to a $\text{Man}_5\text{GlcNAc}$ structure, i.e. $\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3)[\text{Man}(\alpha 1-6)]\text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$ which represents the Man_5 oligosaccharide chain of the dolichol pathway formed in the cytosolic compartment during the biosynthesis of *N*-glycosylprotein glycans. The second activity not retained on the cobalt chelating column was optimally active at neutral pH, was inhibited by swainsonine ($K_i = 28.4 \mu\text{M}$) but not by deoxymannojirimycin and was active with *p*-nitrophenyl α -D-mannoside ($K_m = 0.633 \text{ mM}$). $\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ was broken by this enzymatic activity down to $\text{Man}_8\text{GlcNAc}$ and $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$ structures. Similarities with endoplasmic reticulum α -D-mannosidase exist and this enzyme could be the cytosolic form of the endoplasmic reticulum α -D-mannosidase.

INTRODUCTION

Multiple forms of α -D-mannosidase able to hydrolyse all types of mannosidic linkages found in oligomannosidic type glycans are widely distributed in mammalian tissues (Winchester (1984), Moremen & Touster (1988)). These enzymes are classically divided in two groups. The first one includes mannosidases involved in the maturation of cell surface and intracellular *N*-glycans. They are found in the endoplasmic reticulum (Bischoff & Kornfeld (1983), Bischoff & Kornfeld (1986), Schweden *et al.* (1986)) and in the Golgi apparatus (Tulsiani & Touster (1988), Tulsiani *et al.* (1982b), Novikoff *et al.* (1983), Velasco *et al.* (1993), Lubas & Spiro (1987), Lubas & Spiro (1988)). The second class includes the cytosolic and lysosomal α -D-mannosidases which have been characterized from various tissues (Moremen & Touster (1988), Shoup & Touster (1976), Tulsiani & Touster (1987), Daher *et al.* (1992), De Gasperi *et al.* (1992a), Cheng *et al.* (1986), Michalski *et al.* (1990), De Gasperi *et al.* (1992b)). Among these different mannosidases, cDNAs have been cloned from mammalian tissues (Bischoff *et al.* (1990), Moremen & Robbins (1991), Bause *et al.* (1993)) or other eukaryotes (Kuranda & Robbins (1987), Yoshihisa & Anraku (1989), Camirand *et al.* (1991), Schatzle *et al.* (1992)). Nevertheless, the role or localization of some of these α -D-mannosidases are different and remain unknown (Tulsiani & Touster (1985), Monis *et al.* (1987), Bonay & Hughes (1991), Bonay *et al.* (1992), Tulsiani *et al.* (1989), Tulsiani *et al.* (1993)). In a previous report, we have demonstrated *in vitro* that the degradation of the oligomannosidic type glycans follows a very specific pathway inside the cytosol (Haeuw *et al.* (1991c)). Studies on the specificity of the cytosolic α -D-mannosidase (Moremen & Touster (1988), Tulsiani & Touster (1987)) also suggest that this enzyme plays a role in glycoprotein catabolism. For these reasons, we have undertaken the purification of the cytosolic α -D-mannosidase.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Reagents were obtained from the following sources : Swainsonine and deoxymannojirimycin, Boehringer (Mannheim); phenylmethylsulfonyl fluoride, Sigma; leupeptin, pepstatin A and aprotinin, Boehringer (Mannheim); Brij-35, Pierce; Concanavalin A-sepharose 4B, chelating Sepharose fast flow and Sephacryl S-200, Pharmacia; DEAE trisacryl M, Sepracor France; Electrophoresis chemicals including molecular-mass marker proteins, Bio-Rad.

Substrates

The oligosaccharide $\text{Man}_9\text{GlcNAc}$, i.e. $\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3)[\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-6)]\text{Man}(\alpha 1-6)[\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3)]\text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$, was isolated from urine of patients suffering from mannosidosis as previously described (Egge *et al.* (1982)).

Preparation of cytosolic fractions

The cytosolic extract was prepared as previously described (Haeuw *et al.* (1991c)). Aprotinin (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), leupeptin (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), pepstatin A (0.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and phenylmethylsulfonyl fluoride (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) were added as proteases inhibitors. α -D-mannosidases were purified from the supernatant obtained after centrifugation at 105 000 g during one hour.

Enzyme assays

To ensure the absence of contamination activities by processing α -D-mannosidases during cell fractionation, purity of the fractions was followed by the estimation of marker enzymes activities. Lactate deshydrogenase was selected as marker enzyme for the cytosol. Glucose-6-phosphatase and sialyltransferase were taken as marker enzymes respectively for the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. Lactate deshydrogenase was assayed according to Kornberg (1955) using sodium pyruvate and NADH as

substrates. Glucose-6-phosphatase was assayed according to Beaufay *et al.* (1974) but modified by the addition of 12 mM sodium tartrate to inhibit non-specific acid phosphatase activity (Brightwell & Tappel (1968)). β -D-galactosidase was assayed according to Rodriguez-Berrocal *et al.* (1988) and sialyltransferase according to Bauvois *et al.* (1981). α -D-mannosidase activity towards *p*-nitrophenyl- α -D-mannoside (*p*-nitrophenyl mannosidase activity) was quantified by measuring the release of *p*-nitrophenol (Shoup & Touster (1976)). The reaction mixture (0.2 ml) contained 4 mM *p*-nitrophenyl- α -D-mannoside in 0.1 ml of 50 mM sodium cacodylate pH 6.2 buffer containing 2 mM CoCl₂ and 0.1 ml of enzymatic fraction. The incubations were carried out for 20 min at 37°C. The reaction was stopped by adding 0.2 ml of ethanol at -20°C. After centrifugation (600 g; 10 min), 0.2 ml of the supernatant were added to 0.25 ml of 0.5 M of Na₂CO₃ and 0.7 ml of H₂O. The absorbance at 420 nm was measured to determine the amount of *p*-nitrophenol released. One unit was defined as the amount of enzyme that catalysed the release of 1 nmol of *p*-nitrophenol/min.

Amount of protein was measured by the colorimetric method of Bio-Rad® according to the manufacturer's instructions with BSA as standard.

HPLC analysis

For comparative studies, Man₉GlcNAc was incubated with the two α -D-mannosidase activities as following. The reaction mixture (3.75 ml) contained 1 mg of Man₉GlcNAc in 1.25 ml of 150 mM sodium cacodylate pH 6.2 buffer containing 3 mM CoCl₂ and 2.5 ml of enzymatic fraction (Man₉-mannosidase activity). The incubations were carried out for 4 h at 37°C, the reaction was stopped by adding 3.75 ml of ethanol at -20°C. After centrifugation (600 g; 10 min), the supernatant was desalted on coupled columns (15 ml) of Dowex 50 x 2 (200-400 mesh, H⁺ form) and A.G. 1 x 2 (200-400 mesh, CH₃COO⁻ form). Carbohydrate-containing material was further puri-

fied by gel chromatography on a Bio-Gel P2 (200-400 mesh) column (1 x 50 cm), eluted with water.

HPLC separation of oligomannosidic oligosaccharides was performed on primary amine bonded silica, 5 μm spheri-5 NH_2 column (0.7 x 25 cm, Brownlee). Approximately 500 μg oligosaccharide dissolved in 100 μl water was injected on the column. The column was equilibrated with the initial solvent (acetonitrile/water, 70:30). After the injection, a linear gradient to acetonitrile/water (60:40) was applied for 15 min, followed by a linear gradient to acetonitrile/water (50:50) for 75 min. The flow-rate was 1 ml/min. The oligosaccharides were detected at 206 nm. Integration of each peak area allowed the measurement of the rate of formation and disappearance of each isomer.

Kinetic properties of α -D-mannosidase activities

"Unbound" fraction α -D-mannosidase activity towards increasing concentrations of *p*-nitrophenyl- α -D-mannoside (0.05-3 mM) and Tris-eluted fraction α -D-mannosidase activity towards increasing concentrations of *p*-nitrophenyl- α -D-mannoside (0.02-0.5 mM) in the presence and absence of 5.0 μM swainsonine were measured. α -D-mannosidase activities towards increasing concentrations of deoxymannojirimycin (5-10-20 μM) were measured.

$^1\text{H-NMR}$ analysis

$^1\text{H-NMR}$ analysis of the oligosaccharides in $^2\text{H}_2\text{O}$ (99.95%), (Commissariat de l'énergie atomique, Saclay, France) was carried out on a Bruker AM-400 WB spectrometer operating in the Fourier-transform mode at a probe temperature of 300 K. Chemical shifts (δ) were given relative to acetone in $^2\text{H}_2\text{O}$ ($\delta = 2.225$ ppm). NMR spectrum was interpreted by comparison with NMR data from the literature (Vliegthart *et al.* (1983)) with an accuracy of 0.002 ppm.

Tableau IX : Enzymatic characterization of the cytosolic fraction

Activity in the crude homogenate was taken as 100%. Yield is expressed as a percentage of the total activity of the crude homogenate recovered in the cytosolic enriched fraction (105000 g supernatant). Purification is given by the relative specific activity; specific activity in the cytosolic fraction/specific activity in the starting homogenate.

Marker enzyme	Lactate deshydrogenase		Glucose-6-phosphatase		β-D-galactosidase		Sialyltransferase	
	Cytosol		endoplasmic reticulum		Lysosome		Golgi apparatus	
Specificity	yield	Purification	yield	Purification	yield	Purification	yield	Purification
	%	-fold	%	-fold	%	-fold	%	-fold
Crude homogenate	100	1	100	1	100	1	100	1
Supernatant	78.9	1.85	16.4	0.39	16.24	0.38	3.84	0.09

SDS/PAGE

The system of Laemmli (1970) was used to resolve the proteins under reducing conditions. Samples were solubilized by mixing in SDS buffer containing 2.5 % 2- β -mercaptoethanol, boiled for 3 min. The solubilized material was resolved on a 4-15% linear 1.5 mm-thick polyacrylamide gel. Gels were stained for protein with 0.5% Coomassie Blue in 20% methanol/10% acetic acid and destained in 10% methanol/7% acetic acid.

Purification of the cytosolic α -D-mannosidase

All purification steps were carried out at 0-4°C. The following buffers were used : buffer A, pH 7.4 [20 mM Tris/HCl buffer containing NaN₃ (0.02%)]; buffer B, pH 6.5 [5 mM acetate buffer containing NaCl 0.1 mM, MnCl₂, MgCl₂, CaCl₂ 1 mM and NaN₃ (0.02 %)]; buffer C, pH 7.5 [10 mM Hepes buffer containing NaCl 50 mM and Brij-35 (0.01%)]; buffer D, pH 7.5 [same as buffer C containing NaCl 1 M]; buffer E, pH 8.6 [20 mM Tris/HCl buffer containing NaN₃ (0.02%)]; buffer F, pH 8.6 [same as buffer E containing NaCl 0.3 M].

Step 1 : (NH₄)₂SO₄ precipitation

The soluble cytoplasmic supernatant (approx. 150 ml) was prepared from cytosolic extract prepared from 5 rat livers as described above. The supernatant was mixed with solid (NH₄)₂SO₄ with constant stirring to achieve 40% saturation. The mixture was kept at 0-4°C for 60 min, and the precipitate was collected by high-speed centrifugation (40 000 g for 10 min). The pelleted enzyme was suspended in 25-30 ml of buffer A, and dialysed against 65 vol. of buffer A for 24 h with three changes of the buffer. After dialysis, the sample was concentrated by ultrafiltration (Millipore YM-30 filter).

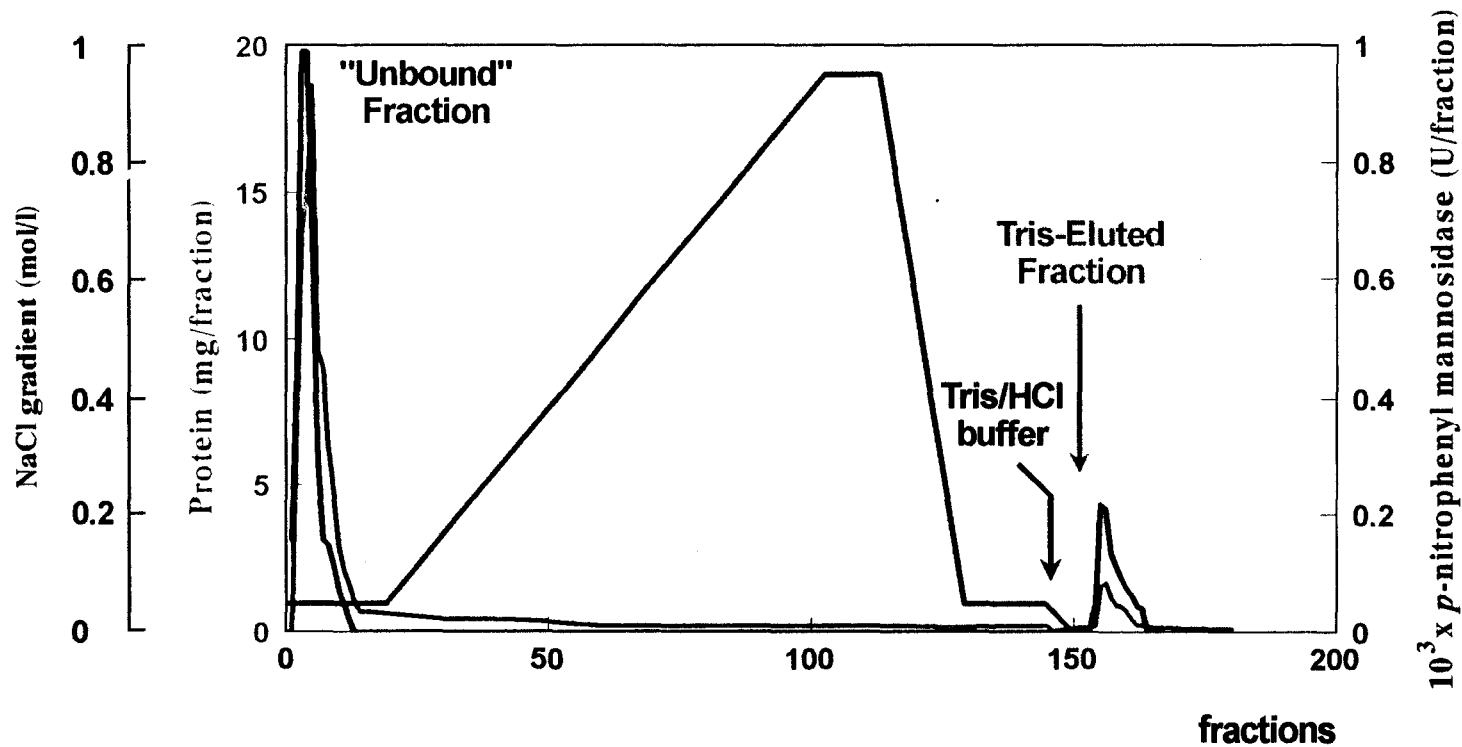


Figure 18 : Purification of α -D-mannosidase by affinity chromatography on a column of cobalt chelating sepharose

Approximately 5750 units of α -D-mannosidase was applied to the column (1 cm x 15 cm). Two fractions are active with PNP-Man as substrate. They are "unbound" fraction and Tris-eluted fraction. Other details are described in the text.

Step 2 : concanavalin A sepharose column chromatography

The concentrated sample was applied to the concanavalin A sepharose column (1 cm x 25 cm) equilibrated with buffer B. The enzyme, eluted in the buffer B, was concentrated by ultrafiltration (Millipore YM-30 filter).

Step 3 : cobalt chelating sepharose column chromatography

The sample was applied to the affinity column (1 cm x 15 cm) equilibrated with buffer C. The column had been first washed with 75-80 ml of buffer C. It was then applied 335-340 ml of a linear NaCl gradient (0.05-1 M) and 125-130 ml of a linear NaCl gradient (1-0.05 M) before the column had been washed with buffer A. The Tris-eluted fraction was concentrated by ultrafiltration (Millipore YM-30 filter).

Step 4 : DEAE trisacryl M column chromatography

The concentrated sample of the Tris-eluted fraction was applied to a DEAE trisacryl M column (2 cm x 25 cm) equilibrated with buffer E. After the column had been washed with 50 ml of buffer E, it was eluted with 1000 ml of a NaCl gradient (0-0.3 M) in buffer E. Fractions (4 ml) were collected at a flow rate of 48 ml/h. Each fraction was checked for protein and *p*-nitrophenyl mannosidase activity.

Step 5 : molecular size column chromatography

Pooled fractions were concentrated using a microconcentrator (Centricon 30). The enzyme was resolved by gel filtration on a column (2 cm x 55 cm) of Sephacryl S 200 equilibrated with buffer A. Fractions (4 ml) were collected at a flow rate of 10.8 ml/h .

RESULTS

All purification steps were carried out in the presence of proteinase inhibitors to avoid possible contaminations by other subcellular compartments. This objective was very important since lysosome, endoplasmic re-

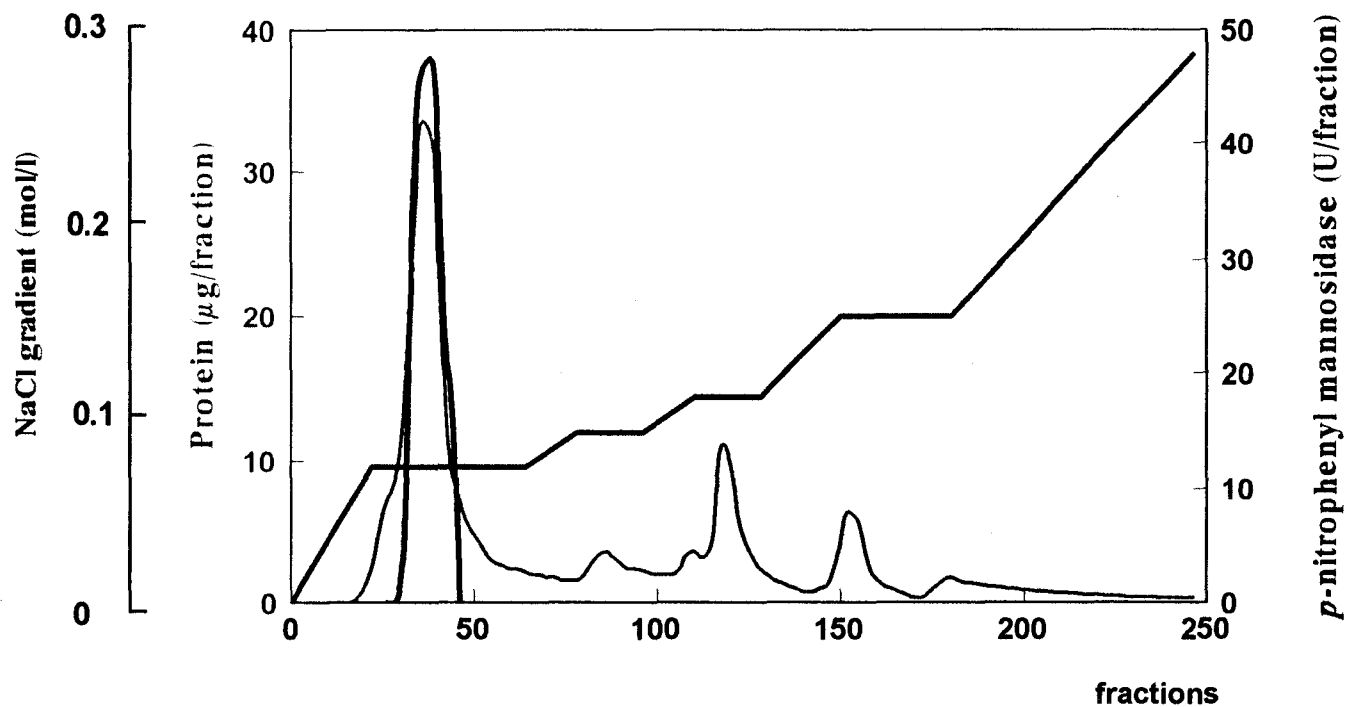


Figure 19 : Chromatography of cytosolic α -D-mannosidase on a column of DEAE trisacryl M
 Approximately 855 units of the enzyme was applied to the column (2 cm x 25 cm) and eluted with a gradient of NaCl.
 Other details are described in the text.



ticulum and Golgi apparatus are known to contain α -D-mannosidase activities. The supernatant obtained after 105 000 g centrifugation contained 78.9% lactate dehydrogenase activity with twofold enrichment over the crude homogenate (Tableau IX page 99). Lactate dehydrogenase is a marker enzyme for the cytosol. In contrast, the endoplasmic reticulum marker, glucose-6-phosphatase and the lysosomal marker, β -D-galactosidase, were lowly enriched from the initial activity. The Golgi marker, sialyltransferase, was almost undetectable in the cytosolic fraction.

Using $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation as a first step for cytosolic α -D-mannosidase purification, we recovered 85.74% of the activity using 40% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturation (Tableau X page 105).

Concanavalin A sepharose column chromatography was used to free the cytosolic α -D-mannosidase from the potential presence of Golgi and lysosomal α -D-mannosidase contaminants which are selectively bound to the column (Opheim & Touster (1978), Tulsiani *et al.* (1977)). The total yield enzyme was not very different after α -D-mannosidase elution on concanavalin A sepharose column suggesting a low contamination with mannosidases from other subcellular compartments (Tableau X page 105).

The cobalt chelating sepharose column chromatography was used because of the strong activation of the cytosolic α -D-mannosidase observed in presence of cobalt ions as previously described (Haeuw *et al.* (1991c)) and was also based on a report showing the purification of a soluble mannosidase from monkey brain (Mathur & Balasubramanian (1984)). This chromatographic step allowed to discriminate between two mannosidases forms, respectively, an "unbound" and a "Tris-eluted" fraction (Figure 18 page 101). Both fractions are active using *p*-nitrophenol as substrate. Nevertheless, their reactivity towards the $\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ oligosaccharide is completely different as indicated below.

Tableau X : Purification of cytosolic α -D-mannosidase from rat liver

The soluble cytosolic supernatant was prepared from the livers of five rats. The enzyme from various purification steps was assayed using 4 mM *p*-nitrophenyl α -D-mannoside in 0.1 ml of 50 mM sodium cacodylate pH 6.2 buffer containing 2 mM CoCl_2 as described in the materials and methods section.

Fraction	Total protein	Total activity	Specific activity	Recovery	Purification
	mg	units ¹	units/mg	%	-fold
Supernatant	1887.8	6920	3.66	100	1
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0-40%)	236.5	5933.4	25.01	85.74	6.83
Concanavalin A sepharose	207.9	5741.1	27.6	82.96	7.54
Cobalt chelating sepharose	6.35	853.77	134.45	12.34	36.73
DEAE trisacryl M	0.351	468.4	1334.47	6.77	364.61
Sephacryl S 200	0.0764	184.6	2416.23	2.66	660.17

1. One unit of enzyme is defined as the amount of enzyme catalyzing the release of 1 nmol of *p*-nitrophenol/min under the conditions of the standard assay defined in the materials and methods section.

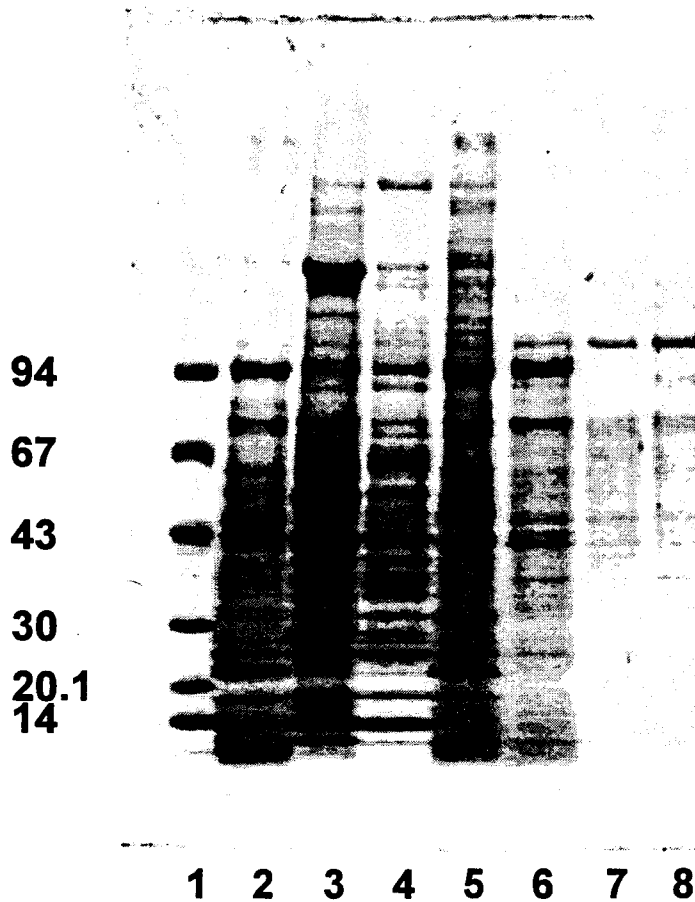


Figure 20 : Electrophoretic behaviour of the purified α -D-mannosidase

SDS/PAGE was carried out on the different protein pools :

lane 1 : standard marker proteins.

lane 2 : concanavalin A; 40 μ g of enzyme protein containing 1.1 unit of activity.

lane 3 : crude homogenate.

lane 4 : supernatant; 40 μ g of enzyme protein containing 0.15 units of activity.

lane 5 : $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 40 μ g of enzyme protein containing 1.0 unit of activity.

lane 6 : cobalt; 40 μ g of enzyme protein containing 5.38 units of activity.

lane 7: DEAE; 30.5 μ g of enzyme protein containing 40.7 units of activity.

lane 8 : Sephacryl S 200; 20 μ g of enzyme protein containing 48.6 units of activity.

The α -D-mannosidase started to be eluted on DEAE trisacryl M column in fraction 30 and the peak activity was present over 15 fractions (Figure 19 page 103).

Pooled fractions showed a specific activity of approx. 1335 units/mg of protein, which corresponds to 365-fold purification over the cytoplasmic supernatant (Tableau X page 105).

Rat liver cytosolic α -D-mannosidase was purified nearly 660-fold (Tableau X page 105). Between 2.5 and 3 % of the original enzyme activity was eluted from the molecular size column at an apparent molecular mass of 113 kDa. The purified enzyme, when subjected to SDS/PAGE under reducing conditions, resolved into a major protein band of apparent molecular mass of 108 kDa and 3 to 4 minor bands (Figure 20 page 106). The fact that the native enzyme was eluted from a gel filtration column at an apparent molecular mass of 113 kDa suggests that the enzyme is a monomer .

The "unbound" and Tris-eluted fractions showed a maximum activity at pH 6.4 to 6.8 (Figure 21 page 108). But, the affinity for *p*-nitrophenyl α -D-mannoside is different for the two mannosidase activities. The "unbound" fraction showed a K_m of 0.633 mM while Tris-eluted fraction had a K_m of 0.072 mM. Neither activities were inhibited by 1-deoxymannojirimycin, a potent inhibitor of Golgi mannosidase I (Bischoff & Kornfeld (1984)). Both however display different inhibition kinetics with respect to swainsonine. A 28.4 μ M K_i was found for the "unbound" fraction while that of the Tris-eluted fraction was at 3.7 μ M (Tableau XI page 111). Only the Tris-eluted fraction is activated by cobalt ions (data not shown).

Man₉GlcNAc was incubated with the two enzymatic fractions during 4 hours. The hydrolysis of Man₉GlcNAc by the "unbound" fraction (229.25 units/2.5 ml) was limited to Man₇GlcNAc (Figure 22A page 110). In the same conditions, the Tris-eluted fraction (90.75 units/2.5 ml) converted the

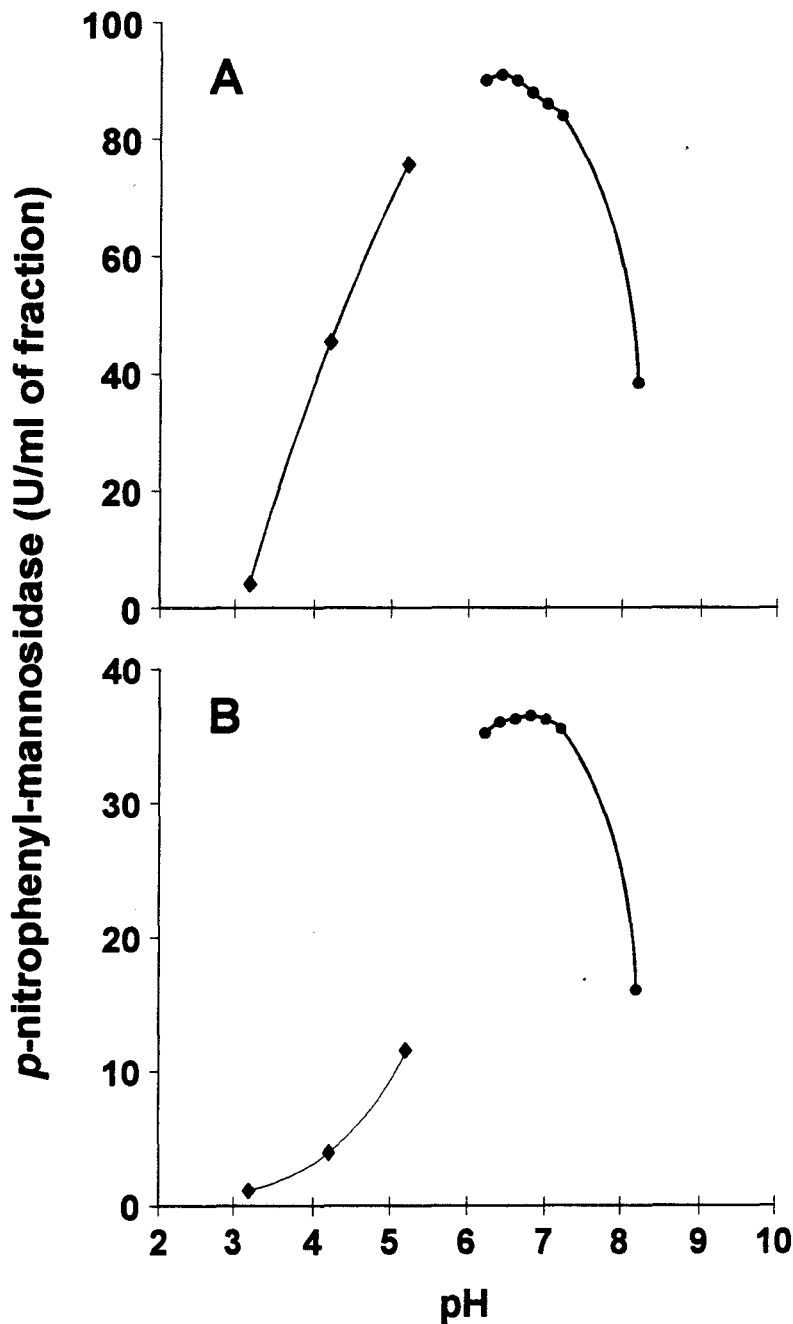


Figure 21 : Effect of pH on "unbound" and Tris-eluted α -D-mannosidase activities

Samples were incubated with 4 mM *p*-nitro-phenyl α -D-mannoside. The reaction buffers were 0.05 M citrate phosphate (pH 3.2-5.2) [◆] and 0.05 M sodium cacodylate buffer (pH 6.2-8.2) [●].

A : "unbound" fraction on cobalt sepharose column; **B** : Tris-eluted fraction on cobalt sepharose column.

substrate to Man₅GlcNAc as a sole final hydrolysis product. Indeed, after 4 hours incubation, no intermediate isomers can be detected (Figure 22B page 110). In the two cases, the rate of formation of each isomer is given (Tableau XII page 111).

The structure of the Man₅GlcNAc oligosaccharide was further controlled by ¹H-NMR. The accumulated Man₅GlcNAc is an oligosaccharide lacking the α -1,3-linked Man-A residue as can be deduced from the analysis of the Man₅GlcNAc NMR spectrum (Figure 23 page 113) in which the Man-A C1H resonance is absent and the Man-4' C1H signal is upfield shifted to $\delta = 4.916$ ppm.

DISCUSSION

A previous report demonstrated an immunological relationship between the endoplasmic reticulum α -D-mannosidase, and the cytosolic α -D-mannosidase suggesting that the endoplasmic reticulum α -D-mannosidase escaped its compartment during cell fractionation (Bischoff & Kornfeld (1986)). These results contradicted our own about the exact subcellular localization of the soluble form of the α -D-mannosidase. Nevertheless, different experiments about the substrate specificity of the "so-called" soluble α -D-mannosidase argue in favour of an enzymatic form specifically localized in the cytosol (Tulsiani & Touster (1987), Daher *et al.* (1992), De Gasperi *et al.* (1992a)). In the present report, in our effort to purify the soluble enzyme, we succeed in discriminating between two soluble α -D-mannosidase activities.

Curiously, the cobalt "unbound" activity shows an optimum pH (Figure 21 page 108), a substrate specificity (Figure 22A page 110) and a low inhibition by swainsonine (Tableau XI page 111) similar to those reported for the endoplasmic reticulum α -D-mannosidase (Bischoff & Kornfeld (1983)).

These results are consistent with a previous report about the isolation,

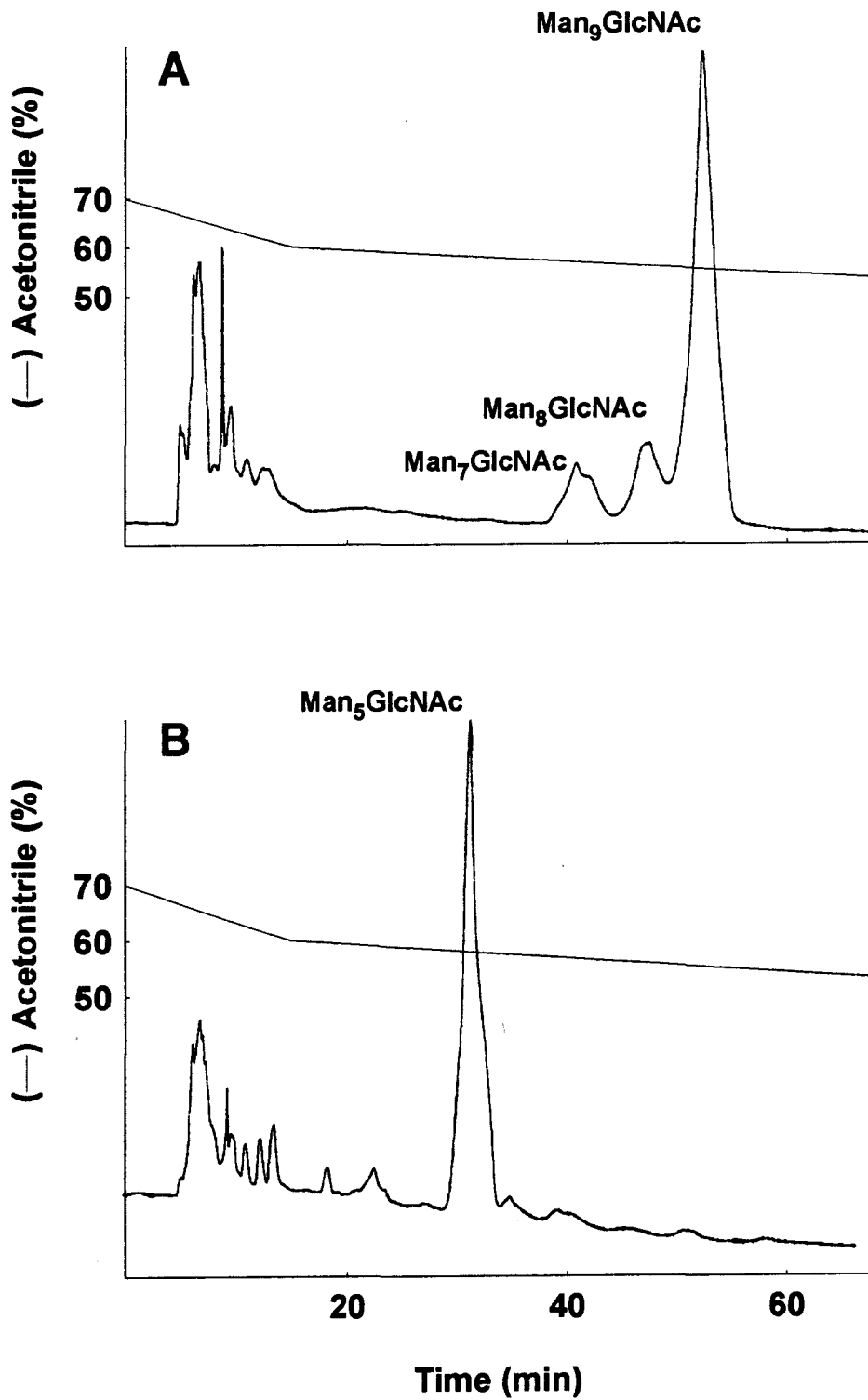


Figure 22 : HPLC elution profile on spheri-5 NH_2 column of the degradation of the oligosaccharides formed after a 4 h incubation time of $\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ with the "unbound" (A) and Tris-eluted (B) mannosidase activities

Tableau XI : Kinetic properties of the α -D-mannosidase activities

"Unbound" fraction K_m and K_i : Samples were incubated with increasing concentrations of *p*-nitrophenyl- α -D-mannoside (0.05-3 mM) in the absence (K_m) or presence (K_i) of 5.0 μ M swainsonine.

Tris-eluted fraction K_m and K_i : Samples were incubated with increasing concentrations of *p*-nitrophenyl- α -D-mannoside (0.02-0.5 mM) in the absence (K_m) or presence (K_i) of 5.0 μ M swainsonine.

	pH optimum	K_m (mM)	K_i (swainsonine) (μ M)
"unbound" fraction	6.4 - 6.8	0.633	28.4
Tris-eluted fraction	6.4 - 6.8	0.072	3.7

Tableau XII : Substrate specificity of "unbound" fraction and Tris-eluted fraction α -D-mannosidase activity

Samples were incubated as described in the materials and methods section during 4 hours. The percent of each product obtained is calculated from the integration of each oligosaccharide peak area obtained by HPLC.

products after 4 hours (%)	α -D-mannosidase activity	
	"unbound" fraction	Tris-eluted fraction
Man ₉ GlcNAc	82.4	-
Man ₈ GlcNAc	11.25	-
Man ₇ GlcNAc	6.35	-
Man ₆ GlcNAc	-	-
Man ₅ GlcNAc	-	100

characterization and expression of cDNAs encoding a rat liver endoplasmic reticulum α -mannosidase (Bischoff *et al.* (1990)). Because of the lack of signal sequences to direct translocation across the endoplasmic reticulum membrane, the authors suggested that the cDNA might encode a cytoplasmic α -D-mannosidase, and endoplasmic reticulum might also contain a distinct but very similar α -D-mannosidase activity. They also suggest that endoplasmic reticulum α -D-mannosidase could be translocated in the cytosol as a response to some metabolic signal, as previously described for the plasminogen activators inhibitor 2 (Belin *et al.* (1989)). This α -D-mannosidase activity corresponds to the α -D-mannosidase activity described here in the cobalt "unbound" fraction.

Moreover, the second enzymatic activity (Tris-eluted form) presents completely different cobalt dependence, substrate specificity (Figure 22B page 110), K_m and is more strongly inhibited by swainsonine (Tableau XI page 111). We might speculate that this enzymatic form constitutes a specific cytosolic α -D-mannosidase. These data confirm previous studies concerning the substrate specificity of a soluble α -D-mannosidase activity (Daher *et al.* (1992), De Gasperi *et al.* (1992a), Haeuw *et al.* (1991c)) showing that this enzyme is able to hydrolyse $\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ oligosaccharides to give a single product which is $\text{Man}_5\text{GlcNAc}$. The latter possesses the same structure as one of the polyprenolic-bound intermediates synthesised on the cytosolic face of the endoplasmic reticulum during the assembly of the common precursor of *N*-glycosylprotein glycans (Snider & Rogers (1984)). Moreover, we have demonstrated that the purified α -D-mannosidase is able to cleave the substrate $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ to give the final product $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ (unpublished work). The biological role of the specific cytosolic α -D-mannosidase could be in the regulation of the biosynthetic assembly of *N*-glycosylproteins by hydrolysis of dolichol intermediates or in *N*-glycans

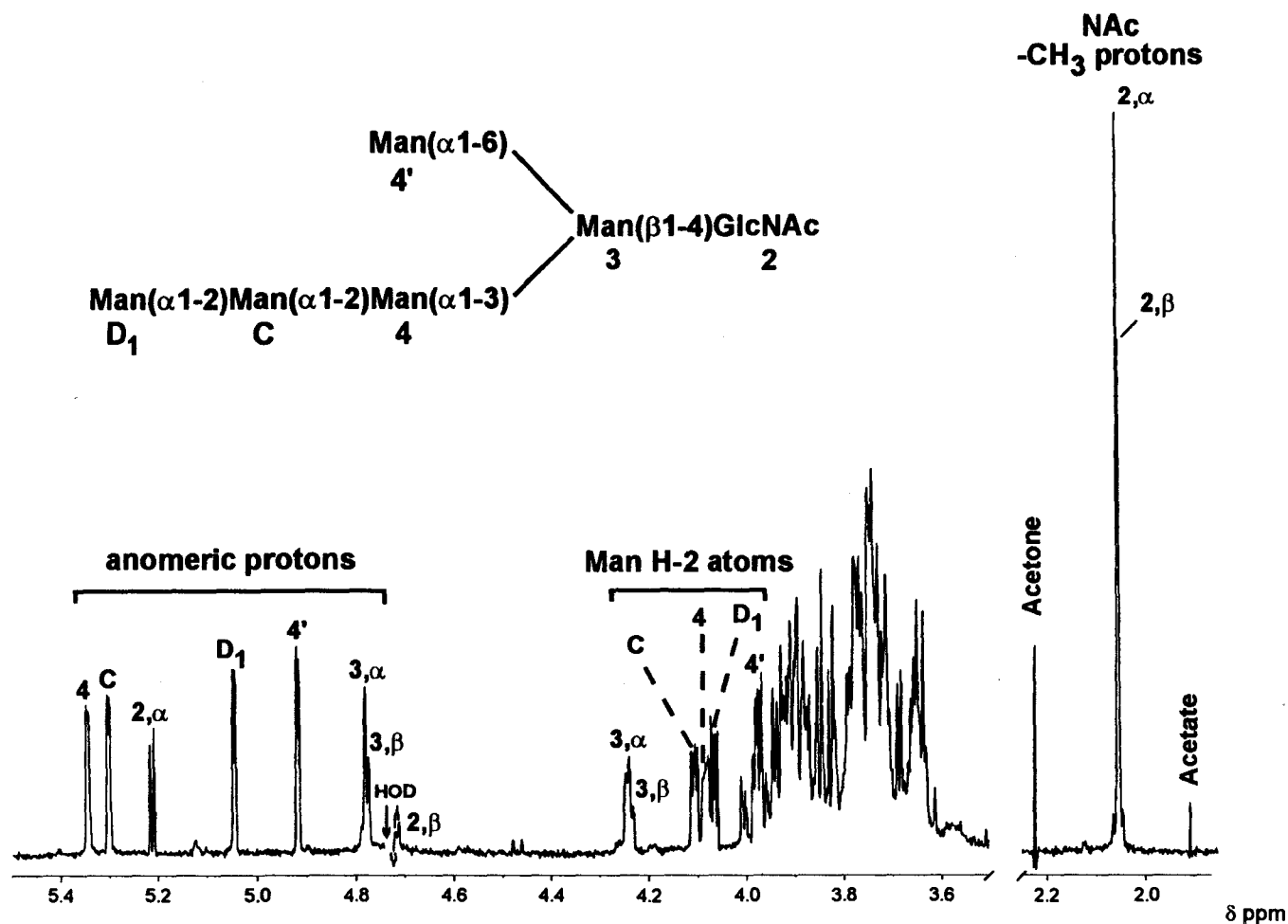


Figure 23 : ¹H-NMR spectrum of Man₅GlcNAc oligosaccharide resulting from the digestion of Man₉GlcNAc by the Tris-eluted mannosidase activity.



degradation, in synergy with the lysosomal α -D-mannosidases (Tulsiani & Touster (1987), Haeuw *et al.* (1991a), Haeuw *et al.* (1991b)).

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the *Centre National de la Recherche Scientifique (Unité mixte de Recherche n° 111 : Relations structure-fonctions des constituants membranaires; Director, Professor André Verbert)*, by the *Université des Sciences et Technologies de Lille* and by the *Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur*. We are grateful to Professors André Verbert and René Cacan for helpful discussions and advice. We are also indebted to Fabrice Allain and Christophe Mariller for their help and advice in the protein purification.

III. Spécificité de substrat de l' α -D-mannosidase cytosolique vis-à-vis d'oligosaccharides-diphospho-dolichols

L' α -D-mannosidase cytosolique purifiée dégrade le composé $\text{Man}_9\text{-GlcNAc}$ en un unique produit $\text{Man}_5\text{GlcNAc}$ pseudo-linéaire similaire à l'intermédiaire polyprénolique, situé sur la face cytosolique de la membrane du *reticulum* endoplasmique au cours de la biosynthèse des précurseurs des glycanes liés *N*-glycosidiquement. Ces résultats confirment ceux précédemment obtenus lors de l'étude de la spécificité de l' α -D-mannosidase soluble contenue dans le surnageant cytosolique après fractionnement cellulaire (Haeuw *et al.* (1991c)). L'hypothèse d'un rôle de l' α -D-mannosidase cytosolique dans le métabolisme des intermédiaires polyprénoliques avait alors été soulevée. Malheureusement, l'extrait protéique constitué par le surnageant cytosolique était trop hétérogène et empêchait ainsi de tirer toute conclusion quant aux incubations menées avec l'intermédiaire polyprénolique $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$.

Nous avons entrepris de réitérer ces manipulations, en incubant les intermédiaires polyprénoliques $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ et $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ avec l' α -D-mannosidase cytosolique purifiée. Les résultats obtenus, rapportés dans le compte-rendu de l'article qui suit cette brève introduction, permettent de démontrer que l' α -D-mannosidase cytosolique pourrait jouer un rôle dans le métabolisme des précurseurs de la biosynthèse des *N*-glycosylprotéines.

**Evidence for the hydrolysis of oligosaccharide-diphospho-
dolichol by the cytosolic α -D-mannosidase from rat liver. A
possible alternative route for the biosynthesis of *N*-
glycosylproteins**

Thierry GRARD, Agnès SAINT-POL, René CACAN, Gérard STRECKER,
André VERBERT and Jean-Claude MICHALSKI*

Laboratoire de Chimie Biologique (Unité mixte de Recherche du Centre
National de la Recherche Scientifique n°111)

Université des Sciences et Technologies de Lille, France

Tel : 20 43 41 46

Fax : 20 43 65 55

* To whom correspondence should be addressed.

Key words : α -D-mannosidase, cytosol, dolichol, *N*-glycosylation.

Abbreviations : P-P-Dol, pyrophosphoryldolichol; $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$,
 $\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3)[\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-6)]\text{Man}(\alpha 1-6)[\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3)]\text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc-P-P-Dol}$; $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$,
 $\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3)[\text{Man}(\alpha 1-6)]\text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc-P-P-Dol}$; UDP-GlcNAc, uridyl-diphospho-*N*-acetylglucosamine;
GDP-Man, guanosyl-diphospho-mannose; Dol-P-Man, mannosyl-phosphoryl-dolichol; Dol-P-Glc, glucosyl-phosphoryl-dolichol.

SUMMARY

We have previously reported the substrate specificity of the rat liver cytosolic α -D-mannosidase using $\text{Man}_9\text{GlcNAc}$, i.e. $\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3)[\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-6)]\text{Man}(\alpha 1-6)[\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3)]\text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$ as substrate [Haeuw J.F., Strecker G., Wieruszeski J.M., Montreuil J. and Michalski J.C. (1991) *Eur. J. Biochem.* 202, 1257-1268]. $\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ is hydrolysed and gives $\text{Man}_5\text{GlcNAc}$, i.e. $\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3)[\text{Man}(\alpha 1-6)]\text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$ which represents the Man_5 oligosaccharide chain of the dolichol pathway formed in the cytosolic compartment during the biosynthesis of *N*-glycosylprotein glycans. Here, we study the purified cytosolic α -D-mannosidase substrate specificity using radiolabelled oligosaccharide-diphospho-dolichol as substrates. The cytosolic α -D-mannosidase is able to cleave the substrate $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ to give the final product $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ suggesting a role of this enzyme in the regulation in the biosynthesis of asparagine-linked oligosaccharides.

INTRODUCTION

The biosynthesis of precursors of protein *N*-glycosylation is initiated by the formation of $\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$. Then, five mannoses are added yielding $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$. The sugar donors, in these reactions, are UDP-GlcNAc and GDP-Man. Thereafter, four mannoses and three glucoses are added to form $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ which is the glycosylation donor to nascent proteins in the lumen of the rough endoplasmic reticulum (Kornfeld & Kornfeld (1985)). The sugar donors, in this case, are Dol-P-Man and Dol-

P-Glc. Studies on the topography of the previous reactions have shown that the biosynthesis of these dolichol derivatives occurs in both sides of the endoplasmic reticulum membrane (Hirschberg & Snider (1987)). $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ has been detected on the cytosolic side of the endoplasmic reticulum membrane (Snider & Rogers (1984)) while the subsequent dolichol intermediates, with additional mannoses and glucoses, face the luminal side (Snider & Rogers (1984), Snider & Robbins (1982)).

We have previously reported the substrate specificity of the rat liver cytosolic α -D-mannosidase (Haeuw *et al.* (1991c)). This enzyme hydrolyses $\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ to give a unique hexasaccharide ($\text{Man}_5\text{GlcNAc}$) which has the same structure as the polyprenolic-bound oligosaccharide intermediate synthesized on the cytosolic face of the endoplasmic reticulum during the assembly of the common precursor of *N*-glycosylprotein glycans (Snider & Rogers (1984)). We have purified the cytosolic α -D-mannosidase activity (submitted for publication). In this report, we further investigate the purified cytosolic α -D-mannosidase specificity in regard of the two substrates $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$, i.e. $\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3)[\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-6)]\text{Man}(\alpha 1-6)[\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-2)-\text{Man}(\alpha 1-3)]\text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-O)\text{-P-P-Dol}$ and $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$, i.e. $\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3)[\text{Man}(\alpha 1-6)]\text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-O)\text{-P-P-Dol}$ to characterize a possible alternative route for the biosynthesis of *N*-glycosylproteins.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

D-[2-³H]Mannose (429 GBq/mmol) was purchased from Amersham International (Bucks, UK).

Substrates

Man₉GlcNAc₂-P-P-dolichol was prepared from splenocytes in 0.5 mM glucose medium conditions which gave labelled Glc₃Man₉GlcNAc₂-P-P-dolichol and Man₉GlcNAc₂-P-P-dolichol which were prepared from 4-week-old Swiss mice as previously described (Cacan *et al.* (1987)).

Man₅GlcNAc₂-P-P-dolichol was prepared from mutant cell line B3F7 as described previously (Cacan *et al.* (1993)). Briefly, cells were routinely cultured in monolayer in α minimal essential medium with 10% fetal calf serum (Gibco laboratories, Grand Island, NY, USA) at 34°C in 10-cm petri dishes, under 5% CO₂ atmosphere. Cells were suspended by the action of 1 ml trypsin/EDTA (0.5 g/l and 0.2 g/l, respectively, from Gibco laboratories) during 5 min at 34°C. The cells were then washed with 10 ml culture medium and resuspended in the incubation medium. The concentration of cells in this suspension was determined using a Coulter counter. Cells were then transferred to 39°C 8 h before labelling and kept at this temperature during labelling for 1 h with [2-³H]Mannose, 50 μ Ci/ml in α minimal essential medium without glucose and with 10% dialysed calf serum. Incubations were kept at 39°C (Stoll (1986)). At the end of the labelling period, the medium was removed by aspiration and the cell layer was rapidly washed three times with ice-cold phosphate-buffered saline. The reaction was ter-

minated by adding to the dish 1.1 ml of a mixture made of 8 vol. methanol and 3 vol. 0.1 ml Tris/HCl pH 7.4, 4 mM MgCl₂; 1.2 ml chloroform was added to obtain a final mixture of chloroform/methanol/water (3:2:1, by vol., the volume of the cells being estimated as 0.1 ml).

The sequential lipid extraction procedure was as described earlier (Cacan *et al.* (1980)). Briefly, the remaining interphase was washed five times with the theoretical upper phase (chloroform/methanol/water, 10:10:3, by vol.). This extract contained the oligosaccharide-lipids.

Purification of the cytosolic α -D-mannosidase

Cytosolic α -D-mannosidase (E.C.3.2.1.24) was purified as described elsewhere (submitted for publication). Briefly, the enzyme was purified after 40% saturation (NH₄)₂SO₄ precipitation of the cytosol using a combination of conA sepharose, cobalt chelating sepharose, anion exchange chromatography and gel filtration.

Incubations and separation of the products

Incubations were realized at 37°C in 50 mM sodium cacodylate buffer pH 6.2 in the presence of 0.1% Triton X-100 (to solubilize oligosaccharide-diphospho-dolichol substrates) and 1 mM cobalt chloride. For comparative kinetic studies, approximately 500.000 cpm of substrate were incubated with the purified cytosolic α -D-mannosidase during 16 hours. The oligosaccharide moiety of the oligosaccharide-lipids was then released by mild acid treatment (0.1 N HCl in tetrahydrofuran, 50°C for 2 h) (Stoll & Kragg (1983)). The soluble oligosaccharide material released in the aqueous phase

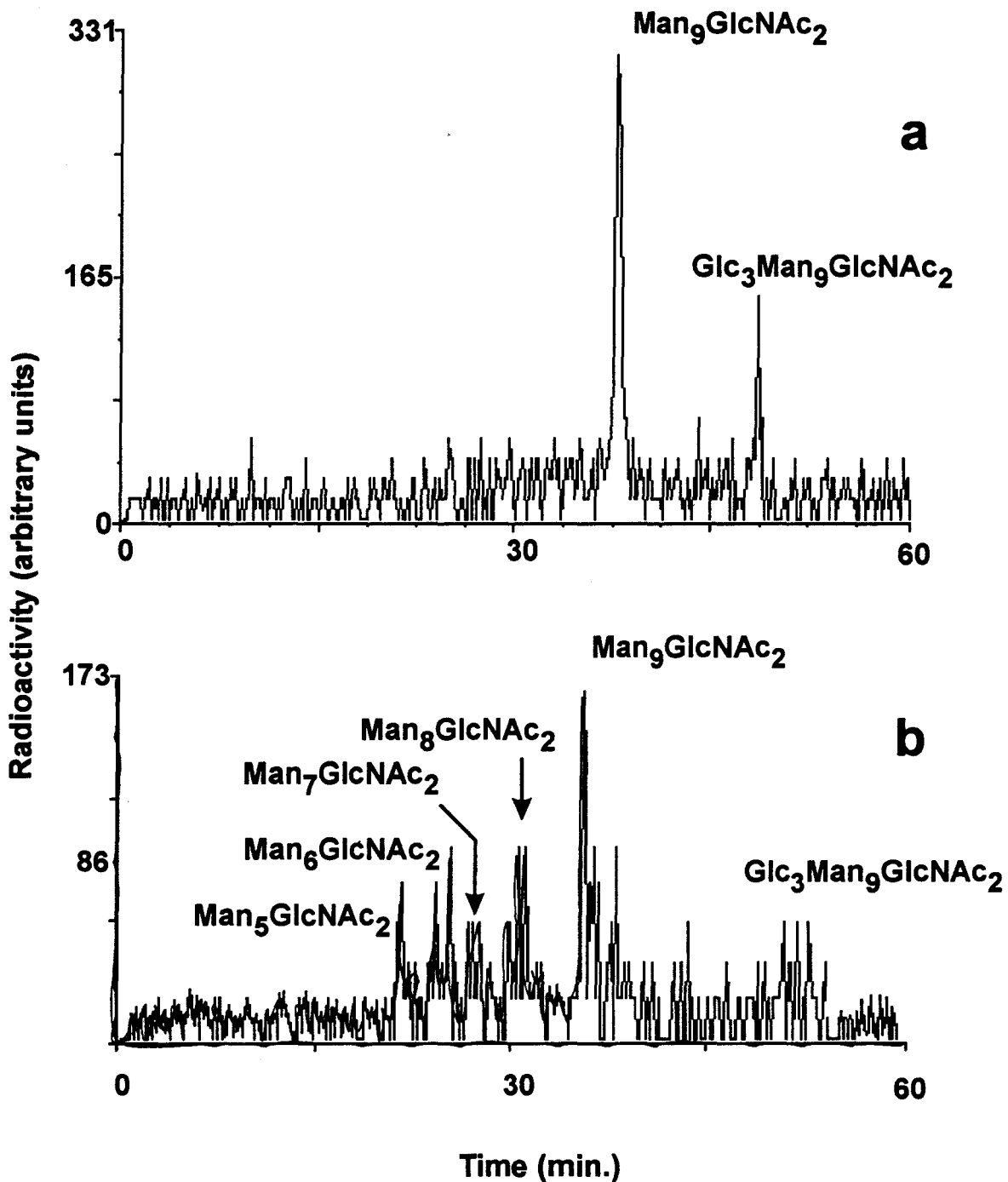


Figure 24 : HPLC analysis of the $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ degradation by the cytosolic $\alpha\text{-D}$ -mannosidase activity

Incubation and H.P.L.C. analysis conditions were as described in the materials and methods section.

(a) $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ as standard after THF hydrolysis. (b) degradation of $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$

was purified on a Biogel P-2 column (1 cm x 50 cm, 200-400 mesh) in 0.1 M acetic acid, before HPLC analysis.

HPLC analysis

Oligosaccharide material was analyzed by HPLC on an amino-derivatized column (NH₂ P-50 Asahipak column, Asahi Chemical Industry Co.) with a solvent system of acetonitrile/water from 70/30 to 50/50 by volume, at a flow rate of 1 ml/min for 75 min. The separation of the labelled oligosaccharides was followed by continuous-flow detection of the radioactivity with a Flo-one β -detector (Flotec, France) using Luma flow II (Lumac, The Netherlands) as scintillation fluid.

RESULTS

The cytosolic α -D-mannosidase purification (submitted for publication) was necessary to avoid aggregation between proteins fraction and oligosaccharides-diphospho-dolichol during the hydrolysis experiments.

Study of the hydrolysis of the Man₉GlcNAc₂-diphospho-dolichol by the cytosolic α -D-mannosidase

After 16 hours of incubation, Man₉GlcNAc₂-diphospho-dolichol (Figure 24a page 121) was hydrolysed by the purified cytosolic α -D-mannosidase activity (Figure 24b page 121) to give respectively the following products Man₈, Man₇, Man₆ and Man₅GlcNAc₂-diphospho-dolichol (Tableau XIII page 125) comparatively with standards oligosaccharides (data not shown). This result can be related to previous studies which indicate that Man₅GlcNAc

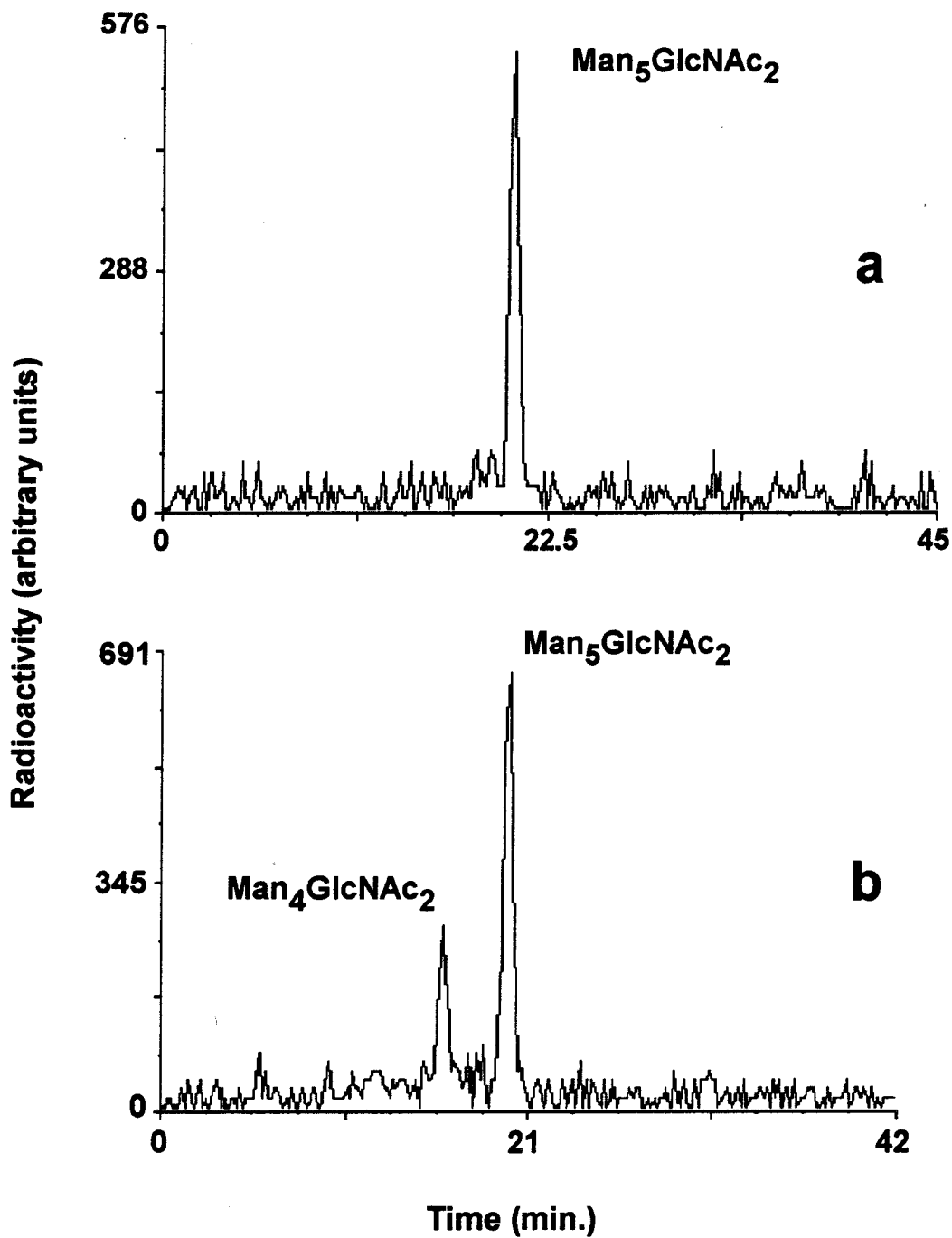


Figure 25 : HPLC analysis of the $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ degradation by the cytosolic $\alpha\text{-D}$ -mannosidase activity

Incubation and H.P.L.C. analysis conditions were as described in the materials and methods section.

(a) $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ as standard after THF hydrolysis. (b) degradation of $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$

oligosaccharide constitute the final product of the digestion of Man₉GlcNAc oligosaccharide by the cytosolic α -D-mannosidase (Haeuw *et al.* (1991c), Daher *et al.* (1992), De Gasperi *et al.* (1992a)). This observation was confirmed by the same experiments using Man₅GlcNAc₂-diphospho-dolichol as substrate.

Study of the hydrolysis of the Man₅GlcNAc₂-diphospho-dolichol by the cytosolic α -D-mannosidase

After 16 hours of incubation with the purified cytosolic α -D-mannosidase, a limited hydrolysis (35.3%) of Man₅GlcNAc₂-diphospho-dolichol (Figure 25a page 123) is observed (Tableau XIV page 125) giving a single Man₄GlcNAc₂-diphospho-dolichol (Figure 25b page 123). As previously described, Man₅GlcNAc is considered as a limit final product of hydrolysis by the soluble α -D-mannosidase (Haeuw *et al.* (1991c)). The limited hydrolysis of Man₅GlcNAc₂-diphospho-dolichol observed in this experiment, may certainly be explained by the incubation conditions : presence of detergent and low substrate concentration. Nevertheless, when compared to the hydrolysis of Man₉GlcNAc₂-diphospho-dolichol, Man₅GlcNAc₂-diphospho-dolichol presents a strong resistance to the α -D-mannosidase hydrolysis, suggesting that *in vivo*, it should represent the final product of mannosidase degradation.

DISCUSSION

In this report, we have demonstrated that oligosaccharide-diphospho-dolichol are potential substrates for the cytosolic α -D-mannosidase.

Tableau XIII : Substrate specificity of the α -D-mannosidase activity on $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$

Samples were incubated as described in the materials and methods section for 16 hours. The percent of each product obtained is calculated from the area of each oligosaccharide on the H.P.L.C. diagram.

oligosaccharide-diphospho- dolichol obtained after 16 hours of hydrolysis	α -D-mannosidase activity
	% of products
$[^3\text{H}]\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$	44.2
$[^3\text{H}]\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$	24.6
$[^3\text{H}]\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$	10.7
$[^3\text{H}]\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$	10.0
$[^3\text{H}]\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$	10.5

Tableau XIV : Substrate specificity of the α -D-mannosidase activity on $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$

Samples were incubated as described in the materials and methods section for 16 hours. The percent of each product obtained is calculated from the area of each oligosaccharide on the H.P.L.C. diagram.

oligosaccharide-diphospho- dolichol obtained after 16 hours of hydrolysis	α -D-mannosidase activity
	% of products
$[^3\text{H}]\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$	64.7
$[^3\text{H}]\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$	35.3

$\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ is hydrolyzed and leads to the release of $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$, which has the same structure as one of the oligosaccharides-diphospho-dolichol intermediates synthesized on the cytosolic face of the endoplasmic reticulum during the *N*-glycosylprotein glycan synthesis (Snider & Rogers (1984), Hirschberg & Snider (1987)). This is the first report showing the potential hydrolysis of oligosaccharide-diphospho-dolichol by a cytosolic located glycosidase. This enzyme may play a key-role in the biosynthetic assembly of *N*-linked glycans taking into account of different reports indicating that the resulting product of the enzymatic transfer of mannose from GDP-Man to lipid-linked oligosaccharides on the cytosolic face of the endoplasmic reticulum is the heptasaccharide $\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3)[\text{Man}(\alpha 1-6)]\text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}-(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$ (Forsee *et al.* (1977), Chambers *et al.* (1977), Schutzbach *et al.* (1980)). Nevertheless, GDP-Man transfer to lipid-linked oligosaccharides gives lipid-linked oligosaccharides from 7 to 10 monosaccharides, in absence of EDTA which inhibits the formation of Dol-P-Man (Chambers *et al.* (1977)) or in absence of amphomycin, which inhibits mannose transfer from GDP-Man to Dol-P-Man (Kang *et al.* (1978)). Another possibility should be that the mannosyltransferases responsible of the synthesis of Man_6 to $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ (Chambers *et al.* (1977)), are inhibited by EDTA or amphomycin. For this reason, lipid-linked oligosaccharides from 7 to 10 monosaccharides could occur on the cytosolic face of the endoplasmic reticulum. In this case, a possible role for the cytosolic α -D-mannosidase could be in the trimming of oligosaccharides-diphospho-dolichol (Figure 26 page 127) which may

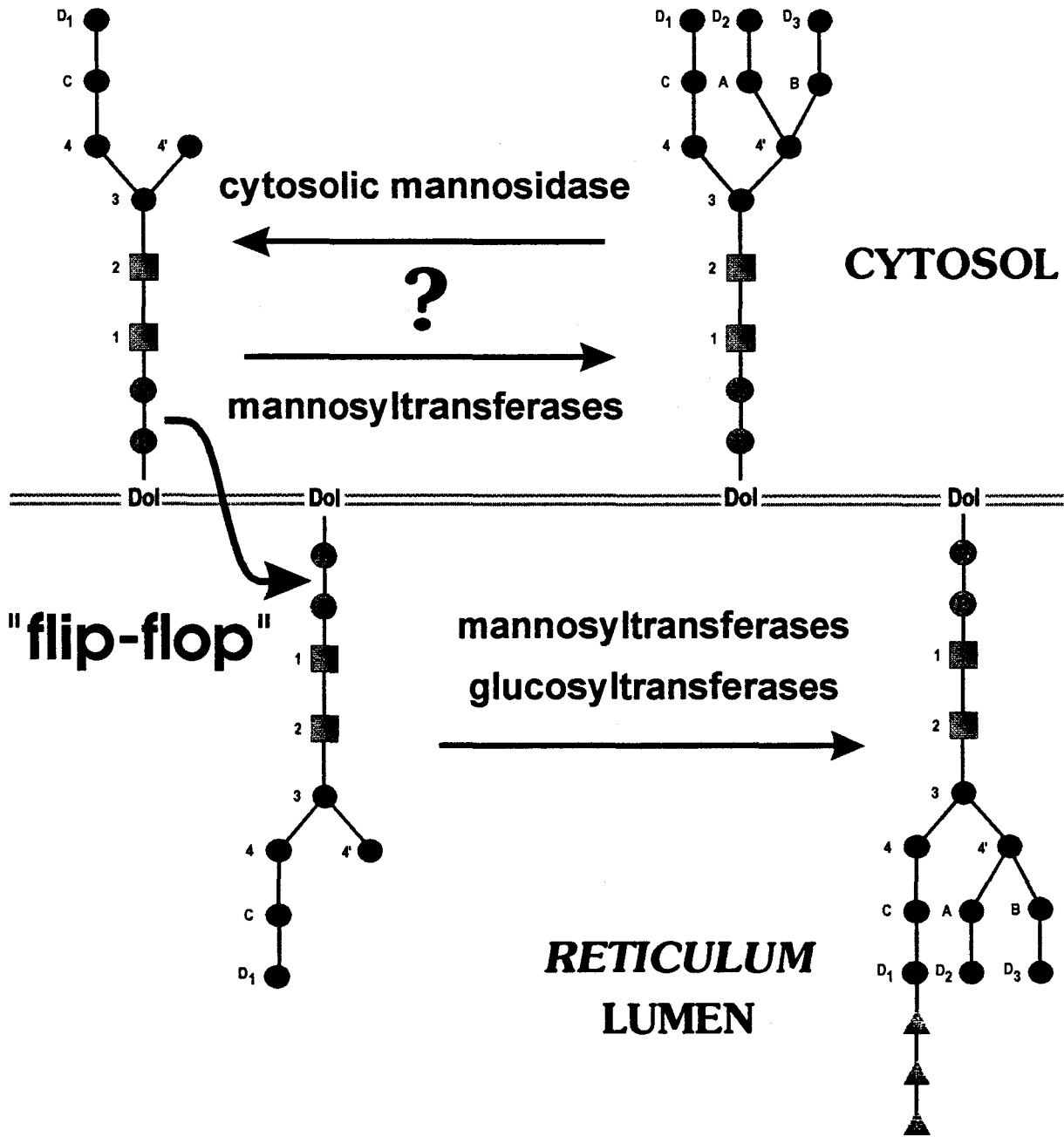


Figure 26 : Potential role of the cytosolic α -D-mannosidase in the trimming of oligosaccharide-diphosphodolichol

▲, Glc; ■, GlcNAc; ●, Man; ●, phosphoryl; Dol, dolichol.

constitute a new regulation pathway of the processing of asparagine-linked oligosaccharides.

Another potential role of the cytosolic α -D-mannosidase could be, as suggested by a previous report (Cacan *et al.* (1989)), in the catabolic pathway of oligosaccharides-diphospho-dolichol. These authors demonstrate that the degradation of oligosaccharide-diphospho-dolichol leads to the release of oligomannosides with $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ structure which could be translocated to the cytosol to be further degraded. In this case, the cytosolic α -D-mannosidase activity may participate to the catabolism of oligomannoside moieties. This suggestion is reinforced by a recent observation demonstrating that in presence of high concentration of swainsonine (a potent inhibitor of Golgi mannosidase II (Tulsiani *et al.* (1982a)) and lysosomal α -D-mannosidase (Dorling *et al.* (1980)), a linear $\text{Man}_5\text{GlcNAc}$ oligosaccharide is accumulated in the soluble fraction of cells (Kang *et al.* (1993)).

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the *Centre National de la Recherche Scientifique (Unité mixte de Recherche n° 111 : Relations structure-fonctions des constituants membranaires; Director, Professor André Verbert)*, by the *Université des Sciences et Technologies de Lille* and by the *Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur*. We are indebted to Odette Labiau and Catherine Dengremont for the preparation of oligosaccharide-diphospho-dolichol substrates.

IV. Discussion

Les intermédiaires polyprénoliques constituent des substrats potentiels pour l' α -D-mannosidase cytosolique. Snider et Rogers ont démontré, en 1984, que seuls les intermédiaires $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ franchissent la membrane du *reticulum* endoplasmique (voir page 80). En supposant que des intermédiaires polyprénoliques possédant plus de 5 mannoses sont formés sur la face cytosolique de la membrane du *reticulum* endoplasmique, servant ainsi de « réserve » à la biosynthèse des *N*-glycosylprotéines, l' α -D-mannosidase cytosolique, en élaguant les mannoses de ces composés, constituerait une enzyme-clef dans le déclenchement ou l'arrêt de la « translocation » des dérivés $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ (Figure 27 page 130). Dans ce cas, l' α -D-mannosidase cytosolique jouerait un rôle dans la régulation de la biosynthèse des *N*-glycosylprotéines.

D'autre part, les études menées par différentes équipes, sur la spécificité de substrat de l' α -D-mannosidase cytosolique montraient que cette enzyme jouerait un rôle crucial dans le catabolisme des glycanes de type oligomannosidique. En effet, Tulsiani et Touster (1987), De Gasperi *et al.* (1989) et Haeuw *et al.* (1991a et b) ont montré que les α -D-mannosidases cytosoliques possèdent une activité privilégiée vis-à-vis des composés de type oligomannosidique ramifiés, définissant ainsi l'existence possible d'une synergie d'action entre les compartiments cytosolique et lysosomique : la dégradation de certains oligosaccharides de type branché, libérés par l'action de l'endo-*N*-acétyl- β -D-glucosaminidase cytosolique (Pierce *et al.* (1979,

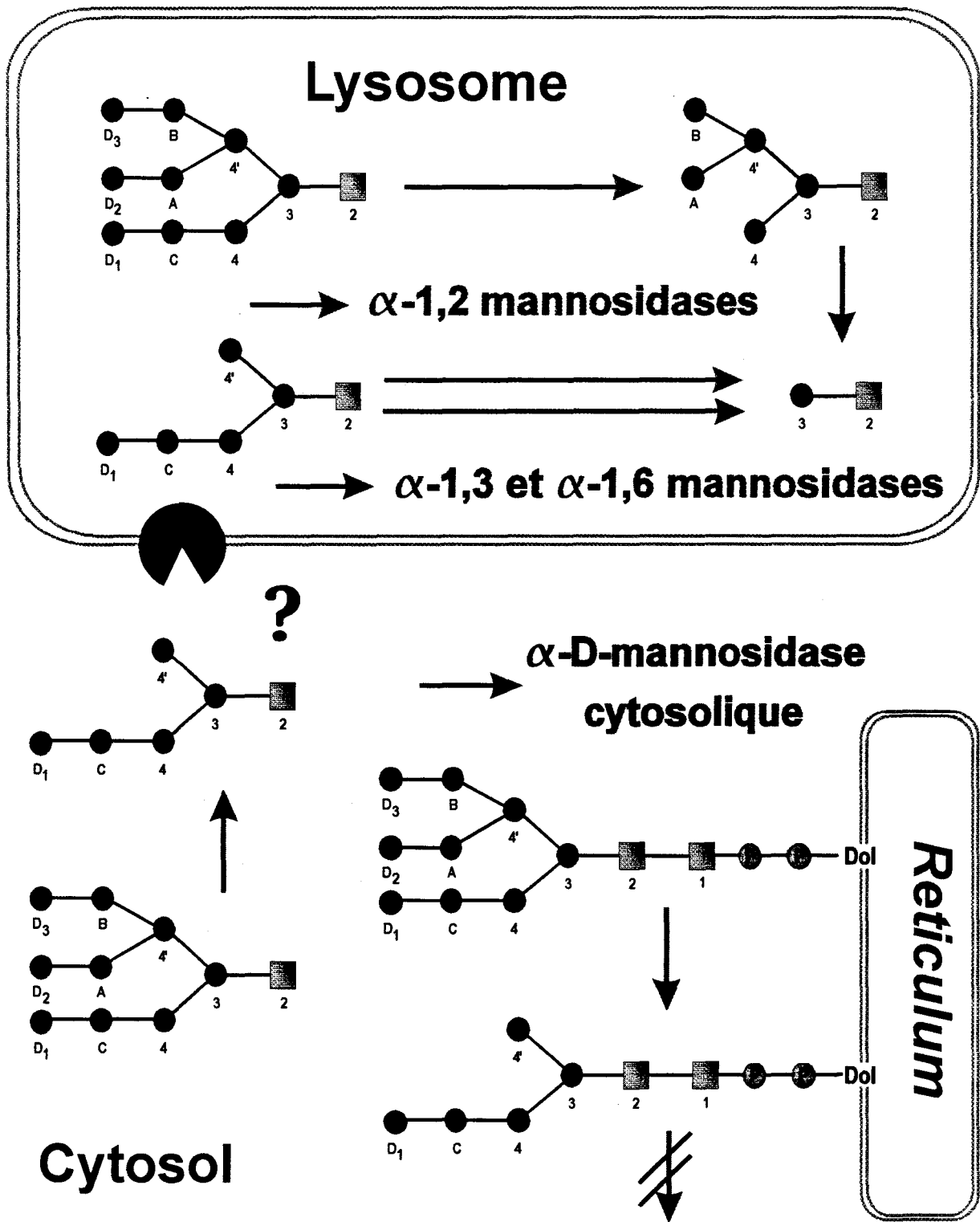


Figure 27 : Complémentarité d'action entre les α -D-mannosidases cytosolique et lysosomique

■, GlcNAc; ●, Man; ●, phosphoryl; Dol, dolichol.

1980)), débiterait dans le cytosol, et les produits linéaires formés seraient ensuite conduits vers les lysosomes pour la poursuite de l'hydrolyse par l'intermédiaire d'un transporteur dont la présence reste à démontrer (Figure 27 page 130).

Toutefois, il existe d'autres structures glycaniques mannosylées dans le cytosol (Krusius *et al.* (1986, 1987), Marchase *et al.* (1982)).

La phosphoglycoprotéine cytosolique de 62 kDa, substrat du transfert de Glc-1-P sur le carbone 6 d'un résidu de mannose a été décrite comme étant la parafusine chez la paramécie (Satir *et al.* (1990)), et la phosphoglucomutase chez la levure et le muscle squelettique de Lapin (Marchase *et al.* (1993)). La structure du glycane de cette glycoprotéine a été étudiée partiellement. Srisomsap *et al.* (1988a) ont démontré que ce glycane était constitué de résidus mannosidiques liés en α , couplés à la protéine sur les acides aminés sérine ou thréonine, par l'intermédiaire d'une liaison O-glycosidique. Ce type de structure oligosaccharidique est rencontrée dans les mannoprotéines des eucaryotes inférieurs. La structure mannosylée, liée O-glycosidiquement la plus fréquemment rencontrée est la suivante, Man(α 1-3)Man(α 1-2)Man(α 1-2)Man-O-Ser (Stewart *et al.* (1968), Raschke *et al.* (1973)). Or, cette O-glycosylation s'effectue au sein du *reticulum* endoplasmique et de l'appareil de Golgi chez la levure, alors que le glycane de la parafusine ou de la phosphoglucomutase est synthétisé par l'intermédiaire d'une mannosyltransférase cytosolique (non encore caractérisée à ce jour), uniquement à partir de GDP-Man (Srisomsap *et al.* (1988b)).

Il faudrait entreprendre la purification de la phosphoglucomutase afin de caractériser la structure complète de ses glycanes et vérifier ainsi que les oligosaccharides mannosylés constituent d'éventuels substrats pour l' α -D-mannosidase cytosolique.

CONCLUSION

Les travaux préalablement entrepris au laboratoire sur le catabolisme des glycannes de type oligomannosidique avaient conduit à la mise en évidence d'un catabolisme cytosolique des *N*-glycosylprotéines. L'étroite spécificité de cette enzyme avait permis d'émettre deux hypothèses :

- ✓ complémentarité d'action entre les compartiments cytosolique et lysosomique.
- ✓ intervention dans la biosynthèse des précurseurs de la *N*-glycosylation.

Toutefois, la controverse liée à sa localisation cytosolique restait entière.

Les résultats obtenus lors de la purification de l' α -D-mannosidase cytosolique apportent plusieurs éléments de réponse. Au cours de la purification, nous avons réussi à discriminer deux activités α -D-mannosidasiques :

- La première, retenue sur colonne de cobalt immobilisé, a été enrichie 660 fois. L' α -D-mannosidase cytosolique ainsi purifiée dégrade l'intermédiaire polyprénolique $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ en un unique produit $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$, dont la structure correspond à l'intermédiaire polyprénolique limite situé sur la face cytosolique de la membrane du *reticulum* endoplasmique. Ce résultat confirme l'intervention possible de l' α -D-mannosidase cytosolique dans la régulation de la biosynthèse des *N*-glycosylprotéines.

Il est aussi probable que l' α -D-mannosidase cytosolique joue un rôle dans la dégradation des glycannes mannosylés, spécifiquement cytosoliques,

décrits dans différents tissus animaux. Pour cela, il sera nécessaire d'étudier plus précisément la structure de ces glycanes.

- La seconde α -D-mannosidase, non retenue sur colonne de cobalt immobilisé, dégrade le composé $\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ en $\text{Man}_8\text{GlcNAc}$. Cette enzyme présente une grande similitude avec l' α -D-mannosidase soluble du *reticulum* endoplasmique. En 1990, le clonage du gène codant pour cette dernière enzyme a permis de considérer différemment sa localisation subcellulaire. L' α -D-mannosidase soluble du *reticulum* endoplasmique pourrait être localisée au sein du cytosol ou du *reticulum* endoplasmique, suivant l'épissage ou non de ses pré-mRNA.

Le fait d'avoir purifié l' α -D-mannosidase permet de lever en partie la controverse liée à sa localisation cytosolique. Cette distribution subcellulaire pourra d'ailleurs être confortée par des expériences d'immunolocalisation, à l'aide d'anticorps dirigés contre cette forme isoenzymatique. Il conviendra également de rechercher une éventuelle homologie avec les différentes α -D-mannosidases cellulaires, voire d'autres α -D-mannosidases solubles telle que, par exemple, l' α -D-mannosidase de cerveau de Rat.

BIBLIOGRAPHIE

Références

Pages

A

- ABELJON C. et HIRSCHBERG C.B. (1988) **Intrinsic membrane glycoproteins with cytosol-oriented sugars in the endoplasmic reticulum** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 1010-1014..... 84
- ABELJON C. et HIRSCHBERG C.B. (1990) **Topography of initiation of N-glycosylation reactions** *J. Biol. Chem.* **265**, 14691-14695..... 80
- AON M.A. et CURTINO J.A. (1985) **Protein-bound glycogen is linked to tyrosine residues** *Biochem. J.* **229**, 269-272..... 83
- AOYAGI T., YAMAMOTO T., KOJIRI K., MORISHIMA H., NAGAI M., HAMADA M., TAKEUCHI T. et UMEZAWA H. (1989) **Mannostatins A and B. New inhibitors of α -D-mannosidase produced by *Streptomyces verticillium verticillus* var. *quintum* ME3-AG3. Taxonomy, production, isolation, physico-chemical properties and biological activities** *J. Antibiot.* **42**, 883-889..... 78
- AQUINO D.A., MARGOLIS R.U. et MARGOLIS R.K. (1984a) **Immunocytochemical localization of a chondroitin sulfate proteoglycan in nervous tissue. I. Adult brain, retina, and peripheral nerve** *J. Cell Biol.* **99**, 1117-1129 86
- AQUINO D.A., MARGOLIS R.U. et MARGOLIS R.K. (1984b) **Immunocytochemical localization of a chondroitin sulfate proteoglycan in nervous tissue. II. Studies in developing brain** *J. Cell Biol.* **99**, 1130-1139 86

B

- BANERJEE D.K. (1989) **Amphomycin inhibits mannosylphosphoryldolichol synthesis by forming a complex with dolichylmonophosphate** *J. Biol. Chem.* **264**, 2024-2028..... 82
- BANERJEE D.K., SCHER M.G. et WAECHTER C.J. (1981) **Amphomycin. Effect of the lipopeptide antibiotic on the glycosylation and extraction of dolichyl monophosphate in calf brain membranes** *Biochemistry* **20**, 1561-1568..... 82
- BARON M.D. et GAROFF H. (1990) **Mannosidase II and the 135-kDa Golgi-specific antigen recognized by monoclonal antibody 53FC3 are the same dimeric protein** *J. Biol. Chem.* **265**, 19928-19931..... 42

- BAUSE E., BIEBERICH E., ROLFS A., VÖLKER C. et SCHMIDT B. (1993) **Molecular cloning and primary structure of mang-mannosidase from human kidney** *Eur. J. Biochem.* 217, 535-540 33; 95
- BAUSE E., BREUER W., SCHWEDEN J., ROESER R. et GEYER R. (1992) **Effect of substrate structure on the activity of Mang-mannosidase from pig liver involved in N-linked oligosaccharide processing** *Eur. J. Biochem.* 208, 451-457 32; 36
- BAUSSANT T., STRECKER G., WIERUSZESKI J.M., MONTREUIL J. et MICHALSKI J.C. (1986) **Catabolism of glycoprotein glycans. Characterization of a lysosomal endo-N-acetyl- β -D-glucosaminidase specific for glycans with a terminal chitobiose residue** *Eur. J. Biochem.* 159, 381-385..... 91
- BAUVOIS B., CACAN R., NURDEN A.T., CAEN J., MONTREUIL J. et VERBERT A. (1981) **Membrane glycoprotein Iib is the major endogenous acceptor for human platelet ectosialyltransferase** *Febs Lett.* 125, 277-281..... 97
- BEAUDET A.L. et NICHOLS B.L. (1976) **Residual altered α -mannosidase in human mannosidosis** *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 68, 292-298 66
- BEAUFAY H., AMAR-COSTESEEC A., PEYTMANS E., THINES-SEMPOUX U., WIBO M., et BERTHET J. (1974) **Analytical study of microsomes and isolated subcellular membranes from rat liver** *J. Cell Biol.* 61, 188-200 97
- BELIN D., WOHLWEND A., SCHLEUNING W.D., KRUITHOF E.K.O. et VASSALLI J.D. (1989) **Facultative polypeptide translocation allows a single mRNA to encode the secreted and cytosolic forms of plasminogen activators inhibitor 2** *EMBO J.* 8, 3287-3294 32; 112
- BEYTIA E.D. et PORTER J.W. (1976) **Biochemistry of polyisoprenoid biosynthesis** *Annu. Rev. Biochem.* 45, 113-142..... 48
- BISCHOFF J. et KORNFELD R. (1983) **Evidence for an α -mannosidase in endoplasmic reticulum of rat liver** *J. Biol. Chem.* 258, 7907-7910 28; 36; 37; 78; 95; 109
- BISCHOFF J. et KORNFELD R. (1984) **The effect of 1-deoxymannojirimycin on rat liver α -mannosidases** *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 125, 324-331 38; 76; 107
- BISCHOFF J. et KORNFELD R. (1986) **The soluble form of rat liver α -mannosidase is immunologically related to the endoplasmic reticulum membrane α -mannosidase** *J. Biol. Chem.* 261, 4758-4765 29; 36; 70; 91; 95; 109

- BISCHOFF J., LISCUM L. et KORNFELD R. (1986) The use of 1-deoxymannojirimycin to evaluate the role of various α -mannosidases in oligosaccharide processing in intact cells *J. Biol. Chem.* 261, 4766-4774..... 30; 33; 36
- BISCHOFF J., MOREMEN K.W. et LODISH H.F. (1990) Isolation, characterization and expression of cDNA encoding a rat liver endoplasmic reticulum α -mannosidase *J. Biol. Chem.* 265, 17110-17117.....
..... 30; 31; 34; 95; 112
- BLUMENFELD M.L. et KRISMAN C.R. (1986) The initiation of glycogen biosynthesis in rat heart α -1,4 glucans tightly associated with glycogen synthase *Eur. J. Biochem.* 156, 163-169 83
- BONAY P. et HUGHES C. (1991) Purification and characterization of a novel broad-specificity (α 1 \rightarrow 2, α 1 \rightarrow 3 and α 1 \rightarrow 6) mannosidase from rat liver *Eur. J. Biochem.* 197, 229-238 54; 55; 57; 95
- BONAY P., ROTH J. et HUGHES C. (1992) Subcellular distribution in rat liver of a novel broad-specificity (α 1 \rightarrow 2, α 1 \rightarrow 3 and α 1 \rightarrow 6) mannosidase active on oligomannose glycans *Eur. J. Biochem.* 205, 399-407 55; 57; 95
- BOSSUYT X. et BLANCKAERT N. (1993) Topology of nucleotide-sugar. Dolichyl phosphate glycosyltransferases involved in the dolichol pathway for protein glycosylation in native rat liver microsomes *Biochem. J.* 296, 627-632..... 80
- 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 the lysosomal aspartylglucosaminidase and endo-N-acetyl- β -D-glucosaminidase *Eur. J. Biochem.* 169, 131-136 91
- BRIGHTWELL R. et TAPPEL A.L. (1968) Lysosomal acid pyrophosphatase and acid phosphatase *Arch. Biochem. Biophys.* 124, 333-343 97

C

- CACAN R., CECHELLI 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, 469-474 119
- CACAN R., HOFACK B. et VERBERT A. (1980) Fate of oligosaccharide-lipid intermediates synthesized by resting rat-spleen lymphocytes *Eur. J. Biochem.* 106, 473-479..... 120

- CACAN R., LABIAU O., MIR A.M. et VERBERT A. (1993) Effect of cell attachment and growth on the synthesis and fate of dolichol-linked oligosaccharides in Chinese hamster ovary cells *Eur. J. Biochem.* 215, 873-881..... 119
- CACAN R., LEPERS A., BELARD 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..... 128
- CAMIRAND A., HEYSEN A., GRONDIN B. et HERSCOVICS A. (1991) Glycoprotein biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation and characterization of the gene encoding a specific processing α -mannosidase *J. Biol. Chem.* 266, 15120-15127..... 34; 35; 95
- CAPASSO J.M., ABELJON C. et HIRSCHBERG C.B. (1988) An intrinsic membrane glycoprotein of the Golgi apparatus with O-linked N-acetylglucosamine facing the cytosol *J. Biol. Chem.* 263, 19778-19782..... 84
- CARROLL M., DANCE N., MASSON P.K., ROBINSON D. et WINCHESTER B.G. (1972) Human mannosidosis, the enzymic defect *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 49, 579-583..... 61; 68
- CHAMBERS J., FORSEE W.T. et ELBEIN A.D. (1977) Enzymatic transfer of mannose from mannosyl-phosphoryl-polyprenol to lipid-linked oligosaccharides by pig aorta *J. Biol. Chem.* 252, 2498-2506..... 80; 82; 126
- CHAMPION M.J. et SHOWS T.B. (1977) Mannosidosis. Assignment of the lysosomal α -mannosidase B gene to chromosome 19 in man *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 2968-2972..... 61
- CHENG S.H., MALCOLM S., PEMBLE S. et WINCHESTER B. (1982) The subunit structure of the multiple forms of human liver acidic α -D-mannosidase *Biochem. Soc. Trans.* 10, 403-404..... 63; 67
- CHENG S.H., MALCOLM S., PEMBLE S. et WINCHESTER B. (1986) Purification and comparison of the structures of human liver acidic α -D-mannosidases A and B *Biochem. J.* 233, 65-72..... 39; 63; 67; 95
- CHOU C.F. et OMARY B.M. (1993) Mitotic arrest-associated enhancement of O-linked glycosylation and phosphorylation of human keratins 8 and 18 *J. Biol. Chem.* 268, 4465-4472..... 84
- CHOU C.F., SMITH A.J. et OMARY M.B. (1992) Characterization and dynamics of O-linked glycosylation of human cytokeratin 8 and 18 *J. Biol. Chem.* 267, 3901-3906..... 84

CLARKE B.L., NAYLOR C. et LENNARZ W.J. (1989) **Comparative studies on mannosylphosphoryl dolichol and glucosylphosphoryl dolichol synthases** *Chem. Phys. lipids* 51, 239-247 80

CORDES V.C. et KROHNE G. (1993) **Sequential O-glycosylation of nuclear pore complex protein gp62 in vitro** *Eur. J. Cell Biol.* 60, 185-193 84

D

D'ONOFRIO M., STARR C.M., PARK M.K., HOLT G.D., HALTIWANGER R.S., HART G.W. et HANOVER J.A. (1988) **Partial cDNA sequence encoding a nuclear pore protein modified by O-linked N-acetylglucosamine** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 9595-9599 84

DAHER S.A., DE GASPERI R., DANIEL P., HIRANI S., WARREN C. et WINCHESTER B. (1992) **Substrate specificity of human liver neutral α -mannosidase** *Biochem. J.* 286, 47-53 71; 72; 95; 109; 112; 124

DAHMS N.M., LOBEL P. et KORNFELD S. (1989) **Mannose-6-phosphate receptors and lysosomal enzyme targeting** *J. Biol. Chem.* 264, 12115-12118 59

DANIEL P.F., EVANS J.E., DE GASPERI R., WINCHESTER B. et WARREN C. (1992) **A human lysosomal $\alpha(1\rightarrow6)$ -mannosidase active on the branched trimannosyl core of complex glycans** *Glycobiology* 2, 327-336 66

DANIELS L.B., COYLE P.J., CHIAO Y.B., GLEW R.H. et LABOW R.S. (1981) **Purification and characterization of a cytosolic broad specificity β -glucosidase from human liver** *J. Biol. Chem.* 256, 13004-13013 85

DAVIS L.I. et BLOBEL G. (1987) **Nuclear pore complex contains a family of glycoproteins that includes p62. Glycosylation through a previously unidentified cellular pathway** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 7552-7556 84

DE DUVE C., PRESSMAN B.C., GIANETTO R., WATTIAUX R. et APPELMANS F. (1955) **Tissue fractionation studies. VI. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue.** *Biochem. J.* 60, 604-617 90

DE GASPERI R., DAHER S.A., DANIEL P.F., WINCHESTER B.G., JEANLOZ R.W. et WARREN C.D. (1991) **The substrate specificity of bovine and feline lysosomal α -D-mannosidases in relation to α -mannosidosis** *J. Biol. Chem.* 266, 16556-16563 65

- DE GASPERI R., DAHER S.A., HALL N., WINCHESTER B. et WARREN C.D. (1989) **Specificity of lysosomal α -mannosidase for natural substrates** *Biochem. Soc. Trans.* 17, 1036-1037 63; 70; 129
- DE GASPERI R., DAHER S.A., WINCHESTER B. et WARREN C. (1992a) **Substrate specificity of the bovine and feline neutral α -mannosidases** *Biochem. J.* 286, 55-63..... 71; 72; 95; 109; 112; 124
- DE GASPERI R., DANIEL P.F. et WARREN C. (1992b) **A human lysosomal α -mannosidase specific for the core of complex glycans** *J. Biol. Chem.* 267, 9706-9712..... 62; 66; 67; 95
- DEGLON N., KRAPP A., BRON C. et FASEL N. (1991) **Translocation of the yeast dolichol-phosphate-mannose synthase into microsomal membranes** *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 174, 1337-1342..... 80
- DEWALD B. et TOUSTER O. (1973) **A new α -D-mannosidase occurring in Golgi membranes** *J. Biol. Chem.* 218, 7223-7233 37; 42
- DONG D.L.Y. et HART G.W. (1991) **Purification and initial characterization of a cytoplasmic and neutral N-acetylglucosaminidase** *Glycobiology* 8, 211-212 83
- DONG D.L.Y., XU Z.S., CHEVRIER M.R., COTTER R.J., CLEVELAND D.W. et HART G.W. (1993) **Glycosylation of mammalian neurofilaments. Localization of multiple O-linked N-acetylglucosamine moieties on neurofilament polypeptides L and M** *J. Biol. Chem.* 268, 16679-16687 84
- DORLING P.R., HUXTABLE C.R. et COLEGATE S.M. (1980) **Inhibition of lysosomal α -mannosidase by swainsonine, an indolizidine alkaloid isolated from *Swainsonia canescens*** *Biochem. J.* 191, 649-651 29; 53; 61; 75; 128
- DUNPHY W.G., BRANDS R. et ROTHMAN J.E. (1985) **Attachment of terminal N-acetylglucosamine to asparagine-linked oligosaccharides occurs in central cisternae of the Golgi stack** *Cell* 40, 463-472..... 44
- DUNPHY W.G., FRIES E., URBANI L.J. et ROTHMAN J.E. (1981) **Early and late functions associated with the Golgi apparatus reside in distinct compartments** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 7453-7457 41

E

- EGGE H., MICHALSKI J.C. et STRECKER G. (1982) **Heterogeneity of urinary oligosaccharides from mannosidosis. Mass spectrometric analysis of permethylated Man₉, Man₈ and Man₇ derivatives** *Arch. Biochem. Biophys.* 213, 318-326..... 96

- EHLERS M.R. et RIORDAN J.F. (1991) **Membrane proteins with soluble counterparts. Role of proteolysis in the release of transmembrane proteins** *Biochemistry* 30, 10065-10074 56
- ELBEIN A.D. (1987) **Inhibitors of the biosynthesis and processing of N-linked oligosaccharide chains** *Annu. Rev. Biochem.* 56, 497-534 73
- ELBEIN A.D., SOLF R., DORLING P.R. et VOSBECK K. (1981) **Swainsonine. An inhibitor of glycoprotein processing** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 7393-7397 75
- ELBEIN A.D., TROPEA J.E., MITCHELL M. et KAUSHAL G.P. (1990) **Kifunensine, a potent inhibitor of the glycoprotein processing mannosidase I** *J. Biol. Chem.* 265, 15599-15605 37; 78
- ELTING J.J., CHEN W.W. et LENNARZ W.J. (1980) **Characterization of a glucosidase involved in an initial step in the processing of oligosaccharide chains** *J. Biol. Chem.* 255, 2325-2331 27; 33
- F**
- FINNE J., KRUSIUS T., MARGOLIS K.R. et MARGOLIS R.U. (1979) **Novel mannitol-containing oligosaccharides obtained by mild alkaline borohydride treatment of a chondroitin sulfate proteoglycan from brain** *J. Biol. Chem.* 254, 10295-10300 86
- FLEET G.W.J., SMITH P.W., EVANS S.V. et FELLOWS L.E. (1984) **Design synthesis and preliminary evaluation of a potent α -mannosidase inhibitor. 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-mannitol** *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1240-1241 77
- FLEISCHER B. (1981) **The nucleotide content of rat liver Golgi vesicles** *Arch. Biochem. Biophys.* 212, 602-610 80
- FORSEE W.T. et SCHUTZBACH J.S. (1981) **Purification and characterization of a phospholipid-dependent α -mannosidase from rabbit liver** *J. Biol. Chem.* 256, 6577-6582 56; 57
- FORSEE W.T., GRIFFIN J.A. et SCHUTZBACH J.S. (1977) **Mannosyltransfer from GDP-mannose to oligosaccharide-lipids** *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 75, 799-805 80; 126
- FORSEE W.T., PALMER C.F. et SCHUTZBACH J.S. (1989) **Purification and characterization of an α -1,2-mannosidase involved in processing asparagine-linked oligosaccharides** *J. Biol. Chem.* 264, 3869-3876 57; 58
- FORSEE W.T., SPRINGFIELD J.D. et SCHUTZBACH J.S. (1982) **Effect of phospholipids on α -1,2-mannosidase activity** *J. Biol. Chem.* 257, 9963-9967 56

- FUKUDA M.N., MASRI K.A., DELL A., LUZZATTO L. et MOREMEN K.W. (1990) **Incomplete synthesis of N-glycans in congenital dyserythropoietic anemia type II caused by a defect in the gene encoding α -mannosidase II** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 7443-7447..... 45

G

- GILLIGAN D.M. et SATIR B.H. (1982) **Protein phosphorylation/dephosphorylation and stimulus-secretion coupling in wild type and mutant *Paramecium*** *J. Biol. Chem.* 257, 13903-13906 88
- GODELAINE D., BEAUFAY H., WIBO M. et RAVOET A.M. (1983) **Alteration of membrane barrier in stripped rough microsomes from rat liver on incubation with GTP. Its relevance to the stimulation by this nucleotide of the dolichol pathway for protein glycosylation** *J. Cell Biol.* 97, 340-350 80
- GOLDBERG D.E. et KORNFELD S. (1983) **Evidence for extensive subcellular organization of asparagine-linked oligosaccharide processing and lysosomal enzyme phosphorylation** *J. Biol. Chem.* 258, 3159-3165 44
- GONZALEZ-YANES B., CICERO J.M., BROWN R.D. et WEST C.M. (1992) **Characterization of a cytosolic fucosylation pathway in *Dictyostelium*** *J. Biol. Chem.* 267, 9595-9605 83
- GRABOWSKI G.A., IKONNE J.U. et DESNICK R.J. (1980) **Comparative physical, kinetic and immunologic properties of the acidic and neutral α -D-mannosidase isozymes from human liver** *Enzyme* 25, 13-25 63; 68
- GRINNA L.S. et ROBBINS P.W. (1979) **Glycoprotein biosynthesis. Rat liver microsomal glucosidases which process oligosaccharides** *J. Biol. Chem.* 254, 8814-8818..... 27; 33

H

- HAEUW J.F., GRARD T., ALONSO C., STRECKER G. et MICHALSKI J.C. (1994) **The core specific lysosomal α (1-6)-mannosidase activity depends on aspartamidohydrolase activity** *Biochem. J.* 297, 463-466..... 64; 66; 67
- HAEUW J.F., MICHALSKI J.C., STRECKER G., SPIK G. et MONTREUIL J. (1991a) **Cytosolic glycosidases. Do they exist ?** *Glycobiology* 1, 487-492 71; 114; 129
- HAEUW J.F., STRECKER G., WIERUSZESKI J.M., MONTREUIL J. et MICHALSKI J.C. (1991b) **Etude comparée des catabolismes lysosomique et cytosolique des glycannes de type oligomannosidique** *C. R. Acad. Sci. Paris t.312, série III*, 131-139..... 71; 91; 114; 129

- HAEUW J.F., STRECKER G., WIERUSZESKI J.M., MONTREUIL J. et MICHALSKI J.C. (1991c) **Substrate specificity of rat liver cytosolic α -D-mannosidase. Novel degradative pathway for oligomannosidic type glycans** *Eur. J. Biochem.* 202, 1257-1268 69; 71; 72; 91; 95; 96; 104; 112; 115; 118; 124
- HALTIWANGER R.S., HOLT G.D. et HART G.W. (1990) **Enzymatic addition of O-GlcNAc to nuclear and cytoplasmic proteins, identification of a uridine diphospho-N-acetylglucosamine-peptide β -N-acetylglucosaminyltransferase** *J. Biol. Chem.* 265, 2563-2568 83; 84
- HALTIWANGER R.S., KELLY W.G., ROQUEMORE E.P., BLOMBERG M.A., DONG L.Y.D., KREPPPEL L., CHOU T.Y. et HART G.W. (1992) **Glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins is ubiquitous and dynamic** *Biochem. Soc. Trans.* 20, 264-269 79
- HANOVER J.A. et LENNARZ W.J. (1978) **The topological orientation of N,N'-diacetylchitobiosylpyrophosphoryldolichol in artificial and natural membranes** *J. Biol. Chem.* 254, 9237-9246 80
- HANOVER J.A. et LENNARZ W.J. (1980) **N-linked glycoprotein assembly. Evidence that oligosaccharide attachment occurs within the lumen of the endoplasmic reticulum** *J. Biol. Chem.* 255, 3600-3604 79
- HANOVER 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 80
- HANOVER J.A., COHEN C.K., WILLINGHAM M.C. et PARK M.K. (1987) **O-linked N-acetylglucosamine is attached to proteins of the nuclear pore. Evidence for cytoplasmic and nucleoplasmic glycoproteins** *J. Biol. Chem.* 262, 9887-9894 84
- HARPAZ N. et SCHACHTER H. (1980) **Control of glycoprotein synthesis. Processing of asparagine-linked oligosaccharides by one or more rat liver Golgi α -D-mannosidases dependent on the prior action of UDP-N-acetylglucosamine α -D-mannoside β 2-N-acetylglucosaminyltransferase I** *J. Biol. Chem.* 255, 4994-4902 43
- HART G.W., HALTIWANGER R.S., HOLT G.D. et KELLY W.G. (1989) **Glycosylation in the nucleus and cytoplasm** *Annu. Rev. Biochem.* 58, 841-874 79
- HART G.W., HOLT G.D. et HALTIWANGER R.S. (1988) **Nuclear and cytoplasmic glycosylation. Novel saccharide linkages in unexpected places** *T.I.B.S.* 13, 380-384 79
- HASELBECK A. et TANNER W. (1982) **Dolichyl phosphate-mediated mannosyl transfer through liposomal membranes** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 1520-1524 80

- HASILIK A. et NEUFELD E.F. (1980a) **Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts. Synthesis as precursors of higher molecular weight** *J. Biol. Chem.* 255, 4937-4945..... 59
- HASILIK A. et NEUFELD E.F. (1980b) **Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts. Phosphorylation of mannose residues** *J. Biol. Chem.* 255, 4946-4950..... 59
- HEMMING F.W. (1974) in *Biochemistry of lipids* (Goodwin, T.W., ed.) 4, pp. 39-97, Butterworths and university Park Press, London and Baltimore 48
- HILLER A.M., KORO L.A. et MARCHASE R.B. (1987) **Glucose-1-phosphotransferase and N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase have distinct acceptor specificities** *J. Biol. Chem.* 262, 4377-4381..... 87
- HIRAIZUMI S., SPOHR U. et SPIRO R.G. (1993) **Characterization of endomannosidase inhibitors and evaluation of their effect on N-linked oligosaccharide processing during biosynthesis** *J. Biol. Chem.* 268, 9927-9935..... 76
- HIRSCHBERG C.B. et SNIDER M.D. (1987) **Topography of glycosylation in the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus** *Annu. Rev. Biochem.* 56, 63-87..... 79; 118; 126
- HOFLACK B. et KORNFELD S. (1985a) **Lysosomal enzyme binding to mouse P388D₁ macrophage membranes lacking the 215 kDa mannose-6-phosphate receptor. Evidence for the existence of a second mannose-6-phosphate receptor** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 4428-4432 59
- HOFLACK B. et KORNFELD S. (1985b) **Purification and characterization of a cation-dependent mannose-6-phosphate receptor from murine P388D₁ macrophages and bovine liver** *J. Biol. Chem.* 260, 12008-12014 59
- HOLT G.D., HALTIWANGER R.S., TORRES C.R. et HART G.W. (1987a) **Erythrocytes contain cytoplasmic glycoproteins** *J. Biol. Chem.* 262, 14847-14850 84
- HOLT G.D., SNOW C.M., SENIOR A., HALTIWANGER R.S., GERACE L. et HART G.W. (1987b) **Nuclear pore complex glycoproteins contain cytoplasmically disposed O-linked N-acetylglucosamine** *J. Cell Biol.* 104, 1157-1164 84
- 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 glycoproteins as a function of the state of enterocytic differentiation of HT-29 cells** *Eur. J. Biochem.* 205, 1169-1174 76

- HASILIK A. et NEUFELD E.F. (1980a) **Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts. Synthesis as precursors of higher molecular weight** *J. Biol. Chem.* 255, 4937-4945..... 59
- HASILIK A. et NEUFELD E.F. (1980b) **Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts. Phosphorylation of mannose residues** *J. Biol. Chem.* 255, 4946-4950..... 59
- HEMMING F.W. (1974) in *Biochemistry of lipids (Goodwin, T.W., ed.)* 4, pp. 39-97, Butterworths and university Park Press, London and Baltimore 48
- HILLER A.M., KORO L.A. et MARCHASE R.B. (1987) **Glucose-1-phosphotransferase and N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase have distinct acceptor specificities** *J. Biol. Chem.* 262, 4377-4381..... 87
- HIRAIZUMI S., SPOHR U. et SPIRO R.G. (1993) **Characterization of endomannosidase inhibitors and evaluation of their effect on N-linked oligosaccharide processing during biosynthesis** *J. Biol. Chem.* 268, 9927-9935..... 76
- HIRSCHBERG C.B. et SNIDER M.D. (1987) **Topography of glycosylation in the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus** *Annu. Rev. Biochem.* 56, 63-87..... 79; 118; 126
- HOFLACK B. et KORNFELD S. (1985a) **Lysosomal enzyme binding to mouse P388D₁ macrophage membranes lacking the 215 kDa mannose-6-phosphate receptor. Evidence for the existence of a second mannose-6-phosphate receptor** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 4428-4432 59
- HOFLACK B. et KORNFELD S. (1985b) **Purification and characterization of a cation-dependent mannose-6-phosphate receptor from murine P388D₁ macrophages and bovine liver** *J. Biol. Chem.* 260, 12008-12014 59
- HOLT G.D., HALTIWANGER R.S., TORRES C.R. et HART G.W. (1987a) **Erythrocytes contain cytoplasmic glycoproteins** *J. Biol. Chem.* 262, 14847-14850 84
- HOLT G.D., SNOW C.M., SENIOR A., HALTIWANGER R.S., GERACE L. et HART G.W. (1987b) **Nuclear pore complex glycoproteins contain cytoplasmically disposed O-linked N-acetylglucosamine** *J. Cell Biol.* 104, 1157-1164 84
- 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 glycoproteins as a function of the state of enterocytic differentiation of HT-29 cells** *Eur. J. Biochem.* 205, 1169-1174 76

- HASILIK A. et NEUFELD E.F. (1980a) **Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts. Synthesis as precursors of higher molecular weight** *J. Biol. Chem.* 255, 4937-4945..... 59
- HASILIK A. et NEUFELD E.F. (1980b) **Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts. Phosphorylation of mannose residues** *J. Biol. Chem.* 255, 4946-4950..... 59
- HEMMING F.W. (1974) in *Biochemistry of lipids* (Goodwin, T.W., ed.) 4, pp. 39-97, Butterworths and university Park Press, London and Baltimore 48
- HILLER A.M., KORO L.A. et MARCHASE R.B. (1987) **Glucose-1-phosphotransferase and N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase have distinct acceptor specificities** *J. Biol. Chem.* 262, 4377-4381..... 87
- HIRAIZUMI S., SPOHR U. et SPIRO R.G. (1993) **Characterization of endomannosidase inhibitors and evaluation of their effect on N-linked oligosaccharide processing during biosynthesis** *J. Biol. Chem.* 268, 9927-9935..... 76
- HIRSCHBERG C.B. et SNIDER M.D. (1987) **Topography of glycosylation in the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus** *Annu. Rev. Biochem.* 56, 63-87..... 79; 118; 126
- HOFACK B. et KORNFELD S. (1985a) **Lysosomal enzyme binding to mouse P388D₁ macrophage membranes lacking the 215 kDa mannose-6-phosphate receptor. Evidence for the existence of a second mannose-6-phosphate receptor** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 4428-4432 59
- HOFACK B. et KORNFELD S. (1985b) **Purification and characterization of a cation-dependent mannose-6-phosphate receptor from murine P388D₁ macrophages and bovine liver** *J. Biol. Chem.* 260, 12008-12014 59
- HOLT G.D., HALTIWANGER R.S., TORRES C.R. et HART G.W. (1987a) **Erythrocytes contain cytoplasmic glycoproteins** *J. Biol. Chem.* 262, 14847-14850 84
- HOLT G.D., SNOW C.M., SENIOR A., HALTIWANGER R.S., GERACE L. et HART G.W. (1987b) **Nuclear pore complex glycoproteins contain cytoplasmically disposed O-linked N-acetylglucosamine** *J. Cell Biol.* 104, 1157-1164 84
- 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 glycoproteins as a function of the state of enterocytic differentiation of HT-29 cells** *Eur. J. Biochem.* 205, 1169-1174 76

- HUBBARD S.C. et IVATT R.J. (1981) **Synthesis and processing of asparagine-linked oligosaccharides** *Annu. Rev. Biochem.* 50, 555-583..... 27; 49
- HULTBERG B. et MASSON P.K. (1975) **Activation of residual acidic α -mannosidase activity in mannosidosis tissues by metal ions** *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 67, 1473-1479..... 66
- HULTBERG B., LUNBLAD A., MASSON P.K. et ÖCKERMAN P.A. (1975) **Specificity studies on α -mannosidases using oligosaccharides from mannosidosis urine as substrates** *Biochim. Biophys. Acta* 410, 156-163..... 63; 68

J

- JAKOI E.R. et MARCHASE R.B. (1979) **Ligatin from embryonic chick neural retina** *J. Cell Biol.* 80, 642-650..... 87
- JAKOI E.R., ZAMPIGHI G. et ROBERTSON J.D. (1976) **Regular structures in unit membranes. II. Morphological and biochemical characterization of two water-soluble proteins isolated from the suckling rat ileum** *J. Cell Biol.* 70, 97-111 87
- JOLLY R.D., WINCHESTER B.G., GEHLER J., DORLING P.R. et DAWSON G. (1981) **Mannosidosis. A comparative review of biochemical and related clinicopathological aspects of three forms of the disease** *J. Appl. Biochem.* 3, 273-291..... 58
- JOZIASSE D.H., SHAPER J.H., VAN DEN EIJNDEN D.H., VAN TUNEN A.J. et SHAPER N. (1989) **Bovine α 1 \rightarrow 3-galactosyltransferase. Isolation and characterization of a cDNA clone. Identification of homologous sequences in human genomic DNA** *J. Biol. Chem.* 264, 14290-14297 34

K

- KANG M.S., BOWLIN T.L., VIJAY I.K. et SUNKARA S.P. (1993) **Accumulation of pentamannose oligosaccharides in human mononuclear leukocytes by action of swainsonine, an inhibitor of glycoprotein processing** *Carbohydrate Research* 248, 327-337 128
- KANG M.S., SPENCER J.P. et ELBEIN A.D. (1978) **Amphotycin inhibition of mannose and GlcNAc incorporation into lipid-linked saccharides** *J. Biol. Chem.* 253, 8860-8866 82; 126
- KATZ F.N., ROTHMAN J.E., LINGAPPA V.R., BLOBEL G. et LODISH H.F. (1977) **Membrane assembly *in vitro*. Synthesis, glycosylation, and asymmetric insertion of a transmembrane protein** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 3278-3282..... 79

- KAUSHAL G.P. et ELBEIN A.D. (1993) The use of glycoprotein processing inhibitors to distinguish various mannosidases *Trends Glycosci. Glycotech.* 5, 209-218..... 73
- KEAN E.L. (1991) Topographical orientation in microsomal vesicles of the *N*-acetylglucosaminyltransferases which catalyse the biosynthesis of *N*-acetylglucosaminylpyrophosphoryldolichol and *N*-acetylglucosaminyl-*N*-acetylglucosaminylpyrophosphoryldolichol *J. Biol. Chem.* 266, 942-946..... 80
- KEARSE K.P. et HART G.W.(1991) Lymphocyte activation induces rapid changes in nuclear and cytoplasmic glycoproteins *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 1701-1705..... 84
- KIANG W.L., MARGOLIS R.U. et MARGOLIS R.K. (1981) Fractionation and properties of a chondroitin sulfate proteoglycan and the soluble glycoproteins of brain *J. Biol. Chem.* 256, 10529-10537..... 86
- KING I.A. et HOUNSELL E.F. (1989) Cytokeratin 13 contains O-glycosidally linked *N*-acetylglucosamine residues *J. Biol. Chem.* 264, 14022-14028 84
- KLINGER M.M., MARGOLIS R.U. et MARGOLIS R.K. (1985) Isolation and characterization of the heparan sulfate proteoglycans of brain. Use of affinity chromatography on lipoprotein lipase-agarose *J. Biol. Chem.* 260, 4082-4090..... 86
- KORNBERG A. (1955) Lactic deshydrogenase of muscle in *Methods in enzymology* (Colowick S.P. and Kaplan N.O ed.) vol. 1, pp 441-443 Academic press New York. 96
- KORNFELD R. et KORNFELD S. (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides *Annu. Rev. Biochem.* 54, 631-664 27; 49; 117
- KORO L.A. et MARCHASE R.B. (1982) A UDP-glucose glycoprotein glucose-1-phosphotransferase in embryonic chicken neural retina *Cell* 31, 739-748 85; 87
- KRUSIUS T., FINNE J., MARGOLIS R.K. et MARGOLIS R.U. (1986) Identification of an O-glycosidic mannose-linked sialylated tetrasaccharide and keratan sulfate oligosaccharides in the chondroitin sulfate proteoglycan of brain *J. Biol. Chem.* 261, 8237-8242..... 131
- KRUSIUS T., REINHOLD V.N., MARGOLIS R.K. et MARGOLIS R.U. (1987) Structural studies on sialylated and sulphated O-glycosidic mannose-linked oligosaccharides in the chondroitin sulphate proteoglycan of brain 86; 131

- KURANDA M.J. et ROBBINS P.W. (1987) Cloning and heterologous expression of glycosidase genes from *Saccharomyces cerevisiae* *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 2585-2589 95

L

- LAEMMLI U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄ *Nature (London)* 227, 680-685 100
- LEGLER G. et BIEBERICH E. (1988) Isolation of a cytosolic β -glucosidase from calf liver and characterization of its active site with alkyl glucosides and basic glycosyl derivatives *Arch. Biochem. Biophys.* 260, 427-436 85
- LEGLER G. et JÜLICH E. (1984) Synthesis of 5-amino-5-deoxy-D-mannopyranose and 1,5-di-deoxy-1,5-imino-D-mannitol, and inhibition of α - and β -D-mannosidases *Carbohydr. Res.* 128, 61-72 76
- LI E., TABAS I. et KORNFELD S. (1978) The synthesis of complex-type oligosaccharides. I. Structure of the lipid-linked oligosaccharide precursor of the complex-type oligosaccharides of the vesicular stomatitis virus G protein *J. Biol. Chem.* 253, 7762-7770 48
- LINGAPPA V.R., LINGAPPA J.R., PRASAD R., EBNER K.E. et BLOBEL G. (1978) Coupled cell-free synthesis, segregation, and core glycosylation of a secretory protein *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 2338-2342 79
- LUBAS W.A. et SPIRO R.G. (1987) Golgi endo- α -D-mannosidase from rat liver, a novel linked carbohydrate unit processing enzyme *J. Biol. Chem.* 262, 3775-3781 38; 46; 47; 95
- LUBAS W.A. et SPIRO R.G. (1988) Evaluation of the role of rat liver Golgi endo- α -D-mannosidase in processing N-linked oligosaccharides *J. Biol. Chem.* 263, 3990-3998 46; 47; 95

M

- MARCHASE R.B., BOUNELIS P., BRUMLEY L.M., DEY N., AUGER D., FRITZ T.A., KULESZA P. et BEDWELL D.M. (1993) Phosphoglucomutase in *Saccharomyces cerevisiae* is a cytoplasmic glycoprotein and the acceptor for a glucose-phosphotransferase *J. Biol. Chem.* 268, 8341-8349 88; 131
- MARCHASE R.B., KORO L.A., KELLY C.M. et McCLAY D.R. (1982) Retinal ligatin recognizes glycoproteins bearing oligosaccharides terminating in phosphodiester-linked glucose *Cell* 28, 813-820 87; 131

- MARCHASE R.B., RICHARDSON K.L., SRISOMSAP C., DRAKE R.R. et HALEY B.E. (1990) Resolution of phosphoglucomutase and the 62 kDa acceptor for the glucosylphosphotransferase *Arch. Biochem. Biophys.* 280, 122-129..... 87
- MARCHASE R.B., SAUNDERS A.M., RIVERA A.A. et COOK J.M. (1987) The β -phosphoro[35 S]thioate analogue of UDP-Glc is efficiently utilized by the glucose phosphotransferase and is relatively resistant to hydrolytic degradation *Biochim. Biophys. Acta* 916, 157-162 87
- MARINKOVIC D.V. et MARINKOVIC J.N. (1976) Isolation and properties of α -D-mannosidase from human kidney *Biochem. J.* 155, 217-223 61
- MARSH C.A. et GOURLAY G.C. (1971) Evidence for a non-lysosomal α -mannosidase in rat liver homogenates *Biochim. Biophys. Acta* 235, 142-148 68
- MATHUR R. et BALASUBRAMANIAN A.S. (1984) Cobalt-ion chelate affinity chromatography for the purification of brain neutral α -D-mannosidase and its separation from acid α -D-mannosidase *Biochem. J.* 222, 261-264 70; 104
- MATSUURA F., NUNEZ H.A., GRABOWSKI G.A. et SWEELEY C.C. (1981) Structural studies of urinary oligosaccharides from patients with mannosidosis *Arch. Biochem. Biophys.* 207, 337-352 65
- MERSMANN G. et BUDECKE E. (1977) Evidence for material from mannosidosis fibroblasts crossreacting with anti-acidic α -mannosidase antibodies *Febs letters* 73, 123-126..... 66
- MICHALSKI J.C., HAEUW J.F., WIERUSZESKI J.M., MONTREUIL J. et STRECKER G. (1990) *In vitro* hydrolysis of oligomannosyl oligosaccharides by the lysosomal α -D-mannosidases *Eur. J. Biochem.* 189, 369-379 60; 63; 67; 91; 95
- MIYAGI T. et TSUIKI S. (1985) Purification and characterization of cytosolic sialidase from rat liver *J. Biol. Chem.* 260, 6710-6716 85
- MIYAGI T., KONNO K., EMORI Y., KAWASAKI H., SUZUKI K., YASUI A. et TSUIKI S. (1993) Molecular cloning and expression of cDNA encoding rat liver skeletal muscle cytosolic sialidase *J. Biol. Chem.* 268, 26435-26440 85
- MOLYNEUX R.J. et JAMES L.F. (1982) Loco intoxication. Indolizidine alkaloids of spotted locoweed (*Astragalus lentiginosus*) *Science* 216, 190-191 75
- MONIS E., BONAY P. et HUGHES C. (1987) Characterization of a mannosidase acting on α 1 \rightarrow 3- and α 1 \rightarrow 6-linked mannose residues

- of oligomannosidic intermediates of glycoprotein processing** *Eur. J. Biochem.* 168, 287-294..... 54; 57; 95
- MONTREUIL J. (1975) **Recent data on the structure of the carbohydrate moiety of glycoproteins. Metabolic and biological implications** *Pure Appl. Chem.* 42, 431-477..... 24; 26; 27
- MONTREUIL J. (1987) **Structure and conformation of glycoproteins glycans** In *Vertebrate lectins* (Olden K., Perents J.B., Eds) Van Nostrand Reinhold Co., New York, 1-29 24
- MOORE S.E.H. et SPIRO R.G. (1990) **Demonstration that Golgi endo- α -D-mannosidase provides a glucosidase-independent pathway for the formation of complex N-linked oligosaccharides of glycoproteins** *J. Biol. Chem.* 265, 13104-13112 46; 47
- MOREMEN K.W. (1989) **Isolation of a rat liver golgi mannosidase II clone by mixed oligonucleotide-primed amplification of cDNA** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 5276-5280 45
- MOREMEN K.W. et ROBBINS P.W. (1991) **Isolation, characterization and expression of cDNAs encoding murine α -mannosidase II, a Golgi enzyme that controls conversion of high mannose to complex N-glycans** *J. Cell Biol.* 115, 1521-1534 29; 34; 45; 95
- MOREMEN K.W. et TOUSTER O. (1985) **Biosynthesis and modification of Golgi mannosidase II in HeLa and 3T3 cells** *J. Biol. Chem.* 260, 6654-6662 42
- MOREMEN K.W. et TOUSTER O. (1986) **Topology of mannosidase II in rat liver Golgi membranes and release of the catalytic domain by selective proteolysis** *J. Biol. Chem.* 261 10945-10951..... 42; 47
- MOREMEN K.W. et TOUSTER O. (1988) **Mannosidases in mammalian glycoprotein processing** dans *Protein transfer and organelle biogenesis* Academic Press inc. 209-240 26; 95
- MOREMEN K.W., TOUSTER O. et ROBBINS P.W. (1991) **Novel purification of the catalytic domain of Golgi α -mannosidase II. Characterization and comparison with the intact enzyme** 266, 16876-16885..... 42
- ## N
- NABI I.R. (1993) **Biosynthetic targeting pathway of lysosomal membrane glycoproteins** *Trends Glycosy. Glycotechnol.* 5, 438-449..... 59
- NORDEN N.E., LUNBLAD A., SVENSSON S., ÖCKERMAN P.A. et AUTIO S. (1973) **A mannose-containing trisaccharide isolated from urines of three patients with mannosidosis** *J. Biol. Chem.* 248, 6210-6215 65

- NORDEN N.E., LUNDBLAD A., SVENSSON S. et AUTIO S. (1974) **Characterization of two mannose-containing oligosaccharides isolated from the urine of patients with mannosidosis** *Biochemistry* 13, 871-874 65
- NOVIKOFF P.M., TULSIANI D.R.P., TOUSTER O., YAM A. et NOVIKOFF A.B. (1983) **Immunocytochemical localization of α -D-mannosidase II in the golgi apparatus of rat liver** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 4364-4368 44; 47; 95
- O**
- OCKERMAN P.A. (1967) **A generalized storage disorder resembling Hurler's syndrome** *Lancet* 2, 239-241 58
- OGIER-DENIS E., BLAIS A., HOURI J.J., VOISIN T., TRUGNAN G. et CODOGNO P. (1994) **The emergence of a basolateral 1-deoxymannojirimycin-sensitive mannose carrier is a function of intestinal epithelial cell differentiation. Evidence for a new inhibitory effect of 1-deoxymannojirimycin on facultative mannose transport** *J. Biol. Chem.* 269, 4285-4290 77
- OGIER-DENIS E., TRUGNAN G., SAPIN C., AUBERY M. et CODOGNO P. (1990) **Dual effect of 1-deoxymannojirimycin on the mannose uptake and on the N-glycan processing of the human colon cancer cell line HT-29** *J. Biol. Chem.* 265, 5366-5369 77
- OKUMURA T. et YAMASHINA I. (1973) **Further purification and characterization of α -D-mannosidase from hog kidney** *J. Biochem. (Tokyo)* 73, 131-138 61
- OPHEIM D.J. et TOUSTER O. (1978) **Lysosomal α -D-mannosidase of rat liver. Purification and comparison with the Golgi and cytosolic α -D-mannosidases** *J. Biol. Chem.* 253, 1017-1023 43; 63; 68; 104
- P**
- PALAMARCZYK G., MITCHELL M., SMITH P.W., FLEET G. et ELBEIN A.D. (1985) **1,4-dideoxy-1,4-imino-D-mannitol inhibits glycoprotein processing and mannosidase** *Arch. Biochem. Biophys.* 243, 35-45 77
- PAN Y.T., KAUSHAL G.P., PAPANDREOU G., GANEM B. et ELBEIN A.D. (1992) **D-mannolactam amidrazone. A new mannosidase inhibitor that also inhibits the endoplasmic reticulum or cytoplasmic α -mannosidase** *J. Biol. Chem.* 267, 8313-8318 79
- PARK M.K., D'ONOFRIO M., WILLINGHAM M.C. et HANOVER J.A. (1987) **A monoclonal antibody against a family of nuclear pore proteins (nucleoporins). O-linked N-acetylglucosamine is part of immunodeterminant** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 6462-6466 84

- PARODI A.J. et LELOIR L.F. (1979) The role of lipid intermediates in the glycosylation of proteins in the eucaryotic cell *B.B.A.* 559, 1-37 48
- PAULSON et COLLEY (1989) Glycosyltransferases. Structure, localization and control of cell type-specific glycosylation *J. Biol. Chem.* 264, 17615-17618 45
- PEDEMONTE C.H., SACHS G. et KAPLAN J.H. (1990) An intrinsic membrane glycoprotein with cytosolically oriented N-linked sugars *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 9789-9793 83
- PEREZ M. et HIRSCHBERG C.B. (1985) Translocation of UDP-N-acetylglucosamine into vesicles derived from rat liver rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus *J. Biol. Chem.* 260, 4671-4678 80
- PEREZ M. et HIRSCHBERG C.B. (1986) Topography of glycosylation reactions in the rough endoplasmic reticulum membrane *J. Biol. Chem.* 261, 6822-6830 80
- PHILLIPS N.C., ROBINSON D. et WINCHESTER B.G. (1974a) Human liver α -D-mannosidase activity *Clin. Chim. Acta* 55, 11-19 61; 68
- PHILLIPS N.C., ROBINSON D. et WINCHESTER B.G. (1976) Characterization of human liver α -D-mannosidase purified by affinity chromatography *Biochem. J.* 153, 579-587 61; 68
- PHILLIPS N.C., ROBINSON D., WINCHESTER B.G. et JOLLY R.D. (1974b) Mannosidosis in Angus cattle. The enzymic defect *Biochem. J.* 137, 363-371 61; 68
- PIERCE R.J., SPIK G. et MONTREUIL J. (1979) Cytosolic location of an endo-N-acetyl- β -D-glucosaminidase activity in rat liver and kidney *Biochem. J.* 180, 673-676 85; 129
- PIERCE R.J., SPIK G. et MONTREUIL J. (1980) Demonstration and cytosolic location of an endo-N-acetyl- β -D-glucosaminidase activity towards an asialo-N-acetyl-lactosaminic-type substrate in rat liver *Biochem. J.* 185, 261-264 85; 131
- PITCHER J., SMYTHE C., CAMPBELL D.G. et COHEN P. (1987) Identification of the 38-kDa subunit of rabbit skeletal muscle glycogen synthase as glycogenin *Eur. J. Biochem.* 169, 497-502 83
- POHLMANN R., HASILIK A., CHENG S., PEMBLE S., WINCHESTER B. et VON FIGURA K. (1983) Synthesis of lysosomal α -mannosidase in normal and mannosidosis fibroblasts *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 115, 1083-1089 61

- POHLMANN R., WAHEED A., HASILIK A. et VON FIGURA K. (1982) **Synthesis of phosphorylated recognition marker in lysosomal enzymes is located in the *cis* part of Golgi apparatus** *J. Biol. Chem.* 257, 5323-5325 41

R

- RASCHKE W.C., KERN K.A., ANTALIS C. et BALLOU C.E. (1973) **Genetic control of yeast mannan structure. Isolation and characterization of mannan mutants** *J. Biol. Chem.* 248, 4660-4666 131
- REITMAN M.L. et KORNFELD S. (1981) **UDP-N-acetylglucosamine. Glycoprotein N-acetylglucosamine-1- phosphotransferase. Proposed enzyme for the phosphorylation of the high mannose oligosaccharide units of lysosomal enzymes** *J. Biol. Chem.* 256, 4275-4281 51; 87
- RIZZOLO L.J. et KORNFELD R. (1988) **Post-translational protein modification in the endoplasmic reticulum. Demonstration of fatty acylase and deoxymannojirimycin-sensitive α -mannosidase activities** *J. Biol. Chem.* 263, 9520-9525 31; 36
- ROBBINS P.W., HUBBARD S.C., TURCO S.J. et WIRTH D.F. (1977) **Proposal for a common oligosaccharide intermediate in the synthesis of membrane glycoproteins** *Cell* 12, 893-900 48
- RODRIGUEZ I.R. et FLIESLER S.J. (1988) **A 42 kDa protein in rabbit tissues and in a glycogen synthase preparation cross-reacts with antibodies to glycogenin** *Arch. Biochem. Biophys.* 260, 628-637 83
- RODRIGUEZ I.R. et WHELAN W.J. (1985) **A novel glycosyl-amino acid linkage. Rabbit-muscle glycogen is covalently linked to a protein via tyrosine** *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 132, 829-836 83
- RODRIGUEZ-BERROCAL J.F., PAEZ DE LA CADENA M., CABEZAS J.A. et PERES-GONZALES N. (1988) **Purification and characterization of acid β -D-galactosidase from rabbit spleen** *J. Biochem.* 104, 66-71 97
- ROTH J. (1987) **Subcellular organization of glycosylation in mammalian cells** *Biochim. Biophys. Acta* 906, 405-436 49
- ROTHMAN J.E. (1981) **The Golgi apparatus. Two organelles in tandem** *Science* 213, 1212-1220 41
- RUSSO R.N., SHAPER N.L., TAATJES D.J. et SHAPER J. (1992) **β 1,4-galactosyltransferase. A short NH₂-terminal fragment that includes the cytoplasmic and transmembrane Domain is sufficient for Golgi retention** *J. Biol. Chem.* 267, 9241-9247 34

S

- SAHAGIAN G.G., DISTLER J. et JOURDIAN G.W. (1981) **Characterization of a membrane-associated receptor from bovine liver that binds phosphomannosyl residues of bovine testicular β -galactosidase** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 4289-4293..... 59
- SATIR B.H., SRISOMSAP C., REICHMAN M. et MARCHASE R.B. (1990) **Parafusin, an exocytic sensitive phosphoprotein, is the primary acceptor for the glucosylphosphotransferase in *Paramecium tetraurelia* and rat liver** *J. Cell Biol.* 111, 901-907..... 87; 131
- SAUNIER B., KILKER Jr R.D., TKACZ J.S., QUARONI A. et HERSCOVICS A. (1982) **Inhibition of N-linked complex oligosaccharide formation by 1-deoxynojirimycin, an inhibitor of processing glucosidases** *J. Biol. Chem.* 257, 14155-14161..... 76
- SCHATZLE J., BUSH J. et CARDELLI J. (1992) **Molecular cloning and characterization of the structural gene coding for the developmentally regulated lysosomal enzyme, α -mannosidase, in *Dicystostelium discoideum*** *J. Biol. Chem.* 267, 4000-4007..... 63; 95
- SCHUTZBACH J.S., SPRINGFIELD J.D. et JENSEN J.W. (1980) **The biosynthesis of oligosaccharide-lipids. Formation of an α -1,2-mannosyl-mannose linkage** *J. Biol. Chem.* 255, 4170-4175..... 80; 126
- SCHWANINGER R., BECKERS C.J.M. et BALCH W.E. (1991) **Sequential transport of protein between the endoplasmic reticulum and successive Golgi compartments in semi-intact cells** *J. Biol. Chem.* 266, 13055-13063 44
- SCHWEDEN J. et BAUSE E. (1989) **Characterization of trimming Man₉-mannosidase from pig liver. Purification of a catalytically active fragment and evidence for the transmembrane nature of the intact 65 kDa enzyme** *Biochem. J.* 264, 347-355..... 33; 36; 76
- SCHWEDEN J., LEGLER G. et BAUSE E. (1986) **Purification and characterization of a neutral processing mannosidase from calf liver acting on (Man)₉(GlcNAc)₂ oligosaccharides** *Eur. J. Biochem.* 157, 563-570 28; 31; 32; 36; 95
- SHAO M.C., KRUDY G., ROSEVEAR P.R. et WOLD F. (1989) **Protein matrix effects on glycan processing by mannosidase II and sialyltransferase from rat liver** *Biochemistry* 28, 4077-4083 43
- SHOUP V.A. et TOUSTER O. (1976) **Purification and characterization of the α -D-mannosidase of rat liver cytosol** *J. Biol. Chem.* 251, 3845-3852 29; 68; 70; 72; 95; 97

- SNAITH S.M. (1977) Multiple α -mannosidase activities in mammalian tissues as shown by metal-ion activation *Biochem. J.* 163, 557-564..... 68
- SNIDER M.D. et ROBBINS P.W. (1982) Transmembrane organization of protein glycosylation. Mature oligosaccharide-lipid is located on the luminal side of microsomes from chinese hamster ovary cells *J. Biol. Chem.* 257, 6796-6801 79; 118
- SNIDER M.D. et ROGERS O.C. (1984) Transmembrane movement of oligosaccharide-lipids during glycoprotein synthesis *Cell* 36, 753-761 80; 112; 118; 126; 129
- SNIDER M.D., SULTZMAN L.A. et ROBBINS P.W. (1980) Transmembrane location of oligosaccharide-lipid synthesis in microsomal vesicles *Cell* 21, 385-392..... 80
- SNOW C.M., SENIOR A. et GERACE L. (1987) Monoclonal antibodies identify a group of nuclear pore complex glycoproteins *J. Cell Biol.* 104, 1143-1156 84
- SPIRO M.J. et SPIRO R.G. (1985) Effect of anion-specific inhibitors on the utilization of sugar nucleotides for N-linked carbohydrate unit assembly by thyroid endoplasmic reticulum vesicles *J. Biol. Chem.* 260, 5808-5815..... 80
- SRISOMSAP C., MATTOX S.A., CUMMINGS R.D. et MARCHASE R.B. (1988a) The glucosylphosphotransferase recognizes O-linked mannose residues on its 62 kDa acceptor *J. Cell Biol.* 107, 406a (Abstr. 2312)..... 87; 131
- SRISOMSAP C., RICHARDSON K.L., JAY J.C. et MARCHASE R.B. (1988b) Localization of the glucose phosphotransferase to a cytoplasmically accessible site on intracellular membranes *J. Biol. Chem.* 263, 17792-17797..... 88; 131
- SRISOMSAP C., RICHARDSON K.L., JAY J.C. et MARCHASE R.B. (1989) An α -glucose-1-phosphate phosphodiesterase is present in rat liver cytosol *J. Biol. Chem.* 264, 20540-20546..... 85; 88
- STARR C.M. et HANOVER J.A. (1990) Glycosylation of nuclear pore protein p62. Reticulocyte lysate catalyses O-linked N-acetylglucosamine addition *in vitro* *J. Biol. Chem.* 265, 6868-6873..... 84
- STEWART T.S., MENDERSHAUSEN P.B. et BALLOU C.E. (1968) Preparation of mannopentaose, mannohexaose, and mannoheptaose from *Saccharomyces cerevisiae* Mannan *Biochemistry* 7, 1843-1854 131
- STOLL J. et KRAGG S.S. (1983) Isolation and characterization of mammalian glycosylation mutants *J. Cell Biol.* 97, 443 120

- STOLL, J. (1986) PhD thesis, School of Hygiene and Public Health, The Johns Hopkins University, Baltimore. 119
- STRECKER G. et MONTREUIL J. (1979) **Glycoprotéines et glycoprotéinoses** *Biochimie* 61, 1199-1246 23
- STRECKER G., FOURNET B., MONTREUIL J., DHONDT J.L. et FARRIAUX J.P. (1976) **Etude chimique des mannosides urinaires excrétés au cours de la mannosidose** *Biochimie* 58, 579-586 65
- STRYNADKA N.C.J. et JAMES M.N.G. (1989) **Crystal structures of the helix-loop-helix calcium-binding proteins** *Annu. Rev. Biochem.* 58, 951-998 35
- SUBRAMANIAN S.V. et SATIR B.H. (1992) **Carbohydrate cycling in signal transduction. Parafusin, a phosphoglycoprotein and possible Ca⁺⁺- dependent transducer molecule in exocytosis in *Paramecium*** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89, 11297-11301 88
- T**
- TABAS I. et KORNFELD S. (1978) **The synthesis of complex type oligosaccharides. III. Identification of an α -D-mannosidase activity involved in a late stage of processing of complex-type oligosaccharides** *J. Biol. Chem.* 253, 7779-7786 28; 43
- TABAS I. et KORNFELD S. (1979) **Purification and characterization of rat liver Golgi α -mannosidase capable of processing asparagine-linked oligosaccharides** *J. Biol. Chem.* 254, 11655-11663 37; 38
- TAI T., YAMASHITA K., ITO S. et KOBATA A. (1977) **Structures of the carbohydrate moiety of ovalbumin glycopeptide III and the difference in specificity of endo- β -N-acetylglucosaminidases** *J. Biol. Chem.* 252, 6687-6694..... 26; 27
- TROPEA J.E., KAUSHAL G.P., PASTUSZAK I., MITCHELL M., AOYAGI T., MOLYNEUX R.J. et ELBEIN A.D. (1990) **Mannostatin A, a new glycoprotein-processing inhibitor** *Biochemistry* 29, 10062-10069..... 78
- TULSIANI D.R.P. et TOUSTER O. (1983) **Swainsonine causes the production of hybrid glycoproteins by human skin fibroblasts and rat liver golgi preparations** *J. Biol. Chem.* 258, 7578-7585 42; 76
- TULSIANI D.R.P. et TOUSTER O. (1985) **Characterization of a novel α -D-mannosidase from rat brain microsomes** *J. Biol. Chem.* 260, 13081-13087..... 53; 54; 57; 95
- TULSIANI D.R.P. et TOUSTER O. (1987) **Substrate specificities of rat kidney lysosomal and cytosolic α -D-mannosidases and effects of**

- swainsonine suggest a role of the cytosolic enzyme in glycoprotein catabolism *J. Biol. Chem.* 262, 6506-6514..... 63; 67; 70; 71; 72; 75; 95; 109; 114; 129
- TULSIANI D.R.P. et TOUSTER O. (1988) The purification and characterization of mannosidase IA from rat liver Golgi membranes *J. Biol. Chem.* 263, 5408-5417..... 39; 40; 47; 95
- TULSIANI D.R.P., COLEMAN V.D. et TOUSTER O. (1988) Rat epididymal α -D-mannosidase. Purification, carbohydrate composition, substrate specificity and antibody production *Arch. Biochem. Biophys.* 267, 60-68 55
- TULSIANI D.R.P., HARRIS T.M. et TOUSTER O. (1982a) Swainsonine inhibits the biosynthesis of complex glycoproteins by inhibition of Golgi mannosidase II *J. Biol. Chem.* 257, 7936-7939 42; 53; 75; 128
- TULSIANI D.R.P., HUBBARD S.C., ROBBINS P.W. et TOUSTER O. (1982b) α -D-mannosidases of rat liver Golgi membranes. mannosidase II is the GlcNAcMan₅-cleaving enzyme in glycoprotein biosynthesis and mannosidases IA and IB are the enzymes converting Man₉ precursors to Man₅ intermediates *J. Biol. Chem.* 257, 3660-3668 28; 38; 39; 43; 47; 95
- TULSIANI D.R.P., OPHEIM D.J. et TOUSTER O. (1977) Purification and characterization of α -D-mannosidase from rat liver Golgi membranes *J. Biol. Chem.* 252, 3227-3233..... 37; 42; 104
- TULSIANI D.R.P., SKUDLAREK M.D. et ORGEBIN-CRIST M.C. (1989) Novel α -D-mannosidase of rat sperm plasma membranes. Characterization and potential role in sperm-egg interactions *J. Cell Biol.* 109, 1257-1267..... 55; 57; 95
- TULSIANI D.R.P., SKUDLAREK M.D., NAGDAS S.K. et ORGEBIN-CRIST M.C. (1993) Purification and characterization of rat epididymal fluid α -D-mannosidase. Similitaries to sperm plasma-membrane α -D-mannosidase *Biochem. J.* 290, 427-436 56; 57; 95
- TURNER J.R., TARTAKOFF A.M. et GREENSPAN N.S. (1990) Cytologic assessment of nuclear and cytoplasmic O-linked N-acetylglucosamine distribution by using anti-streptococcal monoclonal antibodies *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 5608-5612 84

U

- UGALDE R.A., STANELONI R.J. et LELOIR L.F. (1979) Microsomal glucosidases acting on the saccharide moiety of the glucose-containing dolichyl diphosphate oligosaccharide *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 91, 1174-1181..... 27; 33

V

- VANSTAPEL F. et BLANCKAERT N. (1988) **Carrier-mediated translocation of uridine diphosphate glucose into the lumen of endoplasmic reticulum-derived vesicles from rat liver** *J. Clin. Invest.* 82, 1113-1122 80
- VARKI A. et KORNFELD S. (1981) **Purification and characterization of rat liver α -N-acetylglucosaminylphosphodiesterase** *J. Biol. Chem.* 256, 9937-9943..... 51
- VELASCO A., HENDRICKS L., MOREMEN K.W., TULSIANI D.R.P., TOUSTER O. et GIST FARQUHAR M. (1993) **Cell type-dependent variations in the subcellular distribution of α -mannosidase I and II** *J. Cell Biol.* 122, 39-51 41; 45; 95
- VERNER K. et SCHATZ G. (1988) **Protein translocation across membranes** *Science* 241, 1307-1313 32
- VLIEGENTHART J.F.G., DORLAND L. et VAN HALBEEK H. (1983) **High-resolution, ^1H -nuclear magnetic resonance spectroscopy as a tool in the structural analysis of carbohydrates related to glycoproteins** *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 41, 209-374 98

W

- WAHEED A., HASILIK A. et VON FIGURA K. (1981) **Processing of the phosphorylated recognition marker in lysosomal enzymes. Characterization and partial purification of a microsomal α -N-acetylglucosaminylphosphodiesterase** *J. Biol. Chem.* 256, 5717-5721..... 51
- WAHEED A., HASILIK A. et VON FIGURA K. (1982) **UDP-N-acetylglucosamine. Lysosomal enzyme precursor N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase. Partial purification and characterization of the rat liver Golgi enzyme** *J. Biol. Chem.* 257, 12322-12331 51; 87
- WEINSTEIN J., UJITA LEE E., Mc ENTEE K., LAI P.H. et PAULSON J.C. (1987) **Primary structure of β -galactoside α 2,6-sialyltransferase. Conversion of membrane-bound enzyme to soluble forms by cleavage of the NH_2 -terminal signal anchor** *J. Biol. Chem.* 262, 17735-17743 34
- WENG S. et SPIRO R.G. (1993) **Demonstration that a kifunensine-resistant α -mannosidase with a unique processing action on N-linked oligosaccharides occurs in rat liver endoplasmic reticulum and various cultured cells** *J. Biol. Chem.* 268, 25656-25663 28; 35; 36; 78

WINCHESTER B. (1984) **Role of α -D-mannosidases in the biosynthesis and catabolism of glycoproteins** *Biochem. Soc. Trans.* 12, 522-524 26; 95

WINCHESTER B., AL DAHER S., CARPENTER N.C., CENCI DI BELLO I., S. CHOI S., FAIRBANKS A.J. et FLEET W.J. (1993) **The structural basis of the inhibition of human α -mannosidases by azafuranose analogues of mannose** *Biochem. J.* 290, 743-749 77

Y

YAMASHITA K., TACHIBANA Y., MIHARA K., OKADA S., YABUUCHI H. et KOBATA A. (1980) **Urinary oligosaccharides of mannosidosis** *J. Biol. Chem.* 255, 5126-5133 65

YOSHIHISA T. et ANRAKU Y. (1989) **Nucleotide sequence of AMS1, the structure gene of vacuolar α -mannosidase of *Saccharomyces cerevisiae*** *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 163, 908-915 30; 95

Z

ZANETTA J.P., MEYER A., DONTENWILL M., BASSET P. et VINCENDON G. (1982) **Rat brain α -mannosidase. Purification, properties and interaction with its antibodies** *J. Neurochem.* 39, 1601-1606 70; 72

ZANETTA J.P., ROUSSEL G., DONTENWILL M. et VINCENDON G. (1983) **Immunohistochemical localization of α -mannosidase during postnatal development of the rat cerebellum** *J. Neurochem.* 40, 202-208 70; 72

