

50376
4996
374

N° d'ordre :

Université des Sciences et Technologies de Lille

Thèse

présentée par

Agnès SAINT-POL

pour l'obtention du grade de
Docteur de l'Université

Spécialité : Biochimie

Etude des oligosaccharides libres polymannosylés :
Caractérisation de leur transport
du cytosol vers le lysosome

Commission d'examen :

Rapporteurs : Docteur Bernard HOLFLACK
Professeur Michel MONSIGNY

Examineurs : Professeur René CACAN
Docteur Jean-Claude MICHALSKI
Docteur Stuart MOORE
Professeur André VERBERT

12119



40 200608

50376
1996
374



Ce travail a été réalisé au sein de l'Unité INSERM 410 de Neuroendocrinologie et Biologie Cellulaire Digestives dirigée par le Docteur Marc Laburthe, dans l'équipe du Docteur Patrice Codogno, sous la direction du Docteur Stuart Moore.

Il a bénéficié d'une allocation de recherche du Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur.

130

RESUME

La N-glycosylation des protéines est une modification post-traductionnelle fréquente. Elle s'effectue dans la lumière du *reticulum* endoplasmique par le transfert « en bloc » d'un oligosaccharide le $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ à partir d'un oligosaccharide-lipide le $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$, sur une séquence tripeptidique consensus de la protéine. Dans une lignée dérivant d'hépatocarcinome humain (les cellules HepG2), la N-glycosylation est accompagnée de la libération de 15 à 20% d'oligosaccharides dont l'origine $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ est montrée pour une majeure partie d'entre eux. Les oligosaccharides libérés dans la lumière du *reticulum* endoplasmique sont ensuite directement transportés dans le compartiment cytosolique sous forme de $\text{Man}_{8,9}\text{GlcNAc}_2$. Deux glycosidases, une endoglucosaminidase et une mannosidase cytosoliques les élaguent partiellement jusqu'à la formation d'un produit limite, le $\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3)[\text{Man}(\alpha 1-6)] \text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$.

Nous avons étudié le devenir des oligosaccharides libres cytosoliques sur la lignée HepG2. Des expériences de pulse-chasse contrôlées montrent qu'après 3 à 4 heures de chasse, les oligosaccharides libres disparaissent. Au contraire, l'utilisation de la concanamycine A, qui inhibe les ATPases vacuolaires stabilise les oligosaccharides libres dans les cellules. Ceux-ci retrouvés dans les compartiments vésiculaires ont des structures compatibles avec une origine cytosolique, ce qui montre un transfert des oligosaccharides libres du cytosol vers un compartiment acide. Alors que le transfert n'est pas modifié par des inhibiteurs de la macroautophagie, il est affecté après l'inhibition de la mannosidase cytosolique et la réduction du niveau d'ATP cellulaire, et indique que la dégradation partielle et une source d'énergie sont nécessaires pour assurer le transport. Nous avons montré par des expériences de fractionnement subcellulaire que les oligosaccharides libres cytosoliques et particulièrement le $\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3)[\text{Man}(\alpha 1-6)] \text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$ sont transportés vers les lysosomes. En conclusion, ces travaux et ceux réalisés précédemment au laboratoire présentent un nouveau trajet intracellulaire, du *reticulum* endoplasmique vers le cytosol et du cytosol vers les lysosomes.

Mots clés: lysosome-cytosol-*reticulum* endoplasmique-transport-oligomannosides libres-HepG2.

SOMMAIRE

AVANT-PROPOS	6
INTRODUCTION	9
1. SCHEMA DE BIOSYNTHESE DES N-GLYCOSYLPROTEINES	10
1.1. <i>Le cycle des dolichols produit l'oligosaccharide-lipide $Glc_3Man_9GlcNAc_2$-P-P-Dol</i>	10
1.2. <i>La maturation des N-glycosylprotéines débute dans le reticulum endoplasmique et se poursuit au niveau de l'appareil de Golgi</i>	12
1.2.1. La maturation des N-glycanes débute dans le <i>reticulum</i> endoplasmique.....	14
1.2.2. La maturation se poursuit dans l'appareil de Golgi.....	16
2. FACTEURS CONTROLANT LA N-GLYCOSYLATION DES PROTEINES	18
2.1. <i>Effet de l'inhibition ou de la stimulation de la synthèse protéique sur la synthèse des oligosaccharides-lipides</i>	19
2.2. <i>L'oligosaccharyltransférase</i>	21
2.2.1. Topologie.....	21
2.2.2. Identification et purification de l'oligosaccharyltransférase.....	21
2.2.3. Tous les sites potentiels de N-glycosylation ne sont pas utilisés.	24
2.3. <i>Des oligosaccharides sont libérés dans le reticulum endoplasmique</i>	29
2.3.1. La N-glycosylation des protéines est accompagnée de l'apparition d'oligosaccharides libres.....	29
2.3.2. Les oligosaccharides neutres sont majoritaires.....	32
3. LES OLIGOSACCHARIDES LIBRES SUIVENT UNE VOIE PARTICULIERE	36
3.1. <i>Les oligosaccharides libres OSGN2 sont libérés dans la lumière du reticulum endoplasmique</i>	36
3.2. <i>Les oligosaccharides libres ne sont pas sécrétés</i>	37

3.3. <i>Les oligosaccharides libres quittent très rapidement la voie vésiculaire et sont transportés dans le cytosol.</i>	38
3.4. <i>Les événements sont moins clairs pour les OSGN1</i>	39
3.5. <i>Les événements dans le compartiment cytosolique</i>	39
3.5.1. Les oligosaccharides libres sont partiellement dégradés dans le cytosol	39
3.5.2. Des systèmes enzymatiques susceptibles de produire de telles structures sont identifiés.....	40
4. LES LYSOSOMES SONT DES ORGANITES ACIDES.	46
4.1. <i>Définition des lysosomes</i>	46
4.2. <i>Organisation générale de la voie d'endocytose</i>	46
4.3. <i>L'acidification des lysosomes.</i>	48
4.3.1. Une ATPase est responsable de l'acidification.....	48
4.3.2. Conséquences de l'acidification sur la voie d'endocytose et sur les fonctions des lysosomes.....	49
5. TRANSPORTS JUSQU'AUX LYSOSOMES PAR VOIE VESICULAIRE	51
5.1. <i>Transport des protéines de la membrane lysosomique.</i>	52
5.1.1. Les protéines majoritaires sont bien décrites.....	52
5.1.2. Les protéines de la membrane peuvent suivre deux voies pour atteindre les lysosomes.....	53
5.2. <i>Transport des hydrolases lysosomiques.</i>	54
5.2.1. Les hydrolases lysosomiques sont modifiées et échappent à la sécrétion	54
5.2.2. Les récepteurs du mannose 6-phosphate	56
5.2.3. Fonctions des récepteurs du mannose 6-P dans le ciblage des hydrolases lysosomiques.....	58
5.3. <i>La macroautophagie et l'hétérophagie : deux voies pour rejoindre les lysosomes.</i>	60
5.3.1. La macroautophagie.	61
5.3.2. L'hétérophagie	63

6. LES ECHANGES DIRECTS LYSOSOME-CYTOSOL.....	66
6.1. <i>Les produits de dégradation retournent vers le cytosol</i>	66
6.1.1. Caractéristiques du transport lysosome-cytosol.....	66
6.1.2. Les transports de mannose et N-acétylglucosamine.....	67
6.2. <i>Des systèmes de transport cytosol-lysosome sont décrits.</i>	68
6.2.1. La cystéine cytosolique est rapidement transportée jusqu'aux lysosomes.	70
6.2.2. Certaines protéines sont spécifiquement transportées du cytosol vers les lysosomes.....	72
6.2.3. Des hydrolases de levure rejoignent la vacuole à partir du cytosol	74
 RESULTATS.....	 79
 DISCUSSION.....	 136
 BIBLIOGRAPHIE.....	 154

ABBREVIATIONS

AMPc	adénosine mono-phosphate cyclique
ARN-S	résidus 1 à 20 de la RNase A
ASGP	asialoglycoprotéine
ASGP	asialoglycoprotéine
Asn	asparagine
ATP	adénosine tri-phosphate
CCCP	carbonylcyanide-3-chlorophenylhydrazone
CCM A	concanamycine A
CPY	carboxypeptidase Y
CST	castanospermine
Cys	cystéine
DMJ	déoxymannojirimycine
Dol	dolichol
DTT	di-thiothréitol
EDTA	acide éthylène diamine tétra-acétique
EGF	epidermal growth factor
Endo-H	endo- β -N-acétylglucosaminidase H
GDP-Man	guanosine diphosphate mannose
Glc	D-glucose
Glc-P-Dol	glucosyl phosphodolichol
GlcNAc	N-acétylglucosamine
GlcNAc-1-P	N-acétylglucosamine 1-phosphate
GlcNAc-P-P-Dol	N-acétylglucosaminy pyrophosphodolichol
Gly	glycine
GTP	guanosine tri-phosphate
HRP	peroxydase de raifort
LDH	lactate déshydrogénase
LDL	« light density lipoprotein »
Man	D-mannose
Man 6-P	mannose 6-phosphate

Man-P-Dol	mannosyl phosphodolichol
NH ₄ Cl	Chlorure d'ammonium
OSGN1	oligosaccharide neutre avec un résidu de N-acétylglucosamine en position réductrice
OSGN2	oligosaccharide neutre avec deux résidus de N-acétylglucosamine en position réductrice
P-Dol	phosphodolichol
P-P-Dol	pyrophosphodolichol
PDGF	« platelet derived growth factor »
PNGase	peptide N-glycosidase
RMP-CD	récepteur du mannose 6-phosphate cation dépendant
RMP-CI	récepteur du mannose 6-phosphate cation indépendant
RNase	ribonucléase
SNAP	« soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein »
TGN	réseau trans-Golgien
Tyr	tyrosine
UDP	uridine diphosphate
UDP-GlcNAc	uridine diphosphate N-acétylglucosamine

AVANT-PROPOS

La N-glycosylation des protéines est l'une des modifications post-traductionnelles majeures. Dans la lumière du *reticulum* endoplasmique, c'est le transfert « en bloc » d'un oligosaccharide, le $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ à partir du $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ sur une séquence peptidique particulière qui engendre la N-glycosylation d'une protéine (Kornfeld et Kornfeld, 1985).

La lumière du *reticulum* endoplasmique rugueux est aussi le siège de la production d'oligosaccharides polymannosylés libres provenant principalement du $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ (Spiro et Spiro, 1991; Moore et al., 1995). Il est maintenant établi que les oligomannosides renfermant 8 et 9 résidus de mannose et 2 résidus de N-acétylglucosamine, sont directement transportés dans le compartiment cytosolique (Moore et al., 1995). Deux glycosidases, une endoglucosaminidase et une mannosidase cytosoliques les élaguent séquentiellement jusqu'à la formation d'un produit limite, le $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_1$ pseudo-linéaire de structure suivante: $\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3)[\text{Man}(\alpha 1-6)]\text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$.

Si les premières étapes, de l'apparition des oligomannosides jusqu'au transport du *reticulum* endoplasmique vers le cytosol sont établies, le devenir du $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_1$ n'est lui que supposé (Moore et Spiro, 1994; Kmiécik et al., 1995; Grard et al., 1996). Ainsi, nous avons étudié le devenir des oligosaccharides libres cytosoliques et plus particulièrement, nous avons voulu examiner l'hypothèse d'une dégradation des oligosaccharides cytosoliques dans le lysosome, dégradation consécutive à leur transport dans la lumière du compartiment lysosomique.

Avant d'exposer les résultats obtenus sur ce transport, deux points relatifs à la N-glycosylation et aux communications possibles avec les lysosomes seront détaillés.

La libération d'oligosaccharides s'inscrit dans le cadre de la N-glycosylation. Il est donc possible qu'une telle libération réponde à un mécanisme de régulation de la synthèse des N-glycosylprotéines. Les mécanismes de régulation sont peu connus, par exemple l'ajustement quantitatif de la synthèse des oligosaccharides-lipides à celui de la synthèse protéique n'est ni affirmé, ni infirmé. Ainsi, il est intéressant d'introduire quelques données acquises sur la régulation de la N-glycosylation, données généralement acquises en dépit d'une analyse des oligosaccharides libres.

Une grande majorité des oligosaccharides est libérée des oligosaccharides-lipides (Anumula et Spiro, 1983; Moore et al., 1995) et, la libération par l'oligosaccharyltransférase est supposée par Spiro et Spiro (1991) et Villers et al. (1994). Bien que cela ne soit pas

formellement montré, l'impossibilité de transfert de l'oligosaccharide sur la séquence peptidique consensus pourrait être compensée par un transfert sur l'eau, engendrant un oligosaccharide $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ libre. L'oligosaccharyltransférase serait donc une enzyme « clef » dans l'apparition des oligosaccharides libres. Ce n'est que très récemment qu'elle a été purifiée et, les rôles des différentes sous-unités la composant ne sont pas encore clairement définis. Cependant, l'existence de sous-unités régulatrices a été suggérée. Dans ce contexte, la présentation de l'oligosaccharyltransférase et des conditions de réaction entre les donneurs lipidiques et les accepteurs peptidiques est apparue nécessaire.

Les oligosaccharides-lipides ne sont sans doute pas la seule source de production des oligosaccharides libres. Certains résultats attestent de l'origine glycoprotéique pour une partie des oligosaccharides libres. Ceux-ci ne possèdent qu'un seul résidu de N-acétylglucosamine (Anumula et Spiro, 1983, Villers et al., 1994). Les événements concernant ces oligosaccharides soulèvent encore beaucoup de questions et présagent de la complexité de l'origine des oligosaccharides libres et de leurs conditions de formation.

Dans une seconde partie, les voies de communications des lysosomes avec les autres organites et avec le compartiment cytosolique sont introduites. Le transport de la majeure partie des macromolécules jusqu'aux lysosomes s'effectue par voie vésiculaire. Particulièrement, l'autophagie conduit à la dégradation des macromolécules d'origine endogène, alors que l'hétérophagie conduit à celle des macromolécules d'origine exogène. Par contre, la sortie des produits de dégradation résulte d'un transport direct vers le compartiment cytosolique dans lequel ces produits pourront être réutilisés.

Certaines molécules sont cependant transportées jusqu'aux lysosomes indépendamment d'une voie vésiculaire. Par exemple, certaines protéines cytosoliques portent une séquence-signal, qui induit leur transport jusqu'aux lysosomes. Chez la levure, deux hydrolases sont également transportées du compartiment cytosolique jusqu'à la vacuole. Si les mécanismes de translocation de ces macromolécules sont partiellement élucidés, aucun transporteur n'a été réellement caractérisé.

INTRODUCTION

1. Schéma de biosynthèse des N-glycosylprotéines

Les N-glycosylprotéines résultent de l'association covalentielle d'un glycane et d'une protéine, la liaison s'effectue entre le résidu de N-acétylglucosamine du glycane en position réductrice et un résidu d'asparagine de la protéine.

Les glycanes liés N-glycosidiquement possèdent en commun un noyau trimannosidique $\text{Man}(\alpha 1-3)[\text{Man}(\beta 1-6)]\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-\text{N})\text{Asn}$. Trois types de chaînes oligosaccharidiques sont définies suivant la nature des antennes substituant le noyau trimannosidique : le type oligomannosidique, le type N-acétyllactosaminique et le type hybride (figure 1). La biosynthèse des N-glycosylprotéines débute par le transfert « en bloc » d'un oligosaccharide, commun à tous les types de glycane liés N-glycosidiquement, à partir d'un oligosaccharide-lipide.

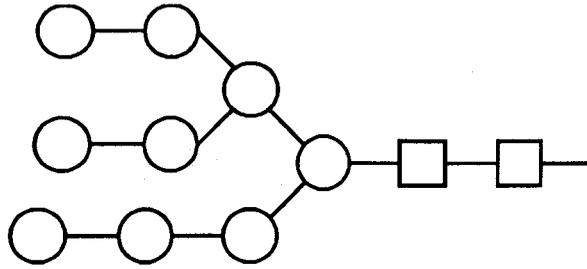
Le but de ce chapitre est de replacer les différentes étapes de la biosynthèse de l'oligosaccharide lipide $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ puis de décrire brièvement les événements survenant après son transfert en bloc sur la séquence $\text{Asn-X-Thr}(\text{Ser})$ de protéines en cours de synthèse.

1.1. Le cycle des dolichols produit l'oligosaccharide-lipide $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$

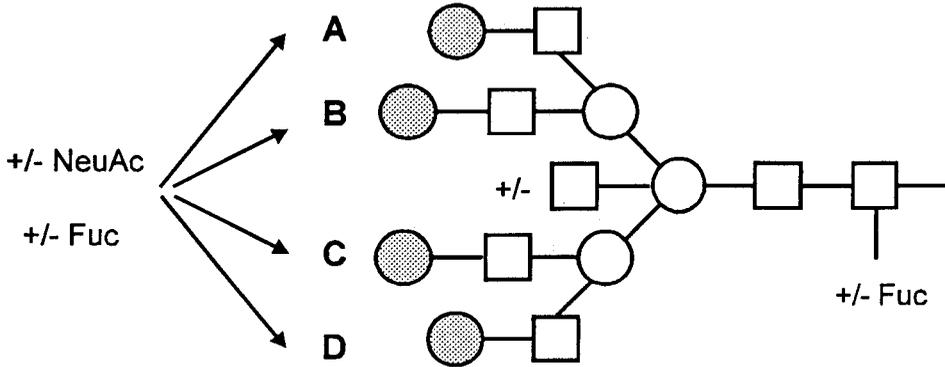
Le cycle des dolichols élabore un oligosaccharide-lipide dans le *reticulum* endoplasmique, où au moins 17 glycosyltransférases sont nécessaires. Les différentes étapes du cycle se mettent en place du côté cytosolique et du côté luminal du *reticulum* endoplasmique.

La figure 2 schématise les différentes étapes du cycle (Revue de Kornfeld et Kornfeld, 1985; Roth, 1987; Hirschberg et Snider, 1987):

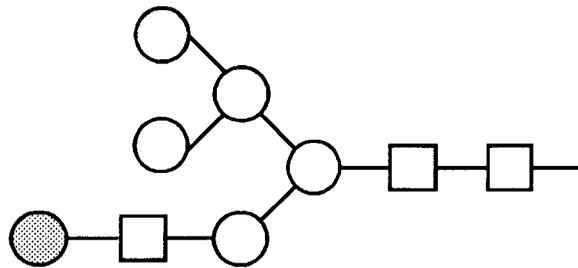
1. Le dolichol est un lipide polyisoprénique possédant de 17 à 21 unités d'isoprène, pouvant être substitué. Il s'insère dans la membrane du *reticulum* endoplasmique et sert d'ancrage pendant la synthèse de l'oligosaccharide-lipide. Deux résidus de N-acétylglucosamine sont ajoutés probablement du côté cytosolique, sur le dolichol pyrophosphate.



Glycane de type oligomannosidique



Glycane de type N-acétyllactosaminique: l'association des antennes A+B, A+B+C, A+B+D et A+B+C+D conduit respectivement aux structures bi-, tri-, tri'- et tétra-antennées.



Glycane de type hybride

□ N-acétyl-D-glucosamine ○ D-mannose ● D-galactose

NeuAc: acide N-acétylneuraminique

Fuc: L-fucose

Figure 1: représentation des trois types de glycanes liés N-glycosidiquement aux protéines

2. Cinq résidus de mannose sont ensuite additionnés pour former une structure pseudo-linéaire. Le GDP-Man est le nucléotide-sucré donneur pour cette étape, qui se déroule du côté cytosolique.

3. L'élaboration du $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ se poursuit du côté luminal du *reticulum* endoplasmique. Un mécanisme de flip-flop rend compte de la translocation du $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ de la face cytosolique vers la lumière du *reticulum* endoplasmique, le mécanisme n'est pas encore clarifié.

4. Les quatre derniers résidus de mannose sont ajoutés à partir du Man-P-Dol sur la face luminale du *reticulum* endoplasmique. Celui-ci est synthétisé par la Man-P-Dol synthase, qui utilise le GDP-Man et le P-Dol comme substrats. Cette étape qui s'effectue sur la face cytosolique est également suivie de la translocation du Man-P-Dol vers la face luminale. Le $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ est synthétisé par différentes mannosyltransférases.

5. La synthèse de l'oligosaccharide-lipide se termine par l'addition de trois résidus de glucose sur la branche en 3. Le Glc-P-Dol, synthétisé d'une façon similaire au Man-P-Dol, fournit les résidus de glucose dans la lumière du *reticulum* endoplasmique.

6. L'oligosaccharyltransférase réalise le transfert de l'oligosaccharide $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ à partir du donneur glycolipidique, sur la séquence consensus Asn-X-Thr(Ser) des protéines en cours d'élongation.

Les différentes étapes du cycle des dolichols conduisant au transfert « en bloc » de l'oligosaccharide sont maintenant bien décrites. Au contraire, les modes de régulation de la biosynthèse de l'oligosaccharide-lipide ainsi que ceux de la régulation du transfert « en bloc » sont peu compris.

1.2. La maturation des N-glycosylprotéines débute dans le *reticulum* endoplasmique et se poursuit au niveau de l'appareil de Golgi

La maturation des N-glycosylprotéines commence immédiatement après le transfert de l'oligosaccharide sur la protéine. Des glucosidases et mannosidases résidant dans le *reticulum* endoplasmique et l'appareil de Golgi élaguent l'oligosaccharide jusqu'à l'obtention du glycané portant le noyau trimannosidique commun (figure 1). C'est à partir de cette structure que les glycosyltransférases de l'appareil de Golgi vont élaborer des glycanes de type bi, ou tri

RETICULUM ENDOPLASMIQUE

CYTOSOL

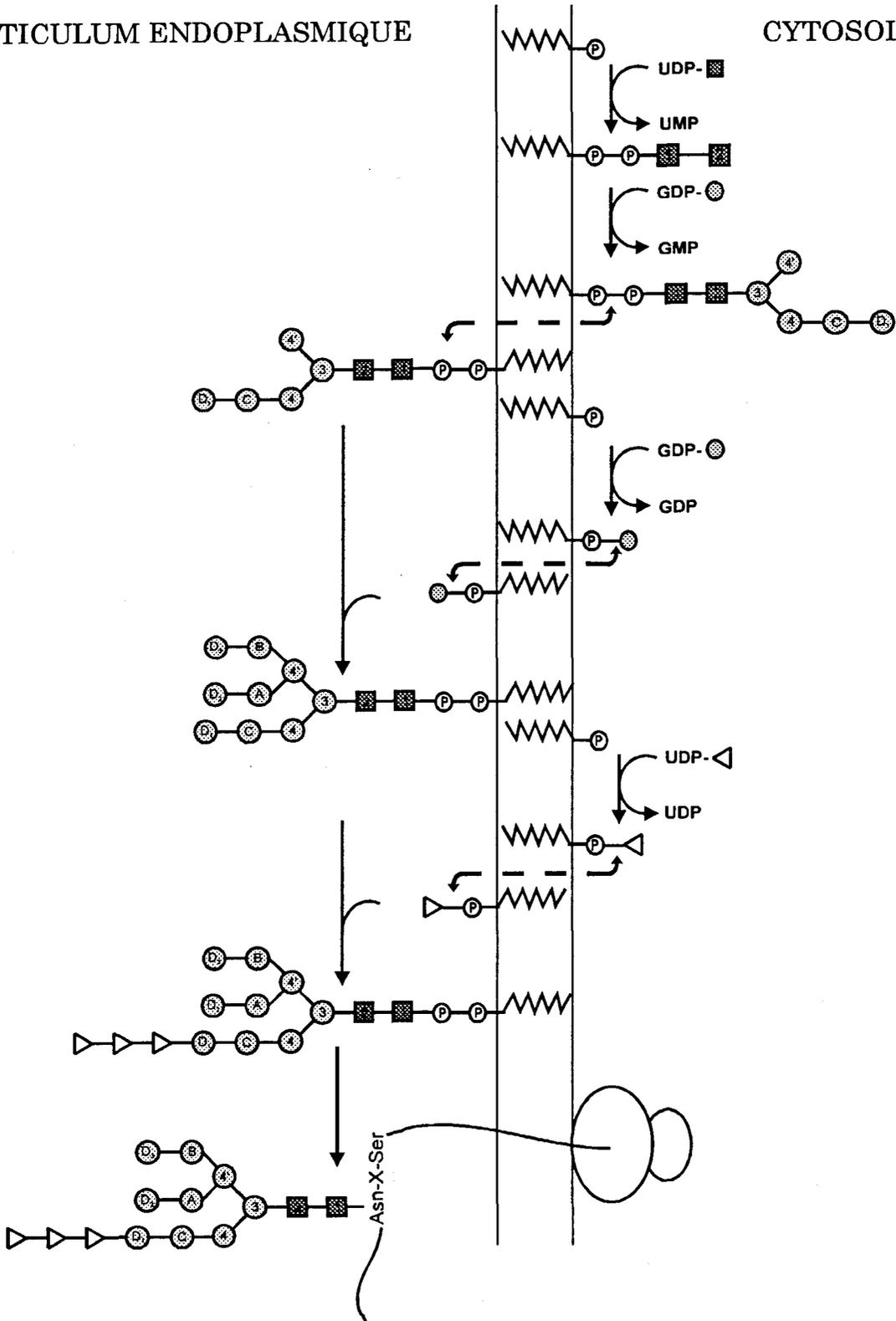


Figure 2

Représentation schématique de l'élaboration
des oligosaccharides-lipides jusqu'au transfert sur la protéine

tétraantennés. Seul le schéma général conduisant à la formation du noyau trimannosidique sera détaillé (Kornfeld et Kornfeld, 1985; Roth 1987; Hirschberg et Snider 1987; Daniel *et al.*, 1994; Moremen *et al.*, 1994).

1.2.1. La maturation des N-glycanes débute dans le *reticulum* endoplasmique

Des glycosidases localisées dans le *reticulum* endoplasmique participent aux premières étapes de la maturation des N-glycanes transférés sur la protéine.

La glucosidase I libère le premier résidu de glucose situé à l'extrémité terminale non réductrice, et la glucosidase II clive les deux autres résidus de glucose (figure 3). Ces deux enzymes sont inhibées par la deoxynojirimycine et la castanospermine. Il est maintenant montré qu'un cycle de déglucosylation-reglucosylation des glycanes permet la mise en conformation des glycoprotéines (Helenius, 1994; Hammond et Helenius, 1995).

Plusieurs activités mannosidasiques résident dans le *reticulum* endoplasmique. L' α -1,2 mannosidase du *reticulum* endoplasmique (mannosidase I du *reticulum* endoplasmique) a été la première activité caractérisée (du foie de Rat). Son étude sur les cellules CHO montre qu'elle hydrolyse le résidu D₂ du Man₉GlcNAc₂ pour former l'isomère B du Man₈GlcNAc₂ (figure 3B) (Bischoff *et al.*, 1986). L'inhibition par la deoxymannojirimycine n'est pas systématique et semble varier selon les types cellulaires (Daniel *et al.*, 1994).

L'inhibition de cette activité par la kifunensine a permis de détecter une deuxième activité, kifunensine résistante (mannosidase II du *reticulum* endoplasmique) dans le foie de Rat. L'enzyme hydrolyse le résidu D₃ du Man₉GlcNAc₂ pour former l'isomère C du Man₈GlcNAc₂ (figure 3B) (Weng et Spiro, 1993).

Une troisième activité mannosidasique, la Man₉mannosidase a été purifiée des microsomes de foie de Veau et de Porc (Schweden *et al.*, 1986; Schweden et Bause, 1989). Elle hydrolyse 3 des 4 résidus de mannose du Glc₃Man₉GlcNAc₂ liés en α -1,2 (figure 3, Bause *et al.*, 1992). La présence de résidus de glucose sur l'oligosaccharide inhibe cette activité, indiquant qu'elle intervient après la déglucosylation par les glucosidases I et II du *reticulum* endoplasmique. La Man₉mannosidase a été localisée et limitée à certaines régions du *reticulum* endoplasmique, (Roth *et al.*, 1990). Cependant, la Man₉mannosidase de rein humain exprimée dans les cellules COS est localisée dans l'appareil de Golgi (Bieberich et Bause, 1995). La fonction de cette enzyme n'est pas encore élucidée.

Plusieurs voies de maturation des N-glycanes semblent donc possibles, et sont résumées sur la figure 4. La maturation est poursuivie au niveau de l'appareil de Golgi par l'intervention d'autres mannosidases.

1.2.2. La maturation se poursuit dans l'appareil de Golgi.

Les glycanes des N-glycosylprotéines nouvellement synthétisées rejoignant l'appareil de Golgi, seront soumis à l'action séquentielle de la mannosidase I puis de la mannosidase II. Préalablement, une autre mannosidase peut intervenir sur les glycanes encore glucosylés, une activité endomannosidasique a été caractérisée au niveau de l'appareil de Golgi. Cette endomannosidase libère les oligosaccharides $\text{Glc}_{1-3}\text{Man}$ à partir des glycanes $\text{Glc}_{1-3}\text{Man}_{4-9}\text{GlcNAc}_2$ (Lubas et Spiro, 1987).

La mannosidase I est constituée de deux isoformes IA et IB, toutes les deux sont inhibées par la deoxymannojirimycine et hydrolysent le $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ pour former le $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ branché, $\text{Man}(\alpha 1-3)[\text{Man}(\alpha 1-6)]\text{Man}(\alpha 1-6)[\text{Man}(\alpha 1-3)]\text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$ (figure 3). Sa localisation au niveau de l'appareil de Golgi varie de la région *cis* à la région *trans*, selon les types cellulaires.

C'est l'intervention de la mannosidase II sur le glycanes qui définit le type N-acétyllactosaminique. En effet, cette enzyme clive les deux résidus de mannose A et B (figure 3), conduisant à la formation du noyau trimannosidique sur lequel des chaînes oligosaccharidiques seront formées. Son intervention requiert le transfert préalable d'un résidu de N-acétylglucosamine sur le mannose 4 du glycanes. La swainsonine est un puissant inhibiteur de la mannosidase II, son addition augmente ainsi la proportion de glycanes de type hybride.

L'élaboration des glycanes de type hybride et de type N-acétyllactosaminique se poursuit dans les cisternes de l'appareil de Golgi par le transfert de N-acétylglucosamine, de galactose, de fucose et d'acide sialique.

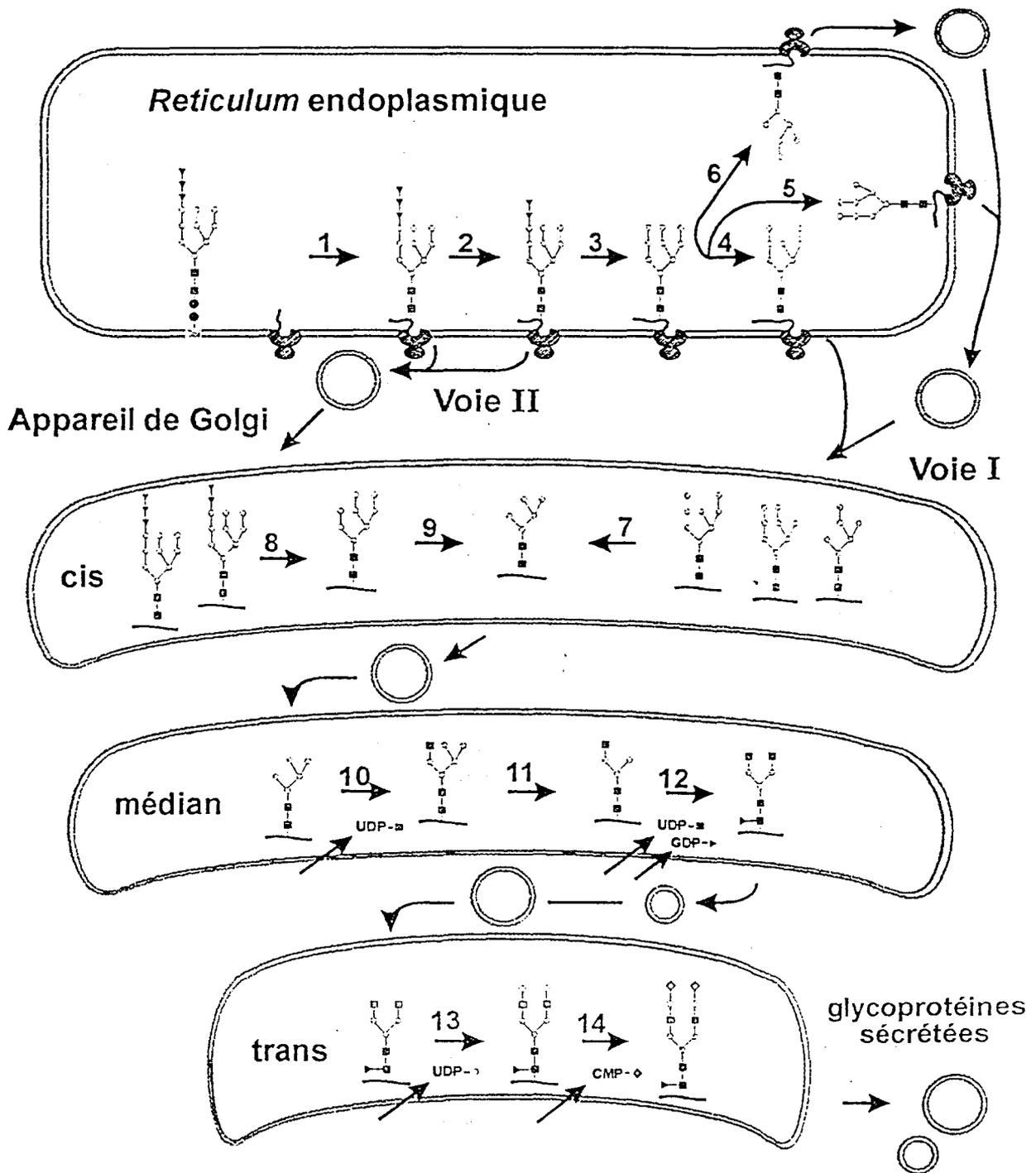


Figure 4

Différentes étapes de la maturation des glycanes des N-glycosylprotéines

1 : oligosaccharyltransférase

2 : α -glucosidase I3 : α -glucosidase II4 : α -1,2-mannosidase du *reticulum*5 : α -mannosidase kifunensine résistante6 : Man_6 -mannosidase7 : α -mannosidase I8 : endo- α -mannosidase9 : α -mannosidase I10 : *N*-acétylglucosaminyltransférase I11 : α -mannosidase II12 : fucosyltransférase et
N-acétylglucosaminyltransférase II

13 : galactosyltransférase

14 : sialyltransférase

► : Fuc ◯ : Gal ▼ : Glc ■ : GlcNAc ○ : Man ◆ : NeuAc ● : phosphoryl Col : dolichol.

2. Facteurs contrôlant la N-glycosylation des protéines

Bien que les étapes de la biosynthèse du $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ ainsi que celles de la maturation des glycanes des N-glycosylprotéines soient maintenant bien décrites, les événements régulant la N-glycosylation des protéines sont peu connus.

Le cycle des dolichols constitue la première étape de la N-glycosylation soumise à une régulation. Bien que de nombreux travaux portant sur les points de régulation du cycle des dolichols aient été réalisés, aucun schéma général de régulation ne peut être élaboré. Les résultats, impliquant divers éléments du cycle sont souvent différents, voire en contradiction. Il est vraisemblable que plusieurs points de régulation existent et il est possible que les facteurs de régulation divergent selon les tissus et types cellulaires.

Les intermédiaires lipidiques formés pourraient constituer un ou des points de régulation métabolique. Les quantités relatives des différents intermédiaires lipidiques varient considérablement entre les types cellulaires, ce qui rend difficile la compréhension de la mise en place d'une régulation. Par exemple, la concentration intracellulaire de Man-P-Dol est près de 20 et 70 fois supérieure à celle du $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ et GlcNAc-P-P-Dol respectivement dans les cellules de l'utérus de Souris (Carson *et al.*, 1987). Le $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ est par contre l'espèce majoritaire dans les cellules CHO (Rosenwald *et al.*, 1990) et le Man-P-Dol, Glc-P-Dol et GlcNAc-P-P-Dol sont en quantité équivalente.

Le Man-P-Dol pourrait agir comme activateur allostérique pour la synthèse de GlcNAc-P-P-Dol (Kean *et al.*, 1985). Mais il est difficile de suggérer un chemin de régulation via le Man-P-Dol en comparant ces données avec celles de Carson *et al.* (1987) qui montrent dans l'utérus de Souris que le traitement par des oestrogènes provoque une augmentation du niveau de Man-P-Dol sans entraîner un accroissement du niveau de GlcNAc-P-P-Dol et Glc-P-Dol .

Une observation est cependant souvent partagée: l'inhibition de la synthèse protéique entraîne l'arrêt de synthèse des oligosaccharides-lipides. Une corrélation entre la synthèse protéique et celle des oligosaccharides-lipides pourrait expliquer l'apparition d'une partie des oligosaccharides libres (Anumula et Spiro, 1983; Spiro et Spiro, 1991; Villers *et al.*, 1994).

Néanmoins, aucune des études présentées dans la paragraphe suivant ne s'est penchée sur la production de ces oligosaccharides libres.

2.1. Effet de l'inhibition ou de la stimulation de la synthèse protéique sur la synthèse des oligosaccharides-lipides.

Le niveau de synthèse protéique pourrait constituer un point de régulation de la biosynthèse des oligosaccharides-lipides. Des cinétiques d'incorporation de $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Man}$ dans les cellules CHO établissent que la quantité de $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ marqué atteint un état d'équilibre après 15 à 20 minutes, ce qui indique que le transfert de $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ est compensé par sa synthèse. Ainsi, le temps de demi-vie du $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ varie de 3,5 à 6 minutes (Hubbard et Robbins, 1980).

Si le traitement de cellules par l'actinomycine D entraîne une diminution de la synthèse protéique d'un facteur n , l'état d'équilibre du $\text{Glc}_3[2\text{-}^3\text{H}]\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ est atteint après n fois plus de temps (Hubbard et Robbins, 1980). Le temps de demi-vie du $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ est par conséquent augmenté d'un facteur n . Lorsque le cycloheximide (autre inhibiteur de la synthèse protéique) est additionné après un marquage de 20 min., au début de la chasse (c.à.d quand l'état d'équilibre du $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ est atteint), il n'y a pas de diminution de la radioactivité associée aux oligosaccharides-lipides, alors que les cellules contrôles subissent une chute de radioactivité due au transfert sur les protéines (Hubbard et Robbins, 1980). Ainsi, l'ensemble de ces observations suggère que **la vitesse de synthèse de protéines régule celle des oligosaccharides-lipides. Plus précisément, le transfert d'oligosaccharides-lipides précède la synthèse de nouveaux oligosaccharides-lipides, ce qui présuppose l'existence d'un «pool» de dolichol, comme facteur limitant.**

Le même phénomène est observé en traitant des coupes de thyroïde de Veau avec la puromycine, un troisième inhibiteur de la synthèse protéique (Spiro et Spiro, 1986; Spiro et Spiro, 1991). Ainsi, une diminution d'incorporation de $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Man}$ dans les oligosaccharides-lipides est corrélée à la diminution de synthèse de glycoprotéines. L'addition d'un peptide qui possède la séquence consensus et qui traverse la membrane du *reticulum* endoplasmique, multiplie par 4 le transfert d'oligosaccharides-lipides. Les synthèses de Man-P-Dol , GlcNAc-P-P-Dol et de Glc-P-Dol sont multipliées par 3; 2,5 et 3 respectivement. Les auteurs suggèrent

que le «pool» de dolichol-phosphate libre généré par le transfert des P-P-Dol-oligosaccharides est disponible pour une nouvelle élaboration de $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$.

De la même façon, Schmitt et Elbein (1979) et Pan et Elbein (1990) observent un arrêt de la synthèse de GlcNAc-P-P-Dol et en conséquence des oligosaccharides-lipides en réponse à une inhibition de la synthèse protéique et montrent que les activités des glycosyltransférases ne sont pas affectées. L'addition d'un peptide exogène lève l'inhibition par le cycloheximide. L'addition de P-Dol exogène sur des cellules contrôles augmente l'incorporation de $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Mannose}$ au niveau du Man-P-Dol , du $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ et des protéines, confortant l'hypothèse d'une quantité limitée de dolichol-phosphate (Spiro et Spiro, 1986; 1991). Toutefois, l'addition de P-Dol exogène sur des cellules traitées par le cycloheximide ne permet pas la « reprise » de la synthèse de $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ et du GlcNAc-P-P-Dol mais augmente seulement celle de Man-P-Dol . Ces deux observations supposent que i) l'existence d'un « pool » de P-Dol ne peut à lui seul expliquer l'arrêt de synthèse du $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ après inhibition de la synthèse protéique. ii) La présence de P-Dol suffit à la synthèse de Man-P-Dol . Ainsi, la synthèse des oligosaccharides-lipides est probablement soumise à une régulation très complexe.

Des résultats récents, obtenus après une longue stimulation par l'AMPC renforcent l'hypothèse d'un « pool » d'oligosaccharides-lipides. Un traitement de cellules JEG-3 avec le 8-bromo-AMPC suivi de la mesure de la glycosylation d'un peptide exogène (Asn-X-Thr) entraîne une stimulation rapide de la N-glycosylation mais aussi une stimulation à long terme (Konrad et Merz, 1994). L'activité de l'oligosaccharyltransférase n'est pas modifiée, par contre l'incorporation de $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Man}$ dans le $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ est multipliée par 6 après 16 heures. Des expériences de pulse-chasse soulignent que le transfert de $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ sur les protéines s'accroît dans les cellules traitées au 8-bromo-AMPC. Une augmentation de l'activité cis-prényltransférase responsable de la synthèse du dolichol s'ajoute à l'augmentation du transfert sur les protéines. L'incorporation de mévalonate tritié est multiplié par 20 après 40 heures d'incubation (Konrad et Merz, 1996). Une expérience confirme l'addition des deux événements, dans les cellules traitées avec le 8-bromo-AMPC, même si le cycloheximide et la puromycine empêchent la synthèse de $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$, le niveau de $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ est toujours supérieur à celui des cellules non traitées avec le 8-bromo-AMPC. **Ainsi, deux événements expliquent la stimulation de la N-glycosylation : i) l'accroissement de la synthèse protéique et du**

transfert de $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ libèrent du P-Dol réutilisable pour la biosynthèse de nouveaux oligosaccharides-lipides. ii) la synthèse *de novo* de dolichol est accrue, due à l'augmentation de l'activité de la cis-prényltransférase, amplifiant le « pool » de P-Dol disponible pour le cycle des dolichols.

2.2. L'oligosaccharyltransférase

2.2.1. Topologie

Les dernières étapes de la biosynthèse de l'oligosaccharide-lipide $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -P-Dol se déroulent dans la lumière du *reticulum* endoplasmique rugueux. Le transfert de l'oligosaccharide sur la protéine naissante s'effectue du même côté de la membrane, indiquant une localisation du site actif de l'oligosaccharyltransférase dans la lumière du *reticulum* endoplasmique (Kornfeld et Kornfeld, 1985; Roth, 1987). L'entrée du peptide dans le *reticulum* endoplasmique est immédiatement suivie de la N-glycosylation de résidus d'Asn inscrits dans la séquence consensus Asn-X-Thr/Ser (Kornfeld et Kornfeld, 1985).

Ce n'est que très récemment que l'oligosaccharyltransférase a été purifiée. En effet, c'est un complexe protéique très labile et son activité est considérablement réduite après solubilisation des membranes du *reticulum* endoplasmique par des détergents ioniques et non ioniques (Roth, 1987). L'activité de l'enzyme *in vitro* dépend de la présence de phosphatidylcholine (Chalifour et Spiro, 1988).

2.2.2. Identification et purification de l'oligosaccharyltransférase

2.2.2.1. L'oligosaccharyltransférase des vertébrés est un complexe enzymatique

L'oligosaccharyltransférase a été purifiée de trois organismes différents: du pancréas de Chien (Kelleher *et al.*, 1992), d'oviductes de Poule (Kumar *et al.*, 1994) et de foie de Porc (Breuer et Bause, 1995). Les méthodes de purification comparables ont conduit à l'isolement d'un trimère dont les sous-unités ont une masse d'environ 66 kDa, 64-63 kDa, 48-50 kDa. Une quatrième sous-unité de 40 kDa a été purifiée avec l'oligosaccharyltransférase de foie de Porc (Breuer et Bause, 1995).

Ces protéines présentent une remarquable homologie, par exemple, la sous-unité de 50 kDa d'oviducte de Poule et la sous-unité de 48 kDa du pancréas de Chien (Kumar *et al.*, 1994). Des expériences d'immunoprécipitation et d'immunomarquage révèlent que les sous-

unités de 66 et 64-63 kDa correspondent aux ribophorines I et II, respectivement (Kelleher *et al.*, 1992; Kumar *et al.*, 1994; Breuer et Bause, 1995). Les ribophorines avaient d'abord été impliquées dans la machinerie de translocation des protéines dans la lumière du *reticulum* endoplasmique (Sanders et Sheckman, 1992). L'inhibition de la translocation des protéines par des anticorps dirigés contre la ribophorine I suggère maintenant que l'oligosaccharyltransférase est proche de la machinerie de translocation. Le rapport stoechiométrique des ribophorines et ribosomes est estimé à 1:1 (Kelleher *et al.*, 1992).

Les trois sous-unités forment des protéines transmembranaires dont l'ectodomaine est situé du côté luminal, l'ensemble se comporte comme une protéine d'environ 200 kDa, indiquant un rapport stoechiométrique de 1:1:1 (Kelleher *et al.*, 1992; Kumar *et al.*, 1994). Bien que les sites de fixation du peptide, du lipide-donneur et le site catalytique ne soient pas identifiés, il a été spéculé que la sous-unité de 66 kDa fixe l'oligosaccharide-lipide (Kelleher *et al.*, 1992) et celle de 48 kDa (OST48) porte le site catalytique (Breuer et Bause, 1995).

2.2.2.2. *L'oligosaccharyltransférase de levure renferme 6 sous-unités*

Les outils de la biologie moléculaire utilisés chez la levure ont apporté des éléments nouveaux dans la compréhension de l'organisation de l'oligosaccharyltransférase. L'oligosaccharyltransférase purifiée est constituée de 6 sous-unités α , β , γ , δ , ϵ et ξ (voir tableau 1).

Des alignements de séquence ont permis d'identifier la sous-unité β comme la WBP1P (pour « Wheat Germ Binding protein ») de levure qui présente une similitude avec la sous-unité de 48 kDa (OST48) de vertébrés. La sous-unité δ de 30 kDa correspond à la SWP1P de levure et à la partie C-terminale de la ribophorine II (Kelleher et Gillmore, 1994). Ces deux sous-unités sont en contact dans le complexe de l'oligosaccharyltransférase (te Heesen *et al.*, 1993). La sous-unité α correspond à la ribophorine I des vertébrés (Silberstein *et al.*, 1995b). L'interruption des gènes codant pour ces protéines réduit non seulement l'activité de l'oligosaccharyltransférase, mais prévient également la croissance de la levure (te Heesen *et al.*, 1992; Silberstein *et al.*, 1995b). Les 3 sous-unités copurifiées avec l'oligosaccharyltransférase de vertébrés sont donc retrouvées dans l'oligosaccharyltransférase de levure (tableau 1).

Toutefois, 3 sous-unités sont absentes de l'oligosaccharyltransférase de vertébrés; il est possible que lors de la purification ces sous-unités soient « perdues ». Comme l'activité de l'oligosaccharyltransférase des vertébrés *in vitro* est inférieure à celle de levure dans les mêmes

conditions, les trois sous-unités « supplémentaires » pourraient stimuler l'activité oligosaccharyltransférase.

Des travaux sur la sous-unité OST3 de 34 kDa sont en accord avec cette hypothèse. L'interruption de gène de l'OST3 n'affecte pas la croissance de la levure, contrairement aux 3 sous-unités « communes » avec l'oligosaccharyltransférase de vertébrés (Karaoglu *et al.*, 1995). Toutefois, la glycosylation des protéines est réduite, l'activité de l'oligosaccharyltransférase est réduite de 50% lors d'un dosage *in vitro*. De façon intéressante, la N-glycosylation des mutants $\Delta ost3$ est affectée différemment en fonction des protéines suivies. Par exemple, alors que 4 sites de glycosylation de la carboxypeptidase Y (CPY) sont occupés dans la souche sauvage, 3,5 en moyenne le sont dans 2 souches mutantes $\Delta ost3$ (87% de la glycosylation est maintenu). La protéine WBP1P possède en moyenne 2 sites de glycosylation occupés dans la souche sauvage, seulement 0,4 site est occupé dans les souches mutantes (21% de la glycosylation est maintenu). Ainsi, la sous-unité OST3 semble stimuler la glycosylation des protéines.

La sous-unité de 16 kDa codant pour la protéine OST2 est maintenant séquencée et des souches mutantes sont construites (Silberstein *et al.*, 1995a). L'interruption de la protéine OST2 réduit l'activité de l'oligosaccharyltransférase *in vitro*. De plus, c'est une sous-unité essentielle pour la croissance de la levure, qui présente une forte homologie avec la protéine DAD1. DAD1, très conservée et présente dans les cellules de vertébrés, est supposée être un élément suppresseur de l'apoptose. Contrairement aux autres sous-unités décrites, la prédiction par analyse de profil d'hydrophobicité et la digestion par la trypsine de membranes placent la majeure partie de la protéine OST2 du côté cytosolique. Cette observation n'implique pas directement la protéine dans la fixation ou la réaction de transfert, par contre, l'organisation du segment transmembranaire en α hélice permet d'imaginer une participation de la protéine OST2 dans l'organisation du complexe de l'oligosaccharyltransférase.

Les travaux récents sur l'oligosaccharyltransférase de levure n'ont ni localisé les sites de fixation du donneur et de l'accepteur, ni le site catalytique. La conservation de trois sous-unités est très bien corrélée avec la conservation du donneur lipidique et de la séquence consensus acceptrice. Toutefois, la disparition des trois autres sous-unités n'est pas encore expliquée.

Symbole	Poids moléculaire	Nom (levure)	Nom (vertébrés)
α	62-64 kDa	OST1	Ribophorine I
β	45 kDa	WBP1PP	OST48
γ	34 kDa	OST3	
δ	30 kDa	SWP1P	Ribophorine II
ϵ	16 kDa	OST2	DAD1 ?
ξ	9 kDa		

Tableau 1 : corrélation entre les différentes sous-unités de l'oligosaccharyltransférase de levure et de vertébrés.

2.2.3. Tous les sites potentiels de N-glycosylation ne sont pas utilisés.

Certains paramètres cinétiques de l'oligosaccharyltransférase ont été déterminés bien avant la purification de l'enzyme. C'est une enzyme stimulée par le Mn^{2+} dont l'activité est complètement inhibée par l'EDTA (chélateur de cations divalents). Un K_m de 3,6 μM est calculé pour l'oligosaccharide-lipide avec un pH optimum de 7,0 (Spiro *et al.*, 1979a; Breuer et Bause, 1995): 5 à 10 minutes après le début d'une réaction de transfert *in vitro*, 50% des oligosaccharides-lipides ajoutés est transféré sur des protéines endogènes (Spiro *et al.*, 1979a). La figure 5 schématise les différents points qui seront détaillés dans ce chapitre.

2.2.3.1. Le transfert sur la séquence consensus n'est pas systématique

Comme décrit ci-dessus, la séquence peptidique acceptrice dans la réaction de transfert de l'oligosaccharide est le tripeptide Asn-X-Thr/Ser (Kornfeld et Kornfeld, 1985). L'acide aminé hydroxylé en position +2 pourrait aider la réaction de transfert, des interactions de type hydrogène entre la thréonine (ou la sérine) et l'asparagine favorisant l'«attaque» nucléophile de la fonction amine de l'asparagine (Bause, 1983; Kornfeld et Kornfeld, 1985). Une étude statistique sur de nombreuses glycoprotéines souligne que les séquences consensus sont glycosylées 9 fois sur 10. La proline est le seul acide aminé qui empêche le transfert, qu'elle soit située en position +1 ou +3 (l'Asn est en position 0, Gavel et von Heijne, 1990). C'est la conformation adoptée par le peptide renfermant le résidu de proline qui a été mise en cause. Les séquences acceptrices s'organisent en structure en coude β favorisant les interactions de type hydrogène (Bause, 1983).

La spécificité de l'oligosaccharyltransférase varie suivant la nature de l'acide aminé hydroxylé. Bien que les fréquences Asn-X-Thr et Asn-X-Ser soient identiques, la glycosylation des sites est 2 fois plus importante lorsque l'acide aminé en position +2 est la thréonine (Gavel et von Heijne, 1990); le Km diminue 7 fois et le Vmax est multiplié par 2 (Gavel et von Heijne, 1990; Breuer et Bause, 1995).

La spécificité de l'oligosaccharyltransférase varie suivant la nature du donneur lipidique. En effet, l'affinité apparente du tripeptide est multipliée par 10 lorsque le donneur est le Glc₃Man₉GlcNAc₂-P-P-Dol comparé au GlcNAc₂-P-P-Dol (Breuer et Bause, 1995). Ainsi, la reconnaissance du donneur lipidique favoriserait la reconnaissance de l'accepteur.

La glycosylation de certains sites n'est pas systématique, et définit la présence de glycoformes. Kornfeld et Kornfeld (1985) relatent la glycosylation effective d'un tiers des séquences consensus. L'activateur du plasminogène (t-AP) possède trois sites de N-glycosylation. Dans la forme de type I, les trois sites sont occupés alors que dans la forme de type II, un site n'est pas occupé. Des microsomes de pancréas de Chien sont capables de glycosyler le t-AP en présence ou en absence d'un agent oxydant (Bulleid *et al.*, 1992). La présence de l'agent oxydant favorisant la formation de ponts disulfures ne modifie pas la formation des glycoformes. Au contraire, lorsque l'agent oxydant est absent, les ponts disulfures ne se forment pas et, le type I est la seule forme présente (la glycosylation du t-AP est complète). Ces résultats sont reproduits sur des cellules CHO transfectées par le t-AP, en présence ou en absence de DTT (agent réducteur, Allen *et al.*, 1995). Ainsi, **la formation de ponts disulfures qui se met en place dans les 10 minutes après le début de la traduction est en compétition avec le transfert d'oligosaccharides, pouvant aboutir à la formation de glycoformes.**

Toutes les séquences consensus n'ont pas accès au site catalytique de l'oligosaccharyltransférase. Lep est une protéine de *Escherichia coli* utilisée comme sonde dans un système de glycosylation *in vitro* (Nilson et von Heijne, 1993). Elle est ancrée dans la membrane des microsomes de pancréas de Chien par deux domaines H1 et H2. Quand une séquence consensus est introduite du côté luminal à au moins 13 acides aminés des domaines H1 et H2, la glycosylation est possible. Ainsi, le site actif de l'oligosaccharyltransférase serait situé à 40-45 Å (13 acides aminés) de la membrane avec une orientation de la séquence parallèle à la membrane (Nilson et von Heijne, 1993). Le Glc₃Man₉GlcNAc₂-P-P-Dol a une

longueur de 90 Å dont 45 à 65 Å est associé à la membrane du *reticulum* endoplasmique, le reste de la molécule correspondant à 25-45 Å doit atteindre le site actif.

L'efficacité de transfert peut être modulée par la séquence C-terminale d'une protéine, en aval du site de glycosylation. La glycosylation de la protéine du virus de la rage n'est pas modifiée par la délétion du domaine transmembranaire et d'une partie de la séquence C-terminale. Pourtant, lorsque la partie C-terminale est tronquée en-deça des 68 acides aminés distants du site de glycosylation, la glycosylation est affectée (Shakin-Eshlemen *et al.*, 1993). Pour expliquer l'influence de la partie C-terminale, plusieurs modèles sont proposés : i) le peptide de 68 acides aminés aide l'accès de la séquence consensus au site actif de l'oligosaccharyltransférase, ii) la glycosylation est post-traductionnelle et la partie C-terminale permet un repliement correct de la protéine pour favoriser la réaction de transfert.

2.2.3.2. Influence du donneur-lipidique

Toutes les études effectuées sur différentes lignées cellulaires soulignent que les mannoses de la branche en 6 de l'oligosaccharide-lipide ne sont pas indispensables pour assurer le transfert de l'oligosaccharide sur la protéine naissante (Spiro *et al.*, 1979a; Rearick *et al.*, 1981; Gershman et Robbins, 1981; Turco et Pickard, 1982). A partir de microsomes de thyroïde, les pourcentages de transfert sur les protéines d'oligosaccharides démannosylés et d'oligosaccharides natifs sont identiques (Spiro *et al.*, 1979a).

L'élimination de glucose du milieu de culture a un effet notoire et rapide sur la synthèse des oligosaccharides-lipides. Après 15 à 30 minutes d'incubation sans glucose, les oligosaccharides-lipides majeurs sont $\text{Glc}_{0-3}\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ (Rearick *et al.*, 1981; Gershman et Robbins, 1981; Turco et Pickard, 1982). La synthèse incomplète d'oligosaccharides-lipides lors d'une carence en glucose se reproduit sur plusieurs lignées cellulaires (Rearick *et al.*, 1981; Gershman et Robbins, 1981; Turco et Pickard, 1982). Toutes ces lignées sont capables de glycosyler les protéines, l'absence de mannose ne perturbe pas le transfert. La présence de résidus de glucose sur la branche en 3 est par contre systématiquement observée sur la protéine immédiatement après le transfert du $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ (Rearick *et al.*, 1981; Turco et Pickard, 1982). Des résultats similaires sont obtenus pour la protéine G, du virus de la stomatite intégrée à des cellules embryonnaires de Poulet, lorsque les cellules sont traitées avec le CCCP, qui inhibe l'ATPase mitochondriale et prive la cellule d'énergie (Datema et Schwarz, 1981). Dans ces conditions, la N-glycosylation de la protéine G se poursuit mais elle est quantitativement réduite. Conjointement aux

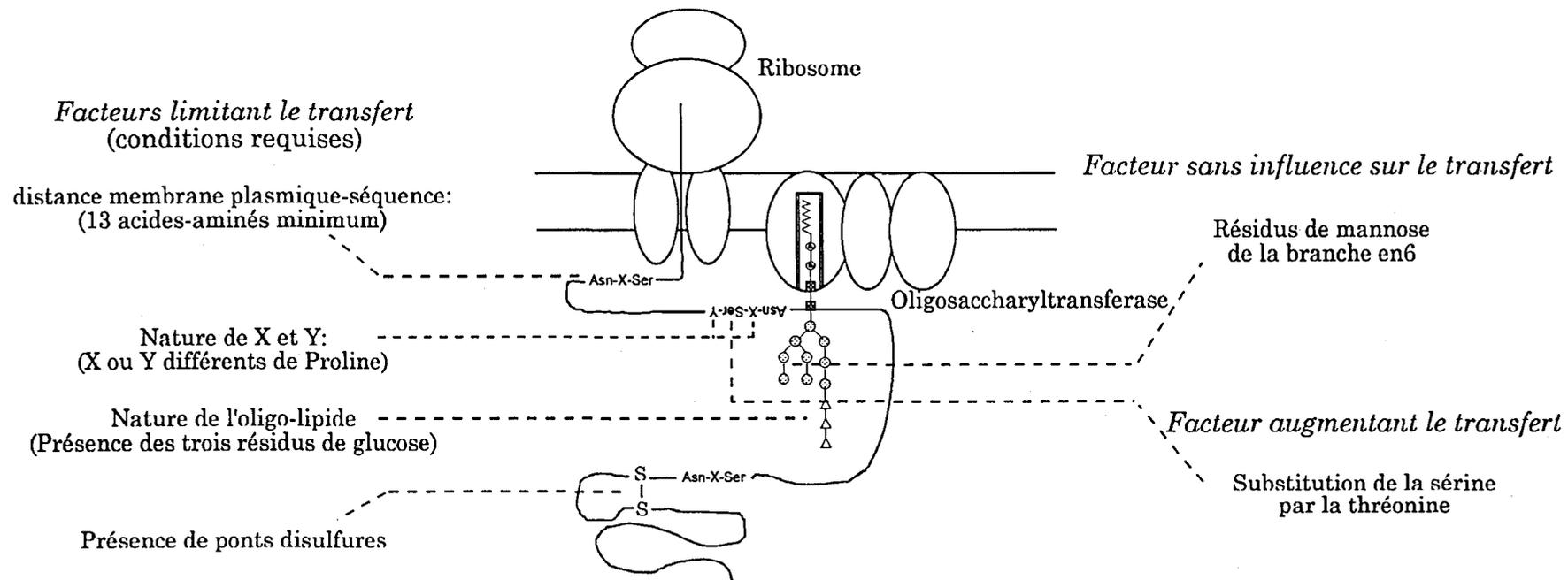


Figure 5: Facteurs modulant l'activité de transfert de l'oligosaccharyltransférase sur la séquence consensus acceptrice

observations décrites ci-dessus, la N-glycosylation des protéines est effectuée par le transfert de $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ dans des lignées mutantes de lymphocyte de Souris (BW5147.3) déficientes en Man-P-Dol synthase (Chapman *et al.*, 1979). Celle-ci se poursuit par la déglucosylation et démannosylation pour former le $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{-Asn}$ qui est la base de la biosynthèse de glycoprotéines de type N-acétyllactosaminique (Kornfeld *et al.*, 1979). Des expériences de transfert des oligosaccharides *in vitro* confirment que la présence de glucose est indispensable pour le transfert des oligosaccharides sur les protéines: 90% des oligosaccharides glucosylés sont transférés, contre seulement 10% des oligosaccharides non glucosylés (Turco *et al.*, 1977; Spiro *et al.*, 1979a).

L'ensemble de ces résultats indique que les trois résidus de glucose sont indispensables au transfert des oligosaccharides sur les protéines. Par opposition, les résidus de mannose de la branche en 6 ne semblent pas intervenir (figure 5).

Une glucosidase de microsomes de thyroïde de Veau clive les résidus de glucose d'oligosaccharides-lipides (Spiro *et al.*, 1979b). Lorsque le transfert sur les protéines est inhibée par l'EDTA, des résidus de glucose sont libérés des oligosaccharides-lipides, supposant que le transfert sur les protéines et une déglucosylation des oligosaccharides-lipides sont en « compétition ». C'est l'utilisation consécutive de plusieurs drogues, la puromycine, le CCCP et la castanospermine (inhibiteur des glucosidases du *reticulum* endoplasmique) qui a défini un cycle de glucosylation-déglucosylation des oligosaccharides-lipides (Spiro *et al.*, 1983; Spiro et Spiro, 1991). Le traitement avec la puromycine stabilise les oligosaccharides-lipides $\text{Glc}_{2-3}\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ dans les microsomes de thyroïde (voir chapitre précédent). L'addition ultérieure de castanospermine cause la formation d'oligosaccharides-lipides renfermant uniquement 3 résidus de glucose, indiquant la reglucosylation du $\text{Glc}_2\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$. L'addition de puromycine puis de CCCP provoque l'accumulation de structures déglucosylées $\text{Man}_{8,9}\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$, et confirme la déglucosylation enzymatique des oligosaccharides-lipides (Spiro et Spiro, 1991). **Un cycle de déglucosylation-reglucosylation des oligosaccharides-lipides $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ est montré. Parce que le transfert des oligosaccharides-lipides sur les protéines nécessite la présence des trois résidus de glucose, la déglucosylation-reglucosylation pourrait moduler l'efficacité de transfert et donc constituer un point de régulation de la N-glycosylation des protéines (Spiro et Spiro, 1991).**

2.3. Des oligosaccharides sont libérés dans le *reticulum* endoplasmique

La mise en évidence d'**oligosaccharides solubles ou libres**, c'est à dire **non conjugués à un lipide ou à une protéine** résulte de l'expérience suivante: lorsque des oligosaccharides-lipides radiomarqués sont ajoutés à des préparations de microsomes, des oligosaccharides solubles sont détectés dans la phase aqueuse après extraction organique par le mélange chloroforme/méthanol/eau, 3/2/1 (Hsu *et al.*, 1974; Oliver *et al.*, 1975). Nous verrons que l'apparition des oligosaccharides solubles est physiologique et probablement le résultat d'une hydrolyse enzymatique.

2.3.1. La N-glycosylation des protéines est accompagnée de l'apparition d'oligosaccharides libres

C'est le déplacement de la radioactivité associée aux oligosaccharides-lipides de la phase organique vers la phase aqueuse qui a d'abord suggéré un lien entre la N-glycosylation et la production des oligosaccharides solubles. Les oligosaccharides libres identifiés dans la phase aqueuse ont de plus des structures similaires à celles retrouvées sur les oligosaccharides-lipides et les glycoprotéines nouvellement synthétisées; ce sont des **oligosaccharides polymannosylés éventuellement glucosylés avec un ou deux résidus de N-acétylglucosamine** (Anumula et Spiro, 1983).

La tunicamycine inhibe le transfert du résidu de GlcNAc sur le P-Dol, c'est un analogue d'un intermédiaire réactionnel formé par l'UDP-GlcNAc et le P-Dol. En présence de cet inhibiteur, la biosynthèse des oligosaccharides-lipides et en conséquence le transfert sur les protéines sont bloqués. Dans ces conditions, aucun oligosaccharide libre n'est détecté (figure 7, ligne 1) (Cacan *et al.*, 1980; 1987). La bacitracine est un inhibiteur de la pyrophosphatase responsable de l'hydrolyse du P-P-Dol en P-Dol, les oligosaccharides-lipides sont « paralysés ». Le transfert sur les protéines s'arrête comme l'apparition des oligosaccharides solubles (Cacan *et al.*, 1980). Comme décrit précédemment, l'inhibition de la synthèse protéique diminue non seulement la biosynthèse des oligosaccharides-lipides mais aussi l'apparition des oligosaccharides libres (figure 7, ligne 2) (Spiro et Spiro, 1991). L'ensemble de ces résultats établit une relation directe entre la synthèse des oligosaccharides-lipides, le transfert sur les protéines et la production des oligosaccharides libres.

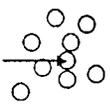
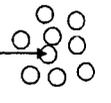
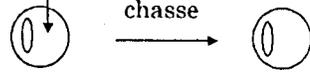
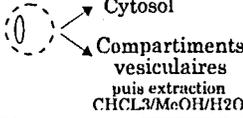
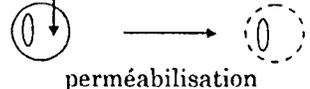
	INCUBATION	ARRÊT	OBSERVATIONS	REFERENCES PRINCIPALES
1	$[^{14}\text{C}]$ oligosaccharides-lipides (+ Triton) 	Extraction CHCL3/MeOH/H2O	dosage <i>in vitro</i> sur une préparation de microsomes les oligosaccharides-lipides sont ajoutés	Anumula et Spiro (1983)
2	UDP- $[^3\text{H}]$ Glc 	Extraction CHCL3/MeOH/H2O	marquage et dosage <i>in vitro</i> sur une préparation de microsomes	Spiro et Spiro (1991)
3	UDP-Glc GDP- $[^{14}\text{C}]$ Man UDP-GlcNAc 	Extraction CHCL3/MeOH/H2O	marquage et dosage <i>in vitro</i> sur des cellules semi-perméabilisées le cytosol est absent	Cacan et al. (1989) Kmiécik <i>et al.</i> (1995)
4	$[2\text{-}^3\text{H}]$ Man 	Extraction CHCL3/MeOH/H2O ou Perméabilisation Cytosol	Dosages <i>in vivo</i> étapes cytosoliques et vésiculaires confondues après la lyse	Cacan et al. (1989) Cacan et al. (1992) Villers et al. (1994)
			étapes cytosoliques et vésiculaires distinguées après la perméabilisation	Moore et Spiro (1994)
5	$[2\text{-}^3\text{H}]$ Man 	Extraction CHCL3/MeOH/H2O	marquage <i>in vivo</i> et dosage <i>in vitro</i> après perméabilisation le cytosol est absent	Moore et al. (1996)

Figure 6: Approches méthodologiques utilisées pour l'étude des oligosaccharides libres

 Cellule perméabilisée  Cellule  Microsomes

Condition d'incubation		Asn-X-Thr	
<i>Inhibiteur de la synthèse des oligosaccharides-lipides</i> Tunicamycine	Pas de production d'OSGN1	Pas de transfert sur les protéines	Pas de production d'OSGN2
<i>Inhibiteur de la synthèse protéique</i> Puromycine (thyroïde de Veau)	Pas de détection d'OSGN1	Diminution de la synthèse protéique par 3	Diminution de la production d'OSGN2 par 3
Cycloheximide (Mutant déficient en Man-P-Dol synthase)	Diminution de la production d'OSGN1	Diminution de la synthèse protéique par 3	Augmentation de la production d'OSGN2 par 10
 Substrat (comparaison avec la forme glucosylée)	Non déterminé	Chute de 90% du transfert	Chute de 90% de la production d'OSGN2
<i>Inhibiteur du transfert</i> EDTA	Pas de détection d'OSGN1	Pas de transfert	Pas de production d'OSGN2
EDTA ajouté en cours de réaction	Production continue	Transfert s'arrête	Production s'arrête
Addition d'un peptide exogène	Non déterminé	Transfert sur le peptide	Diminution de la production d'OSGN2

Figure 7: Relations entre les glycoprotéines, les oligosaccharides-lipides et les oligosaccharides libres

Les premières études ont distingué les oligosaccharides libres phosphorylés et les oligosaccharides libres neutres. Ces derniers possèdent un ou deux résidus de GlcNAc à l'extrémité terminale réductrice et forment les OSGN1 et OSGN2, respectivement.

2.3.2. Les oligosaccharides neutres sont majoritaires

i) L'incubation de préparation de microsomes avec des oligosaccharides-lipides radiomarqués ou avec des nucléotides-sucres précurseurs de la synthèse des oligosaccharides-lipides et, ii) l'incorporation de radioéléments dans les oligosaccharides-lipides par marquage métabolique de cellules en culture ou de tissus constituent les bases des méthodes utilisées pour suivre la formation des oligosaccharides libres (figure 6).

2.3.2.1. Origine des OSGN2

Les OSGN2 apparaissent très rapidement après la synthèse des oligosaccharides-lipides. Lorsque des préparations de membranes microsomales sont incubées avec des oligosaccharides-lipides radiomarqués, le transfert sur les protéines endogènes est accompagné de l'apparition d'oligosaccharides libres (figure 6, ligne 1) (Anumula et Spiro, 1983). Le $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ est le composé majoritaire après 2 minutes de réaction. Villers *et al.* (1994) identifient 91% des oligosaccharides libres comme des OSGN2 après 10 minutes de marquage des cellules B3F7 avec du $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Man}$ (figure 6, ligne 4; cellules CHO mutantes et déficientes en activité Man-P-Dol synthase). Après 20 minutes d'incorporation de $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Man}$ dans les cellules HepG2, la majeure partie des oligosaccharides libres a également deux résidus de GlcNAc à l'extrémité terminale réductrice (Moore et Spiro, 1994). Lorsque les cellules HepG2 sont perméabilisées après le marquage, les OSGN2 sont les seuls oligosaccharides libres neutres détectables dans la fraction vésiculaire (figure 6, ligne 5) (Moore *et al.*, 1995). Les mêmes observations ont été faites par Kmićik *et al.* (1995) sur les cellules CHO et par Spiro et Spiro (1991) sur les microsomes de thyroïde incubés avec de l'UDP- $[^3\text{H}]\text{Glc}$ (lignes 3 et 2, figure 6).

Les OSGN2 dérivent des oligosaccharides-lipides. L'ensemble des données décrites ci-dessus indique que i) la formation des OSGN2 peut être envisagée comme un événement physiologique et ii) liée à la N-glycosylation des protéines.

Dans le chapitre 2.2.3.2, l'importance de la glycosylation des oligosaccharides-lipides dans l'efficacité de transfert sur les protéines a été montrée. D'une façon similaire, l'efficacité

de transfert sur les protéines endogènes de microsomes de thyroïde est réduite de 90% si le Glc₃Man₉GlcNAc₂-P-P-Dol radiomarqué est substitué par le Man₉GlcNAc₂-P-P-Dol. Dans ces conditions, la libération des OSGN2 chute également de 90% (figure 7, ligne 3) (Anumula et Spiro, 1983). Si la quantité d'oligosaccharides-lipides ajoutés aux membranes microsomales est accrue, la capacité de transfert sur les protéines et la production d'OSGN2 sont amplifiées (Anumula et Spiro, 1983). L'EDTA qui inhibe l'activité de l'oligosaccharyltransférase, prévient la glycosylation des protéines mais aussi la formation des OSGN2 (figure 7, ligne 4). La production d'OSGN2 est ainsi corrélée aux capacités de transfert des oligosaccharides sur les protéines.

L'inhibition et la stimulation de la synthèse protéique ont un effet sur la formation des OSGN2. Beaucoup de travaux relatent l'effet de l'inhibition et/ou de la stimulation de la synthèse protéique sur la formation des oligosaccharides-lipides, et mettent en jeu un « pool » d'oligosaccharides-lipides disponibles pour la N-glycosylation (voir chapitre 2.1). Cependant, peu de ces études se sont intéressées au devenir des oligosaccharides libres dans ces conditions. Par exemple, après incorporation de [2-³H]Man dans les cellules CHO, la chasse est réalisée en présence de cycloheximide (Hubbard et Robbins, 1980), la radioactivité associée aux oligosaccharides-lipides ne varie pas. Ainsi, le transfert sur les protéines n'est plus possible dans ces conditions mais, la libération d'OSGN2 ne semble pas non plus stimulée. Un résultat similaire a été obtenu par Spiro et Spiro (1991) en traitant des coupes de thyroïde avec la puromycine: la synthèse des oligosaccharides-lipides est réduite et celle des OSGN2 est réduite du même facteur. Par opposition à ces résultats, lorsque les cellules B3F7 sont traitées avec le cycloheximide, la radioactivité associée aux protéines diminue pendant qu'une augmentation de la radioactivité associée au OSGN2 est observée (Villers *et al.*, 1994). Si l'inhibition de la synthèse protéique accroît la libération d'oligosaccharides libres, la quantité de P-Dol disponible pour une nouvelle synthèse d'oligosaccharides-lipides devrait augmenter.

Les expériences de stimulation de synthèse protéique sont en fait mimées par l'addition de peptides exogènes (figure 7, ligne 5; renfermant la séquence consensus) lors d'expériences *in vitro*. Dans ces conditions, l'apparition des OSGN2 décroît en même temps que la concentration en peptides augmente (Spiro et Spiro, 1991; Moore *et al.*, 1995). **Ces expériences confirment i) la libération des OSGN2 des oligosaccharides-lipides et ii) la relation entre la capacité de N-glycosylation et l'apparition des OSGN2. Toutefois, même si l'addition de peptides exogènes fournit des résultats similaires suivant les**

systèmes utilisés, l'effet de l'inhibition de la synthèse protéique est variable (Spiro et Spiro, 1991; Villers *et al.*, 1994).

Une part des oligosaccharides libres OSGN2 pourraient dériver de glycoprotéines après l'action d'une PNGase. L'activité PNGase est largement répandue chez les champignons, bactéries mais aussi chez les mammifères (Suzuki *et al.*, 1995). Cette enzyme a été purifiée et caractérisée d'une lignée de fibroblastes, les cellules L-629 (Suzuki *et al.*, 1994) et caractérisée dans le foie, rein, cerveau et rate de Souris (Kitajima *et al.*, 1995). Sa localisation intracellulaire n'est pas encore clairement définie, toutefois, son pH optimum neutre et son absence de réactivité vers les glycoasparagines écartent le compartiment lysosomique (Suzuki *et al.*, 1994). Il a été parallèlement montré que certaines protéines présentent dans leur séquence peptidique un acide aspartique situé à deux acides aminés d'une sérine ou d'une thréonine, alors que la séquence nucléotidique prévoit un résidu d'asparagine (Suzuki *et al.*, 1995). Cette substitution d'acides aminés peut être le résultat de la PNGase. En effet, la PNGase coupe entre le résidu de N-acétylglucosamine et l'asparagine et transforme ce dernier en aspartate (Suzuki *et al.*, 1994; 1995). C'est pourquoi Suzuki *et al.* présumant une déglycosylation de certaines glycoprotéines, libérant des OSGN2.

Des travaux récents rapportent que l'infection de cellules présentatrices de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I par le cytomégalovirus conduit à la dégradation rapide des protéines du CMH I dans le cytosol par le protéasome (Wiertz *et al.*, 1996). Un intermédiaire non glycosylé de ces protéines détecté avant la protéolyse résulte en fait de l'action d'une activité PNGase, qui entraînerait la libération d'OSGN2. Hiller *et al.*, (1996) ont également montré la dégradation ubiquitine-dépendante par le protéasome de la carboxypeptidase Y mal repliée et synthétisée dans le *reticulum* endoplasmique. La dégradation de glycoprotéines réticulaires dans le cytosol conduisant à la libération d'OSGN2 par une PNGase pourrait être le résultat d'un repliement incorrect des protéines dans le *reticulum* endoplasmique et ainsi constituer une autre alternative pour la formation des OSGN2.

2.3.2.2. Les OSGN1 ont sans doute deux origines

Deux origines sont envisagées pour la formation des OSGN1: les OSGN2 et les glycoprotéines de type oligomannosidique.

L'incorporation de [2-³H]Man dans les cellules HepG2 et CHO (Moore et Spiro, 1994; Villers *et al.*, 1994) ou des mesures *in vitro* sur des microsomes isolés additionnés

d'oligosaccharides-lipides (figure 6, ligne 1) (Anumula et Spiro, 1983) soulignent que les OSGN1 apparaissent après les OSGN2. Une conversion des OSGN2 en OSGN1 peut expliquer ces cinétiques (chapitre 3.3). Moore *et al.* (1995) (figure 6, ligne 5) n'ont pas détecté d'OSGN1 dans les compartiments vésiculaires après un marquage métabolique avec le [2-³H]mannose. De la même façon, des microsomes de thyroïde incubés avec de l'UDP-[³H]Glc (figure 6, ligne 2), produisent presque exclusivement des OSGN2 en dépit de la capacité de N-glycosylation des protéines (Spiro et Spiro, 1991). Ces premiers résultats présagent que la conversion des OSGN2 en OSGN1 ne se déroule pas dans les compartiments vésiculaires.

Le transfert des oligosaccharides sur les protéines est maximal après 5 minutes d'incubation des microsomes avec des oligosaccharides-lipides radiomarqués (figure 6, ligne 1) (Anumula et Spiro, 1983). Lorsqu'après 4 minutes de réaction, l'EDTA est ajouté, la production d'OSGN2 est arrêtée et la quantité de radioactivité associée reste stable. Au contraire, l'apparition des OSGN1 continue, pendant que la radioactivité associée aux glycoprotéines diminue (figure 7, ligne 4), **les glycoprotéines sont aussi des candidats pour une production d'OSGN1**. La diminution de la radioactivité associée aux protéines, accompagnée de la libération d'OSGN1 est observée lors d'expériences *in vivo* après marquage métabolique (Villers *et al.*, 1994). La détection d'une endoglucosaminidase dans les préparations de microsomes de thyroïde active sur les glycoprotéines renforce cette hypothèse (Anumula et Spiro, 1983).

Les deux origines de production des OSGN1 sont vraisemblables. Cependant, aucune donnée expérimentale n'a pu établir les quantités relatives des OSGN1 dérivant des OSGN2 et ceux dérivant de la dégradation des glycoprotéines. Toutefois, les différentes observations décrites suggèrent que la majeure partie des OSGN1 résulte de la dégradation des OSGN2.

2.3.2.3. Une faible part des oligosaccharides libres sont phosphorylés

En effet, des données récentes établissent la part des oligosaccharides libres phosphorylés à 5% des oligosaccharides libres dans les cellules CHO (Kmiécik *et al.*, 1995). Cette part est amplifiée à 15% lors de dosage *in vitro* sur des cellules perméabilisées (Kmiécik *et al.*, 1995). Lorsque les oligosaccharides-lipides des cellules CHO sont marqués avec du [2-³H]Man en présence de glucose, de castanospermine et de déoxymannojirimycine, ceux-ci sont constitués par le Glc₁₋₃Man₉GlcNAc₂-P-P-Dol. Dans ces conditions, les oligosaccharides libres phosphorylés sont essentiellement représentés par le Man₅GlcNAc₂-P

dont la structure est similaire à celle du $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ synthétisé sur la face cytosolique (Cacan *et al.*, 1992). Ces oligosaccharides libres phosphorylés semblent de plus libérés du côté cytosolique, supposant une activité pyrophosphatase cytosolique (Kmiécik *et al.*, 1995).

La libération des oligosaccharides libres phosphorylés dépend du niveau de glucosylation des oligosaccharides-lipides. En effet, quand l'UDP-Glc est absent du milieu d'incubation de cellules CHO perméabilisées, les oligosaccharides-lipides ne sont plus glucosylés et 40% des oligosaccharides libres sont maintenant phosphorylés (ils correspondent à 15% des oligosaccharides libres en présence d'UDP-Glc (Kmiécik *et al.*, 1995).

La nature des oligosaccharides libres phosphorylés est différente dans d'autres types cellulaires étudiés mais ils ne sont jamais glucosylés (Hoflack *et al.*, 1981; Cacan *et al.*, 1987). L'addition d'UDP-Glc sur des lymphocytes de Rat diminue également la libération d'oligosaccharides libres phosphorylés. La quantité de ces oligosaccharides est supérieure à la quantité des oligosaccharides transférés sur les protéines endogènes en absence d'UDP-Glc (Cacan *et al.*, 1980), et inférieure après ajout d'UDP-Glc (Hoflack *et al.*, 1981).

3. Les oligosaccharides libres suivent une voie particulière

3.1. Les oligosaccharides libres OSGN2 sont libérés dans la lumière du *reticulum* endoplasmique

Comme décrit précédemment, la majorité des OSGN2 dérivent des oligosaccharides-lipides, qui sont localisés dans le *reticulum* endoplasmique. Les OSGN2 détectés après des temps courts de marquage correspondent aux $\text{Glc}_{0-3}\text{Man}_{8-9}\text{GlcNAc}_2$ (Spiro et Spiro, 1991; Moore et Spiro, 1994; Cacan *et al.*, 1989), identiques aux structures des oligosaccharides-lipides situés du côté luminal. Ces oligosaccharides libres sont également colocalisés avec des glucosidases sensibles à la castanospermine, ils ne sont plus déglucosylés après ajout de cet agent (Cacan *et al.*, 1989; Kmiécik *et al.*, 1995; Moore *et al.*, 1995). Ces glucosidases ont été localisées dans le *reticulum* endoplasmique.

La mise au point d'un dosage *in vitro* sur des cellules perméabilisées a définitivement établi la libération des OSGN2 dans la lumière du *reticulum* endoplasmique. La

perméabilisation de la membrane plasmique permet de séparer le compartiment cytosolique de l'ensemble des compartiments vésiculaires (figure 6, ligne 5) (Moore *et al.*, 1995). Cette approche a montré que i) Les oligosaccharides libres présents dès le marquage continuent de s'accumuler, ii) ils ne sortent pas des compartiments vésiculaires, et se situent bien dans la lumière des compartiments. iii) Alors qu'ils sont constitués de $\text{Glc}_{1-3}\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, après 1 heure d'incubation ils sont déglucosylés et correspondent au $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$.

3.2. Les oligosaccharides libres ne sont pas sécrétés

Les expériences de marquage *in vivo* n'ont jamais révélé la présence d'oligosaccharides libres dans le milieu extracellulaire, supposant que les oligosaccharides libérés dans la lumière du *reticulum* endoplasmique ne suivent pas la voie de sécrétion (Moore et Spiro, 1994; Cacan *et al.*, 1989).

Il est intéressant d'introduire à ce niveau les travaux de Wieland *et al.* (1987) qui reposent sur la sécrétion d'un glycotriptide dans les cellules CHO et les cellules HepG2.

Wieland *et al.* (1987) ont ajouté aux cellules un tripeptide N-acyl-Asn-[^{125}I]Tyr-Thr-NH₂ (séquence consensus de N-glycosylation), qui pénètre dans la cellule et les différents compartiments cellulaires. Il est glycosylé par le transfert de $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ dans le *reticulum* endoplasmique et quitte la cellule par la voie d'exocytose. Wieland *et al.* (1987) ont montré dans un premier temps que les glycopeptides traversaient la cellule via l'appareil de Golgi puisque endo-H sensibles ils deviennent endo-H résistants (par la perte de la branche liée en α -1,6), soulignant qu'un glycane porté par une petite molécule telle un tripeptide peut être le substrat des glycosidases responsables de la maturation des glycoprotéines.

Des expériences de marquage et de pulse-chasse montrent que i) le temps de demi-vie des glycopeptides dans la cellule est d'environ 10 minutes, ii) les glycopeptides endo-H sensibles et résistants sont sécrétés à la même vitesse; ils suivent la même voie. iii) Une variation de concentration de glycopeptides d'un facteur 100 ne modifie pas la vitesse de sécrétion. Ces résultats ont conduit au concept que la sécrétion de glycopeptides ne dépendait pas de l'existence d'un signal et en l'occurrence d'un signal glucidique.

La sécrétion rapide et efficace des oligosaccharides libérés dans la lumière du *reticulum* endoplasmique pouvait être envisagée. Mais l'absence de détection des oligosaccharides libres dans le milieu de sécrétion a mis à l'écart cette hypothèse. Nous verrons qu'ils sont directement transportés dans le compartiment cytosolique. Le transport des oligosaccharides

libres vers le cytosol doit être lui aussi efficace pour échapper à la voie de sécrétion (le temps de demi-vie d'un glycotriptide dans la cellule est de 10 minutes).

3.3. Les oligosaccharides libres quittent très rapidement la voie vésiculaire et sont transportés dans le cytosol.

Dans le système de dosage *in vitro* mis au point par Moore *et al.* (1995) les cellules perméabilisées après un marquage avec le $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Man}$ sont incubées 1 heure à 37°C pendant laquelle des oligosaccharides libres OSGN2 sont produits dans le *reticulum* endoplasmique (figure 6, ligne 5). L'addition d'ATP provoque une conversion du $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ en $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ puis une sortie rapide de ces OSGN2 vers le cytosol. i) C'est une sortie dépendante de l'hydrolyse d'ATP. ii) Le traitement avec la bréfeldine A redistribue les enzymes de l'appareil de Golgi dans le *reticulum* endoplasmique. Dans ces conditions, les oligosaccharides libres sont partiellement dégradés par la mannosidase I de l'appareil de Golgi pour former des structures renfermant 5 résidus de mannose. Comme dans des conditions de dosage témoin, les OSGN2 transportés renferment 8 et 9 résidus de mannose, les oligosaccharides libres ne transitent vraisemblablement pas par l'appareil de Golgi et, le transport s'effectue directement du *reticulum* endoplasmique vers le cytosol. iii) Des oligosaccharides libres triglucosylés s'accumulent dans la lumière du *reticulum* endoplasmique. En effet, après un traitement avec la castanospermine (inhibiteur des glucosidases I et II) l'addition d'ATP n'autorise pas la sortie des OSGN2, seule la conversion $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ en $\text{Glc}_3\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ est observée.

Les résultats décrits par Kmiécik *et al.* (1995) sur les cellules CHO sont en accord avec ceux obtenus sur les cellules HepG2. Toutefois, les structures des oligosaccharides libres identifiés sont partiellement différentes, en particulier le $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ linéaire est détecté après des temps courts de réaction. Les équipements enzymatiques et notamment en glucosidases diffèrent suivant les types cellulaires et tissus étudiés (Daniel *et al.*, 1994), de telles différences peuvent expliquer les variations de structure des oligosaccharides libres, sans modifier l'ensemble des événements.

3.4. Les événements sont moins clairs pour les OSGN1

Une faible part des OSGN1 semble être libérée des glycoprotéines (Spiro et Spiro, 1991; Villers *et al.*, 1994, chapitre 1.2.3.2.2.). Une apparition des OSGN1 dans la lumière du *reticulum* endoplasmique, lieu de synthèse des glycoprotéines est possible.

L'incertitude sur la localisation des OSGN1 après un marquage bref, est basée sur une absence de détection dans les compartiments vésiculaires lors de dosage *in vitro* mis au point sur des cellules HepG2 (Moore *et al.*, 1995), les microsomes de thyroïde (Spiro et Spiro, 1991) et les cellules CHO (Kmiécik *et al.*, 1995). En effet, comme décrit précédemment aucun oligosaccharide libre OSGN1 n'est associé avec les compartiments vésiculaires. Le dosage mis au point par Anumula et Spiro (1983) met en jeu des préparations de microsomes et des oligosaccharides-lipides marqués mais la réaction est assurée par l'ajout de 0,1% de Triton et ne permet pas de conclure à la localisation des OSGN1.

D'autre part, la pompe ATPasique qui échange le Na⁺ et le K⁺, située au niveau de la membrane plasmique, possède des glycanes dirigés vers le compartiment cytosolique (Pedemonte *et al.*, 1990). Ces glycanes sont formés d'un seul résidu de GlcNAc lié N-glycosidiquement et, ne renferment ni mannose, ni aucun autre monosaccharide (Pedemonte et Kaplan, 1992). Ainsi, l'hydrolyse de N-glycanes de type oligomannosidique de cette protéine pourrait donner naissance à des OSGN1 cytosoliques. Cette spéculation représente une alternative à la production des OSGN1 dans le cytosol.

3.5. Les événements dans le compartiment cytosolique

3.5.1. Les oligosaccharides libres sont partiellement dégradés dans le cytosol

Des expériences de pulse-chasse effectuées sur les cellules HepG2, suivies de la perméabilisation de la membrane plasmique par la streptolysine O ont révélé les événements majeurs survenant dans le compartiment cytosolique (Moore et Spiro, 1994). Le transport des oligosaccharides libres Man₈₋₉GlcNAc₂ du *reticulum* endoplasmique dans le compartiment cytosolique est quasiment terminé après 40 minutes de chasse. Les OSGN2 ne sont visibles dans le compartiment cytosolique qu'entre 0 et 40 minutes de chasse pendant que la quantité d'OSGN1 augmente dans ce compartiment. La conversion OSGN2 en OSGN1 est donc tout à fait envisageable. Les OSGN1 sont ensuite progressivement démannosylés jusqu'à la formation

d'un oligosaccharide renfermant 5 résidus de mannose le $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_1$ pseudo-linéaire $\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3)[\text{Man}(\alpha 1-6)]\text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$, structure identique à celle présente dans le cytosol des cellules CHO (Kmiécik *et al.*, 1995). Cette structure est à opposer au $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_1$ branché (figure 1) présent sur les glycoprotéines de type hybride (voir chapitre 1.1). Les oligosaccharides libres détectés après des temps de chasse plus longs sont à nouveau observés dans des compartiments vésiculaires où leur dégradation s'achève.

3.5.2. Des systèmes enzymatiques susceptibles de produire de telles structures sont identifiés

L'existence de glycosidases dans le compartiment cytosolique a été longtemps controversée (Haeuw *et al.*, 1991). Cette controverse était sans doute associée à l'absence de substrats cytosoliques connus. La découverte du passage des oligosaccharides libres dans le compartiment cytosolique apporte des substrats pour deux enzymes l'endo-N-acétylglucosaminidase et la mannosidase cytosoliques.

3.5.2.1. L'endo-N-acétylglucosaminidase cytosolique

Une activité endo-N-acétylglucosaminidasique a été caractérisée dans diverses fractions cytosoliques brutes préparées à partir de foie, de rate, de rein de Rat et de Porc (Nishigaki *et al.*, 1974). Cette enzyme présente un pH optimum de 7,0 et est inactive en dessous de pH 5,0. Une dégradation préalable par des exoglycosidases n'est pas nécessaire, l'activité est bien une activité endo. La localisation cytosolique a été confirmée et la spécificité étudiée dans le foie de Rat par Pierce *et al.*, (1979; 1980) et Tachibana *et al.*, (1982). Cette enzyme agit sur les glycopeptides de type oligomannosidique et de type N-acétyllactosominique, les résidus de mannose liés en $\alpha 1-3$ et en $\alpha 1-6$ sont importants pour l'hydrolyse. Par contre, la présence de l'acide aminé Asn n'est pas nécessaire (Tachibana *et al.*, 1982), elle présente une activité chitobiasique. Elle est maintenant identifiée dans de nombreux organismes dont le foie, le cerveau, le rein humain et murin (Suzuki *et al.*, 1995). Notons que Haeuw *et al.*, (1991) rapportent l'activité possible *in vitro* de l'endo-N-acétylglucosaminidase sur le $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ et le $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$. Une activité chitobiasique a été récemment caractérisée sur une lignée de cellules en culture, les cellules MDBK (Cacan *et al.*, 1996). Contrairement aux activités décrites dans le foie de Rat (Pierce *et al.*, 1979; 1980), cette activité ne clive pas les glycoasparagines.

3.5.2.2. La mannosidase cytosolique

La localisation cytosolique d'une activité mannosidasique a été longtemps controversée (Bischoff et Kornfeld, 1986; Haeuw *et al.*, 1991). Elle est maintenant levée et les récents travaux de Weng et Spiro (1996) ont dévoilé les relations entre la forme cytosolique et réticulaire des mannosidases.

La mannosidase dégrade l'oligosaccharide $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_1$ jusqu'à la formation d'un produit limite le $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_1$. La mannosidase cytosolique a été identifiée dans différents tissus et espèces (Daniel *et al.*, 1994), elle présente la même spécificité de substrats dans la plupart des études réalisées. En effet, l'hydrolyse de l'oligosaccharide $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_1$ est séquentielle et, un seul isomère est présent à chaque étape de dégradation (Haeuw *et al.*, 1991; Al Dahler *et al.*, 1992) (voir figure 8B). **Le résidu de mannose D₃ est le premier résidu de mannose enlevé, conduisant à l'isomère C du $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_1$.** Puis les mannoses B, D₂ et A sont successivement retirés, le produit limite formé est donc le $\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3)[\text{Man}(\alpha 1-6)]\text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$. L'hydrolyse de l'isomère B du $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_1$ fournit également le $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_1$ pseudo-linéaire mais les isomères intermédiaires sont différents (Al Dahler *et al.*, 1992). Les études sur les mannosidases cytosoliques de Chat et Boeuf soulignent une dégradation des oligosaccharides $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ aléatoire avec l'existence de plusieurs isomères à chaque étape avec une très faible vitesse de réaction (De Gasperi *et al.*, 1992a). La présence des 2 résidus de N-acétylglucosamine semble expliquer cette différence. Effectivement, la mannosidase cytosolique agit préférentiellement, voire exclusivement sur les OSGN1 (Oku et Hase, 1991; Grard *et al.*, 1996). Par contre, la glucosylation de la branche en 3, n'affecte pas l'hydrolyse dans des conditions *in vitro* et *in vivo* (Grard *et al.*, 1996; Moore et Spiro 1994) (figure 8A). Il est intéressant de noter que Moore et Spiro (1994) ont observé dans le compartiment cytosolique des cellules HepG2, l'unique présence de l'isomère B du $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ et la présence des isomères B et C du $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_1$. L'isomère B est produit par une mannosidase du *reticulum* endoplasmique, il est ensuite transporté dans le cytosol où il est dégradé par l'endo-N-acétylglucosaminidase pour former l'isomère B du $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_1$. En accord avec les résultats présentés ci-dessus, l'isomère C n'est présent que sur les OSGN1 et dérive du $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_1$ (figure 9).

La mannosidase cytosolique et la mannosidase II du *reticulum* endoplasmique sont apparentées. La mannosidase cytosolique est biochimiquement bien caractérisée. C'est une protéine non glycosylée, dont le pH optimum est de 6,4-6,8, stabilisée par le cobalt et le

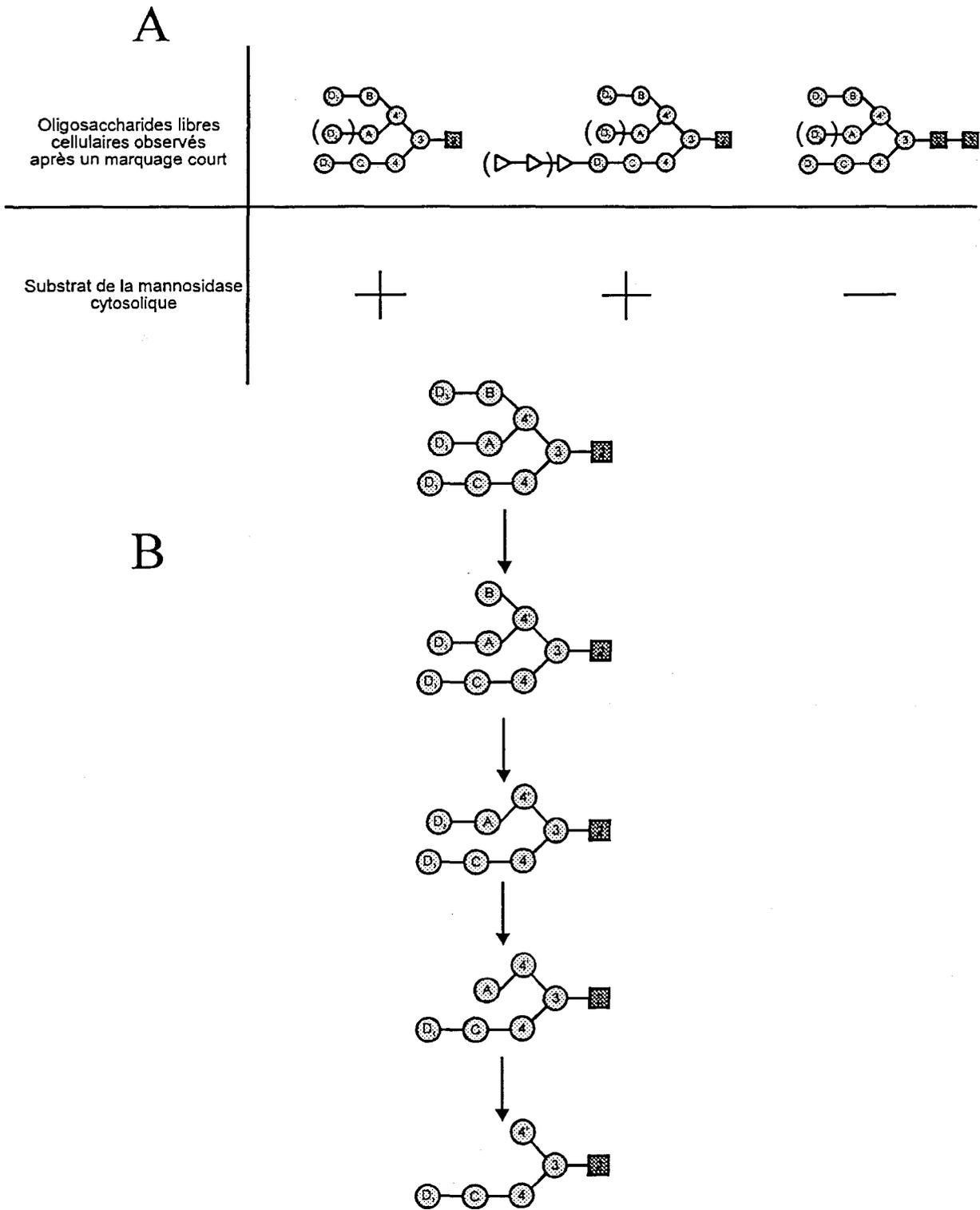


Figure 8

(A) Substrats possibles de la mannosidase cytosolique
et présents dans la cellule

(B) Schéma de dégradation du Man₉GlcNAc₁
par la mannosidase cytosolique

manganèse (Shoup et Touster, 1976; Oku et Hase, 1991; Haeuw *et al.*, 1991; Grard *et al.*, 1994; Weng et Spiro, 1996). Sa masse moléculaire est d'environ 110 kDa et semble active sous forme monomérique (Grard *et al.*, 1994) ou tétramérique (Shoup et Touster, 1976). Des résultats récents établissent une relation entre la mannosidase cytosolique et la mannosidase II du *reticulum* endoplasmique (chapitre 1.2.1; Weng et Spiro, 1996). Les analogies sont basées sur une sensibilité identique à différents inhibiteurs: les deux enzymes sont résistantes à la kifunensine, sensible à une concentration de 100 μ M de swainsonine et de didésoxyiminomannitol, alors que la mannosidase I du *reticulum* endoplasmique est sensible à la kifunensine, résistante à la swainsonine. L'hydrolyse des OSGN1 est préférentielle par la mannosidase cytosolique et la mannosidase II du *reticulum* endoplasmique. L'enzyme cytosolique fournit le $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_1$, et l'enzyme du *reticulum* endoplasmique produit l'isomère C du $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_1$. L'addition de cobalt dans le milieu d'incubation accélère la transformation du $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_1$ en $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_1$ par la mannosidase cytosolique, mais n'a aucun effet sur la conversion $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_1$ en $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_1$ par la mannosidase II. La synthèse d'anticorps dirigés contre la partie N-terminale et d'anticorps dirigés contre la partie C-terminale de la mannosidase cytosolique apporte une hypothèse particulièrement intéressante dans la relation entre ces deux mannosidases. En effet, la mannosidase II du *reticulum* endoplasmique est reconnue par les anticorps dirigés contre la partie C-terminale mais pas par ceux dirigés contre la partie N-terminale. L'ensemble de ces observations suppose que i) c'est la mannosidase cytosolique (110 kDa) qui produit la mannosidase II du *reticulum* endoplasmique (82 kDa) après une coupure protéolytique, ii) la translocation dans *reticulum* endoplasmique est post-traductionnelle (en accord avec l'absence de séquence-signal déjà observée), iii) la coupure protéolytique du côté N-terminal conduit à la perte de l'activation par le cobalt sans doute couplée à la perte de la capacité de conversion $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_1$ - $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_1$. Cette observation pourrait être rapprochée des résultats obtenus sur le transport de la mannosidase de la levure du compartiment cytosolique vers la vacuole (voir partie suivante).

3.5.2.3. Conclusion

La voie suivie par les oligosaccharides libres est en partie élucidée et peut être résumée ainsi: les oligosaccharides libres formés dans le *reticulum* endoplasmique sont directement transportés dans le compartiment cytosolique où ils sont séquentiellement élagués par une

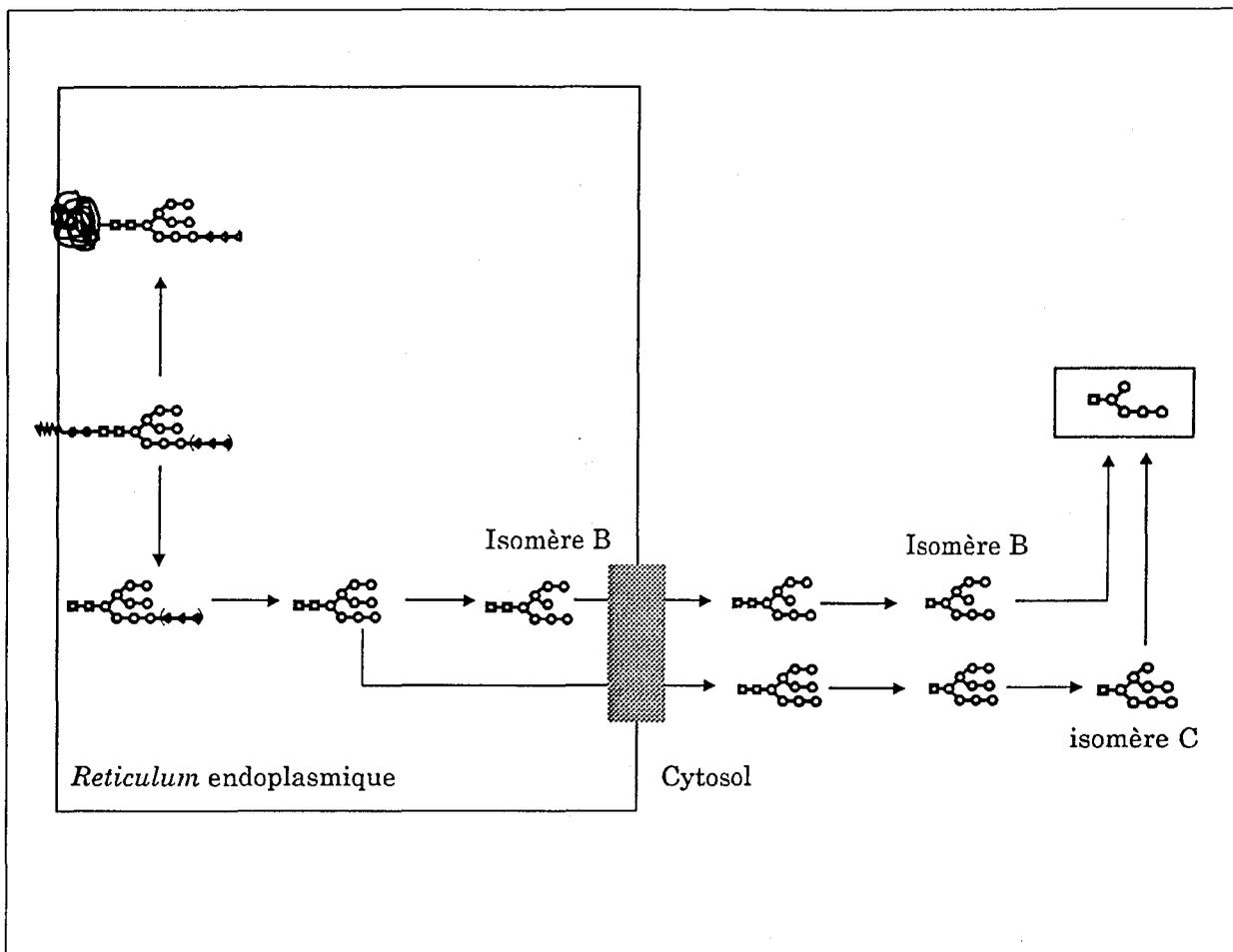


Figure 9

Production et transport des oligosaccharides neutres
(Voie établie sur la lignée HepG2)

endoglucosaminidase et une mannosidase. Le produit limite obtenu est un oligosaccharide renfermant 5 résidus de mannose et un résidu de N-acétylglucosamine pour former la structure $\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3)[\text{Man}(\alpha 1-6)]\text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$.

Parce que ces oligosaccharides libres ne s'accumulent pas dans le cytosol, parce qu'ils ne sont pas retrouvés dans le milieu extérieur dans des conditions physiologiques normales, nous avons supposé qu'ils étaient dégradés. Le compartiment lysosomique est le compartiment cellulaire majeur impliqué dans la dégradation des macromolécules d'origine endogène et exogène. Nous avons donc envisagé une dégradation des oligosaccharides libres cytosoliques dans le compartiment lysosomique, ce qui présageait d'un transport cytosol-lysosome.

Dans la seconde partie de l'introduction, seront rappelées les voies de communication et d'échanges du compartiment lysosomique avec les autres compartiments cellulaires.

4. Les lysosomes sont des organites acides.

4.1. Définition des lysosomes

Les lysosomes ont été caractérisés initialement par des expériences biochimiques, contrairement à la plupart des autres organites mis en évidence sur des observations morphologiques. De Duve *et al.* (1963), suivaient l'activité phosphatase acide; les expériences effectuées révélaient un phénomène de latence de l'activité enzymatique, phénomène levé après addition d'agent solubilisant les membranes, d'où l'hypothèse de structures vésiculaires contenant cette hydrolase acide. Des coupes de tissus fixées au glutaraldéhyde, incubées à pH 5,0 dans un milieu contenant du β -glycérophosphate et du nitrate de plomb révélaient au niveau de l'activité phosphatase acide des précipités de phosphate de plomb diffusant fortement les électrons, et ainsi caractérisant les lysosomes en microscopie électronique. La difficulté d'identification des lysosomes par microscopie reflète l'hétérogénéité de ces organites, hétérogénéité due à leur taille, à la variation de leur contenu en matériel à dégrader. En 1963, de Duve définit les lysosomes comme des vacuoles denses contenant différentes hydrolases acides et responsables de la dégradation de macromolécules endogènes ou exogènes.

Nous savons maintenant que les endosomes tardifs peuvent aussi contenir des hydrolases acides et dégrader certains composés (Authier *et al.*, 1994). Toutefois, nous pouvons souligner que les lysosomes sont la destination finale d'une part importante de macromolécules endogènes ou exogènes destinées à être dégradées, mais aussi des enzymes et protéines lysosomiques nouvellement synthétisées (Kornfeld et Mellman, 1989). C'est pourquoi, **le lysosome peut être défini comme le compartiment final de destination et dégradation de macromolécules d'origines exogène et endogène** (Kornfeld et Mellman, 1989).

4.2. Organisation générale de la voie d'endocytose

Les substrats exogènes digérés à l'intérieur de la cellule par les hydrolases lysosomiques pénètrent dans la cellule par un mécanisme d'endocytose. L'hétérophagie correspond à l'ensemble du processus par lequel les molécules d'origine extracellulaire sont internalisées

puis digérées. L'hétérophagie recouvre la voie d'endocytose, elles sont généralement assimilées.

Les travaux de Strauss (1964) ont établi pour la première fois le passage des protéines internalisées à travers des vacuoles prélysosomiques, avant d'atteindre le compartiment lysosomique pour y être complètement dégradées. Il a administré à des rats de la peroxydase de raifort (HRP) par voie intraveineuse, puis a suivi l'enzyme par la réaction au bleu de benzidine, les lysosomes étaient révélés par la coloration au rouge de phénol (Strauss, 1964, Helenius, 1983). La peroxydase était localisée dans un premier temps dans des vacuoles différentes de celles contenant le rouge de phénol. Après des temps de chasse plus longs, les compartiments lysosomiques étaient les seuls compartiments colorés, ils prenaient une coloration pourpre, témoignant de la présence de la peroxydase et du colorant. Ces compartiments prélysosomiques ont été dénommés les endosomes (Helenius, 1983).

Les premières études sur la distribution cellulaire et la morphologie des endosomes se sont effectuées par microscopie électronique ou de fluorescence, après une brève endocytose de marqueurs. Ainsi, les premiers compartiments marqués ont été appelés endosomes précoces. Ils sont localisés près de la membrane plasmique et forment des réseaux tubulovésiculaires. La deuxième population d'endosomes marqués, les endosomes tardifs, est souvent concentrée dans la région périnucléaire; ils sont plus grands et plus sphériques que la première population et contiennent des inclusions membranaires (« multivesicular bodies ») (Courtoy, 1991). Les lysosomes sont les derniers compartiments marqués. Comme écrit ci-dessus, ils sont difficilement caractérisés morphologiquement, leur nombre et leur taille sont très variables selon le type cellulaire. Toutefois, ils représentent 4 à 5% du volume cellulaire d'un hépatocyte et ont environ 200 copies par cellule (Luiken *et al.*, 1996).

La voie d'endocytose se révèle très complexe dans son organisation et les voies de communications entre les endosomes précoces et tardifs ne sont pas totalement clarifiées. L'étude de la voie d'endocytose peut être corrélée à l'étude du transport de certaines macromolécules. En effet, celles-ci sont utilisées comme marqueurs et traceurs des différents organites. Par exemple, le complexe transferrine-récepteur de la transferrine marque les endosomes précoces et les endosomes de recyclage, alors le récepteur du mannose 6-P indique les endosomes précoces et tardifs mais est absent des lysosomes.

4.3. L'acidification des lysosomes.

Les macromolécules endocytées sont dans un environnement de plus en plus acide des puits de clathrine jusqu'aux lysosomes. Les lysosomes sont en effet les organites les plus acides de la cellule, ils ont un pH intraluminal variant de 4,5 à 5,5 selon les types cellulaires, tandis que les endosomes précoces ont un pH de 6,2-6,3 et les endosomes tardifs, un pH variant de 5,2 à 6,2 (Mellman *et al.*, 1986; Maxfield et Yamashiro, 1991).

4.3.1. Une ATPase est responsable de l'acidification.

L'acidification des organites est assurée par une ATPase de la famille des ATPases vacuolaires (ou V-ATPase, Mellman *et al.*, 1986). Cette acidification ATP-dépendante a été montrée sur des lysosomes isolés dans lesquels la dégradation de l'albumine ne pouvait être observée qu'après addition de ATP. Une préparation de membranes lysosomiques capables d'acidification en présence de ATP infirmaient l'hypothèse d'un équilibre de Donnan entre le cytosol et le lysosome (Schneider, 1981).

4.3.1.1. L'ATPase vacuolaire.

Les ATPases vacuolaires sont des complexes multimériques dont la masse moléculaire est comprise entre 400 et 500 kDa, ce sont des enzymes très conservées au cours de l'évolution. L'ATPase lysosomique du foie de Rat est composée de polypeptides de masse 72, 57, 41, 34, 33, 20 et 17 kDa avec un rapport stoechiométrique de 3/3/1/1/1/1/6 (Moriyama et Nelson, 1989). Il semble que les sous-unités d'environ 70 et 60 kDa soient impliquées dans la catalyse et la régulation de la fixation de l'ATP (Moriyama et Nelson, 1989; Kliensky *et al.*, 1990). Les sous-unités de 20 et 17 kDa sont insérées dans la membrane lysosomique et forment le canal à proton. Il est intéressant de noter que le domaine cytosolique (c'est à dire les sous-unités de 72, 57, 41, 34, 33 kDa) est probablement synthétisé dans le cytosol alors que la synthèse du domaine transmembranaire s'effectue via la voie « réticulaire » (Kliensky *et al.*, 1990); le mécanisme d'assemblage n'est pas encore connu.

4.3.1.2. Régulation du pH intraluminal.

L'ATPase vacuolaire est présente sur la membrane des vésicules recouvertes de clathrine, des endosomes précoces et tardifs, des lysosomes, de l'appareil de Golgi et sur la membrane plasmique de certaines cellules spécialisées (Mellman *et al.*, 1986; Wang et Gluck, 1990). Le pH intraluminal est pourtant différent dans les organites cités, plusieurs hypothèses

ont été émises pour expliquer la régulation du pH. i) Le pH pourrait être modulé par des isoformes de l'ATPase (Wang et Gluck, 1990; Vandyke, 1993). Toutefois, si la présence d'isoformes est montrée d'un type cellulaire à l'autre, elle n'est pas clairement établie au niveau des différents organites d'une cellule donnée (Wang et Gluck, 1990). ii) Le nombre d'ATPases par organite, associé à un rapport surface/volume variant pourrait aussi moduler le pH (van Dyke, 1993; Mellman, 1986). iii) Des différences de perméabilité et donc l'environnement pourrait aussi intervenir. La pompe à proton est électrogénique c'est à dire qu'elle génère un flux net de proton, créant de la même façon un potentiel de membrane. L'entrée d'anions tels les ions Cl^- ou la sortie de cations tels les ions K^+ font varier le potentiel de membrane et le pH. Les endosomes et les lysosomes du foie de Rat ont une perméabilité différente aux ions Cl^- et K^+ , définissant une acidification qualitativement similaire mais quantitativement différente (van Dyke, 1993).

4.3.2. Conséquences de l'acidification sur la voie d'endocytose et sur les fonctions des lysosomes.

L'effet de l'acidification a été largement étudié après neutralisation du pH intraluminal soit en i) dissipant le gradient de proton par l'utilisation de bases faibles telles la chloroquine, le NH_4Cl ou d'ionophores tels la monensine et la nigéricine (Mellman, 1986; Klionsky *et al.*, 1990; Maxfield et Yamashiro, 1991). ii) en inhibant spécifiquement l'ATPase vacuolaire par la bafilomycine A1 (Bowman *et al.*, 1988) et la concanamycine A ou B (Woo *et al.*, 1992). iii) en mutant l'ATPase de la levure (Klionsky *et al.*, 1990).

4.3.2.1. Les lysosomes sont fonctionnels à pH acide.

L'addition de bases faibles augmente le pH intraluminal entraînant une inhibition des hydrolases acides, arrêtant ainsi la dégradation des macromolécules (Mellman *et al.*, 1986). De plus, dans ces conditions les enzymes lysosomiques nouvellement synthétisées ne sont pas transportées jusqu'aux lysosomes. i) Un pH d'environ 6,3 est nécessaire pour la dissociation du récepteur de 46 kDa et de son ligand et un pH inférieur à 6,0 pour la dissociation du récepteur du mannose 6-P de 215 kDa et de son ligand (Hoflack *et al.*, 1987; Maxfield et Yamashiro, 1991). ii) Une sécrétion partielle des précurseurs des hydrolases a été observée après addition de NH_4Cl ou de chloroquine dans les fibroblastes (Gonzales-Noriega *et al.*, 1980) et les macrophages (Imort *et al.*, 1983) ou après addition de bafilomycine A₁ dans les levures et les hépatocytes (Klionsky *et al.*, 1990; Oda *et al.*, 1991).

4.3.2.2. Effet du pH sur le recyclage des récepteurs et le devenir des complexes ligand-récepteur.

Les conséquences de l'utilisation de bases faibles sont très variables le long de la voie d'endocytose. Par exemple, Stoorvogel *et al.* (1987) observent une accumulation intracellulaire totale du récepteur de la transferrine après traitement par la chloroquine sur les cellules HepG2, alors que 50 % des récepteurs seraient recyclés dans les cellules K562 (van Weert *et al.*, 1995, voir discussion). Ces variations ont été associées aux différents types cellulaires et à des effets « secondaires » de la chloroquine (ou autres bases faibles). C'est sans doute pourquoi, les études récentes sur l'acidification de la voie d'endocytose reposent sur l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de l'ATPase vacuolaire, la bafilomycine A₁ et la concanamycine A, de structure très proche. L'addition de la bafilomycine A₁ aux cellules HepG2 montre finalement que l'augmentation du pH ralentit l'endocytose et le recyclage du récepteur de la transferrine mais ne l'inhibe pas (van Weert *et al.*, 1995).

L'utilisation de ces composés a permis de montrer que l'environnement acide des endosomes favorisait la dissociation des récepteurs et de leurs ligands. C'est le cas par exemple du récepteur des LDL et des récepteurs des asialoglycoprotéines. La dissociation du fer et de la transferrine couplée à son récepteur, la fusion de la toxine diphtérique ou de virus avec la membrane endosomique sont aussi dépendants de l'acidification des endosomes (Maxfield et Yamashiro, 1991).

4.3.2.3. Le trafic endosomique est dépendant du pH des endosomes-lysosomes.

Des données récentes suggèrent qu'une perturbation du pH intraluminal n'affecte pas seulement les mécanismes de dissociation récepteur-ligand mais aussi perturbe le trafic et les communications entre les organites. Van Deurs *et al.*, (1996) suivent le trajet de particules d'or cationisées le long de la voie d'endocytose sur les cellules Hep2 traitées ou non avec 2 μ M de bafilomycine A₁. Une endocytose de sérum albumine bovine (SAB) suivie d'un traitement avec la bafilomycine puis, de l'endocytose de particules d'or réduit la colocalisation dans les lysosomes de la SAB et des particules d'or en comparaison avec les cellules contrôles. Van Deurs *et al.* (1996) concluent à un défaut de fusion entre les endosomes et les lysosomes.

Van Weert *et al.*, (1995) ont fait des observations similaires sur les cellules HepG2. Par des expériences de cytochimie, ils montrent que la bafilomycine n'empêche pas le « tri » du récepteur du Man-6-P endocyté et celui de la transferrine, mais le retarde d'environ 10 minutes

(il faut 45 minutes pour une séparation complète). La bafilomycine n'affecte pas non plus la colocalisation de la peroxydase de raifort (endocytée) et du récepteur du Man-6-P après des temps plus longs d'incubation, indiquant l'accessibilité des endosomes tardifs. Ainsi, la bafilomycine A1 n'empêche ni le recyclage du récepteur de la transferrine (van Weert *et al.*, 1995), ni le passage des endosomes précoces aux endosomes tardifs. Par contre, lors d'expériences de pulse-chasse longues (15 minutes + 2 heures) avec la peroxydase de raifort utilisée comme marqueur, la bafilomycine provoque une accumulation de l'enzyme dans les endosomes, accumulation observée après fractionnement cellulaire. Ainsi, l'inhibition de l'ATPase vacuolaire prévient les communications endosome-lysosome, « isolant » les lysosomes dans la cellule. Notons que le trajet endosome-réseau trans-Golgien n'est pas perturbé par la bafilomycine.

Ces résultats sont en contradiction avec les observations de Clague *et al.* (1994) faites sur la lignée cellulaire BHK traitée ou non par la bafilomycine A₁. Des expériences de pulse-chasse en présence de particules d'or cationisées (12+15 minutes) suivies de l'endocytose de la peroxydase de raifort montrent que toutes les particules d'or cationisées restent accessibles à la peroxydase de raifort au niveau des endosomes précoces, dans les cellules traitées avec la bafilomycine, contre 50% dans les cellules contrôles. La bafilomycine empêcherait le transport des endosomes précoces aux endosomes tardifs dans les cellules BHK.

Le maintien d'un pH bas est nécessaire pour le transport et les événements de fusion le long de la voie d'endocytose. L'une des conséquences de l'inhibition de l'acidification serait « d'isoler » les lysosomes dans la cellule.

5. Transports jusqu'aux lysosomes par voie vésiculaire

Les macromolécules destinées à être dégradées dans les lysosomes peuvent y accéder par deux voies vésiculaires : **l'autophagie et l'hétérophagie**. Les **protéines lysosomiques** sont synthétisées dans le *reticulum* endoplasmique, puis transportées jusqu'à l'appareil de Golgi. C'est à ce niveau que le signal de reconnaissance glucidique (le mannose 6-phosphate) est attribué aux enzymes solubles, et définira le transport jusqu'au système endosomique puis aux

lysosomes. Toutes les protéines lysosomiques ne sont pas adressées aux lysosomes par le biais de ce signal, c'est le cas des protéines de la membrane lysosomique.

5.1. Transport des protéines de la membrane lysosomique.

5.1.1. Les protéines majoritaires sont bien décrites.

Les protéines majoritaires de la membrane lysosomique sont classées en 3 groupes, suivant leur masse moléculaire : les protéines de 100-120 kDa, de 70-80 kDa, et de 30-54 kDa. Les protéines du premier groupe (100-120 kDa) représentent 50% des protéines de la membrane lysosomique, les lgp (pour « lysosomal glycoprotein ») ou lamp (pour « lysosomal associated membrane protein ») sont sous-divisées en lamp-1 et lamp-2 (ou lgp A et lgp B). Ces protéines ont une organisation structurale similaire : ce sont des glycoprotéines de type I (un seul segment transmembranaire) dont la partie luminale (380-396 acides aminés) est constituée de 2 domaines séparés par une région riche en proline, sérine ou thréonine. Chaque domaine renferme 4 résidus de cystéine formant des ponts disulfures (Kornfeld et Mellman, 1989; Fukuda, 1991; Nabi, 1993). La queue cytoplasmique (11 acides aminés) renferme un motif Gly-Tyr-X-Y où Y est un acide aminé hydrophobe nécessaire au ciblage des protéines (Nabi, 1993). Les données sur les protéines lamp-3 et LIMP II, moins connues sont rassemblées dans le tableau 2. Toutes les protéines de la membrane lysosomique sont caractérisées par un taux très important de glycosylation. Les glycanes liés N-glycosidiquement possèdent au moins une chaîne de type N-acétyllactosaminique, et sont sialylés, ce qui confère aux protéines un pH_i acide et une part importante des glycanes dans le poids moléculaire des protéines. Les protéines lamp-1 et lamp-2 sont très conservées au cours de l'évolution; les protéines lamp-1 et lamp-2 d'une même espèce présentent moins d'homologie de séquence entre elles que deux protéines lamp-1 (ou lamp-2) de deux espèces différentes (Granger *et al.*, 1990).

Les fortes concentrations en protéines membranaires lysosomiques ont suggéré 2 fonctions: i) le segment cytoplasmique, recouvrant les lysosomes, pourrait servir de marqueur ou signal pour des interactions avec d'autres organites ou des protéines; ii) le domaine intraluminal pourrait constituer une matrice protégeant les lysosomes d'autodégradation.

L'ATPase vacuolaire et l'acide phosphatase (APL) sont les seules protéines membranaires dont le rôle et la structure sont connues (Moriyama et Nelson, 1989; Kornfeld et Mellman, 1989). L'APL est synthétisée sous forme de précurseur membranaire glycosylé de 67

kDa, le segment cytoplasmique renferme la séquence Gly-Tyr-X-Y responsable du ciblage au lysosome (Kornfeld et Mellman, 1989; Nabi, 1993). Dans le lysosome, deux coupures protéolytiques solubilisent l'APL.

	lamp-1	lamp-2	lamp-3	Limp II
Homme	hlamp-1	hlamp-2	CD63 ME491	
Rat	LIMP III lgp120	LIMP IV lgp110	LIMP I	lgp85
Souris	mLAMP-1	mLAMP-2		
Poulet	LEP100			
Masse moléculaire (kDa)	90-120	95-120	30-55	60-85
Nombre de copies/cellule ($\times 10^{-4}$)	30-60	20-60	<20	<20
Nombre de glycanes liés N-glycosidiquement	17-20	16-17	3	jusqu'à 11
Nombre de glycanes liés O-glycosidiquement	+	+	?	?
Pourcentage de glycanes	55-65	55-65	25-55	20-45
Dipeptide Gly-Tyr (queue cytoplasmique)	oui	oui	oui	motif Leu-Ile

Tableau 2 : Nomenclature et propriétés des protéines majeures de la membrane lysosomique, d'après Fukuda (1991) .

5.1.2. Les protéines de la membrane peuvent suivre deux voies pour atteindre les lysosomes.

Les protéines de la membrane lysosomique (lgps) sont synthétisées au niveau du *reticulum* endoplasmique, elles acquièrent les structures N-acétyllactosaminique des chaînes glycaniques au niveau de l'appareil de Golgi avant d'être destinées aux lysosomes. Deux voies sont possibles, i) les lgps sont adressées à la membrane plasmique, puis réinternalisées et destinées aux lysosomes via la voie d'endocytose. ii) les lgps sont directement transportées aux endosomes, puis aux lysosomes (figure 10) (Kornfeld et Mellman, 1989). Les données acquises n'ont pu établir un trajet unique, elles suggèrent que les protéines suivent l'une ou l'autre des voies mais dans un type cellulaire et pour une lgp donnés, une seule voie semble être utilisée (Kornfeld et Mellman, 1989; Fukuda, 1991). Par exemple, i) les cinétiques de transport de l'acide phosphatase sont différentes dans les hépatocytes de Rat et les cellules BHK transfectées, indiquant deux trajets différents (Kornfeld et Mellman, 1989; Nabi, 1993). ii) Une technique d'immunoprécipitation de surface permet de détecter 70% des protéines lamp-2

nouvellement synthétisées sur la membrane plasmique des cellules MDCK (Nabi, 1993), alors que le transport des lamp-1 est direct via les endosomes dans les mêmes cellules et dans les cellules HL-60 (Carlsson et Fukuda, 1992; Höning et Hunziker, 1995).

L'importance du segment cytoplasmique dans le ciblage est déterminée. i) Le segment cytoplasmique est nécessaire et suffisant pour cibler les lgps aux lysosomes. Des protéines chimériques composées de l'ectodomaine et du segment transmembranaire de protéines non lysosomiques, et du segment cytoplasmique de lamp-1 sont directement transportées jusqu'aux lysosomes (Höning et Hunziker, 1995). C'est la séquence Gly-Tyr-X-Ile qui se révèle primordiale ainsi que son emplacement dans le segment cytoplasmique (Höning et Hunziker, 1995; Rohrer *et al.*, 1996).

Le ciblage des protéines de la membrane lysosomique repose sur plusieurs étapes clefs dépendantes d'un signal porté par le segment cytoplasmique. La séquence de ce signal est très conservée, même s'il existe des variations sur la nature des acides aminés en position terminale (Kornfeld et Mellman, 1989) et sur les voies de transport des lgps.

5.2. Transport des hydrolases lysosomiques.

Les structures N-glycaniques des enzymes lysosomiques solubles renferment un ou deux résidus de Man 6-P, composant un signal glucidique pour le ciblage jusqu'aux lysosomes (Kornfeld et Mellman, 1989). Ces résidus de Man 6-P sont en effet reconnus par deux récepteurs lectiniques situés au niveau du réseau trans-Golgien (Kornfeld et Mellman, 1989). Les hydrolases destinées aux lysosomes sont donc prises en charge par ces récepteurs qui les transportent jusqu'à la voie d'endocytose, avant qu'elles soient délivrées aux lysosomes.

5.2.1. Les hydrolases lysosomiques sont modifiées et échappent à la sécrétion

L'absence de caractérisation de déterminants sur les glycoprotéines de sécrétion participe à l'idée d'un « flux en masse » et d'une voie de sécrétion par défaut. Au contraire, les hydrolases lysosomiques acquièrent dès leur sortie du *reticulum* endoplasmique un signal qui i) les discriminera des protéines de sécrétion et ii) permettra leur transport jusqu'au compartiment lysosomique (Kornfeld et Mellman, 1989).

Dans un premier temps, une enzyme la N-acétylglucosamine-1-phosphotransférase reconnaît un ensemble de résidus de lysine organisé en structure tridimensionnelle porté par les protéines destinées aux lysosomes (Baranski *et al.*, 1991). Cette enzyme est alors chargée de

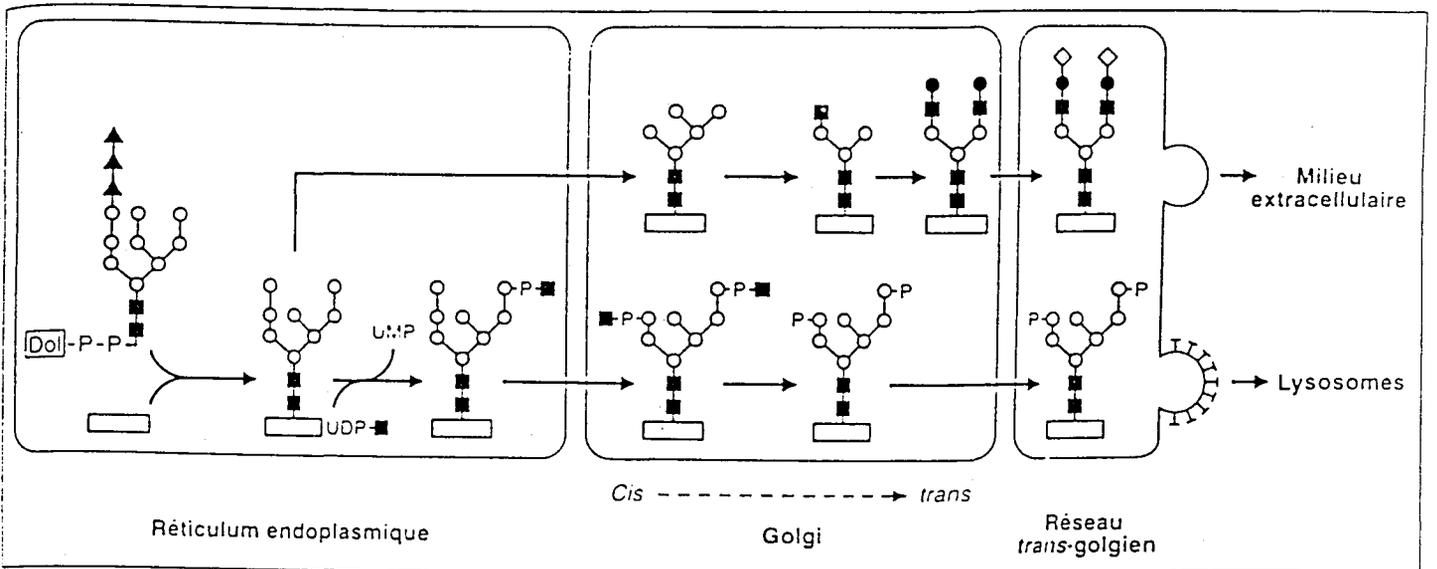


Figure 10

Glycosylation des enzymes lysosomiques et des protéines de sécrétion
Acquisition du signal Man 6-P par l'action de la phosphotransférase et
la N-acétylglucosaminidase respectivement

(Meresse et al. (1990) *Médecine/Sciences*, 9, 148-156)

(■), GlcNAc ; (O), Man ; (▲), Glc ; (●), Gal ; (◇), NeuAc.

transférer à partir de l'UDP-GlcNAc un résidu de GlcNAc-1-P en 2 sur un résidu de mannose lié en 1-6 de la branche en 6 de l'oligomannoside (figure 11). Ce premier transfert débute 10 à 15 minutes après le début de la synthèse des glycoprotéines, et est probablement effectué dans le compartiment intermédiaire (Kornfeld et Mellman, 1989). Le transfert d'un second résidu de GlcNAc-1-P est possible et se déroule vraisemblablement au niveau du *cis*-Golgi après l'intervention de la mannosidase I qui libère le mannose situé à l'extrémité terminale non réductrice de la branche en 3 (figure 11). Dans un second temps, la N-acétylglucosamine-1-phosphodiester- α -N-acétylglucosaminidase de l'appareil de Golgi hydrolyse les résidus de GlcNAc et laisse ainsi apparaître les résidus de phosphomonoester (Man-6-P) (Kornfeld et Mellman, 1989).

Deux récepteurs situés au niveau du réseau trans-Golgien reconnaissent les résidus de Man-6-P (Kornfeld et Mellman, 1989; Kornfeld, 1992). Ceux-ci participent à la séquestration du complexe récepteur-ligand dans des vésicules recouvertes de clathrine, vésicules destinées aux compartiments endosomiques. Les enzymes lysosomiques rejoindront seules le compartiment lysosomique.

5.2.2. Les récepteurs du mannose 6-phosphate

Les deux récepteurs lectiniques sont dénommés RMP-CD et RMP-CI, le premier est cation-dépendant, la fixation du ligand requiert la présence d'ions manganèse, tandis que le second est cation-indépendant.

Le récepteur du mannose 6-phosphate cation indépendant (RMP-CI) est une glycoprotéine de masse moléculaire de 275-300 kDa. La partie luminale est composée de 15 domaines homologues de 147 acides aminés chacun environ. C'est une glycoprotéine membranaire de type I puisqu'un seul segment peptidique traverse la membrane. Comme pour les protéines de la membrane lysosomique, c'est le segment cytoplasmique de 163 acides aminés qui possède les signaux d'internalisation à partir de la membrane plasmique et de transport à partir du réseau trans-Golgien (Kornfeld et Mellman, 1989; Kornfeld, 1992). **Le RMP-CI est aussi le récepteur de l'IGF II (Insulin-like growth factor II)**. Le site de fixation de l'IGF II et celui des enzymes lysosomiques diffèrent, et les deux substrats ne peuvent pas se fixer en même temps sur le récepteur (Kornfeld, 1992). Le rôle précis de l'interaction IGF II-RMP-CI n'est pas encore élucidé. i) L'interaction est envisagée pour la clearance plasmatique de l'IGF II. ii) Le RMP-CI pourrait intervenir en tant que signal de

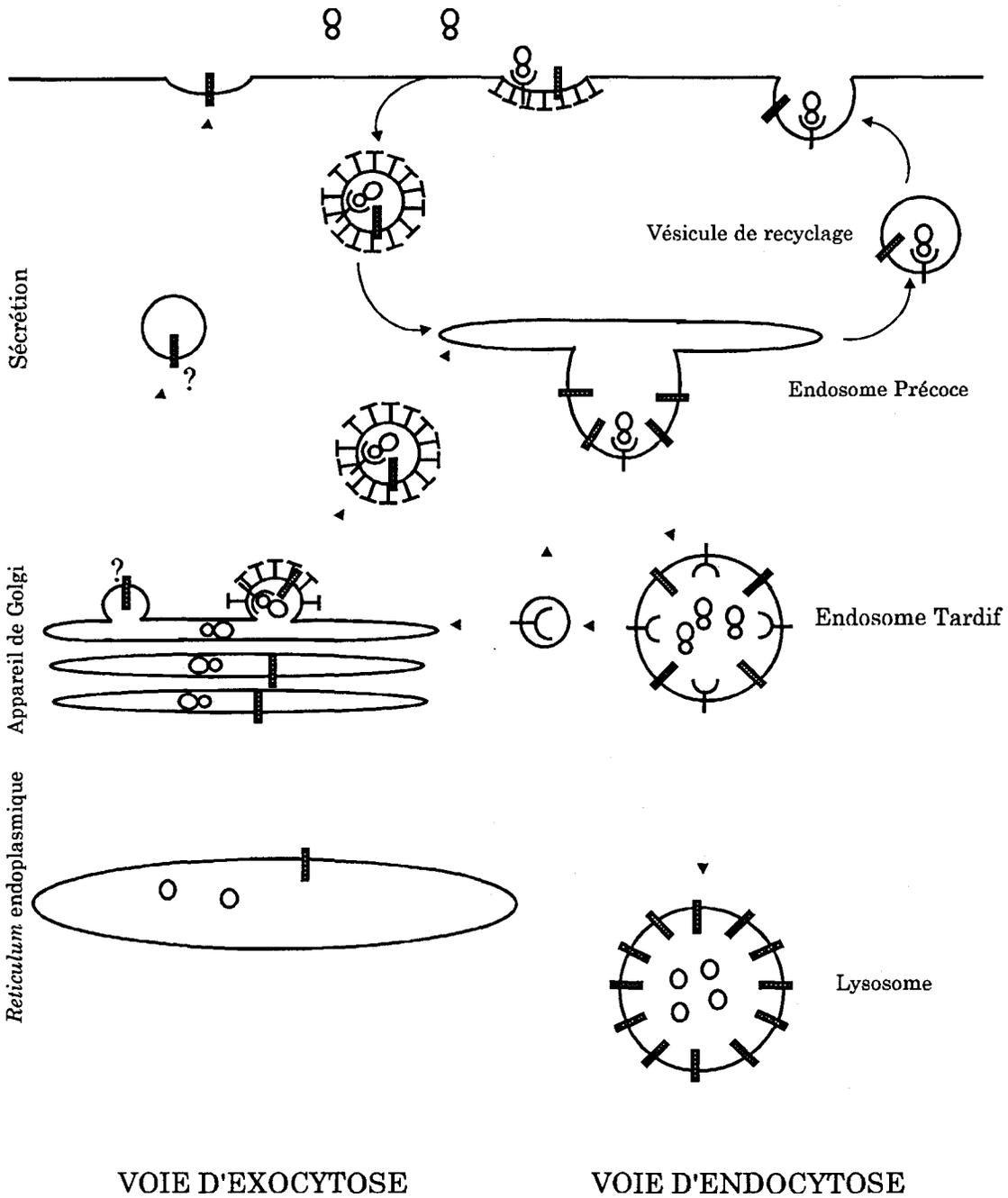


Figure 10: Représentation schématique du transport des hydrolases lysosomique et des protéines de la membrane lysosomique

○ hydrolase

▬ protéine de la membrane lysosomique

⊗ hydrolase phosphorylée sur le(s) mannose(s)

—C— récepteur du mannose 6-P

transduction mais cette hypothèse semble très sujette à controverse (Ludwig *et al.*, 1995). iii) Dans les cellules qui synthétisent l'IGF II, la compétition de l'IGF II et des hydrolases nouvellement synthétisées pour le récepteur est envisagée au niveau de l'appareil de Golgi, ainsi que la sécrétion accrue d'enzymes lysosomiques, conduisant à la dégradation locale de la matrice extracellulaire (Kornfeld, 1992).

Le récepteur du mannose 6-phosphate cation dépendant (RMP-CD) est une glycoprotéine de masse moléculaire de 46 kDa (Hoflack et Kornfeld, 1985). La partie luminale est constituée d'un seul domaine dont la séquence est comparable à celle observée dans les différents domaines du RMP-CI (Kornfeld, 1992). Le segment transmembranaire unique et la queue cytoplasmique ne partagent par contre pas d'identité avec le RMP-CI (Kornfeld et Mellman, 1989; Kornfeld, 1992).

Les affinités et l'organisation des deux récepteurs diffèrent. Le RMP-CD semble s'organiser en dimère voire en tétramère, alors que le RMP-CI reste monomérique (Kornfeld et Mellman, 1989; Kornfeld, 1992). Deux domaines du RMP-CI sont impliqués dans la fixation de 2 résidus de mannose 6-P, le récepteur peut ainsi reconnaître les oligosaccharides diphosphorylés (Kornfeld et Mellman, 1989; Ludwig *et al.*, 1995). Au contraire, le RMP-CD interagit faiblement avec les oligosaccharides diphosphorylés : un monomère ne fixe qu'un résidu de mannose 6-P, et dans l'organisation dimérique, les sites de fixation pourraient être trop éloignés pour interagir avec 2 résidus de mannose 6-P d'un même oligosaccharide. Toutefois, ceci n'exclut pas l'interaction de 2 résidus de mannose 6-P portés par deux oligosaccharides différents (Kornfeld, 1992).

5.2.3. Fonctions des récepteurs du mannose 6-P dans le ciblage des hydrolases lysosomiques

les récepteurs du mannose 6-P sont continuellement recyclés entre la membrane plasmique, le TGN et les endosomes. Par exemple, quand des anticorps dirigés contre le domaine extracytoplasmique sont internalisés, les endosomes comme le TGN sont accessibles aux complexes récepteurs-anticorps. Les mêmes résultats sont obtenus en utilisant d'autres techniques et soulignent que les récepteurs du mannose 6-P ne rejoignent pas le compartiment lysosomique (Kornfeld et Mellman, 1989; Kornfeld, 1992). A l'état d'équilibre, les récepteurs sont répartis différemment entre ces organites. Par exemple, 90% des récepteurs du mannose 6-P sont localisés au niveau d'un compartiment prélysosomique identifié comme l'endosome tardif dans les cellules NRK (Griffiths *et al.*, 1988; 1990).

Les **différentes étapes du transport des enzymes lysosomiques** peuvent être résumées ainsi: les hydrolases ayant acquis leur signal glucidique pendant leur passage dans l'appareil de Golgi, sont prises en charge par les récepteurs du mannose 6-P localisés au niveau du réseau trans-Golgien (Kornfeld et Mellman, 1989; Kornfeld, 1992). Les complexes ligand-récepteurs formés sont concentrés dans des puits recouverts de clathrine, avant de bourgeonner (Ludwig *et al.*, 1991). Les vésicules renfermant les hydrolases acides vont ensuite rejoindre le système endosomique, les endosomes précoces constituent probablement le premier point d'«entrée» dans la voie d'endocytose. En effet, des études cinétiques sur la convergence de la cathepsine D et de macromolécules endocytées suggèrent que les enzymes lysosomiques sont principalement délivrées aux endosomes précoces (Ludwig *et al.*, 1991). Pourtant, à l'état d'équilibre, la majorité des récepteurs est détectée au niveau des endosomes tardifs (Griffiths *et al.*, 1988; 1990). Cette apparente contradiction peut signifier qu'une fraction des complexes ligand-récepteur est directement transportée jusqu'aux endosomes tardifs, et que les récepteurs s'accumulent dans ces endosomes avant d'être recyclés jusqu'au réseau trans-Golgien (Hille-Rehfeld, 1995).

C'est l'acidité des endosomes et particulièrement celle des endosomes tardifs, qui autorise la dissociation récepteur-ligand (Hoflack *et al.*, 1987; Maxfield et Yamashiro, 1991). En effet, un pH d'environ 6,3 est nécessaire pour la dissociation du récepteur de 46 kDa et de son ligand et un pH inférieur à 6,0 pour la dissociation du récepteur de 215 kDa et de son ligand. Les récepteurs sont ensuite recyclés vers le réseau trans-Golgien tandis que les hydrolases sont dirigées vers le compartiment lysosomique. Il existe très peu de données concernant la dernière étape de transport des hydrolases des endosomes jusqu'aux lysosomes. Tenant compte des résultats de Futter *et al.*, (1996), le départ des récepteurs du mannose 6-P pourrait être suivi de la fusion des endosomes tardifs et des lysosomes. Un récepteur membranaire de 43 kDa reconnaît les propeptides des cathepsines D et L à pH acide (Mac Intyre et Erickson, 1993). Il est retrouvé dans la fraction microsomale, renfermant également la fraction endosomique. Une intervention dans le transport des enzymes lysosomiques après celle des récepteurs du mannose 6-P est spéculée. Les hydrolases sont ensuite modifiées par un ou plusieurs clivages protéolytiques (Lee et Marzella, 1992). Des données récentes établissent la déphosphorylation du mannose 6-P dans un compartiment prélysosomique (Bresciani et von Figura, 1996).

Les deux récepteurs pourraient être impliqués différemment dans le ciblage des hydrolases lysosomiques. Le RMP-CI est le seul capable d'endocyter des enzymes lysosomiques (Kornfeld, 1992). Alors que le RMP-CD est recyclé jusqu'à la membrane plasmique, il est incapable d'endocyter les hydrolases (Hille-Rehfeld, 1995). L'obtention de souris transgéniques déficientes en RMP-CD a récemment établi l'importance de ce récepteur dans le ciblage des enzymes lysosomiques (Ludwig *et al.*, 1993). D'une part, le niveau d'enzymes lysosomiques phosphorylées augmente dans le milieu de culture de fibroblastes de ces souris pendant que le niveau intracellulaire des enzymes lysosomiques diminue. D'autre part, des macromolécules non dégradées s'accumulent dans les endosomes/lysosomes. Ces deux effets s'accroissent lorsque les gènes des deux récepteurs sont interrompus (Ludwig *et al.*, 1994; Pohlman *et al.*, 1995). Il apparaît que l'absence d'un récepteur n'est jamais compensée par la présence de l'autre (Ludwig *et al.*, 1994; Pohlman *et al.*, 1995), même lorsqu'il est surexprimé (Kasper *et al.*, 1996; Munier-Lehmann *et al.*, 1996). L'analyse des enzymes sécrétées par les fibroblastes déficients en RMP-CI ou RMP-CD et en RMP-CI/CD révèle différents types de ligands (Munier-Lehmann *et al.*, 1996). 65% des oligosaccharides présents sur les enzymes sécrétées par les cellules déficientes en RMP-CD renferment un seul phosphate, alors que 50% des oligosaccharides présents sur les enzymes sécrétées par les cellules déficientes en RMP-CI en renferment deux (Munier-Lehmann *et al.*, 1996). Ainsi, l'existence de deux récepteurs pourrait être corrélée à des différences d'affinité des ligands phosphorylés et donc d'efficacité de transport. Même si les deux récepteurs semblent capables de transporter les mêmes enzymes lysosomiques (Kasper *et al.*, 1996; Ludwig *et al.*, 1995; Munier-Lehmann *et al.*, 1996).

5.3. La macroautophagie et l'hétérophagie : deux voies pour rejoindre les lysosomes.

L'hétérophagie est associée au processus par lequel les macromolécules d'origine exogène entrent dans la cellule pour y être dégradées. Les macromolécules d'origine endogène sont destinées aux lysosomes par un processus d'autophagie. Trois voies autophagiques sont décrites : la macroautophagie, la microautophagie et la crinophagie (Lee et Marzella, 1992). La **crinophagie** a été observée dans des cellules spécialisées de type endocrine ou exocrine. Des analyses structurales suggèrent que des lysosomes et des granules de sécrétion matures fusionnent pour induire leur dégradation (Lee et Marzella, 1992). La macroautophagie que

nous décrivons ici est le processus de dégradation des macromolécules endogènes le plus fréquemment rencontré.

5.3.1. La macroautophagie.

5.3.1.1. La macroautophagie : un mécanisme de dégradation non sélectif.

Cette voie autophagique est largement utilisée pour la dégradation de protéines endogènes et par conséquent est observée chez de multiples organismes, tels les levures, les champignons et les organismes supérieurs.

Les données sur ce processus reposaient essentiellement sur des études ultrastructurales avant la mise au point de dosages biochimiques. Ceux-ci sont basés sur la mesure de la séquestration de protéines cytosoliques telle la lactate déshydrogénase (LDH) ou sur la mesure de la séquestration de [³H]raffinose (ou de [¹⁴C] lactose) introduit dans la cellule par électroporation (Seglen et Bohley, 1992). i) Ces expériences ont permis de montrer que la macroautophagie est un processus non sélectif puisque la LDH ou l'ornithine décarboxylase sont séquestrées avec un taux de 4% par heure alors qu'elles ont un temps de demi-vie de 19 heures et 1 heure respectivement. ii) La macroautophagie est inductible, c'est la privation en acides aminés qui est le premier régulateur et inducteur dans les hépatocytes (Mortimore et Kadowaki, 1994), 20 minutes après l'induction le nombre d'autolysosomes augmentent. Il est intéressant de noter que des hépatocytes de rat traités avec des agents carcinogènes ont une activité autophagique réduite (Schwarze et Seglen, 1985), alors qu'une lignée cancéreuse colique humaine, les cellules HT-29 indifférenciées présente une activité autophagique élevée (Houry *et al.*, 1995). iii) La macroautophagie est responsable de la dégradation de la plupart des protéines à demi-vie longue, alors que celles à demi-vie courte sont prises en charge par une ou des voies non lysosomiques.

5.3.1.2. Mécanisme de la macroautophagie

Il existe encore beaucoup d'incertitudes sur le mécanisme de la macroautophagie : incertitude concernant l'origine des membranes impliquées dans la séquestration, incertitude concernant les fusions consécutives. Cependant, elle peut être divisée en plusieurs étapes : la formation de l'autophagosome, la maturation en autophagosome tardif, et en autolysosome.

5.3.1.2.1. La formation de l'autophagosome.

La macroautophagie débute par la séquestration de portions de cytoplasme, incluant le cytosol et certains organites, pour former l'autophagosome. La présence de protéines marqueurs du *reticulum* endoplasmique rugueux sur les membranes des autophagosomes indique une séquestration générée par le *reticulum* (Lee et Marzella, 1992; Dunn, 1994). Toutefois, Seglen et Bohley (1992) nomment le phagophore, un organite spécifique (non caractérisé) comme responsable du mécanisme de séquestration.

Quelque soit le mécanisme et les éléments intervenant, l'étape de séquestration est l'étape limitante de la macroautophagie. Cette étape est régulée par certains acides aminés, principalement le tryptophane et la leucine et, sensible à certains inhibiteurs dont la 3 méthyl-adénine, selon un mécanisme inconnu. La séquestration est ATP-dépendante, le niveau de calcium et la température la modulent (Lee et Marzella, 1992; Mortimore et Kadowaki, 1994). Des données récentes montrent que la séquestration est aussi contrôlée par des GTPases (Kadowaki, 1994) et notamment une protéine G hétérotrimérique (Ogier-Denis *et al.*, 1995; 1996).

5.3.1.2.2. La maturation de l'autophagosome.

L'autophagosome formé après la séquestration évolue en **autophagosome tardif**, par acquisition d'une ATPase vacuolaire et de protéines de la membrane lysosomique (Dunn, 1994). La fusion de l'autophagosome avec des vésicules provenant du réseau trans-Golgien et/ou des endosomes tardifs est encore discutée (Dunn, 1994; Lee et Marzella, 1992). Seglen et Bohley (1992) sont en faveur d'une fusion avec les endosomes tardifs puisque le traitement de cellules avec une forte concentration d'asparagine provoque l'accumulation de [¹⁴C] lactose dans des vésicules accessibles à de la β -galactosidase endocytée, ce compartiment est appelé **amphisome** (correspondant à l'autophagosome tardif).

Existe-t'il un facteur qui détermine si une macromolécule endocytée rejoint directement les lysosomes ou traverse préalablement l'amphisome? Il semble que le taux de macroautophagie et la nature du complexe ligand-récepteur ainsi que le type cellulaire utilisé soient les facteurs déterminants. Dans les hépatocytes, l'invertase comme la β -galactosidase utilisent les deux voies, alors que l'EGF et les asialoglycoprotéines traversent la voie d'endocytose uniquement.

5.3.1.2.3. *La maturation en autolysosome.*

Les autophagosomes tardifs (ou amphisomes) fusionnent avec les lysosomes, pour former les autolysosomes. Comme mentionné ci-dessus, cette étape est inhibée par l'asparagine mais aussi par des agents perturbant le cytosquelette (vinblastine ou cytochalasine). Les lysosomes primaires et secondaires sont impliqués dans la fusion, Dunn (1994) estime que 10 à 30% des autolysosomes sont produits par la fusion avec des endosomes tardifs. Cette dernière étape de fusion conduit à la dégradation des macromolécules présentes par les hydrolases lysosomiques, celle-ci peut être inhibée par un anti-protéase, la leupeptine.

5.3.2. **L'hétérophagie**

Comme défini précédemment, les macromolécules d'origine exogène destinées à être dégradées rejoignent les lysosomes par un processus hétérophagique, souvent assimilé à l'endocytose.

5.3.2.1. *L'entrée dans la cellule.*

Deux voies d'entrée sont distinguées pour la pénétration des macromolécules dans la cellule: la voie clathrine-dépendante et la voie clathrine-indépendante (Robinson *et al.*, 1996).

La voie clathrine-dépendante permet l'internalisation rapide de récepteurs associés à leur ligand. La présence de résidu de tyrosine sur le segment cytoplasmique du récepteur semble conditionner le recrutement de protéines adaptatrices, puis de molécules de clathrine. C'est à partir de ce puits recouvert de clathrine qu'une vésicule d'endocytose se formera, se détachera de la membrane plasmique, perdra son manteau de clathrine avant de fusionner avec d'autres vésicules (van Deurs, 1989). Les ligands particulièrement étudiés tels que la transferrine, le LDL, l'EGF, les asialoglycoprotéines sont internalisés par cette voie. Des modifications du segment cytoplasmique peuvent suivre la fixation du ligand (phosphorylation, ubiquitination, Seaman *et al.*, 1996).

Les données sur **les voies clathrine-indépendantes** sont moins nombreuses. Les cavéoles sont de bonnes candidates pour ce mécanisme. Ce sont des petites invaginations dans la membrane plasmique de 50 à 80 nm de diamètre, observées dans de nombreux types cellulaires (van Deurs, 1989; Robinson *et al.*, 1996). La formation de ces cavéoles serait sous la dépendance d'une protéine assemblée en oligomères, la cavéoline. D'autres voies sont décrites mais elles sont particulières à des cellules spécialisées : la phagocytose des macrophages, la macropinocytose des cellules présentatrices d'antigène sur les molécules du

complexe majeur d'histocompatibilité de classe I ou II (Robinson *et al.*, 1996). Ces voies sont directement impliquées dans l'endocytose en phase fluide; la peroxydase de raifort, des particules d'or cationisées souvent utilisées comme marqueurs entrent ainsi dans la cellule. Il est intéressant de souligner que les cellules endocytent l'équivalent de leur surface cellulaire plusieurs fois par jour. Par exemple, les cellules L 629 endocytent l'équivalent de leur surface toutes les deux heures et les macrophages toutes les demi-heure. Cependant, aucune variation de la taille des cellules n'est observée pendant ce laps de temps; l'endocytose clathrine-indépendante est responsable de ce flux impressionnant de membrane. C'est un recyclage permanent entre les membranes internes et plasmique qui assure le maintien du volume cellulaire (van Deurs *et al.*, 1989).

Existe-t'il un point de rencontre des voies dépendantes et indépendantes de clathrine ?

Bien que les résultats aient été controversés, il est maintenant admis que les molécules endocytées en phase fluide et celles liées à un récepteur se rejoignent au niveau des étapes précoces de l'endocytose (van Deurs *et al.*, 1989).

5.3.2.2. *Quelle est le devenir des complexes ligand-récepteur ?*

Les complexes récepteur-ligand sont internalisés par la voie clathrine-dépendante puis rejoignent les endosomes précoces (ou « sorting » endosomes). Plusieurs trajets ont été observés conduisant à une classification en quatre groupes : **i) le récepteur est recyclé via les vésicules de recyclage, tandis que le ligand est dirigé vers les lysosomes pour y être dégradé.** La ségrégation se fait au niveau des endosomes précoces où le récepteur se concentre au niveau de la région tubulaire alors que le ligand est observé dans la région vésiculaire (Schwartz *et al.*, 1991; Lee et Marzella, 1992). Le trajet du ligand (soluble) est supposé être une voie « par défaut » (van Deurs *et al.*, 1989), le transport endosomes-lysosome n'étant pas exclusif, cette hypothèse est renforcée. En effet, une partie de l'ASGP est recyclée vers la membrane sous forme libre ou complexée et une autre partie peut rejoindre le réseau trans-Golgien (Schwartz *et al.* 1991). Les exemples les mieux connus sont les complexes LDL-LDLR et ASGP-ASGPR. **ii) le complexe récepteur-ligand est recyclé vers la membrane plasmique.** Le complexe transferrine-récepteur de la transferrine suit cette voie; la transferrine ayant fixée deux molécules de fer se lie à son récepteur puis est internalisée. Au niveau des endosomes précoces, le fer est libéré, le complexe apotransferrine-récepteur de la transferrine est recyclé via les endosomes de recyclage (Lee et Marzella, 1992). **iii) Le complexe ligand-récepteur est internalisé, l'ensemble est dirigé vers les lysosomes pour y**

être dégradé. Les complexes EGF-EGFR et PDGF-PDGFR suivent cette voie (Lee et Marzella, 1992). iv) **Le complexe ligand-récepteur est internalisé sur la face apicale de cellules polarisées pour être transporté du côté basolatérale, c'est la transcytose** (Mostov, 1994).

Plusieurs facteurs sont impliqués dans la régulation de ces différents trajets : i) l'acidité des endosomes est le premier facteur considéré. La dissociation récepteur-ligand se déroulant au niveau des endosomes précoces est inhibée lorsque le pH intraluminal est augmenté (Mellman *et al.*, 1986). ii) Les ligands eux-mêmes peuvent jouer un rôle dans le tri endosomique : le complexe IgG-FcR est recyclé vers la membrane plasmique alors que le complexe IgGs (où les IgGs couvrent un support)-FcR est directement transporté aux lysosomes. iii) L'importance attribuée au segment cytoplasmique des récepteurs est grandissante. Le signal tyrosine, indispensable pour l'internalisation via la voie clathrine-dépendante est décrit depuis plusieurs années (Trowbridge *et al.*, 1993). Des résultats récents impliquent la phosphatidyl-inositol 3-kinase dans le trafic suivant l'internalisation. Notamment, des mutations de certains résidus de tyrosine sur le segment cytoplasmique du PDGFR, -résidus dont l'intervention dans la fixation de la phosphatidyl-inositol 3-kinase est connue -, affectent le transport du récepteur jusqu'aux lysosomes (Seaman *et al.*, 1996) conduisant à son recyclage.

5.3.2.3. *Que deviennent les macromolécules endocytées en phase fluide ?*

C'est l'absence d'interaction de certaines molécules avec des récepteurs membranaires avant l'internalisation, qui justifie la définition d'endocytose en phase fluide. Ces macromolécules dépourvues théoriquement de signaux intrinsèques suivent les flux membranaires. C'est pourquoi certaines d'entre elles sont utilisées dans de multiples expériences de marquage, de cinétique de transport et de flux le long de la voie d'endocytose.

60% de la peroxydase de raifort (HRP) internalisée atteint les lysosomes dans les 60 minutes suivant l'internalisation (Trowbridge *et al.*, 1993) et entre 30 et 40% est recyclé vers la membrane plasmique en 20 minutes environ (van Deurs *et al.*, 1989). Ainsi, une molécule non couplée à un récepteur suit principalement deux directions avec une direction majeure vers les lysosomes où elle est dégradée.

Au niveau des lysosomes, l'arrivée de constituants membranaires via les endosomes semble continue (voir les expériences utilisant les marqueurs en phase fluide). Un retour de membranes vers les endosomes est par contre plus difficilement mesurable puisque les traceurs

sont dégradés dans les lysosomes. Toutefois, Jahraus *et al.* (1994) ont mis au point une méthode de mesure du flux des lysosomes vers les endosomes. L'accumulation dans les lysosomes de saccharose (non dégradé par la cellule), suivie de l'internalisation de billes de latex recouvertes d'invertase dont le transport s'arrête au niveau des endosomes tardifs permet de confirmer l'existence de flux des lysosomes vers les endosomes. C'est probablement une fusion lysosome-endosome qui est à l'origine de ce retour, mécanisme microtubule-dépendant. D'autre part, la présence accrue de protéines membranaires lysosomes (LEP100) sur la membrane des endosomes après traitement à la chloroquine suppose que le flux endosome-lysosome est bloqué alors que le flux lysosome-endosome peut continuer (Lee et Marzella, 1992).

6. Les échanges directs lysosome-cytosol

6.1. Les produits de dégradation retournent vers le cytosol

Les macromolécules destinées aux lysosomes, sont dégradées par les multiples hydrolases jusqu'à l'obtention de métabolites, des acides aminés, des monosaccharides, des acides nucléiques et de molécules inorganiques. L'accumulation de ces composés dans le compartiment lysosomique est responsable de pathologies, les « pathologies de surcharge lysosomique ». Pour éviter ces problèmes d'accumulation et pour permettre aux cellules de réutiliser les métabolites pour la biosynthèse, des systèmes de transport lysosome-cytosol sont mis en place.

6.1.1. Caractéristiques du transport lysosome-cytosol.

Les données acquises sur les transports lysosome-cytosol des produits de dégradation sont maintenant nombreuses. Paradoxalement, le seul transporteur qui a été purifié et dont l'organisation structurale est partiellement connue est l'ATPase vacuolaire. La caractérisation des autres transporteurs repose essentiellement sur les études des paramètres cinétiques.

Les approches utilisées pour l'étude de ces transporteurs sont similaires. Des lysosomes sont purifiés et, l'étude du transport s'effectue alors soit directement sur les lysosomes purifiés, soit sur les membranes lysosomiques. La détermination des paramètres cinétiques est réalisée soit après accumulation du métabolite dans les vésicules et quantification de l'efflux, soit par

mesure de l'entrée du métabolite dans les vésicules. Ce dernier point supporte un transport bidirectionnel. Le phénomène de transstimulation est commun à tous ces transporteurs, le flux du métabolite est augmenté lorsqu'il est déjà présent dans le compartiment d'arrivée. Cette propriété est exploitée pour identifier la spécificité et la nature des métabolites transportés (Pisoni et Thoene, 1991).

Les résultats acquis sur plusieurs transporteurs (Pisoni et Thoene, 1991) sont présentés dans le tableau 3. Les acides aminés basiques (Lys, Arg) se partagent un même transporteur, le système de transport de type c. Le système d permet le transport des acides aminés acides, tandis que les systèmes e, p, f sont responsables de l'efflux des acides aminés neutres. Le système h intervient quant à lui pour le transfert des acides aminés neutres et hydrophobes. Ce dernier système est soumis à régulation hormonale. En effet, une stimulation hormonale sur les cellules FRTL-5 (cellules de la thyroïde de Rat) augmente le flux de tyrosine, de leucine mais aussi de cystéine. Cette augmentation est inhibée par l'addition de cycloheximide ou d'actinomycine D, indiquant une synthèse du transporteur *de novo*. Cette régulation accroît l'efficacité de recyclage de la tyrosine intervenant dans la biosynthèse de la thyroxine en réponse à la stimulation hormonale.

La vitamine B₁₂ (ou cobalamine) est responsable du transport de cobalt. Complexée à la transcobalamine dans le plasma, elle rejoint la cellule par la voie d'endocytose, qui la mène aux lysosomes avant d'être transportée jusqu'au cytosol par un système saturable et inhibable (Pisoni et Thoene, 1991).

6.1.2. Les transports de mannose et N-acétylglucosamine.

6.1.2.1. Le mannose sort des lysosomes via un transporteur d'hexoses neutres

Les études cinétiques réalisées à partir de membranes lysosomiques déterminent un Km voisin de 50 à 75 mM pour les substrats de ce transporteur, le mannose, le glucose, le galactose et le fucose. Les pentoses, les osamines, les monosaccharides acides ne sont pas transportés. L'efflux d'hexoses est très rapide, le temps de « demi-transport » est de 3 minutes, alors qu'il peut aller jusqu'à 45 minutes pour certains acides aminés (Mancini *et al.*, 1990).

Le transport n'est pas conditionné par le gradient de pH existant entre le cytosol et le lysosome, contrairement au transport d'acide sialique (Mancini *et al.*, 1989), mais il présente un pH optimum acide (Mancini *et al.*, 1989). De plus, l'entrée du glucose dans les membranes

lysosomiques n'est pas affectée par l'ATP, le DTT, les ions sodium et potassium (Jonas *et al.*, 1989).

6.1.2.2. *La N-acétyl-D-glucosamine et la N-acétyl-D-galactosamine se partagent un transporteur.*

Ce transporteur est hautement spécifique des résidus N-acétyl-D-glucosamine et N-acétyl-D-galactosamine, alors que la N-acétyl-D-mannosamine est un mauvais substrat. Le K_m est de 4,4 mM pour les deux premiers monosaccharides.

Comme pour le transport des hexoses neutres, ni le gradient de pH, ni les ions sodium et potassium, ni l'ATP ne sont requis. Contrairement au transport des hexoses neutres, des variations de pH entre 6,0 et 8,0 n'ont aucun effet (Jonas *et al.*, 1989).

6.2. Des systèmes de transport cytosol-lysosome sont décrits.

La microautophagie est définie comme l'internalisation de petites portions de cytoplasme, par les lysosomes dans des conditions physiologiques basales (c'est à dire en absence de régulation, Lee et Marzella, 1992). Alors que les données acquises et en conséquence les revues générales sur la macroautophagie sont nombreuses, celles concernant la microautophagie sont plus rares, indiquant une absence de données convaincantes. Le concept de microautophagie repose sur i) des expériences d'internalisation de billes de silice par des lysosomes isolés, ii) des observations en microscopie électronique de petites invaginations de la membrane lysosomique (Dunn, 1994; Seglen et Bohley, 1992). Deux mécanismes ont alors été proposés, i) les petites invaginations observées permettraient l'internalisation d'une portion de cytoplasme, ii) une séquestration de portions cytoplasmiques dans de petites vésicules puis la fusion avec les lysosomes a été émise (Lee et Marzella, 1992; Seglen et Bohley, 1992).

De Duve et Wattiaux ont défini la microautophagie, et par opposition à la macroautophagie, comme une relation entre le cytoplasme et le lysosome placée au niveau moléculaire (Mortimore et Kadowaki, 1994). Dans ce chapitre seront présentés trois systèmes de transport cytosol-lysosome, spécifique d'un ou plusieurs substrats, systèmes se rapprochant de la définition de la microautophagie de de Duve et Wattiaux.

Transport	Spécificité	t _{1/2} efflux	Affinité (Km)	gdt de pH
Acides aminés				
cystine	Cys	25-45 min	0,3-0,5 mM	+
Système c	Lys	24 min		
	Arg	24 min	0,32 mM	+ ?
Système d	Asp	5-7 min	4 µM	+
	Glu	5-7 min	12 µM	
Système e	Ala			
	Ser			
	Thr			
Système p	Pro	39 min	0.07 mM	
	OH Pro			
Système f	Pro		0.01 mM	
	N-méthyl-Ala			
	Sarcosine			
Système h	Tyr	2-45 min	20 µM	
	monoiodotyr		1,5-1,8 µM	
	Trp	26 min		
	Phe			
	Leu			
Monosaccharides				
Acides	Ac. sialique	2-3 min	0,24 mM	+
	Ac. uronique	2-3 min	0,28 mM	+
Hexosamines	GlcNAc		4,4 mM	- ?
	GalNAc		4,4 mM	- ?
Hexoses neutres	Glc	3 min	75-90 mM	- ?
	Man	3 min	50-75 mM	- ?
nucléosides				
	b. purine	6-7.5 min	9 mM	- ?
	b. pyrimidine	6-7.5 min		
Ions inorganiques				
Sulfate	Sulfate		160 µM	+
	Molybdate			
Phosphate			5 µM	
Vitamine B12			3,5 µM	

Tableau 3 : Caractéristiques de transports de métabolites lysosome-cytosol.

t_{1/2} correspond au temps nécessaire pour que 50% des métabolites soient transportés hors des lysosomes après son chargement.

Les Km sont calculés à partir de l'influx de métabolites à 37 °C ou 25°C à pH voisin de 7.

6.2.1. La cystéine cytosolique est rapidement transportée jusqu'aux lysosomes.

Lorsque des fibroblastes sont marqués avec de la [³⁵S]cystine, après 2 à 5 minutes, 50 à 60% de la radioactivité est retrouvée sous la forme de cystéine au niveau de lysosomes (identifiés par fractionnement subcellulaire). La glutathione réductase cytosolique assure la réduction de la cystine, alors qu'un système de transport assure l'entrée de la cystéine dans les lysosomes (Pisoni *et al.*, 1990). L'existence d'un système de transport spécifique est confirmée sur des lysosomes isolés, incubés avec de la [³⁵S]cystéine. Des expériences d'inhibition avec d'autres acides aminés neutres ou des analogues de la cystéine établissent que i) le transporteur est spécifique de la cystéine, il diffère des systèmes e et f. ii) Les fonctions amine et thiol sont nécessaires alors que la fonction carboxylique n'est pas indispensable au transport. Le transport saturable présente un Km de 53 μM et n'a pas besoin d'ATP.

Par contre, l'efficacité du transport varie en fonction du pH, il est optimum à pH 6-7,5 et très faible à pH 5-6. i) L'efficacité peut être reliée à un flux net de cystéine; une fois dans le lysosome, dans un environnement acide, l'efflux de cystéine via ce transporteur est ralenti. Le diéthylpyrocarbonate (DEPC) inhibe le transport à 80-90%, impliquant un ou des résidus d'histidine dans le site de fixation (l'addition première de cystéine prévient l'inhibition irréversible par le DEPC). Cette inhibition est sensible au variation de pH. Elle est maximale à pH 6,6, qui est aussi la valeur du pK de l'imidazole (groupement de l'histidine), renforçant l'hypothèse d'un transport moins efficace à pH acide, due à une ionisation différente (Pisoni et Vellila, 1995). ii) Le gradient de pH pourrait être impliqué dans le transport. L'entrée de cystéine à l'intérieur de membranes lysosomiques est 1,5 fois plus importante quand le pH externe est de 7,4 alors que le pH interne est de 5,3, en comparaison avec une situation où le pH externe (7,4) est égal au pH interne. La figure 12 schématise le cycle de transport cystéine-cystine existant entre le cytosol et le lysosome, faisant intervenir la glutathione réductase, le transporteur de cystéine cytosolique et les transports de cystine et des acides aminés neutres. Un rôle possible attribué à l'entrée de cystéine dans le lysosome est également schématisé : la cystéine participerait à la rupture des ponts disulfures des substrats protéiques, potentialisant l'action des protéases (Pisoni *et al.*, 1990).

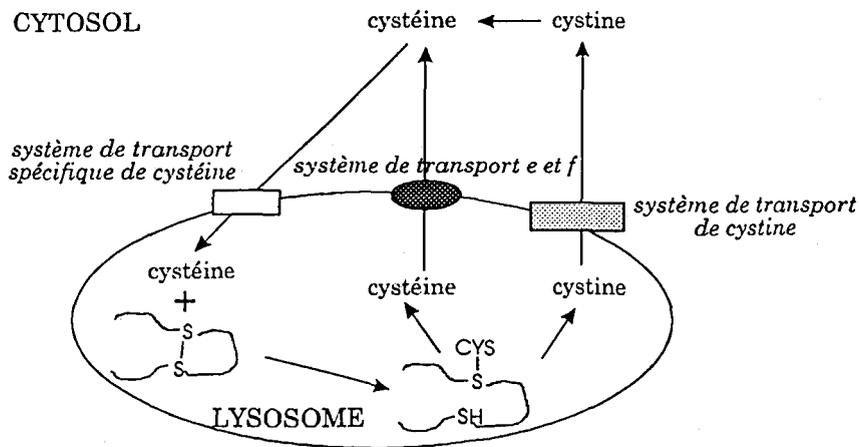


Figure 12
représentation schématique du cycle cystéine-cystine,
du rôle des systèmes de transport dans ce cycle et de la fonction
potentielle de la cystéine

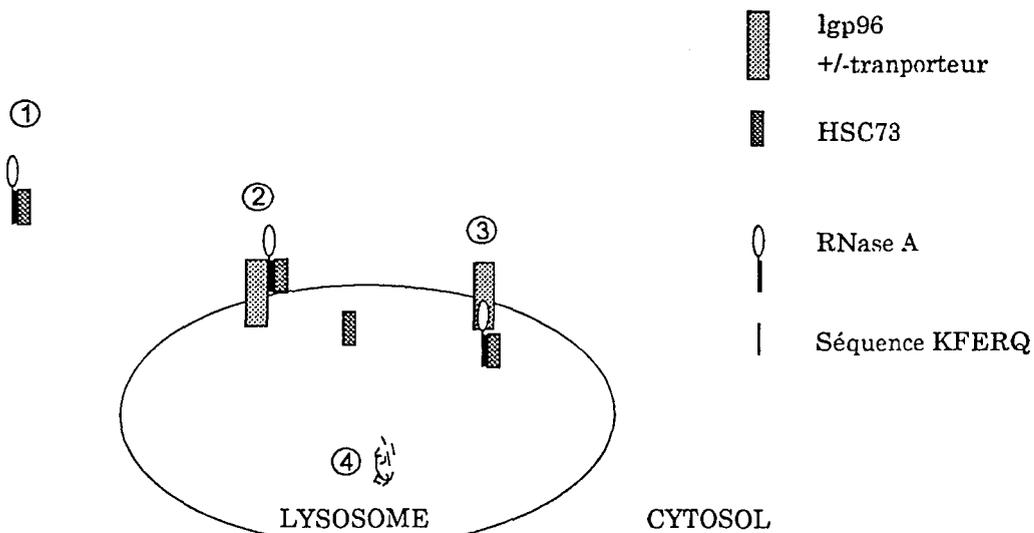


Figure 13
transport possible des protéines renfermant une séquence KFERQ jusqu'au lysosome

- ① Hsc 73 interagit avec la RNase A dans une région proche de la séquence KFERQ
- ② La RNase A se fixe sur le segment N-terminal de la lgp 96, fixation stimulée par la Hsc 73. La protéine Hsc 73 n'est peut-être plus liée à la RNase A à cette étape.
- ③ L'Hsc 73 lysosomale aide l'entrée de la RNase A dans le lysosome
- ④ La RNase A est dégradée par les protéases lysosomales

6.2.2. Certaines protéines sont spécifiquement transportées du cytosol vers les lysosomes.

Le compartiment lysosomique est le site majeur de la dégradation des protéines intracellulaires, il est particulièrement associé à la dégradation des protéines à demi-vie longue. La microautophagie et la macroautophagie constituent deux voies d'accès des protéines endogènes jusqu'aux lysosomes (Seglen et Bohley, 1992; Dunn 1994). Certaines protéines cytosoliques rejoignent le compartiment lysosomique par une voie spécifique, dépendante d'une séquence-signal présente sur la protéine.

La dégradation de la RNase A se déroule dans le compartiment lysosomique. Alors que la demi-vie de la RNase A microinjectée varie entre 80 et 100 heures, la suppression de facteurs de croissance réduit sa demi-vie à 40 heures environ et ne modifie pas celle de la sérum albumine bovine microinjectée. i) 12 heures après la microinjection, une partie de la protéine est associée à la fraction lysosomique après fractionnement subcellulaire, ii) la dégradation est inhibée par le NH_4Cl . iii) La microinjection de la RNase A couplée au raffinose tritié (non métabolisable) permet de détecter le raffinose conjugué à un résidu de lysine au niveau des lysosomes (Mac Elligott *et al.*, 1985). iv) Le transport de RNase A est effectif sur des lysosomes isolés (Chiang *et al.*, 1989).

Les vingt acides aminés en position N-terminale conditionnent la dégradation de la RNase A, c'est en fait la séquence KFERQ qui est indispensable (Chiang *et al.*, 1989). Bien que des expériences de mutagenèse dirigée impliquent tous les acides aminés de la séquence KFERQ (Terlecky *et al.*, 1992), des variations de séquences existent dans certaines protéines cytosoliques ainsi dégradées, suggérant que c'est la nature basique, acide et hydrophobes des acides aminés qui prime (Dice et Chiang, 1989). Des anticorps dirigés contre la séquence KFERQ immunoprécipitent 30% des protéines cytosoliques de fibroblastes, de foie, de rein et du muscle cardiaque. Quelques protéines ont été identifiées et leur dégradation amplifiée après privation en sérum (Dice et Chiang, 1989), c'est le cas de la glycéraldéhyde 3-phosphodéshydrogénase (GAPDH, Aniento *et al.*, 1993; Cuervo *et al.*, 1995).

Les protéines renfermant la séquence KFERQ sont reconnues par une protéine de choc thermique, la protéine Hsc 73 (Chiang *et al.*, 1989; Terlecky *et al.*, 1992). Après passage des protéines cytosoliques sur une colonne de peptides ARN-S immobilisés (acides aminés 1 à 20, contenant la séquence KFERQ), une protéine de 73 kDa est isolée, et identifiée comme la protéine de choc thermique Hsc 73 (Chiang *et al.*, 1989). La mise au point de

dosage *in vitro* sur des fibroblastes perméabilisés ou sur des lysosomes isolés montre que la dégradation de la RNase A dépend de la présence d'ATP, et qu'elle est stimulée par la protéine Hsc 73. La dégradation est de plus « saturable » et réduite en dessous de 30°C (Chiang *et al.*, 1989; Cuervo *et al.*, 1995). Notons que Hsc 73 intervient aussi dans le ciblage des protéines mitochondriales (Hayes et Dice, 1996).

La protéine Hsc 73 est aussi transportée jusqu'aux lysosomes après la privation en sérum. L'efficacité de transport et de dégradation de la RNase A est comparée sur des lysosomes isolés de fibroblastes placés dans des conditions de privation et ceux isolés de fibroblastes placés dans des conditions normales (Terlecky et Dice, 1993). Les lysosomes isolés de cellules privées sont deux fois plus actifs lors du dosage *in vitro*. Cette observation est corrélée à une détection de Hsc 73 dans les lysosomes (Cuervo *et al.*, 1995). Il est intéressant de noter que des expériences de microscopie confocale colocalisent la lgp 120, la β -hexosaminidase et l'Hsc 73; toutefois, l'Hsc 73 n'est pas présente dans tous les compartiments lysosomiques, supposant l'existence de deux populations de lysosomes (Terlecky, 1994). L'endocytose d'anticorps dirigés contre l'Hsc 73 bloque la dégradation de la RNase A, indiquant que l'Hsc 73 intralysosomique est requise.

Les protéines renfermant la séquence KFERQ se fixent sur la membrane lysosomique du côté cytosolique. Terlecky et Dice (1993) et Aniento *et al.* (1993) ont mis en évidence la fixation du peptide ARN-S -la séquence KFERQ est impliquée dans la reconnaissance de la membrane-, et celle de la GAPDH sur la membrane de lysosomes isolés. C'est le calcul du rapport de la GAPDH fixée sur la membrane du côté cytosolique et sensible à la protéinase K et de la GAPDH à l'intérieur des lysosomes insensible au traitement par la protéinase K qui montre la fixation sur la membrane. **La découverte d'un récepteur sur la membrane lysosomique explique la fixation de la RNase A et de la GAPDH** (Cuervo et Dice, 1996). i) La RNase A et la GAPDH se fixent sur une protéine de 96 kDa de la membrane lysosomique après séparation des protéines sur gel de polyacrylamide. ii) une séquence partielle en acides aminés identifie la lgp 96 ou LAMP-2, et l'addition du peptide cytoplasmique de la lgp 96 prévient la fixation de la RNase A sur la membrane de lysosomes isolés. iii) La transfection de cDNA de la lgp 96 dans les cellules CHO (dont la voie KFERQ-dépendante est faible) augmente la dégradation de la RNase A lors de dosage *in vivo* et *in vitro*.

Ainsi, sur la base de ces données, un modèle peut être émis : i) en réponse à la privation en sérum, Hsc 73 (dont la quantité augmente surtout dans le lysosome) interagit avec la séquence KFERQ de la RNase A. ii) La RNase A stimulée par la protéine Hsc 73 se lie à la Igp 96 sur la membrane lysosomique. iii) l'Hsc 73 à l'intérieur du lysosome aide la RNase A à entrer dans le lysosome. iv) La RNase A est dégradée (Figure 13) (Hayes et Dice, 1996).

Notons qu'aucune donnée n'accorde aux protéines LAMP une organisation multimérique suggérant une fonction de transport (Nabi, 1993). Hsc 73 renferme deux séquences KFERQ, indiquant qu'elle entre dans les lysosomes par la voie KFERQ-dépendante.

Il est également intéressant de souligner que la voie de dégradation KFERQ-dépendante, stimulée par la privation en sérum a une mise en place très longue : l'Hsc 73 est détectée dans les lysosomes 16 heures après la privation, et s'accumule jusqu'à 90 heures (des résultats sont similaires pour la RNase A et la GADPH, Cuervo *et al.*, 1995). La macroautophagie, qui est également stimulée par la privation en sérum débute avant la voie KFERQ-dépendante (Dice et Terlecky, 1994).

6.2.3. Des hydrolases de levure rejoignent la vacuole à partir du cytosol

Un transport vésiculaire signal-dépendant cible la majeure partie des hydrolases dans la vacuole, après leur biosynthèse dans le reticulum endoplasmique et le passage à travers l'appareil de Golgi (Klionsky, 1990). Cependant, au moins deux hydrolases, l'aminopeptidase I (API) et l' α -D-mannosidase ne sont pas synthétisées dans le reticulum endoplasmique et sont dirigées vers le compartiment vacuolaire à partir du cytosol (Yoshihisa et Anraku, 1990; Klionsky *et al.*, 1992).

Notons tout d'abord que l'arrivée des hydrolases dans le compartiment acide est suivie d'une ou de coupures protéolytiques assurant la maturation des enzymes et dans le cadre d'études, constituant un témoin de l'entrée dans la vacuole.

L'origine de ces travaux est basée sur des observations similaires. i) ni l' α -D-mannosidase qui possède 7 sites de glycosylation potentiels, ni l'AP-I qui en possède 4 ne sont glycosylées et ne renferment la séquence-signal de translocation au niveau du *reticulum* endoplasmique rugueux. ii) ni le transport de l' α -D-mannosidase, ni celui de l'API ne sont bloqués dans des souches de levure mutantes SEC (mutants déficients dans la voie de sécrétion), alors que le transport de la CPY est inhibé. iii) La surexpression de l'API et de l' α -D-mannosidase ne provoque pas leur sécrétion, mais une accumulation intracellulaire avec un

délai de maturation, contrairement à la CPY qui est sécrétée dans le milieu de culture (Yoshihisa et Anraku, 1990; Klionsky *et al.*, 1992). Il est intéressant de souligner que la surexpression de l' α -D-mannosidase augmente le temps de demi-conversion de l'API de 45 à 65 minutes suggérant une compétition pour la même machinerie (Klionsky *et al.*, 1992). Le temps de demi-conversion de l' α -D-mannosidase est de 10 heures, c'est pourquoi son utilisation comme modèle d'étude est difficile. Les études qui ont suivi ces observations, ont donc surtout concerné le transport de l'API; transport éventuellement applicable à celui de l' α -D-mannosidase.

L'aminopeptidase est synthétisée dans le cytosol sous forme de proenzyme de 61 kDa (pAP-I). Dans la vacuole, elle subit deux coupures protéolytiques pour former l'enzyme mature de 50 kDa (mAP-I). Segui-Real *et al.*, (1995) ont étudié les différentes étapes de maturation ainsi que les protéases concernées. Alors que les mutants déficients en protéinase A (PrA, serait responsable de l'activation des protéases vacuolaires) sont incapables de couper pAP-I, ceux déficients en protéinase B (PrB) convertissent pAP-I en une forme intermédiaire de 55 kDa. La PrA A serait responsable de la coupure des 16 premiers acides aminés en position N-terminale, tandis que PrB de la seconde coupure des 29 acides aminés suivant, 45 acides aminés différencient la forme proenzyme de la forme mature.

C'est le propeptide de 45 acides aminés en position N-terminale qui est responsable du ciblage de l'API au lysosome. Deux hélices α , séparées par une région en coude β forment ce propeptide. La première hélice est une structure amphiphile; d'un côté de l'hélice, les acides aminés sont hydrophiles et chargés alors qu'ils sont hydrophobes de l'autre côté (Oda *et al.*, 1996). Des mutants tronqués sur les acides aminés 1 à 15 ou sur les acides aminés 1 à 45 ne sont pas transportés dans la vacuole (Ségui-Real *et al.*, 1995). Plus précisément, des délétions, mutations d'un ou plusieurs acides aminés sur la première hélice α (acides aminés 1 à 15) bloquent la maturation de pAP-I, qui reste dans la fraction cytosolique, alors que des mutations sur la seconde hélice α n'ont pas d'effet sur la maturation (Harding *et al.*, 1995; Oda *et al.*, 1996).

pAP-I est transportée dans la vacuole post-translationnellement. La construction de chimères « actives » dans le cytosol corrobore l'accumulation de pAP-I avant son transfert dans la vacuole (Ségui-Real *et al.*, 1995).

pAP-I se fixe sur la membrane vacuolaire avant d'être transportée. Un marquage avec la [35 S]Met, suivi d'une lyse osmotique permet de séparer la fraction cytosolique des

compartiments vésiculaires (la vacuole est isolée après fractionnement subcellulaire). Le traitement de ces derniers avec la protéinase K en absence de détergent souligne qu'une partie de pAP-I est sur la membrane vacuolaire du côté cytosolique (Scott *et al.*, 1995). Lorsque la lyse osmotique est suivie de la mesure de la maturation de pAP-I *in vitro*, la présence de la fraction cytosolique n'est pas obligatoire, pAP-I fixée sur la membrane vacuolaire est la seule forme transportée (Scott *et al.*, 1995). Des mutants sur la première hélice α se lient peu sur la membrane vacuolaire et ne sont pas transportés (Klionsky *et al.*, 1995).

La reconstitution du transport est possible *in vitro*. Comme décrit précédemment, c'est essentiellement la fraction associée avec la membrane qui sera transportée. Le transport est évalué par la conversion pAP-I en mAP-I après isolement des vacuoles sur gradient de Ficoll (Scott *et al.*, 1995). La présence d'ATP, de GTP ou de GDP ainsi que l'acidité de la vacuole sont requises pour suivre la maturation de pAP-I.

Le propeptide en position N-terminale est responsable du transport de l'AP-I dans la vacuole, transport précédé par la fixation sur la membrane de la vacuole. Cette dernière observation présuppose la reconnaissance avec l'un des composants de la membrane. Le transport requiert la présence d'ATP, de GTP ou de GDP ce qui n'exclut pas l'intervention de protéines G et pourrait supposer un transport dans un compartiment avant l'arrivée dans la vacuole. De la même façon, les variations de température (<30°C) affectent très rapidement le transport, alors que la translocation de protéines dans le reticulum endoplasmique, qui sert souvent de point de comparaison, est possible à 10°C. Toutefois, le transport de l'API présente des similitudes avec celui des protéines renfermant une séquence KFERQ, bien qu'aucune protéine cytosolique se liant à l'AP-I n'ait été caractérisée.

OBJECTIF DU TRAVAIL

Les études des oligosaccharides-lipides polymannosylés sont en général intégrées aux études de la biosynthèse des N-glycosylprotéines. Pourtant, une fraction des oligosaccharides polymannosylés sont trouvés à l'état libre dans les cellules. Au laboratoire, nous avons déterminé, dans une lignée cellulaire d'hépatocarcinome humain (les cellules HepG2), que les oligosaccharides libres représentent de 15 à 20% des oligomannosides synthétisés sur les dolichols. La production de ces oligosaccharides libres prend donc une réelle importance quantitative.

Leur libération dans la lumière du *reticulum* endoplasmique n'est pas suivie de leur sécrétion via la voie d'exocytose. L'intérêt accordé à l'étude des oligosaccharides libres s'accroît par la caractérisation d'une voie de transport directe, de la lumière du *reticulum* endoplasmique vers le compartiment cytosolique (Moore *et al.*, 1995). Ainsi, les oligosaccharides libres s'échappent très rapidement de la voie d'exocytose.

Une fois dans le compartiment cytosolique, ceux-ci essentiellement composés de Man_8 GlcNAc_2 sont séquentiellement élagués (Moore et Spiro, 1994). Une activité endoglucosaminidase cytosolique est requise pour cliver le résidu de N-acétylglucosamine en position terminale (Moore et Spiro, 1994; Cacan *et al.*, 1996). Une mannosidase cytosolique peut dans ces conditions libérer séquentiellement certains résidus de mannose (Grard *et al.*, 1994). Le produit limite obtenu, renferme 5 résidus de mannose et 1 résidu de N-acétylglucosamine, de structure suivante $\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3)[\text{Man}(\alpha 1-6)]\text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$ (Haeuw *et al.*, 1991; Moore et Spiro, 1994).

Quel est le devenir de ces oligosaccharides libres cytosoliques ?

Plusieurs possibilités pouvaient être envisagées: i) Les oligosaccharides libres cytosoliques sont sécrétés dans le milieu extracellulaire. ii) Ils s'accumulent dans le cytosol. iii) Ils sont repris par le cycle des dolichols et utilisés pour la synthèse de glycoprotéines. iv) Ils sont transportés jusqu'aux lysosomes pour y être dégradés.

Aucune étude n'a révélé la présence d'oligosaccharides libres dans le milieu extracellulaire dans des conditions normales de culture (Cacan *et al.*, 1989; Moore et Spiro, 1994).

La mise en oeuvre d'expériences de pulse-chasse sur les cellules HepG2 a montré que la radioactivité associée aux oligosaccharides libres diminue au cours de la période de chasse (Moore et Spiro, 1994) et permet d'écarter l'hypothèse de l'accumulation des oligosaccharides libres dans le cytosol. La perte des oligosaccharides libres cytosoliques permet d'envisager les deux autres hypothèses: les oligosaccharides libres sont repris par le cycle des dolichols, ou les oligosaccharides libres sont dégradés dans le compartiment lysosomique.

Le lysosome est un compartiment de dégradation majeure des macromolécules. Nombre d'hydrolases y ont été localisées dont deux activités mannosidasiques. La première enzyme caractérisée est remarquable par son aptitude à cliver des structures « linéaires » (Touster et Tulsiani, 1987), la deuxième a une spécificité étroite et ne clive qu'un seul résidu de mannose lié en α 1-6 (De Gasperi *et al.*, 1992).

La dégradation des oligosaccharides libres cytosoliques dans le compartiment lysosomique a constitué la base de notre hypothèse de travail.

RESULTATS

**TRANSFER OF FREE POLYMANNOSE-TYPE OLIGOSACCHARIDES FROM THE
CYTOSOL TO LYSOSOMES IN CULTURED HUMAN HEPATOCELLULAR
CARCINOMA HEPG2 CELLS**

Agnès Saint-Pol, Chantal Bauvy, Patrice Codogno and Stuart E. H. Moore

From the Unité de Neuroendocrinologie et Biologie Cellulaire Digestives, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U410, Faculté de Médecine Xavier Bichat, 16 Rue Henri Huchard, 75018 Paris, France

Corresponding author: Stuart E. H. Moore, INSERM U410, 16 rue Henri Huchard 75018 Paris, France.

Telephone number: 33 1 44856134

Fax number: 33 1 42288765

Running title: Free oligosaccharide trafficking.

SUMMARY

Large free polymannose oligosaccharides generated during glycoprotein biosynthesis rapidly appear in the cytosol of cultured human hepatocellular carcinoma HepG2 cells where they undergo processing by a cytosolic endo H-like enzyme and a mannosidase to yield the linear isomer of Man₅GlcNAc (Man(α1-2)Man(α1-2)Man(α1-3){Man(α1-6)}Man(β1-4)GlcNAc). Here we have examined the fate of these partially trimmed oligosaccharides in intact HepG2 cells. Subsequent to pulse-chase incubations with D-[2-³H]mannose followed by permeabilisation of cells with streptolysin O free oligosaccharides were isolated from the resulting cytosolic and membrane-bound compartments. Control pulse-chase experiments revealed that total cellular free oligosaccharides are lost from HepG2 cells with a half-life of 3-4 hours. In contrast use of the vacuolar H⁺/ATPase inhibitor, concanamycin A, stabilised total cellular free oligosaccharides and enabled us to demonstrate a translocation of partially trimmed oligosaccharides from the cytosol into a membrane-bound compartment. This translocation process was unaffected by inhibitors of autophagy but inhibited if cells were treated with either 100 μM swainsonine, which provokes a cytosolic accumulation of large free oligosaccharides bearing 8-9 residues of mannose, or agents known to reduce cellular ATP levels which lead to the accumulation of the linear isomer of Man₅GlcNAc in the cytosol. Subcellular fractionation studies on Percoll density gradients revealed that the cytosol-generated linear isomer of Man₅GlcNAc is degraded in a membrane-bound compartment that cosediments with lysosomes.

INTRODUCTION

The glycosylation of proteins with N-linked carbohydrate in the endoplasmic reticulum is a common and important posttranslational modification. Surprisingly, this process, accomplished by the transfer of a polymannose-type oligosaccharide from a lipid carrier (dolichol) onto polypeptide (Kornfeld and Kornfeld, 1985), is accompanied by the release of free polymannose-type oligosaccharides into the lumen of the endoplasmic reticulum (ER) (Anumula and Spiro, 1983; Cacan et al., 1987). As large amounts of free oligosaccharides are generated in this way an understanding of the fate of this material became important. It was initially thought that free oligosaccharides generated in the lumen of the ER might be exported from the cell by vesicular transport as a consequence of the effect of bulk flow (Wieland et al., 1987). In fact this was found not to be the case as free oligosaccharides were not recovered from the incubation media of cultured HepG2 cells (Moore and Spiro, 1990) but detected in the cytosol (Moore and Spiro, 1994). More recently free polymannose-type oligosaccharides bearing the terminal reducing di-N-acetylchitobiose moiety have been shown to be transported out of the ER into the cytosol in permeabilised HepG2 cells (Moore et al., 1995). In addition to the transfer of free oligosaccharides from the lumen of the ER into the cytosol there is now evidence to suggest that some free oligosaccharides maybe generated in the cytosol by either the release of cytosolically disposed oligosaccharides from dolichol (Kmićik et al., 1995), or by the degradation of glycoproteins, initiated by a cytosolic N-glycanase (Suzuki et al., 1994), that have been translocated out of the ER into the cytosol (Wiertz et al., 1996). These reports highlight the crucial role that the cytosol plays in the processing and perhaps generation of free oligosaccharides which are generated during the biosynthesis and quality control of glycoproteins. What then is the fate of these free cytosolic oligosaccharides?

It has been known for some years that the cytosol contains both an endo H-like enzyme (Pierce et al., 1979) and an α -mannosidase (Shoup and Touster, 1976, Tulsiani and Touster 1987). In vitro experiments with preparations of the cytosolic α -mannosidase have revealed it to possess two notable features, firstly it is inactive towards large polymannose-type oligosaccharides bearing the di-N-acetylchitobiose moiety at their reducing termini (Oku

and Hase, 1991) and secondly its limit digest product is the linear isomer of Man₅GlcNAc: Man(α 1-2)Man(α 1-2)Man(α 1-3){Man(α 1-6)}Man(β 1-4)GlcNAc (Oku and Hase, 1991; Tulsiani and Touster, 1987). In intact cells cytosolic free oligosaccharides generated during the biosynthesis of glycoproteins are apparently subjected to the actions of these two cytosolic enzymes to yield the pseudolinear isomer of Man₅GlcNAc (Moore and Spiro, 1994).

Here we report on the fate of this cytosolic free oligosaccharide in intact HepG2 cells. It is shown that partially trimmed cytosolic oligosaccharides are translocated into a membrane bound compartment by a non-autophagic process that requires energy. Subcellular fractionation of HepG2 cell homogenates on Percoll density gradients revealed that cytosolic oligosaccharides are ultimately degraded in a compartment that cosediments with lysosomes. Along with a previous report describing the transport of free oligosaccharides from the lumen of the ER into the cytosol (Moore et al., 1995) this report describes a novel trafficking pathway for free oligosaccharides that links the endoplasmic reticulum to the lysosome via the cytosol.

MATERIALS AND METHODS

Culture and radiolabeling of cells

HepG2 cells were cultivated in RPMI 1640 (GIBCO BRL, Paisley, UK) containing 10% FCS (GIBCO) as previously described (Moore and Spiro, 1990). Cells were pulse-radiolabelled with 40 μ Ci D-[2-³H]mannose (20Ci/mmol, Amersham, Slough, UK) for 20 min in 0.5 ml glucose-free Dulbecco's modified Eagle Medium (GIBCO) supplemented with 5% dialysed FCS, 2 mM glutamine, 5mM fucose and 1 mM sodium pyruvate. Cells were chased in complete growth medium containing 5mM fucose and 5 mM mannose. When pulse-chase studies were performed in the presence of swainsonine (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO) and concanamycin A (Ciba-Geigy, Switzerland) the cells were preincubated with these inhibitors for 1 hour prior to the onset of radiolabeling and were added to both the pulse and chase media at the appropriate concentrations. Prior to subcellular fractionation studies cells were pulse-radiolabeled for 20 min with

200 μ Ci D-[2-³H]mannose and chased as described above. Other drugs including 3-methyladenine, asparagine, deoxyglucose, sodium azide and oligomycin (all from Sigma) were included in the chase media only and were added 45 minutes after the onset of the chase incubations, whereas leupeptin (Sigma) was added at the beginning of each chase period.

Permeabilisation of cells

At the end of pulse-chase experiments, cells were released from tissue culture flasks with trypsin/EDTA and washed twice in 1.0 ml of permeabilisation buffer: 250 mM mannitol, 5 mM HEPES (pH 7.3), 2 mM EGTA, 1 mM CaCl₂, 2mM MgCl₂. Cells were then incubated at 4°C for 20 min in 0.5 ml of the permeabilisation buffer containing 1U/ml Streptolysin O (Wellcome Diagnostics, UK). Cells were recovered by centrifugation and the supernatant was kept. Subsequent to washing the cells twice with 0.5 ml permeabilisation buffer at 4°C they were incubated with 0.5 ml prewarmed permeabilisation buffer (37°C) for 5 min and the permeabilised cells were then recovered by centrifugation to yield the membrane bound compartment (MBC) fraction. The final supernatant was pooled with the SLO-containing supernatant and the two subsequent permeabilisation buffer washes to yield 2 mls of the cytosolic compartment fraction (CYTOSOL).

Preparation of free oligosaccharides from cytosolic and MBC fractions of HepG2 cells

Neutral free oligosaccharides were prepared from the cytosol and MBC fractions as previously described (Moore and Spiro, 1994). Briefly, the pellet of permeabilised cells (MBC) was extracted with chloroform/methanol/125mM HEPES(pH 7.2) containing, 4mM MgCl₂, 3:2:1, and after vigorous shaking the upper methanolic phase was recovered, dried and redissolved in water. This material and the cytosolic fractions were desalted on combined columns of AG 1-X2 (acetate form) and AG 50-X2 (H⁺ form), unbound neutral material was then loaded onto columns of charcoal which were then washed with water prior to elution of oligosaccharide material from the charcoal with 30% ethanol. Free oligosaccharides were analysed on plastic thin-layer chromatography

plates coated with silica (Merck) which were developed in *n*-propanol/acetic acid/water (3:2:1) for 12 hours. Resolved components were visualised by fluorography.

Structural analysis of Man₅GlcNAc oligosaccharides

After resolution of free oligosaccharides by thin-layer chromatography components of interest were eluted from the chromatography plates with water and passed over coupled columns of AG 50 (H⁺ form) and AG 1 (acetate form). Non-retained neutral components were dried and subjected to two mannosidase treatments. One aliquot was treated with 1U Jack bean α -mannosidase (Sigma) overnight at 37°C in 40 mM sodium acetate pH 4.5. Another aliquot was digested overnight at 37 °C with 5 μ U α 1-2 mannosidase (Oxford Glycosystems, Hitching Court, Abingdon, UK) in 100 mM sodium acetate buffer pH 5.0. The digestion products were then desalted as described above, concentrated, and resolved by thin layer chromatography on plastic sheets coated with cellulose (0.1 mm thickness, Merck). Chromatographs were developed in pyridine/ethyl acetate/water/ acetic acid 5 : 5 : 3 : 1 for 10 hours, and after drying resolved components were visualised by fluorography. Quantitation of the resolved products was achieved by their elution from the cellulose plates and assaying radioactive components by scintillation counting.

Percoll density gradient fractionation

HepG2 cells were washed three times with ice-cold PBS containing 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ and once with ice-cold subcellular fractionation buffer (SFB), 250 mM sucrose, 20 mM Hepes, 1 mM EDTA, pH 7.2. The cells were scraped from tissue culture flasks in 5 ml SFB and cellular protein was assayed using a bicinchoninic acid protein assay kit (Sigma). The cell pellet obtained after centrifugation at 600g for 10 min was resuspended in SFB (1.5 mg/ml protein) and placed on ice for 15 min. Cell homogenisation was carried out using a tight-fitting Dounce homogeniser (30 passages). After centrifuging the homogenate at 600g for 10 min, the supernatant was removed and kept on ice, and the pellet was resuspended with SFB and rehomogenised and centrifuged as above. Pooled supernatants were adjusted to 5 ml with SFB and 3 ml of a 80% Percoll solution was added (Rijnboutt et al., 1992). The gradient was formed by centrifugation

for 35 min at 92,570 gAv. (Rijnboutt et al., 1992). 400 μ l fractions were collected from the top of the tube with a needle mounted on a syringe. In order to isolate free oligosaccharides from the Percoll gradient fractions were pooled (see figure 9) and diluted in SFB, after centrifugation for 90 min at 100,000 gAv. organelles were recovered separately from the Percoll pellet. Free oligosaccharides were prepared from organelle fractions as described above except that before ion-exchange chromatography sucrose was eliminated from the samples by Biogel P2 gel filtration.

Horseradish peroxidase (HRP) uptake

HepG2 cells were washed with MEMH (MEM containing 1 mM sodium pyruvate, 1 mM L-glutamine and 20 mM HEPES/NaOH pH 7.2) and HRP uptake was performed in MEMH containing 5 mg/ml HRP (Sigma) for 5 or 15 min at 37°C (van Weert et al., 1995). Extracellular HRP was then removed by washing the cells with ice-cold MEMH over a period of 10 min, followed by either a 5 min or a 2 hour chase period, corresponding to the 5 or 15 min pulse times respectively (van Weert et al., 1995). HRP-loaded cells were then washed and homogenised as described above.

Enzymatic assays

HRP activity was assayed in 50 mM phosphate buffer (pH 5.0) containing 0.1% Triton X-100, using 83 μ g/ml *O*-dianisidine and 1% H₂O₂ as substrates (van Weert et al., 1995). The reaction was performed for 5 min at room temperature in the dark; absorbance was measured at 460 nm.

Lysosomal β -D-hexosaminidase activity was measured using p-nitrophenyl N-acetylglucosamine as described previously (Opheim and Touster, 1977). β 1, 4 Galactosyltransferase was assayed by the method of Barker et al. 1972.

NADPH cytochrome c reductase activity was measured as previously described in a 50 mM phosphate, 0.1 mM EDTA buffer pH 7.7 using 1 mg/ml NADPH and 25 mg/ml cytochrome c as substrates. Absorbance increases were measured at 550 nm over a 3 min period.

High-pH anion-exchange chromatography (HPAEC).

HPAEC was carried out on a Dionex apparatus as previously described (Townsend et al., 1991). Components were eluted at 1ml/min with buffer A for 10 min followed by a linear gradient of 0%-10% buffer B over 25 minutes (buffer A, 50 mM NaOH; buffer B, 500mM sodium acetate in buffer A). Column effluent was monitored for radioactive components with a Flow Scintillation Analyser Radiomatic Flow-one/Beta (Packard) using a scintillation fluid (UltimaFlow one AP) flow rate of 2 ml/min. Standard oligosaccharides, prepared as previously described (Haeuw et al., 1991, Michalski et al., 1990) were monitored by pulsed-electrochemical detection.

RESULTS

Free oligosaccharides appear rapidly in the cytosol of HepG2 cells during glycoprotein biosynthesis and are then cleared from this compartment. In a previous study we have shown that free oligosaccharides generated from oligosaccharide-lipid, bearing the di-N-acetylchitobiose moiety (OS-GN2), are rapidly transported out of the ER into the cytosol (Moore et al., 1995). This process was observed *in vitro* upon addition of ATP to permeabilised HepG2 cells. In the present report we have followed the subcellular trafficking of free polymannose oligosaccharides *in vivo* by permeabilising the plasma membrane of [³H]mannose-radiolabelled HepG2 cells with SLO. After centrifugation of permeabilised cells, free oligosaccharides were isolated from the supernatant (cytosolic compartment) and the residual cell pellet, containing intact intracellular organelles (membrane bound compartments, MBCs). Figure 1A shows the results of such an experiment. During the pulse the MBC contains free oligosaccharides (OS-GN2, figure 1; open arrow heads) whereas the cytosol contains the same components and in addition their counterparts bearing a single residue of N-acetylglucosamine at their reducing termini (OS-GN1). Between the pulse and one hour chase period there is a loss of OS-GN2 from the MBC and an increase in free oligosaccharides in the cytosolic compartment. These observations represent the previously described ER-to-cytosol transport process (Moore et al., 1995). After transport out of the ER OS-GN2 are subject to a cytosolic endo H-like activity to yield their OS-GN1 counterparts. OS-GN1 are now potential substrates for the cytosolic mannosidase which trims these components down to a limit digest product; the linear isomer of Man₅GlcNAc (Moore and Spiro, 1994), see figure 2B for representation of this structure. However as can be seen in figure 1A free oligosaccharides neither accumulate in the cytosol nor reappear in an MBC. We reasoned that if cytosolic oligosaccharides are translocated into a degradative compartment they might be difficult to detect due to their rapid hydrolysis into free mannose and N-acetylglucosamine. Because the lysosome is the most likely compartment in which cytosolic oligosaccharides might be degraded we chose to perform pulse-chase experiments in the presence of a vacuolar H⁺/ATPase inhibitor.

The clearance of free oligosaccharides from the cytosol is not dependent upon vacuolar H⁺/ATPase activity. CCM A (Woo et al., 1992) is a vacuolar H⁺/ATPase which has been shown to abolish acidification of lysosomes without affecting cellular ATP levels (Kataoka et al., 1995, Woo et al., 1992), we reasoned that if free oligosaccharides are translocated into an acidic MBC from the cytosol this reagent may either inhibit their access to, or, failing that, block their degradation within an acidic compartment. Free oligosaccharides isolated from the cytosol and MBCs of cells from a pulse-chase experiment performed in the presence of CCM A are shown in figure 1B, results show that when compared to the control experiment (figure 1A) this reagent had very little effect on early events (0-1 hr) during the pulse-chase experiment and we conclude from this that the generation of free oligosaccharides in the ER and their transport out of this compartment into the cytosol is unaffected by CCM A. In contrast figure 1B shows that, after one hour of chase, CCM A provokes a steady accumulation of free oligosaccharides bearing predominantly 7-4 residues of mannose, in a MBC. Although the effect of CCM A is most marked with respect to oligosaccharides recovered from the MBCs we noted systematically, after long chase periods, that this reagent also causes a small but significant accumulation of free oligosaccharide material in the cytosolic compartment. We also observed, after 8 hours of chase in the presence of CCM A, that 7.9% of total free oligosaccharides produced by HepG2 cells could be recovered from the incubation medium, and after 20 hours of chase this figure rose to 18.0%. As the quantity of free oligosaccharides recovered from the incubation media of CCM A-treated cells represented only a small fraction of total cellular free oligosaccharides observed during the time-frame of our experiments the contribution made by these components to the quantitative aspects of our studies have not been taken into account.

These results show that CCM A has only small effects on the appearance and decay of radioactivity associated with free oligosaccharides in the cytosol of HepG2 cells but, in contrast, this reagent provokes a marked accumulation of free oligosaccharides associated with a MBC.

The isomeric structure of the Man₅GlcNAc isolated from MBCs of CCM A-treated HepG2 cells is consistent with its cytosolic origin. In order to evaluate the possibility that the CCM A-provoked accumulation of free oligosaccharides associated with a MBC is related to the loss of these components from the cytosol we next investigated the isomeric configuration of the Man₅GlcNAc associated with the MBCs. The cytosol is known to contain an endo H-like enzyme and an α -mannosidase which together process the large oligosaccharides that are transported out of the ER into the cytosol to yield the limit digest product Man₅GlcNAc (see figure 2: linear structure) (Moore and Spiro, 1994). Although products closely related to CCM A are known to inhibit the degradation of proteins in the lysosomes of certain cell lines (Yoshimori et al., 1991) we could not rule out the possibility that in our hands CCM A caused the accumulation of partially degraded polymannose- or hybrid-type oligosaccharides derived from incomplete lysosomal glycoprotein degradation. If this were the case then any resulting free Man₅GlcNAc should have a structure consistent with its having passed through the Golgi apparatus while N-linked to protein. Accordingly the Man₅GlcNAc isolated from MBCs of CCM A-treated HepG2 cells would be expected to be the branched isomer of this oligosaccharide (see figure 2: branched structure) (Kornfeld and Kornfeld, 1985). Thus transport of this latter component into an MBC of CCM A-treated HepG2 cells would lead to the accumulation of an isomer of Man₅GlcNAc different from that expected from the limit digest product of the cytosolic mannosidase. In order to distinguish between the two possible origins of the Man₅GlcNAc observed to accumulate in the presence of CCM A we have isolated this component from the MBCs and subjected it to digestion with a non specific α -mannosidase (Jack bean) and an α -1, 2 mannosidase (Amano and Kobata, 1986) as shown in figure 2. The linear isomer of Man₅GlcNAc has two α -1, 2 linked mannose residues whereas its branched counterpart contains no such linkages. Results show that the structure isolated from the MBCs of CCM A-treated HepG2 cells is sensitive to the α -1, 2 mannosidase yielding free mannose and the trisaccharide Man₃GlcNAc. Jack-bean α -mannosidase treatment of the Man₅GlcNAc yielded free mannose and the disaccharide Man β -1, 4 GlcNAc, in the ratio 4:1, indicating that this component possessed a single terminal reducing N-acetylglucosamine moiety and that all the α -linked mannose residues were

accessible to an exomannosidase. Similar treatment of the Man₄GlcNAc isolated from the MBCs of CCM A-treated HepG2 cells revealed it also to be sensitive to the α -1, 2 mannosidase yielding the digest products Man₃GlcNAc and mannose (results not shown). These results clearly demonstrate that the isomeric configurations of the free oligosaccharides associated with the MBCs of CCM A-treated HepG2 cells are compatible with their having been generated by the cytosolic mannosidase and not as a consequence of incomplete degradation of free oligosaccharides derived from lysosomal glycoprotein catabolism.

The loss of free oligosaccharides from the cytosol can be accounted for both quantitatively and kinetically by their recovery within a MBC of CCM A-treated HepG2 cells . The ability of CCM A to block the degradation of MBC-associated free polymannose type oligosaccharides has enabled us to further establish the hypothesis that there is a cytosol-to-MBC translocation of free oligosaccharides. Accordingly we have verified that the loss of free oligosaccharides from the cytosol could be quantitatively and kinetically accounted for by their reappearance in a MBC. Quantitation of the free oligosaccharides generated during the control and CCM A pulse-chase incubations is shown in figure 3. In the control incubations there is a loss of total free oligosaccharide from cells such that after eight hours of chase only 25% of the cytosolic free oligosaccharides remain. However in the presence of CCM A the total quantity of free oligosaccharide remains approximately constant between 1 and 8 hours of chase and the loss of free oligosaccharides from the cytosol can be accounted for, both quantitatively and kinetically, by their recovery from the MBCs (see figure 3).

Next we wanted to know whether the free oligosaccharides associated with the MBCs of CCM A-treated HepG2 cells are located within the MBC or are merely associated with the cytosolic face of its delineating membrane. This problem was addressed by performing a pulse-chase incubation in the presence of CCM A as described in figure 1. After 6 hours of chase the cells were first permeabilised with SLO to release the remaining cytosolic oligosaccharides and then resealed with saponin. Results indicated that greater than 90% of the free oligosaccharides associated with the MBCs of SLO-permeabilised cells could

be released upon their repermeabilisation with saponin (results not shown). Identical results were obtained if the saponin treatment was substituted by freeze-thawing (not shown). These results confirm the hypothesis that in CCM A-treated HepG2 cells there is a translocation of free oligosaccharides from the cytosolic compartment into the lumen of a MBC.

Inhibition of cytosolic processing of free polymannose-type oligosaccharides affects their subcellular trafficking. We then wanted to know if the structure of cytosolic free oligosaccharides play a role in their transfer into a MBC. In order to achieve this the total cellular molar equivalent of each free oligosaccharide was calculated after 1, 2, and 4 hours of chase in the presence of CCM A as shown in the upper part of figure 4. The percentage of each oligosaccharide occurring in the MBCs was then computed and displayed in the lower portion of figure 4. Irrespective of the total cellular quantity of Man₉.₈GlcNAc about 17% of these two oligosaccharides are recovered from the MBC after 1, 2, and 4 hours of chase. Because the permeabilisation procedure used in these studies leads to the release of about 80% of cellular lactate dehydrogenase (results not shown) the small percentage of Man₉.₈GlcNAc occurring in the MBCs during the chase incubations may represent free oligosaccharides in non-permeabilised cells. However as the chase progresses there is a steady increase in the proportion of free Man_{7.5}GlcNAc oligosaccharides occurring in the MBCs. These results suggest that oligosaccharides bearing 8 or 9 residues of mannose might be poorly transferred into a MBC. In order to gain more insight into the mechanism of the transfer of free oligosaccharides from the cytosol to a MBC we examined the effect of inhibition of the cytosolic mannosidase on the transfer of cytosolic oligosaccharides into the MBC. If, as suggested above large free oligosaccharides bearing 8 or 9 residues of mannose are poorly transferred from the cytosol into a MBC then an inhibitor of the cytosolic mannosidase would be expected to slow down the transfer of the larger free polymannose-type oligosaccharides from the cytosol into an MBC of HepG2 cells. At high concentrations swainsonine (SW), a non-specific mannosidase inhibitor (Elbein et al., 1981), inhibits the cytosolic α -mannosidase (Tulsiani and Touster, 1987) in addition to Golgi mannosidase II and lysosomal mannosidases. Accordingly HepG2 cells were pulse-radiolabeled and chased in

the presence of 100 μ M SW and, subsequent to permeabilisation with SLO, free oligosaccharides were prepared from both the MBCs and the cytosol as described for figure 1. Figure 5A demonstrates that after 4 hours of chase SW causes an inhibition of the loss of radioactivity associated with free oligosaccharide material from the cytosolic compartment of HepG2 cells. Furthermore thin-layer chromatography of the oligosaccharides recovered from the cytosolic compartment of HepG2 cells chased for 4 hours in the presence of 100 μ M SW revealed that Man₉GlcNAc and Man₈GlcNAc oligosaccharides are stabilised in the cytosol for upto 4 hours and that there is little transfer of these components into the MBC. Although figure 5B shows that free oligosaccharides bearing 9 and 8 residues of mannose are stabilised in the cytosolic compartment of SW-treated cells we observed (figure 5C) a small accumulation of Man₅GlcNAc in the MBCs derived from these cells. As described above in addition to inhibiting the cytosolic mannosidase SW is also known to inhibit Golgi mannosidase II which leads to the production of glycoproteins bearing hybrid-type oligosaccharide chains (Elbein et al., 1981). Hybrid-type oligosaccharide chains possess a core structure which contains the branched Man₅GlcNAc moiety (see figure 2), now, if such glycoproteins, or free oligosaccharides, are transported from the Golgi complex to lysosomes, whose mannosidase activity has been compromised by SW, then we would expect to see an accumulation of a free oligosaccharide corresponding to the branched isomer of Man₅GlcNAc in the MBCs of SW-treated cells. Results (not shown) demonstrated that 100 μ M SW provokes the appearance of only the branched isomer of Man₅GlcNAc in the MBCs of HepG2 cells. Thus, as expected from its ability to trap large free polymannose type oligosaccharides in the cytosol, 100 μ M SW abolished the appearance of linear Man₅GlcNAc in the MBCs. In summary results show that incubation of HepG2 cells with 100 μ M SW arrests the cytosolic trimming of free polymannose-type oligosaccharides and slows down their egress from this compartment.

The Golgi apparatus does not play a major role in the trafficking of free oligosaccharides in HepG2 cells. Taken together the results presented so far provide evidence to show that most free oligosaccharides follow a trafficking pathway from the ER

into the cytosol and then into a MBC possessing a mannosidase with a low pH optimum. However the appearance of the branched isomer of Man₅GlcNAc in the MBCs of SW-treated cells suggested that there may also exist a vesicular trafficking pathway for free oligosaccharides involving the Golgi complex. Furthermore as CCM A is known to affect the movement of glycoproteins through the Golgi complex (Yilla et al., 1993) it is possible that this agent inhibits the normal vesicular traffic of free oligosaccharides through this compartment and in so doing favours their traffic through the cytosol. In order to address this question we have performed pulse-chase experiments in the presence of 0.1 μM SW, a treatment which accurately reproduced the effects of CCM A on free oligosaccharide trafficking. Accordingly at this low concentration we found that SW neither inhibited the cytosolic processing of free oligosaccharides nor inhibited their loss from the cytosolic compartment. In addition, as observed with CCM A, 0.1 μM SW provoked an accumulation of Man₅GlcNAc in the MBCs between the one and eight hour chase periods. At four hours of chase we analysed Man₅GlcNAc isolated from the MBCs of cells treated with 0.1 μM SW as shown in figure 6 (CONTROL), and as can be seen there is now, in contrast to the situation observed in the presence of CCM A (see figure 2), a mixture of the linear (cytosol derived) and branched (Golgi derived) isomers of Man₅GlcNAc. The question now arises as to whether or not free oligosaccharides modified by Golgi enzymes, observed in the presence of SW, are transported through the Golgi as free oligosaccharides or are in fact N-linked to glycoproteins while in transit through this compartment prior to their being released from the peptide backbone in an upstream degradative compartment. To resolve this problem we added leupeptin, an inhibitor of lysosomal protein degradation (Bond and Butler, 1987) which does not affect the vesicular import of material into lysosomes (Rohrer, et al., 1995), to the SW-containing chase medium. As shown in figure 6 the quantity of the branched isomer of Man₅GlcNAc is reduced in a dose dependent manner without any affect being observed on the recovery of its linear counterpart. Therefore by employing 0.1 μM SW to provoke an accumulation of Man₅GlcNAc in the MBCs of HepG2 cells we demonstrate that the two isomers of this free oligosaccharide have different origins. Results indicate that the bulk of free Man₅GlcNAc produced by Golgi enzyme modifications (branched isomer) observed in

the MBCs of SW-treated cells arises from its passage through the Golgi apparatus while N-linked to glycoprotein and not as a free oligosaccharide. Thus although we can not rule out the possibility that small amounts of free oligosaccharides are transported from the ER to the Golgi apparatus our results demonstrate that if this pathway does exist it represents only a minor trafficking route for free oligosaccharides in HepG2 cells.

Inhibitors of macroautophagy do not effect the clearance of free oligosaccharides from the cytosol of HepG2 cells. Having demonstrated that the bulk of free oligosaccharides are transferred from the cytosol into a degradative organelle we went on to investigate the mechanism of this translocation process. Theoretically macroautophagy could be responsible for the clearance of oligosaccharides from the cytosol. To test this possibility we have performed chase incubations in the presence of well known inhibitors of macroautophagy. Pulse-chase experiments were performed as described in figure 1 except that the inhibitors were added to the chase incubations 45 minutes after the onset of the chase period. 3-MA inhibits the sequestration step of the autophagic process (Seglen and Gordon, 1982) therefore if autophagy were responsible for the clearance of free oligosaccharides from the cytosol we would expect this reagent to cause an accumulation of fully trimmed free oligosaccharides in this compartment. Figure 7 reveals this not to be the case and in fact after eight hours of chase 3-MA had no effect on the clearance of free oligosaccharides from the cytosolic compartment of HepG2 cells. However we did note that 3-MA caused an accumulation of free oligosaccharides in the MBCs, although this accumulation was not as large as that observed in the presence of CCM A it is known that 3-MA interferes with the acidification of lysosomes (Caro et al., 1988). Asparagine has been shown to block the fusion of autophagosomes with the lysosomal compartment (Hoyvik et al., 1991) and would, if autophagy were responsible for the clearance of cytosolic oligosaccharides, lead to the accumulation of fully trimmed free oligosaccharides within MBCs. Again figure 7 demonstrates that this was not the case and shows that the chase incubation performed in the presence of asparagine is not significantly different from the control chase incubation.

The transfer of free oligosaccharides from the cytosol into a MBC requires energy. In order to further investigate the nature of the cytosol-to-MBC translocation of free oligosaccharides in HepG2 cells we have investigated the energy dependence of this process. For this purpose we have performed chase incubations in the presence of reagents known to deplete ATP levels in cultured cells (Krijnse-Locker et al., 1994). Figure 8A demonstrates that when HepG2 cells are chased in the presence of deoxyglucose and sodium azide the total molar equivalents of free oligosaccharides within the cytosol remains approximately constant when compared to that observed during control chase periods. Thin-layer chromatographic examination of the cytosol-, and MBC-derived oligosaccharides generated in cells treated with inhibitors of mitochondrial respiration for 8 hours is shown in figure 8B and shows that although cytosolic demannosylation of free oligosaccharides has been completed in drug-treated cells the transfer of the cytosolic terminal digest product into a MBC is severely impaired leading to a marked cytosolic accumulation of Man₅GlcNAc. We observed essentially identical results when we performed chase incubations in the presence of 10 µg/ml oligomycin, a specific inhibitor of the mitochondrial H⁺/ATPase (Ziegler and Penefsky, 1993) (results not shown).

Subcellular fractionation reveals that the linear isomer of Man₅GlcNAc is degraded in lysosomes. We have examined the identity of the MBC in which cytosolically-generated free oligosaccharides are degraded by subcellular fractionation. As in the presence of CCM A the linear isomer of Man₅GlcNAc is stabilised in a MBC of permeabilised HepG2 cells we reasoned that in the absence of this drug free oligosaccharides are degraded within a subcellular compartment possessing a vacuolar H⁺/ATPase and an α-mannosidase with an acidic pH optimum. Although the lysosome best fits these criteria endosomes also possess a vacuolar H⁺/ATPase (Mellman et al., 1986), and in addition they are known to contain acidic hydrolases (Authier et al., 1994). In order to determine the nature of the MBC in which cytosolic free oligosaccharides are degraded we have fractionated HepG2 cell homogenates on a Percoll gradient known to be able to resolve endosomes from lysosomes (Rijnboutt et al., 1992). Initially we chose to fractionate HepG2 cells after treatment with CCM A, however

results presented in figure 9A demonstrate that when compared to subcellular fractionation of untreated cells this reagent caused a marked change in the distribution of the lysosomal marker enzyme, β -hexosaminidase, along the Percoll gradient while not disturbing the distributions of either the Golgi or endoplasmic reticulum marker enzymes. When CCM A treated cells were pulse-radiolabeled and then fractionated on a Percoll gradient we observed that free oligosaccharides (OS-GN2, not shown) are mainly localised to a region of the gradient containing endoplasmic reticulum and Golgi marker enzymes (figure 9B). After four hours of chase in the presence of CCM A free oligosaccharides are now distributed throughout the gradient in similar but not identical fashion to that observed for the lysosomal enzyme β -hexosaminidase.

Due to difficulties in interpreting these results we have used $0.1\mu\text{M}$ SW to provoke an accumulation of free oligosaccharides in the MBC of HepG2 cells prior to subcellular fractionation. As described above we have found that, at a concentration of $0.1\mu\text{M}$, SW mimics the effects of CCM A on the subcellular trafficking of free oligosaccharides in HepG2 cells. Treatment of HepG2 cells with $0.1\mu\text{M}$ SW for four hours did not dramatically affect the distributions of the lysosomal, Golgi or endoplasmic reticulum marker enzymes along the Percoll gradient (compare the top panel of figure 10 with control fractionations in figure 9A). In order to identify endosomal and lysosomal compartments HepG2 cells, treated for 4 hours with $0.1\mu\text{M}$ SW, were allowed to endocytose a brief pulse of the fluid phase marker, HRP, and then chased for various times (van Weert et al., 1995). Cellular homogenates were then fractionated on Percoll density gradients as shown in figure 10 (bottom panel). Results show that, after the pulse, HRP is found uniquely in a region of the gradient (see upper panel, fraction II), in which are found light membranes, including the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. After 4 hours of chase the HRP is now mainly found at the bottom of the gradient, a region shown to contain the lysosomes (see upper panel, fraction IV). These results are consistent with the transfer of the fluid phase marker from the endosomal compartment to the lysosomal compartment as previously described in HepG2 cells (van Weert et al., 1995). Cells treated with $0.1\mu\text{M}$ SW were then pulse-radiolabeled, chased for one and 4 hours, homogenised, and then subjected to subcellular fractionation on Percoll

density gradients. Figure 11A shows that after the pulse free oligosaccharides (OS-GN2, results not shown) are localised to a region of the gradient corresponding to the endoplasmic reticulum/Golgi region of the gradient, after four hours of chase free oligosaccharides (mainly Man₇₋₅GlcNAc, results not shown) now colocalise with the lysosomal marker enzyme β -hexosaminidase. Although only a small amount of free oligosaccharides were recovered from subcellular organelles after one hour of chase these components were distributed equally between regions of the gradient containing the lysosomal marker (fraction IV) and the endoplasmic reticulum/Golgi markers (fraction II). At this early chase time the the gradient fraction II contained free oligosaccharides bearing 9 and 8 residues of mannose whereas those occurring in the gradient fraction IV comprised oligosaccharides bearing 7-5 residues of mannose (results not shown). After thin-layer chromatography of free oligosaccharides recovered from the Percoll density gradients was performed the Man₅GlcNAc was recovered and quantitated as shown in the lower part of figure 11A. We were unable to detect this oligosaccharide in the subcellular organelles of pulse-radiolabeled cells but after one hour of chase small amounts of this component could be detected along the density gradient but was largely found in the lysosomal region of the gradient. After four hours of chase the distribution of Man₅GlcNAc along the Percoll gradient was indistinguishable from that of total free oligosaccharides and indicated that this component is uniquely localised in the lysosomal region of the gradient. HPAEC of the Man₅GlcNAc recovered from the lysosomal region of the Percoll gradients (fraction IV) revealed that after one hour of chase this fraction contained the linear isomer of Man₅GlcNAc, indicative of its having been generated by the cytosolic mannosidase. After 4 hours of chase both the linear and branched isomers of Man₅GlcNAc could be detected in the lysosomal region of the Percoll gradient. Therefore we show that after four hours of chase in either the presence of CCM A or 0.1 μ M SW free oligosaccharides are closely associated with a lysosomal marker enzyme after subcellular fractionation on Percoll density gradients.

DISCUSSION

Permeabilisation of the plasma membrane of HepG2 cells subsequent to pulse-chase incubations has enabled us to evaluate the hypothesis that cytosolic free oligosaccharides are sequestered into and degraded by lysosomes. Short chase incubations revealed that free oligosaccharides rapidly appear in the cytosol at a time during which there is a loss of these components from the MBCs (see figure 1A and B). This observation can be accounted for by the previously observed rapid translocation of large free polymannose-type oligosaccharides out of the ER into the cytosol (Moore et al., 1995). At present it is unclear whether this ER-to-cytosol transport of free oligosaccharides is the sole mechanism responsible for the appearance of free oligosaccharides in the cytosol. Recently it has been proposed that newly synthesised glycoproteins maybe translocated out of the ER and degraded in this compartment (Wiertz et al., 1996) by the actions of a cytosolic N-glycanase (Kitajima et al., 1995; Suzuki et al., 1994) and the proteasome (Ciechanover, 1994; Driscoll and Goldberg, 1990). Clearly such a phenomenon would also give rise to large free polymannose-type oligosaccharides in the cytosol. Whatever the origin of cytosolic oligosaccharides in HepG2 cells radioactivity associated with these components reach maximal levels at about one hour of chase and decline thereafter (see figure 1A and B). We have tested the hypothesis that cytosolic free oligosaccharides are translocated into lysosomes in order to be degraded. In order to do this we have performed pulse-chase experiments in the presence of a vacuolar H⁺/ATPase inhibitor. Concanamycins (Woo et al., 1992) are antibiotics which are closely related to bafilomycin A (Bowman et al., 1988) an agent which has been extensively used to investigate the acidification of intracellular organelles (Clague et al., 1994; Yilla et al., 1993; Yoshimori et al., 1991). In HepG2 cells the use of bafilomycin has demonstrated that vacuolar acidification is required for the transfer of fluid phase markers from endosomes to lysosomes (van Weert et al., 1995) and concanamycin B has been shown to perturb the trafficking and processing of glycoproteins in late Golgi compartments. Presumably then, vacuolar ATPase inhibitors block lysosomal degradation by inhibiting vesicular transport of certain substrates to the lysosome, and by increasing intralysosomal pH, thereby reducing acidic hydrolase activity. Accordingly we reasoned that this reagent should allow us to

examine the fate of cytosolic oligosaccharides without interference by those oligosaccharides generated during glycoprotein catabolism in the lysosome. We have shown that CCM A is able to substantially inhibit the SW-provoked appearance of the branched isomer of Man₅GlcNAc in the MBC of HepG2 cells suggesting that glycoconjugates that have traversed the Golgi apparatus and which are destined for the lysosome are stabilised in the presence of this agent (data not shown). Here we show that despite its ability to block lysosomal glycoprotein degradation CCM A provoked an accumulation of free oligosaccharide in a MBC of HepG2 cells. This accumulation coincided precisely with the loss of free oligosaccharide from the cytosolic compartment. In addition we were able to show that the structures of the oligosaccharides that accumulated in a MBC of CCM A-treated cells were characteristic of their having been generated by the cytosolic mannosidase. These results clearly demonstrate the transfer of free oligosaccharides from the cytosol into a MBC. We went on to show that treating HepG2 cells with 100 μ M SW blocked the trimming of cytosolic oligosaccharides by the cytosolic mannosidase and inhibited their loss from this compartment. As in the presence of 100 μ M SW oligosaccharides bearing 9 and 8 residues of mannose are stabilised with only a minor quantity of Man₇GlcNAc being detected in the cytosolic compartment we conclude that most, if not all, cytosolic free oligosaccharides must be derived from a pre-Golgi compartment (SW does not inhibit either the Golgi mannosidase I (Elbein et al., 1981), see figure 5C, or ER mannosidase I (Weng and Spiro, 1996). Our results show that Man_{7.5}GlcNAc oligosaccharides can be cleared from the cytosol although our results strongly suggest that the smaller the oligosaccharide the more efficient its clearance from the cytosol. The small amounts of Man₇GlcNAc that are transferred into the MBC are slowly trimmed during the chase suggesting that CCM A induced neutralisation of degradative organelles is not complete (see figure 1B). Although lysosomal enzymes are known not to generate linear isomers of polymannose-type oligosaccharides (Michalski, et al. 1990; Al Daher, et al. 1991) it is not clear what isomer of Man₅GlcNAc would be generated from Man₇GlcNAc in the CCM A-sensitive MBC but it is interesting to note that analysis of the MBC-derived Man₅GlcNAc generated during CCM A chases always lead to the detection of small amounts of an oligosaccharide that lost one mannose residue upon digestion with the

α -1, 2 mannosidase (see figure 2). In conclusion evidence demonstrates that cytosolic oligosaccharides are partially trimmed in the cytosol and transferred into a membrane bound compartment. Concerning the relationship between cytosolic trimming and clearance of free oligosaccharides from the cytosol two observations have to be discussed. Firstly figures 1 and 4 indicate that there is an apparent "hold up" of the trimming of cytosolic oligosaccharides at the Man₇GlcNAc stage. Secondly inspection of the rate of free oligosaccharide clearance from the cytosol indicates that this process is somewhat slower than the rate of appearance of these components in the cytosol (which is apparently complete after one hour of chase, see figure 3) a fact that would lead to a steady accumulation of oligosaccharide material in this compartment. These two observations maybe related. We have preliminary data showing that the 5mM mannose required to be added to the chase incubation media may both slow down the trimming of cytosolic free oligosaccharides and slow down their clearance from this compartment (data not shown). Thus under physiological conditions it may be that cytosolic trimming is more efficient allowing a more rapid generation of the Man₅GlcNAc, which maybe cleared from the cytosol more efficiently than its more highly mannosylated counterparts.

After trimming in the cytosol free oligosaccharides are translocated into lysosomes where they are degraded. Subcellular fractionation of HepG2 cells chased in the presence of 0.1 μ M SW for one and four hours indicated that the distribution of free oligosaccharides along Percoll gradients was the same as that observed for the lysosomal marker enzyme β -hexosaminidase. Because we were interested in the final destination of cytosolic free oligosaccharides we have not directly addressed the question of whether free oligosaccharides are in fact transported from the cytosol directly into the lysosome. It is possible that the cytosol-to-MBC oligosaccharide translocation machinery is located on a prelysosomal compartment which ultimately fuses with lysosomes. In this respect our results (figures 1-4) with the vacuolar ATPase inhibitor, CCM A, do not necessarily imply that the MBC into which free oligosaccharides are transported contains a pH-sensitive α -mannosidase. It is possible that free oligosaccharides may be stabilised in CCM A-treated HepG2 cells because

the MBC into which they have been translocated can not fuse with lysosomes whose membrane pH gradient has been perturbed. Indeed subcellular fractionation studies performed on CCM A-treated cells indicate that substantial amounts of free oligosaccharide are found in the endosomal region of the Percoll gradient suggesting that free oligosaccharides may not be transported directly into lysosomes. However some of our observations suggest that free oligosaccharides maybe transported directly into lysosomes. Firstly, in the presence of CCM A we were able to detect substantial amounts of free oligosaccharides bearing 3 and 4 residues of mannose in the vesicular compartment suggesting that once translocated into this compartment these components come into contact with and are slowly acted upon by an α -mannosidase with a low pH optimum. However as endosomes may contain an acidic α -mannosidase (Authier, et al. 1994) this result still leaves the possibility that free oligosaccharides are transported into endosomes and are then rapidly transferred to lysosomes by vesicular fusion. Although we can not rule out this possibility we noted that even when cells were chased in the presence of 0.1 μ M SW for only one hour the majority of Man₅GlcNAc recovered from the density gradient occurred in the lysosomal fraction and not in the endosomal fraction. The fact that substantial quantities of the endosomal marker HRP remain associated with endosomes 4 hours after an HRP pulse suggests that fluid transfer between endosomes and lysosomes would not be rapid enough to account for the absence of free oligosaccharides in the endosomal compartment if indeed these components had been translocated from the cytosol into endosomes, and then onto lysosomes by vesicular transport.

How are free oligosaccharides cleared from the cytosol?

Examining the kinetics of loss of free oligosaccharides from cytosol yields useful information concerning the mechanism of this translocation process. Firstly, as the cytoplasm of cells is continually sequestered by vesicles and delivered to lysosomes by macroautophagy we wondered whether or not this bulk sequestration of the cytosol could account for the delivery of free cytosolic oligosaccharides to the lysosome. It has been shown that by starving hepatocytes of serum, autophagic sequestration can be stimulated 10 fold and under

these conditions only 4% of the cytoplasm can be sequestered per hour (Kopitz et al., 1990). Here, despite the fact that HepG2 cells are chased in complete growth medium, a condition known to inhibit autophagy, we noted that oligosaccharides are cleared from the cytosol with a half-life of about 3-4 hours. Thus it is apparent that autophagic sequestration can not account for the transfer of free oligosaccharides into a vesicular compartment of HepG2 cells. In accordance with this we found that 3-MA a well known inhibitor of autophagic sequestration (Seglen and Gordon, 1982) was without effect on the loss of oligosaccharide material from the cytoplasm. Furthermore as autophagic sequestration is a non-selective process it should theoretically transfer all cytosolic oligosaccharides irrespective of structure into lysosomes. Our results with CCM A (figure 4) and 100 μ M SW (figure 5) suggest that trimming of polymannose oligosaccharides to at least Man₇GlcNAc is required before they are efficiently transferred into lysosomes, indicating that free oligosaccharides are not being sequestered into the lysosomal degradative compartment by bulk uptake of the cytosol. We demonstrate that the cytosol-to-lysosome translocation of free oligosaccharides is strongly impaired if the cells are chased under conditions known to deplete cellular ATP levels. This result is not surprising as in the presence of CCM A or 0.1 μ M SW the cytosol-to-lysosome transfer of free oligosaccharides must occur against a substantial concentration gradient. It remains to be determined whether this transport process is accomplished by a transporter molecule or by an as yet unidentified mechanism such as a type of receptor mediated microautophagy. In conclusion our results suggest that free oligosaccharides are sequestered into lysosomes by an energy requiring process that displays oligosaccharide specificity.

What are the consequences of the sequestration of cytosolic free oligosaccharides in lysosomes?

The results we have obtained with HepG2 cells throw light on a problem that has perplexed researchers investigating the genetic disorder, α -mannosidosis (see discussion in Tulsiani and Touster, 1987, and conclusion in Daniel et al., 1992). Mannosidosis patients have a genetic deficiency in lysosomal α -mannosidase (Carroll et al., 1972) which leads to severe clinical symptoms. At a biochemical level the lesion is characterised by the presence of large quantities of free oligosaccharides in the tissues and urine from affected individuals.

Surprisingly, however, a substantial proportion of the oligosaccharides isolated from the urine of mannosidosis patients possess structures not compatible with their having been formed by the incomplete degradation of complex oligosaccharides derived from lysosomal glycoprotein degradation. In fact the structures of these oligosaccharides were found to be linear in nature (Daniel et al., 1992; Nordén et al., 1974; Strecker et al., 1976), the largest of which being identical to the linear $\text{Man}_5\text{GlcNAc}$ shown in figure 2. The trafficking of free polymannose oligosaccharides from ER to cytosol and, after processing, into the lysosome may now explain the accumulation of the linear oligosaccharides observed in subjects deficient in lysosomal α -mannosidase, however, how these components gain access to the extracellular fluids still remains to be elucidated. In fact we have calculated that in CCM A-treated HepG2 cells 15% of all oligosaccharide structures (including N-linked polymannose-, complex-, and hybrid-type structures, and free oligosaccharides) occur as free polymannose species indicating that this recently outlined free oligosaccharide trafficking pathway must process large quantities of material in cells actively engaged in glycoprotein synthesis (Data not shown). This observation is in line with the fact that the urine of mannosidosis patients may contain up to 250 mg/l of small linear oligosaccharides (Strecker et al., 1976).

An intriguing question can now to be addressed: Why has the cell developed such an elaborate trafficking pathway for the degradation of free oligosaccharides generated in the lumen of the ER when two vesicular pathways already exist between the ER and lysosome? One explanation for this is that free oligosaccharides must be rapidly segregated from their N-linked counterparts in the ER in order to minimise their interference with the folding and trafficking of glycoproteins, a process now thought to involve lectins situated along the secretory pathway (Fiedler and Simmons, 1995). Alternatively free oligosaccharides maybe delivered to the cytosol for a purpose other than to be trimmed in order for their ultimate degradation in the lysosome. Interestingly, the cytosol contains an actin-binding protein, comitin (Weiner et al., 1993), which has recently been shown to be also a mannose-binding lectin (Jung et al., 1996). It was proposed that while the lectin moiety of this protein could bind to cytosolically disposed mannose-containing oligosaccharide-lipids of the Golgi/ER its actin-binding domain could tether it to microfilaments (Jung et al., 1996), thereby forming a

bridge between the cytoskeleton and organelles of the secretory pathway. Could cytosolic free oligosaccharides compete for binding sites on comitin thereby modulating this process?

In conclusion our results show that after their rapid appearance in the cytosol during glycoprotein biosynthesis free oligosaccharides are trimmed by the cytosolic mannosidase and transferred into lysosomes by an energy-dependent mechanism. Our results show that the lysosome is the site for the final degradation of these oligosaccharides and suggest that the lysosomal membrane is itself involved in the uptake of free polymannose-type oligosaccharides from the cytosol.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. J. R. Green (Ciba-Geigy Ltd.) for the gift of concanamycin A, Dr. J-C. Michalski for supplying the two standard Man₅GlcNAc oligosaccharides, and Dr. C. Rabouille for critical reading of the manuscript. HPAEC was performed by Dr. Thierry Fontaine (Laboratoire des Aspergillus, Institut Pasteur, Paris. Dir. Dr. J-P. Latgé). This work was supported by institutional funding from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and by grants from the Association Vaincre les Maladies Lysosomales and a European Community Human Mobility and Research Training Fellowship (to S. E. H. M).

ABBREVIATIONS

CCM A, concanamycin A; DOG, deoxyglucose; GlcNAc, N-acetylglucosamine; Man, mannose; MBC, membrane bound compartment; 3-MA, 3-methyladenine; SLO, streptolysin O; SW, swainsonine.

REFERENCES

- Al Daher, S., De Gasperi, R., Daniel, P., Hall, N., Warren, C. D. and Winchester, B. (1991). Substrate specificity of human lysosomal α -D-mannosidase in relation to genetic α -mannosidosis. *Biochem. J.* **277**, 743-751.
- Amano, J. and Kobata, A. (1986). Purification and characterisation of a novel α -mannosidase from *Aspergillus saitoi*. *J. Biochem.* **99**, 1645-1654.
- Anumula, K. R. and Spiro, R. G. (1983). Release of glucose-containing polymannose oligosaccharides during glycoprotein biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **258**, 15274-15282.
- Authier, F., Posner, B. I. and Bergeron, J. J. M. (1994). Hepatic endosomes are a major physiological locus of insulin and glucagon degradation in vivo. In **Cellular Proteolytic Systems** (Ciechanover, A. J. and Schwartz, A. L., Eds.), 89-113.
- Barker, R., Olsen, K. W., Shaper, J. H. and Hill, R. L. (1972). Agarose derivatives of uridine diphosphate and N-acetylglucosamine for the purification of a galactosyltransferase *J. Biol. Chem.* **253**, 7135-7147.
- Bischoff, J., Liscum, L. and 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.
- Bond, J. S. and Butler, P. E. (1987) Intracellular proteases. *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 333-364
- Bowman, E. J., Siebers, A. and Altendorf, K. (1988). Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 7972-7976.
- Cacan, R., Cecchelli, R. and Verbert, A. (1987). Catabolic pathway of oligosaccharide-diphospho-dolichol. *Eur. J. Biochem.* **166**, 469-474.
- Caro, L. H. P., Plomp, P. J. A. M., Wolvetang, E. J., Kerkhof, C. and Meijer, A. J. (1988). 3-Methyladenine, an inhibitor of autophagy, has multiple effects on metabolism. *Eur. J. Biochem.* **175**, 325-329.
- Carroll, M., Dance, N., Masson, P. K., Robinson, D. and Winchester, B. J. (1972). Human mannosidosis - the enzyme defect. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **49**, 579-583.

- Ciechanover, A. (1994). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell* **79**, 13-21.
- Clague, M. J., Urbé, S., Aniento, F. and Gruenberg, J. (1994). Vacuolar ATPase activity is required for endosomal carrier vesicle formation. *J. Biol. Chem.* **269**, 21-24.
- Daniel, P. F., Evans, J. E., De Gaspari, R., Winchester, B. and Warren, C. D. (1992). A human lysosomal $\alpha(1-6)$ -mannosidase active on the branched trimannosyl core of complex glycans. *Glycobiology* **2**, 327-336.
- Driscoll, J. and Goldberg, A. L. (1990). The proteasome (multicatalytic protease) is a component of the 1500-kDa proteolytic complex which degrades ubiquitin-conjugated proteins. *J. Biol. Chem.* **265**, 4789-4792.
- Elbein, A. D., Solf, R., Dorling, P. R. and Vosbeck, K. (1981). Swainsonine: an inhibitor of glycoprotein processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 7393-7397.
- Fiedler, K. and Simmons, K. (1995). The role of N-glycans in the secretory pathway. *Cell* **81**, 309-312.
- Haeuw, J.-F., Strecker, G., Wieruszkeski, J.-M., Montreuil, J. and Michalski, J.-C. (1991). Substrate specificity of rat liver cytosolic α -D-mannosidase. *Eur. J. Biochem.* 1257-1268.
- Hoyvik, H., Gorden, P. B., Berg, T. O., Stromhaug, P. E. and Seglen, P. O. (1991). Inhibition of autophagic-lysosomal delivery and autophagic lactolysis by asparagine. *J. Cell Biol.* **113**, 1305-1312.
- Jung, E., Fucini, P., Stewart, M., Noegel, A. A. and Schleicher, M. (1996). Linking microfilaments to intracellular membranes: the actin-binding and vesicle-associated protein comitin exhibits a mannose-specific lectin activity. *EMBO J.* **15**, 1238-1246.
- Kataoka, T., Muroi, M., Ohkuma, S., Waritani, T., Magae, J., Takatsuki, A., Kondo, S., Yamasaki, M. and Nagai, K. (1995). Prodigiosin 25-C uncouples vacuolar type H⁺-ATPase, inhibits vacuolar acidification and affects glycoprotein processing. *FEBS Letts.* **359**, 53-59.
- Kitajima, K., Suzuki, T., Kouchi, Z., Inoue, S. and Inoue, Y. (1995). Identification and distribution of peptide: N-glycanase (PNGase) in mouse organs. *Arch. Biochem. Biophys.* **319**, 393-401.

- Kmiécik, D., Herman, V., Stroop, C. J. M., Michalski, J.-C., Mir, A. M., Labiau, O., Verbert, A. and Cacan, R. (1995). Catabolism of glycan moieties of lipid intermediates leads to a single Man₅GlcNAc oligosaccharide isomer: a study with permeabilised CHO cells. *Glycobiology* **5**, 483-494.
- Kopitz, J., Kisen, G. O., Gorden, P. B., Bohley, P. O. and Seglen, P. O. (1990). Nonselective autophagy of cytosolic enzymes by isolated rat hepatocytes. *J. Cell Biol.* **111**, 941-953.
- Kornfeld, R. and Kornfeld, S. (1985). Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 631-664.
- Krijnse-Locker, J., Ericsson, M., Rottier, P. J. M. and Griffiths, G. (1994). Characterisation of the budding compartment of mouse hepatitis virus: evidence that the transport from the RER to the Golgi complex requires only one vesicular transport step. *J. Cell Biol.* **124**, 55-70.
- Michalski, J.-C., Haeuw, J.-F., Wieruszkeski, J.-M., Montreuil, J. and Strecker, G. (1990). In vitro hydrolysis of oligomannosyl oligosaccharides by the lysosomal α -D-mannosidases. *Eur. J. Biochem.* **189**, 369-379
- Mellman, I., Fuchs, R. and Helenius, A. (1986). Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Ann. Rev. Biochem.* **55**, 663-700.
- Moore, S. E. H., Bauvy, C. and Codogno, P. (1995). Endoplasmic reticulum-to-cytosol transport of free polymannose oligosaccharides in permeabilised HepG2 cells. *EMBO J.* **14**, 6034-6042.
- Moore, S. E. H. and 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.
- Moore, S. E. H. and Spiro, R. G. (1994). Intracellular compartmentalisation and degradation of free polymannose oligosaccharides released during glycoprotein biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **269**, 12715-12721.

- Nordén, N. E., Lundblad, A., Svensson, S. and Autio, S. (1974). Characterisation of two mannose-containing oligosaccharides isolated from the urine of patients with mannosidosis. *Biochemistry* **13**, 871-874.
- Oku, H. and Hase, S. (1991). Studies on the substrate specificity of neutral α -mannosidase purified from Japanese quail oviduct by using sugar chains from glycoproteins. *J. Biochem.* **110**, 982-989.
- Opheim, D. J. and Touster, O. (1977). The purification and characterisation of rat liver lysosomal α -L-fucosidase. *J. Biol. Chem.* **252**, 739-743.
- Pierce, R. J., Spik, G. and Montreuil, J. (1979). Demonstration and cytosolic localisation of an endo-N-acetyl- β -D-glucosaminidase activity towards an asialo-N-acetyl-lactosaminic-type substrate in rat liver. *Biochem. J.* **180**, 673-676.
- Rijnboutt, S., Stoorvogel, W., Geuze, H. J. and Strous, G. J. (1992). Identification of subcellular compartments involved in biosynthetic processing of cathepsin-D. *J. Biol. Chem.* **267**, 15665-15672.
- Rohrer, J., Schweizer, A., Johnson, K. F. and Kornfeld, S. (1995). A determinant in the cytoplasmic tail of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor prevents trafficking to lysosomes. *J Cell Biol* **130**, 1297-1306.
- Seglen, P. O. and Gordon, P. B. (1982). 3-methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 1889-1892.
- Shoup, V. and Touster, O. (1976). Purification and characterisation of the α -D-mannosidase of rat liver cytosol. *J. Biol. Chem.* **251**, 3845-3852.
- Strecker, G., Fournet, B., Bouquelet, S., Montreuil, J., Dhondt, J. L. and Farriaux, J.-P. (1976). Etude chimique des mannosides urinaires excrétées au cours de la mannosidose. *Biochimie* **58**,
- Suzuki, T., Kitajima, K., Inoue, S. and Inoue, Y. (1994). Does an animal peptide: N-glycanase have the dual role as an enzyme and a carbohydrate-binding protein? *Glycoconjugate J.* **11**, 469-476.

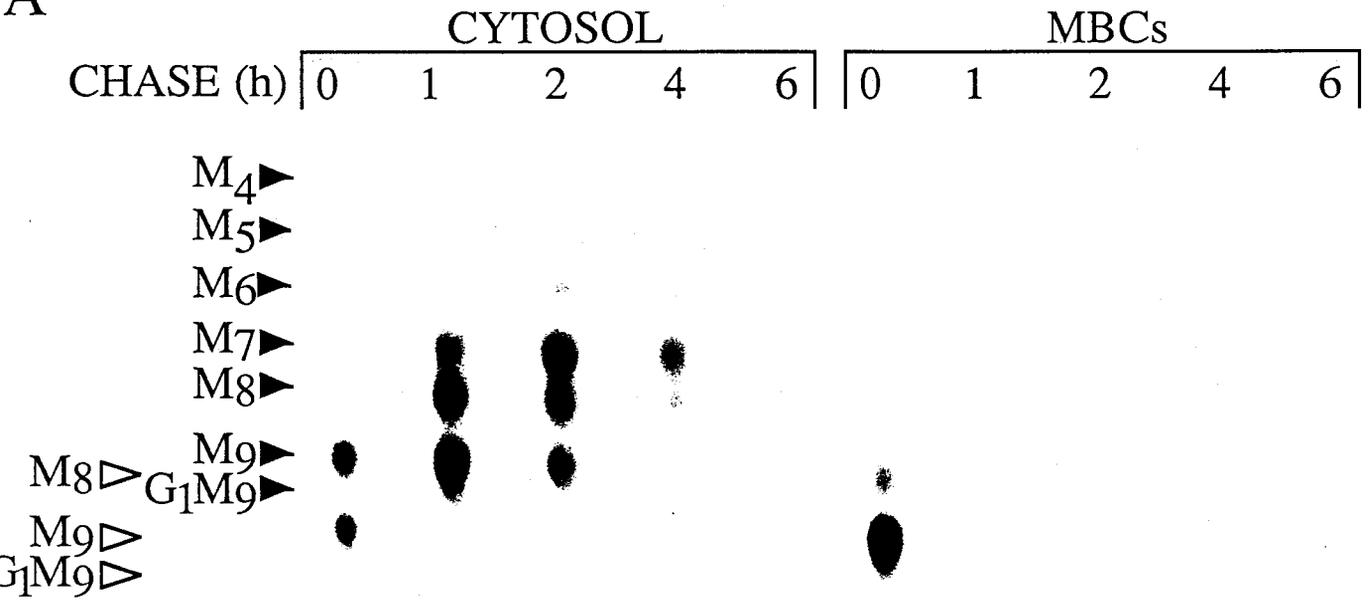
- Townsend, R. R., Atkinson, P. H. and Trimble, R. B.** (1991). Separation of high-mannose isomers from yeast and mammalian sources using high-pH anion-exchange chromatography. *Carbohydrate Research* **215**, 211-217.
- Tulsiani, D. R. P. and Touster, O.** (1987). Substrate specificities of rat kidney 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.
- van Weert, A. W. M., Dunn, K. W., Geuze, H. J. and Maxfield, F. R.** (1995). Transport from late endosomes to lysosomes, but not sorting of integral membrane proteins in endosomes, depends on the vacuolar proton pump. *J. Cell Biol.* **130**, 821-834.
- Weiner, O. H., Murphy, J., Griffiths, G., Schleicher, M. and Noegel, A. A.** (1993). The actin-binding protein comitin (p24) is a component of the Golgi apparatus. *J. Cell Biol.* **123**, 23-34.
- Weng, S. and Spiro, R. G.** (1996). Endoplasmic reticulum kifunensine-resistant α -mannosidase is enzymatically and immunologically related to the cytosolic α -mannosidase. *Arch. Biochem. Biophys.* **325**, 113-123.
- Wieland, F. T., Gleason, M. L., Serafini, T. A. and Rothman, J. E.** (1987). The rate of bulk flow from the endoplasmic reticulum to the cell surface. *Cell* **50**, 289-300.
- Wiertz, E. J. H. J., Joner, T. R., Sun, L., Bogyo, M., Geuze, H. J. and Ploegh, H. L.** (1996). The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC Class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Cell* **84**, 769-779.
- Woo, J.-T., Shinohara, C., Sakai, K., Hasumi, K. and Endo, A.** (1992). Isolation, characterisation and biological activities of concanamycins as inhibitors of lysosomal acidification. *J. Antibiotics* **45**, 1108-1116.
- Yilla, M., Tan, A., Ito, K., Miwa, K. and Ploegh, H. L.** (1993). Involvement of the vacuolar H^+ -ATPases in the secretory pathway of HepG2 cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 19092-19100.
- Yoshimori, T., Yamamoto, A., Moriyama, Y., Futai, M. and Tashiro, Y.** (1991). Bafilomycin A1: A specific inhibitor of vacuolar-type H^+ -ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *J. Biol. Chem.* **266**, 17707-17712.

Ziegler, M. and Penefsky, H. S. (1993). The adenine nucleotide translocase modulates oligomycin-induced quenching of pyranine fluorescence in submitochondrial particles. *J. Biol. Chem.* 268, 25320-25328.

FIGURE LEGEND 1

The effect of concanamycin A on the generation and fate of free oligosaccharides in HepG2 cells. Control (A) or CCM A-treated (B) HepG2 cells were pulse-radiolabeled with D-[2-³H]mannose for 20 minutes and then chased for the indicated times. Cells were then cooled, placed in suspension, and permeabilised with SLO as described in Materials and Methods to yield fractions corresponding to the cytosol (CYTOSOL) and membrane bound compartments (MBCs). Free oligosaccharides were prepared from each of these fractions and then resolved by thin-layer chromatography, on silica-coated plates. The abbreviations associated with the solid arrow heads are; G₁M₉ Glc₁Man₉GlcNAc; M₉, Man₉GlcNAc; M₈, Man₈GlcNAc; M₇, Man₇GlcNAc; M₆, Man₆GlcNAc; M₅, Man₅GlcNAc; M₄, Man₄GlcNAc; M₃, Man₃GlcNAc. Those associated with the open arrow heads are; G₁M₉, Glc₁Man₉GlcNAc₂; M₉, Man₉GlcNAc₂; M₈, Man₈GlcNAc₂.

A



B

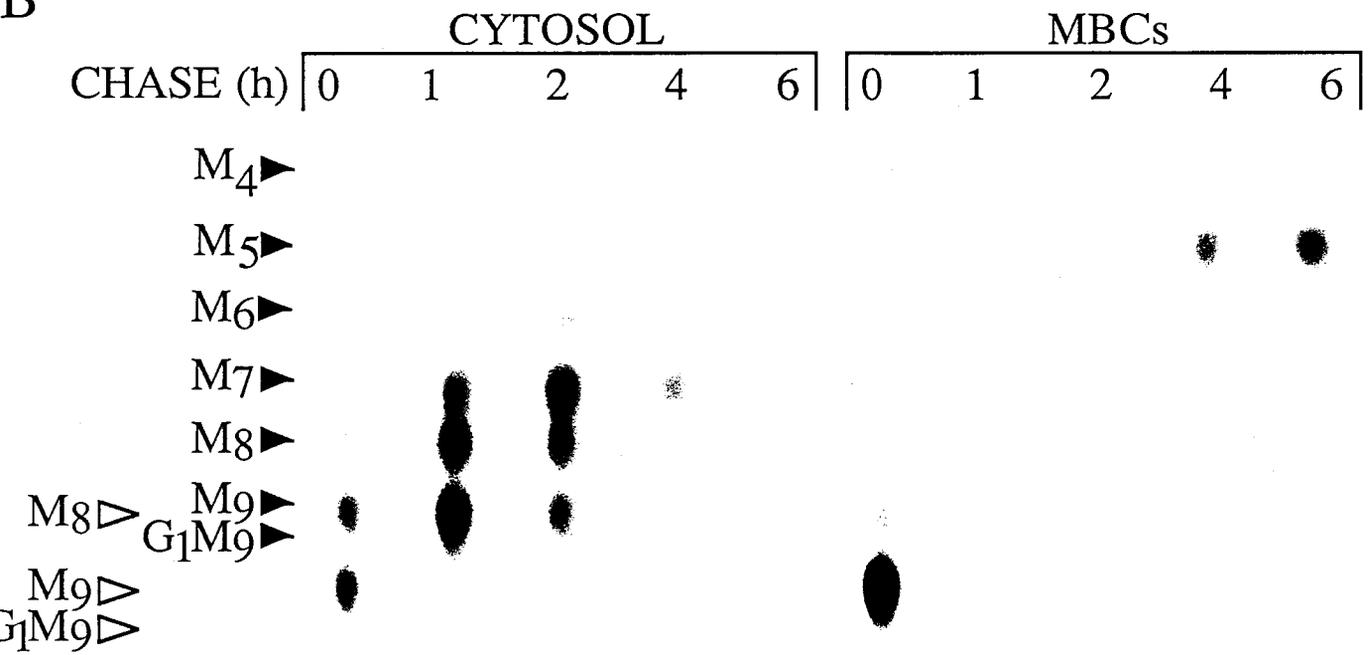
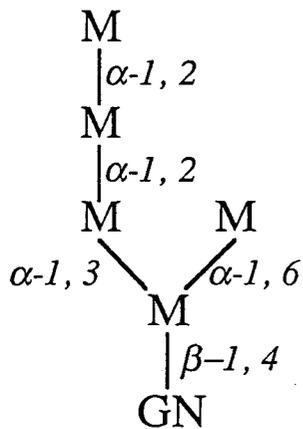
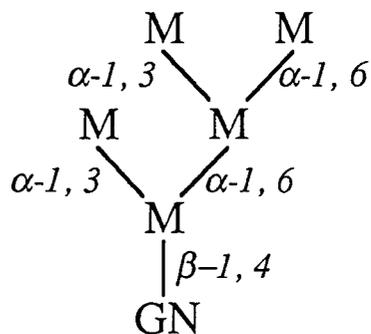


FIGURE LEGEND 2

The linear isomer of $\text{Man}_5\text{GlcNAc}$ accumulates in a membrane bound compartment of CCM A- treated HepG2 cells. HepG2 cells were pulse-radiolabeled and chased for 4 hours in the presence of CCM A as described in Materials and Methods. The cells were then permeabilised with SLO and oligosaccharides were purified from the resulting MBC as previously described and subsequent to thin-layer chromatography as shown in figure 1B the component migrating as $\text{Man}_5\text{GlcNAc}$ was recovered and aliquots of this oligosaccharide were then digested with either jack-bean α -mannosidase (*JACK BEAN*) or an α -1, 2 mannosidase (α -1, 2). After desalting, the digestion products were resolved by thin-layer chromatography on a cellulose-coated plate. Subsequent to visualisation of resolved components by fluorography they were eluted from the chromatography plate and assayed by scintillation counting. The molar equivalents of the resolved components were calculated and, after summing, the percentage molar distribution of the digestion products was calculated. The cytosolic mannosidase generates an isomer (LINEAR) of $\text{Man}_5\text{GlcNAc}$ that contains two α -1, 2-linked mannose residues whereas Golgi mannosidase I leads to the formation of a $\text{Man}_5\text{GlcNAc}$ isomer (BRANCHED) devoid of α -1, 2-linked mannose residues. The abbreviations are as follows: M_5GN , $\text{Man}_5\text{GlcNAc}$; M_4GN , $\text{Man}_4\text{GlcNAc}$; M_3GN , $\text{Man}_3\text{GlcNAc}$; M_2GN , $\text{Man}_2\text{GlcNAc}$; MGN , ManGlcNAc ; M , Mannose.



(LINEAR)



(BRANCHED)

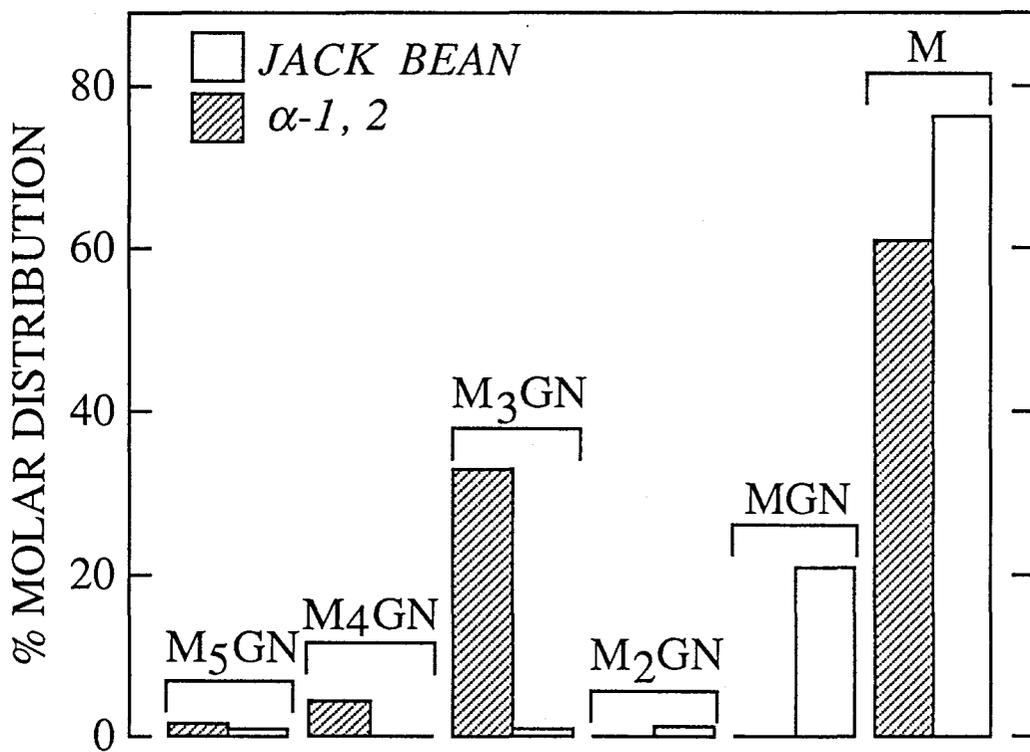


FIGURE LEGEND 3

Quantitation of the transfer of free oligosaccharides from the cytosol into a membrane bound compartment of CCM A-treated HepG2 cells. Cells were pulse-radiolabeled and chased in either the absence (CONTROL) or presence (CCM A) of CCM A. After isolation from both the cytosolic and membrane bound compartments free oligosaccharides were resolved by thin-layer chromatography as described in figure 1. Subsequent to fluorography each of the resolved components were quantitated by densitometry. The molar equivalent (MEq.) of any given oligosaccharide was then calculated by dividing its estimated quantity by the number of mannose residues the component contained. Molar equivalents of all cytosolic (open circles) oligosaccharides were summed and the same procedure was applied to free oligosaccharides derived from the MBCs (closed circles). The open triangles represent the sum of the molar equivalents of the cytosolic and MBC components. The values reported in this figure were calculated from data obtained from the two pulse-chase experiments.

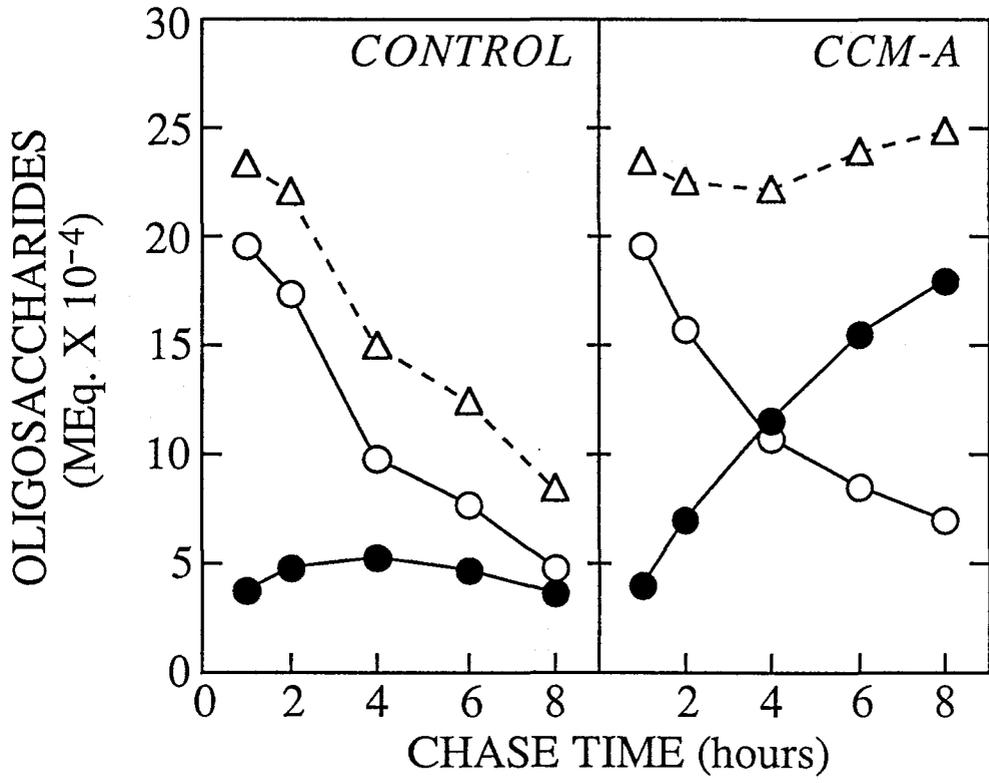


FIGURE LEGEND 4

Different oligosaccharides appear in the membrane-bound compartment at different rates. Using the same data that was used for figure 3 the total cellular molar equivalents of the resolved oligosaccharides were displayed as shown at the 1, 2 and 4 hour chase times (upper panel), whereas the percent of each indicated component found to be present in the MBCs is plotted directly below. The abbreviations are; M₉, Man₉GlcNAc; M₈, Man₈GlcNAc; M₇, Man₇GlcNAc; M₆, Man₆GlcNAc; M₅, Man₅GlcNAc.

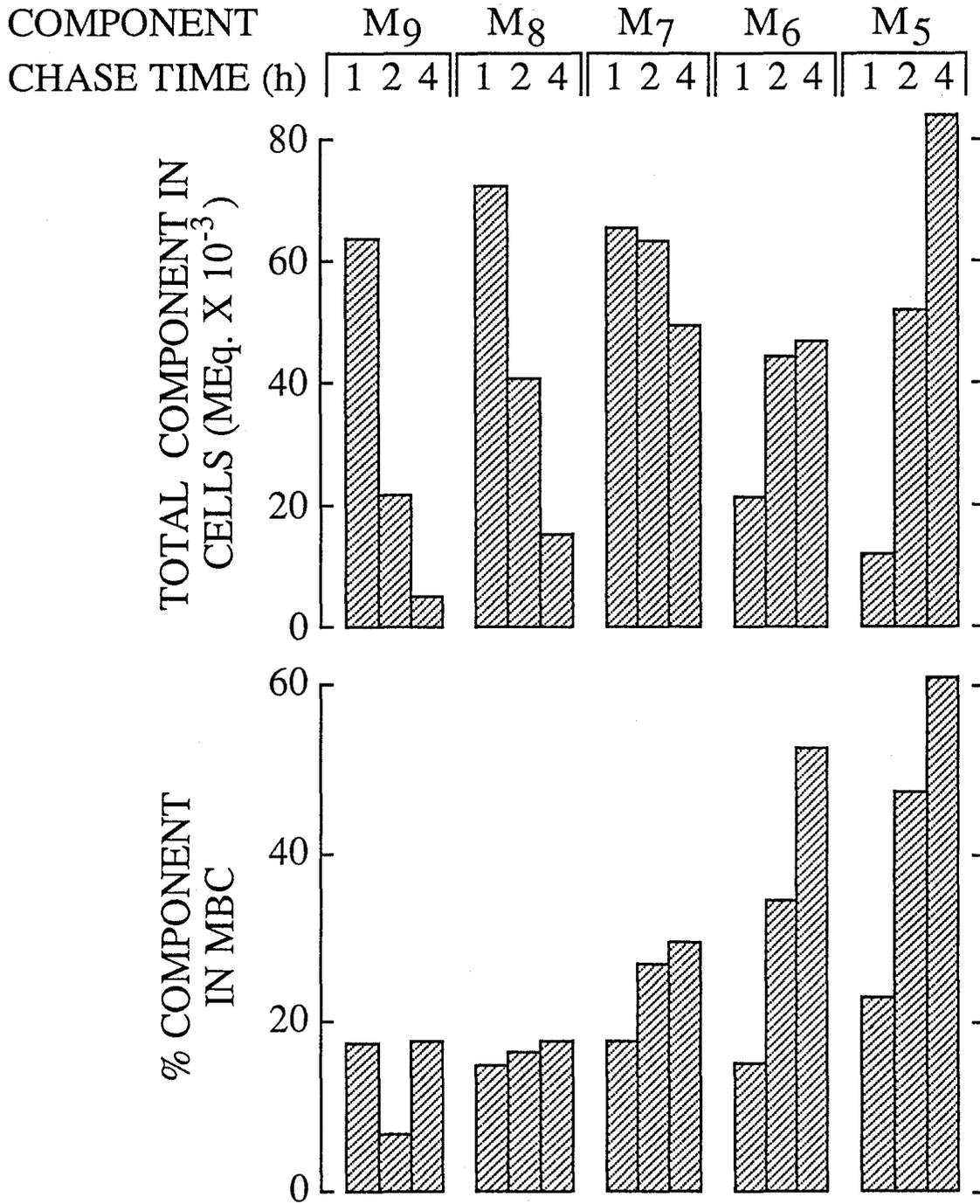
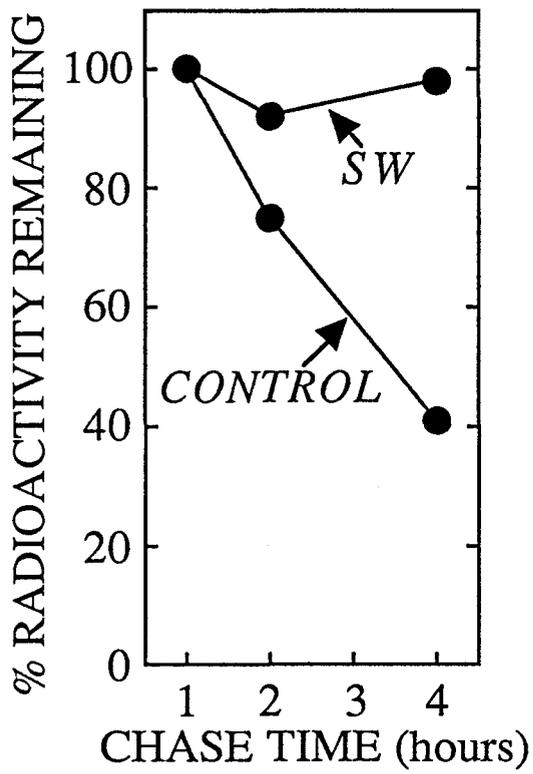


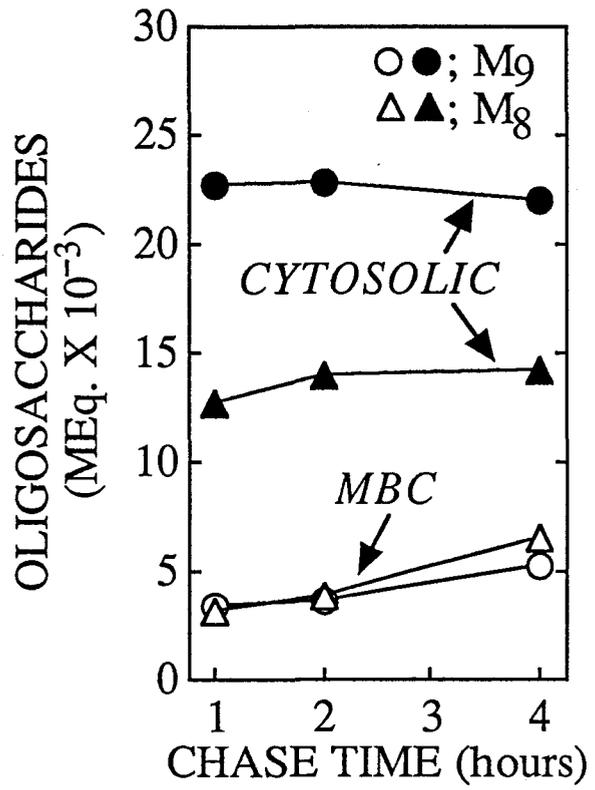
FIGURE LEGEND 5

The effects of swainsonine on the subcellular trafficking and processing of free polymannose oligosaccharides. HepG2 cells were pulse-radiolabeled and chased for the indicated times in the absence (*CONTROL*) or presence (*SW*) of 100 μ M SW as described in the legend to figure 1. (A) After permeabilisation of the cells free oligosaccharides were isolated from the cytosolic compartment and quantitated by scintillation counting. After 1 hour of chase the quantity of free oligosaccharides in the cytosol are maximal (see figure 1) and this value has been set at 100%. During the chase the radioactivity associated with free oligosaccharides remaining in the cytosol has been expressed as a percent of the 1 hour chase value. (B) After thin-layer chromatographic resolution of free oligosaccharides isolated from the cytosolic compartment (*CYTOSOLIC*) and membrane bound compartments (*MBC*) of cells radiolabeled and chased in the presence of 100 μ M SW, components (*M*₉, Man₉GlcNAc; *M*₈, Man₈GlcNAc) were quantitated as described in the legend to figure 3. (C) After permeabilisation of cells that had been chased for 4 hours in the presence of 100 μ M SW free oligosaccharides were isolated from the cytosolic (*CYTOSOL*) and membrane-bound compartments (*MBCs*) and resolved by thin layer chromatography on silica-coated plates. The abbreviations are as defined in the legend to figure 1.

A



B



C

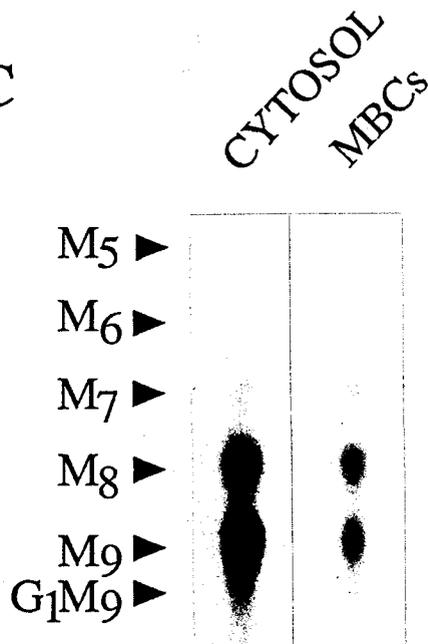


FIGURE LEGEND 6

Leupeptin inhibits the formation of the branched isomer of Man₅GlcNAc in swainsonine-treated HepG2 cells. HepG2 cells were pulse-radiolabeled and chased for four hours in the presence of 0.1 μM SW (*CONTROL*). Where indicated the chase media were supplemented with leupeptin (*LEU*) at either 100 or 300 μg/ml. After permeabilisation of the cells and isolation of free oligosaccharides from the MBCs the resulting radioactive components were resolved by HPAEC as described in Materials and Methods. The region of the chromatograph corresponding to the elution times of the linear (*LINEAR*) and branched (*BRANCHED*) isomers of Man₅GlcNAc is shown.

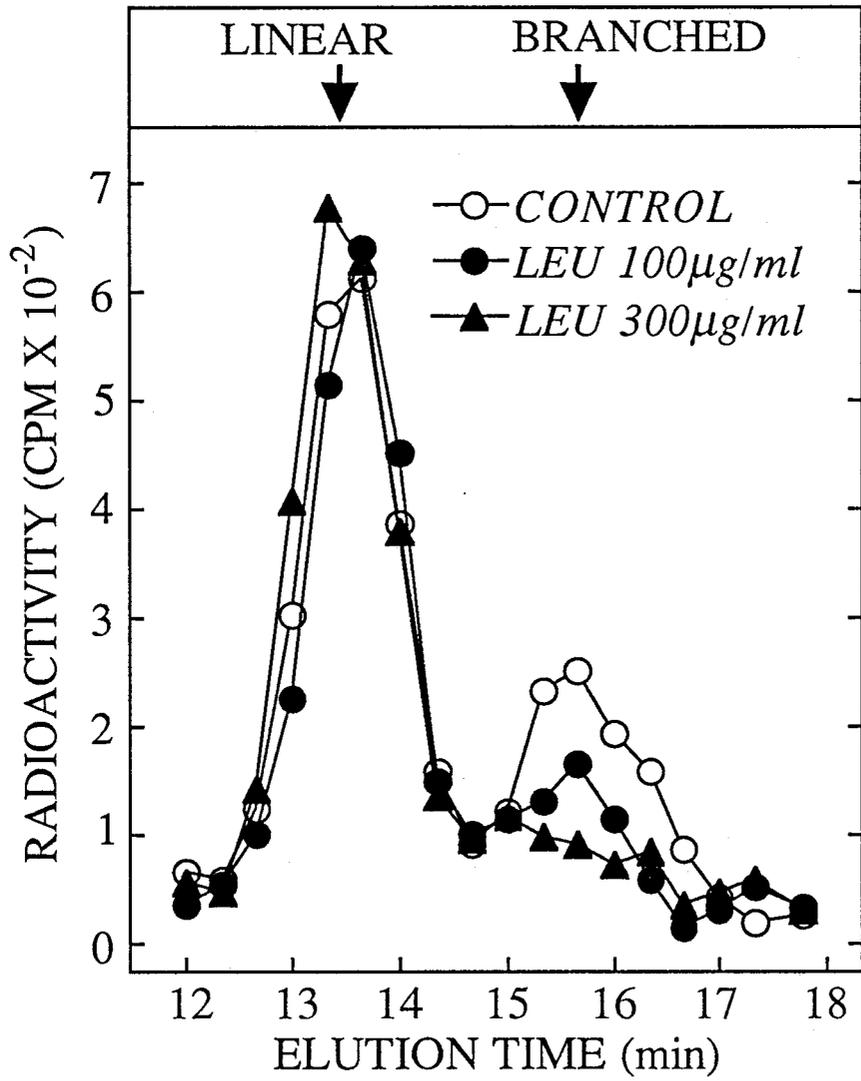


FIGURE LEGEND 7

Inhibitors of macroautophagy do not affect the clearance of free oligosaccharides from the cytosol of HepG2 cells. Pulse-chase experiments were performed exactly as described for figure 1. Control or CCM A-treated cells were pulse-radiolabeled and chased for 8 hours in the presence of CCM A, 3-methyladenine (3-MA) or asparagine (Asn). After permeabilisation of the cells as described in Materials and Methods radioactivity associated with free oligosaccharides isolated from the cytosolic (*CYTOSOL*) and membrane bound compartments (*MBCs*) was assayed by scintillation counting.

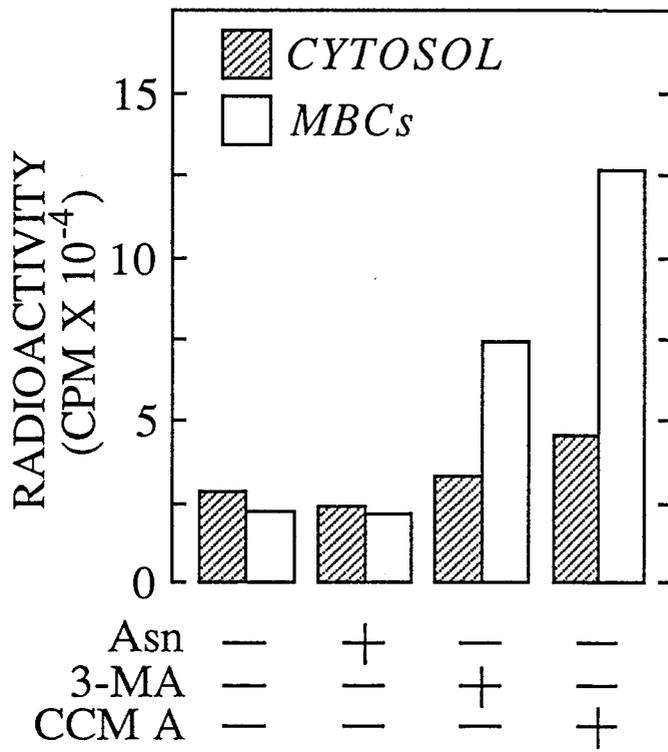
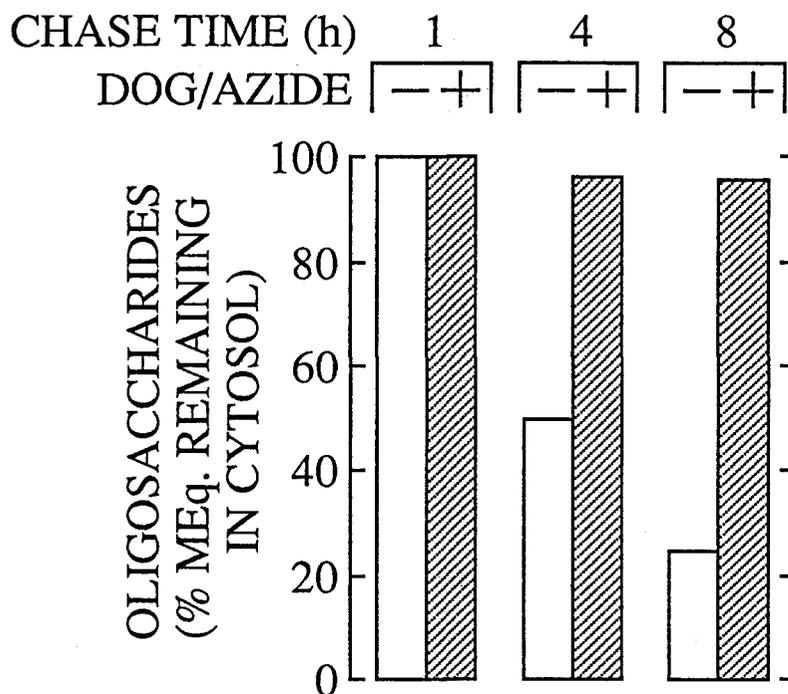


FIGURE LEGEND 8

The effects of cellular ATP depleting agents on the clearance of free oligosaccharides from the cytosol of HepG2 cells. HepG2 cells were pulse-radiolabeled and chased for the indicated times as described in the legend to figure 1. Where indicated a mixture of deoxyglucose and sodium azide (DOG/AZIDE) was added to the chase medium 45 minutes after the onset of the chase period (to give a final concentration of 10mM for each drug). (A) After permeabilisation of the cells free oligosaccharides were prepared from the cytosolic fraction and the molar equivalents of these components were calculated as described in the legend of figure 3. As the quantity of free oligosaccharides reaches maximal levels after one hour of chase this value was set at 100% for both the control and drug-treated cells. (B) Free oligosaccharides isolated from the cytosolic compartment of control and HepG2 cells. Free oligosaccharides isolated from the cytosolic compartment (CYTOSOL) and membrane-bound compartments (MBCs) derived from cells chased for eight hours in the presence and absence of DOG/AZIDE were separated by thin layer chromatography on silica-coated plates as described in the legend to figure 1. The abbreviations are as defined in the legend to figure 1. The oligosaccharide migrating as $\text{Man}_6\text{GlcNAc}$ is known to comprise a mixture of $\text{Glc}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}$ and $\text{Man}_6\text{GlcNAc}$ (Moore and Spiro, 1994) and is the likely degradation product of $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ by the cytosolic mannosidase.

A



B

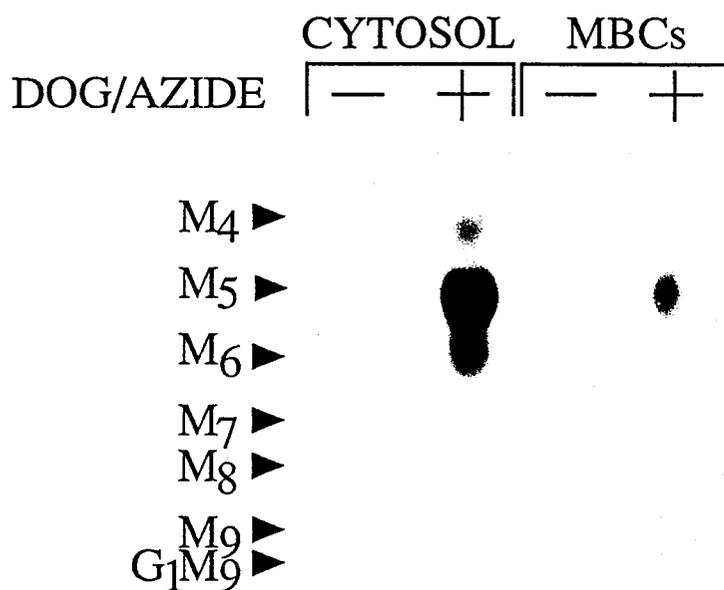


FIGURE LEGEND 9

Concanamycin A affects the distribution of a lysosomal marker enzyme on Percoll density gradients. (A) Control cells (open circles) or cells treated with CCM A for four hours were homogenised and fractionated on Percoll density gradients as described in Materials and Methods. The sedimentation position of lysosomes, the Golgi apparatus and ER were identified by performing assays for β -D-hexosaminidase (β -HEX), β -1, 4-galactosyltransferase (GAL T'ASE) and NADPH cytochrome C reductase (NADPH RED'ASE) respectively. (B) CCM A-treated cells were pulse radiolabeled (PULSE) and chased (CHASE) in the presence of CCM A for four hours prior to subcellular fractionation as described above. After collecting the gradient in four fractions (I-IV) as shown in the upper panel of (A) organelles were separated from Percoll and cytosol by centrifugation as described in Materials and Methods. Free oligosaccharides were isolated from the resulting organelles and assayed by scintillation counting.

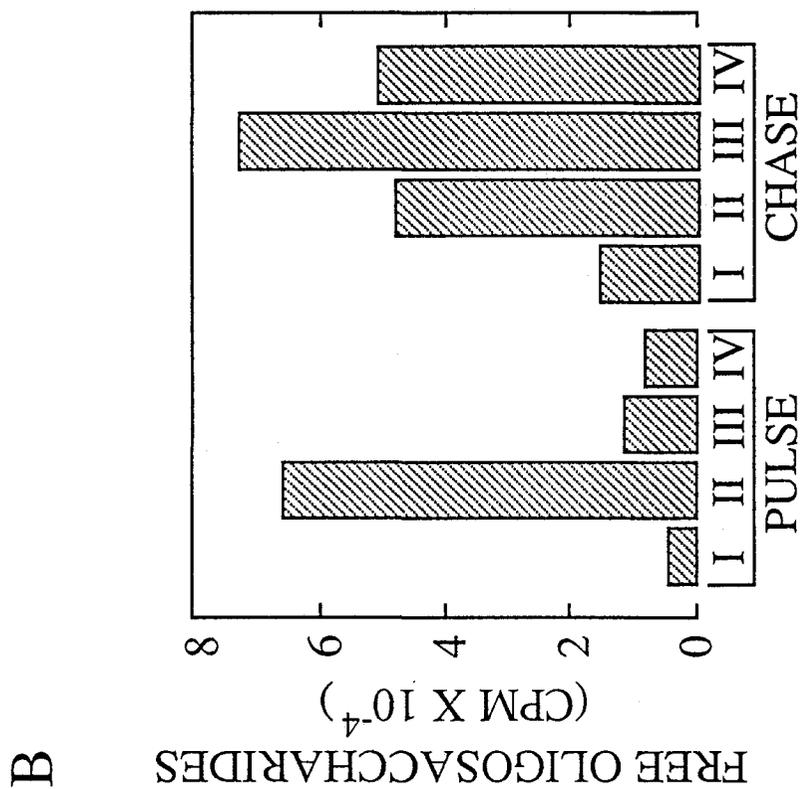
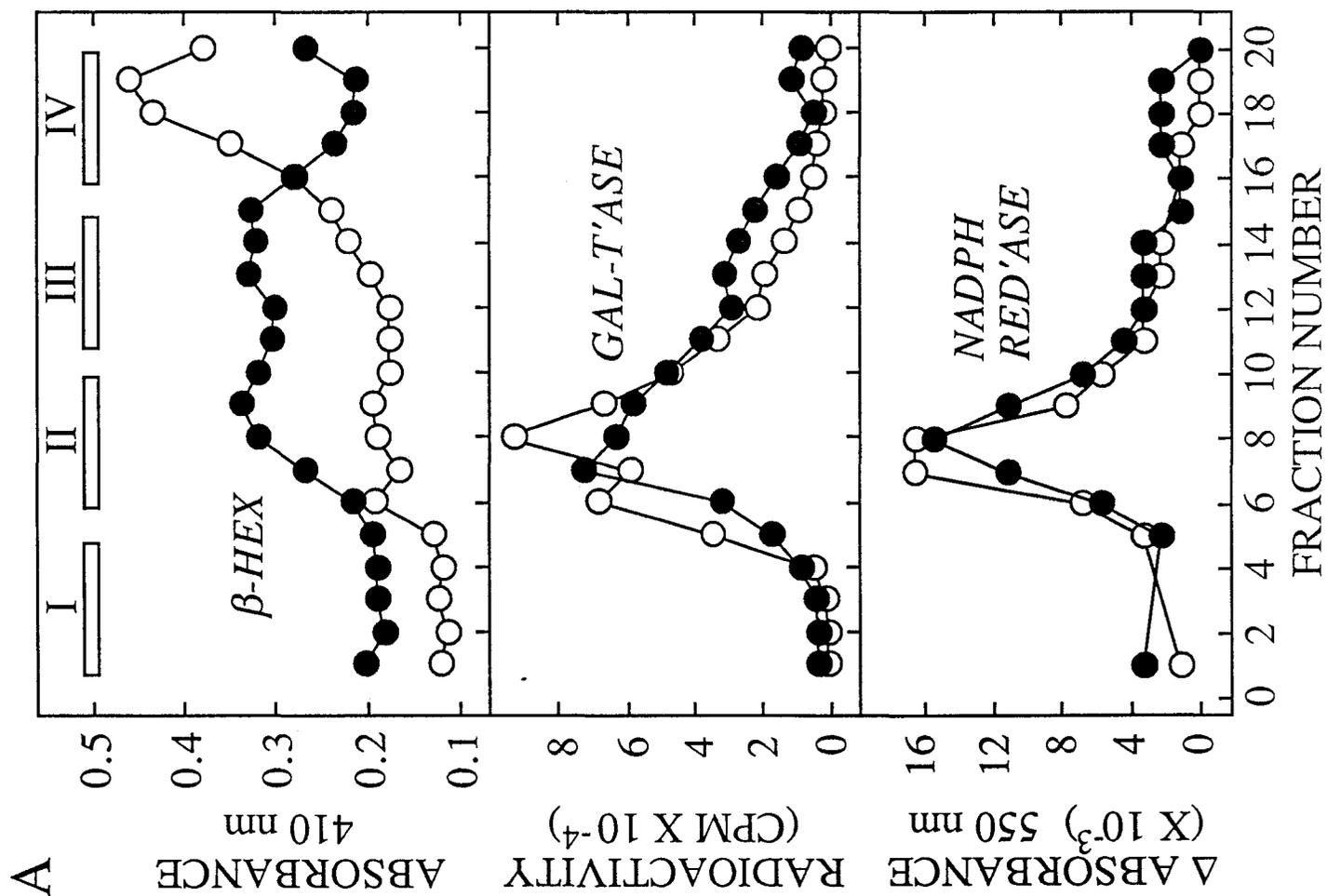


FIGURE LEGEND 10

Subcellular fractionation of SW-treated HepG2 cells on Percoll density gradients.

(Top panel) cells treated for four hours with 0.1 μ M SW were homogenised and fractionated on Percoll density gradients as described in the legend to figure 9. β -D-hexosaminidase (closed circles), β -1, 4-galactosyltransferase (triangles) and NADPH cytochrome C reductase (open circles) were assayed in order to identify the sedimentation positions of lysosomes, the Golgi apparatus and the ER respectively. (Lower panel) Cells were treated for 1 hour with 0.1 μ M SW, pulse-labeled with HRP (open symbols), and then chased for 4 hours (solid symbols) as described in Materials and Methods. HRP-labeled cells were homogenised and a post-nuclear supernatant was fractionated on Percoll gradients. Material from the gradient was recovered in twenty fractions each of which was assayed for HRP activity.

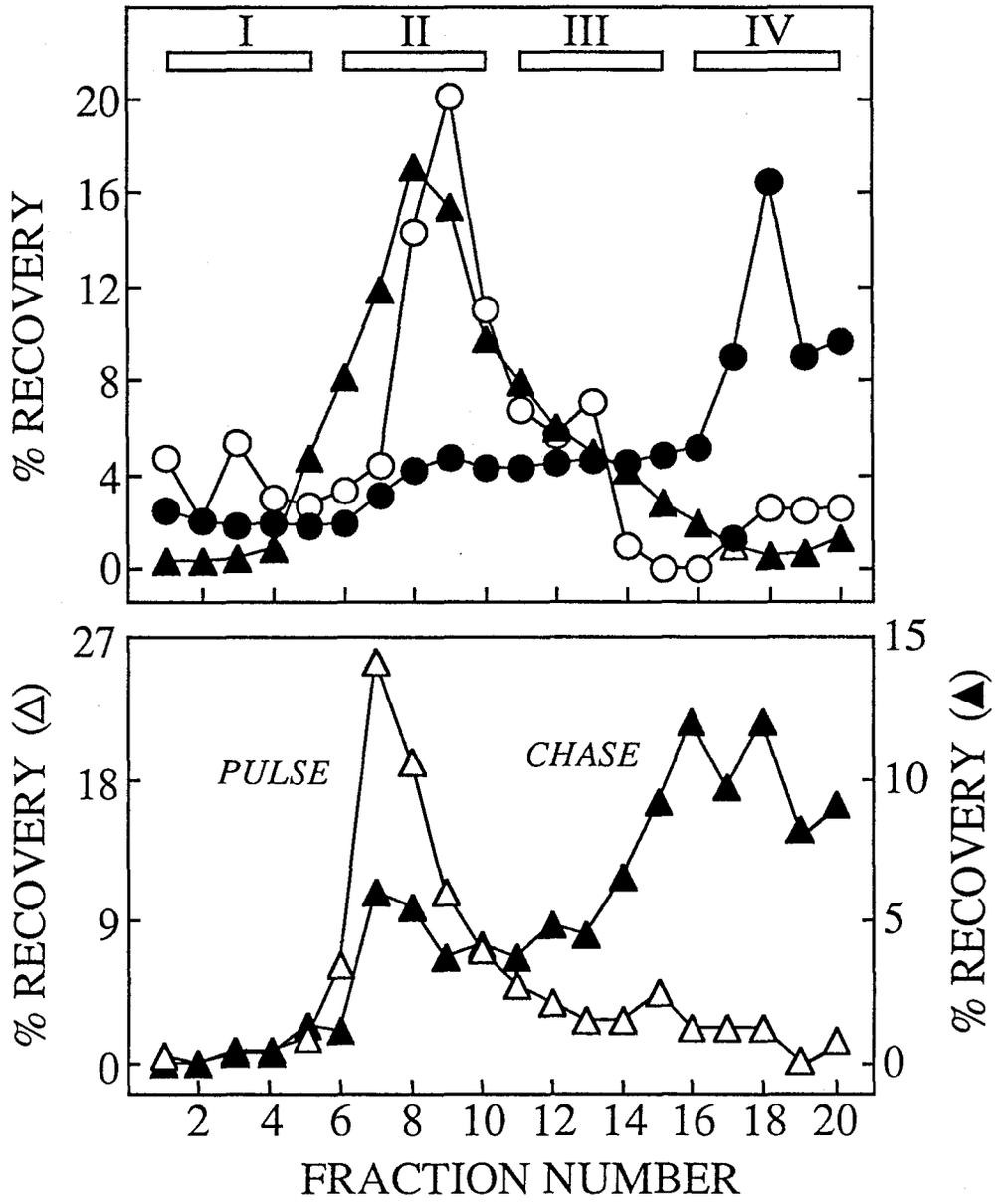
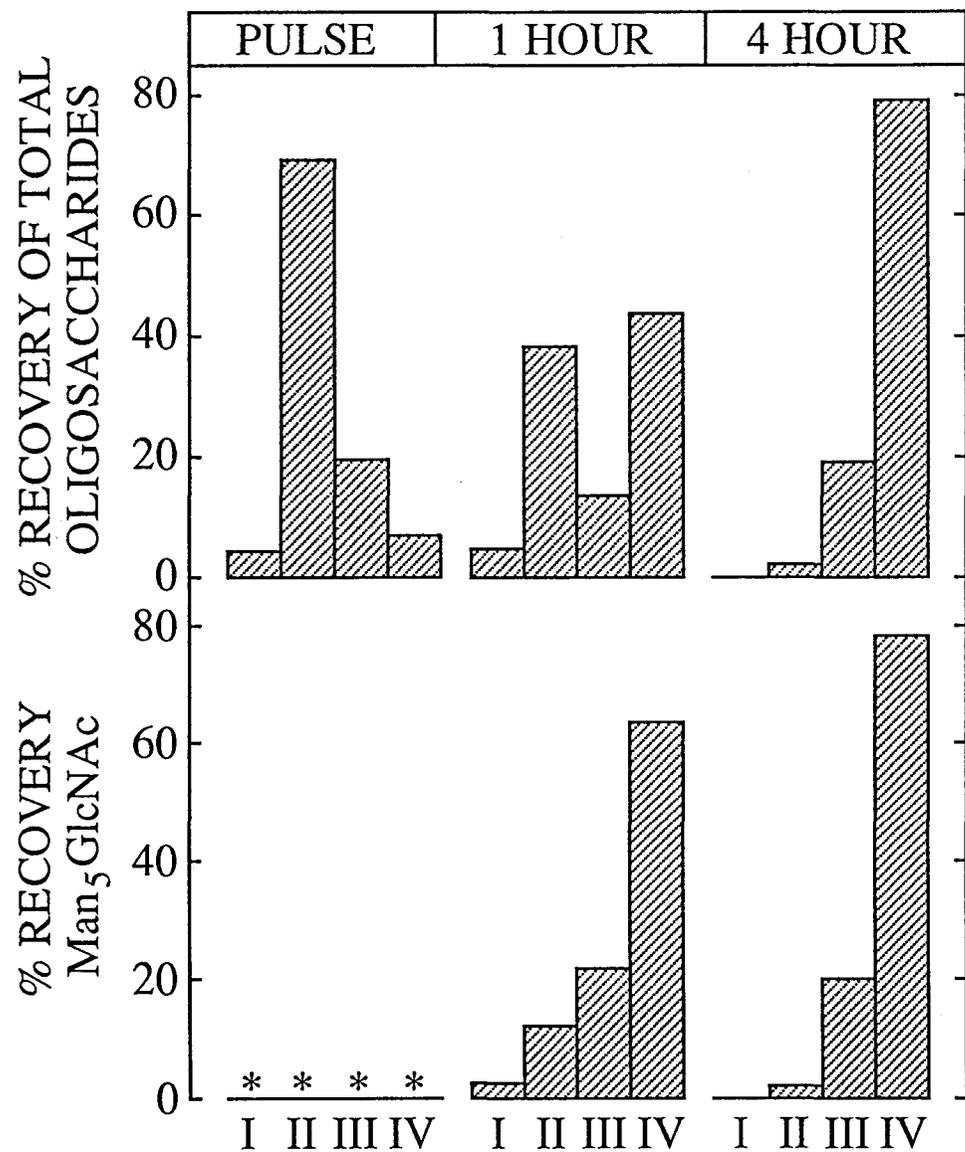


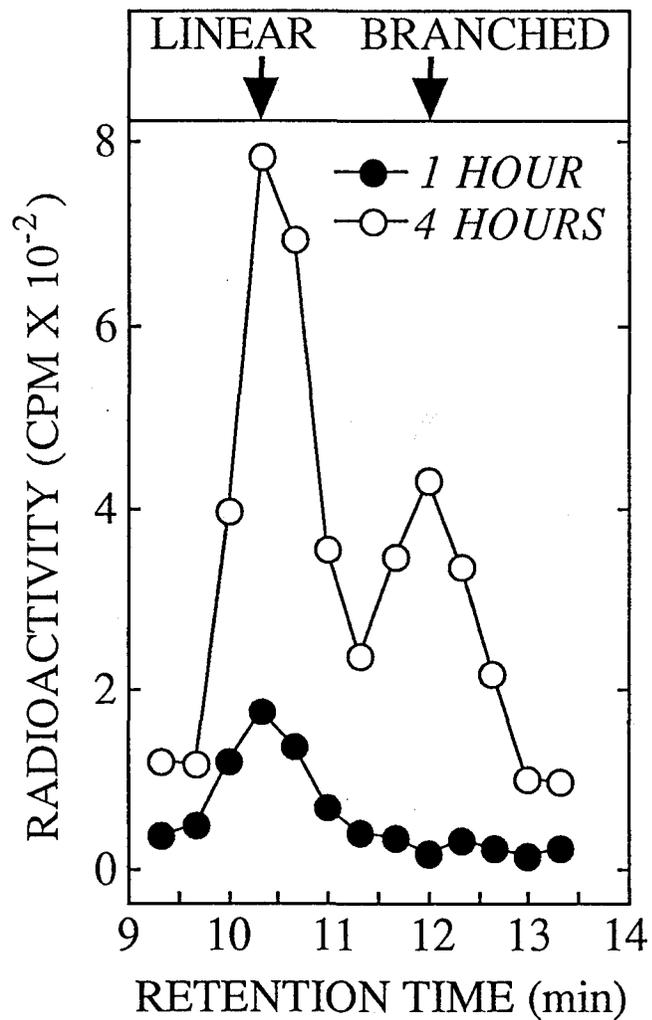
FIGURE LEGEND 11

Characterisation of free oligosaccharides isolated from organelles cosedimenting with lysosomal marker enzymes on Percoll gradients. (A) HepG2 cells pretreated with 0.1 μ M SW for 1 hour, were pulse-radiolabeled with D-[2-³H]mannose and chased for one and four hours in the presence of SW. After homogenisation of the cells and fractionation of the post nuclear supernatants on Percoll gradients organelles were recovered from fractions I-IV (see figure 10). Free oligosaccharides (top panel) were recovered from the organelles of each fraction and assayed by scintillation counting. The results have been expressed as a percentage of the total free oligosaccharides recovered from the organelles. The quantities of radioactivity (cpm $\times 10^{-3}$) associated with free oligosaccharides isolated from the organelles were; 74.7, 27.9, and 197.3, for the pulse, one hour and four hour chase times respectively. (bottom panel) After thin-layer chromatography of the oligosaccharides from each subcellular fraction the oligosaccharide migrating as Man₅GlcNAc was quantitated by scintillation counting and recovery of this component as a percentage of the total Man₅GlcNAc recovered from the subcellular fractions I-IV is represented for the pulse and the two chase times. The asterisk indicates that this component was not detected in the pulse incubation. (B) The Man₅GlcNAc isolated from fraction IV of the Percoll density gradients as described above was analysed by HPAEC as described in Materials and Methods. The region of the chromatograph corresponding to the elution times of the linear (LINEAR) and branched (BRANCHED) isomers of Man₅GlcNAc is shown.

A



B



DISCUSSION

Les travaux présentés, montrent dans les cellules hépatiques HepG2, l'existence d'un transport des oligosaccharides libres cytosoliques partiellement démannosylés jusqu'aux compartiments lysosomiques dans lesquels ils sont hydrolysés en mannose et N-acétylglucosamine.

D'autres types cellulaires ont déjà été impliqués dans la production d'oligosaccharides libres: les cellules CHO (Cacan *et al.*, 1992; Villers *et al.*, 1994; Kmiécik *et al.*, 1995), les splénocytes de Rat (Cacan *et al.*, 1987), les cellules thyroïdiennes de Veau (Anumula et Spiro, 1983), les lymphocytes de Rat (Cacan *et al.*, 1980; Hoflack *et al.*, 1981) et les hépatocytes de Porc (Oliver *et al.*, 1975). Toutefois, dans aucun de ces systèmes, les voies de transport *reticulum* endoplasmique-cytosol-lysosome n'ont été montrées. Le transport *reticulum* endoplasmique-cytosol semble se confirmer dans les cellules CHO (Kmiécik *et al.*, 1995).

Nous avons entrepris l'étude de ces voies de transport sur un lymphoblastome de Souris, les cellules BW5417.3. L'utilisation du dosage *in vitro* mis au point par Moore *et al.* (1995) sur cette lignée a confirmé la sortie d'oligosaccharides libres du *reticulum* endoplasmique vers le compartiment cytosolique, ces oligosaccharides correspondent aux $\text{Man}_{8,9}\text{GlcNAc}_2$. La Figure 1 montre que la présence d'ATP conditionne la sortie des oligosaccharides libres des compartiments vésiculaires (MBCs) vers le cytosol, ce qui suppose, par analogie avec les résultats de Moore *et al.* (1995), le transport direct du *reticulum* endoplasmique vers le compartiment cytosolique.

Des expériences de pulse-chasse sont effectuées dans des conditions *in vivo* similaires à celles utilisées pour les cellules HepG2. Après un marquage de 20 minutes avec du $[2\text{-}^3\text{H}]\text{mannose}$, le milieu de marquage est dilué par du milieu de chasse (milieu de culture complet) contenant 5 mM de mannose et 5 mM de fucose. A la fin de chaque période de chasse, les cellules sont centrifugées, les milieux sont récupérés et les cellules perméabilisées par la Streptolysine O. La nature et la répartition des oligosaccharides libres dans les compartiments vésiculaires et cytosoliques après un pulse et 2 heures de chasse sont comparables à celles obtenues dans les cellules HepG2, et indiquent une démannosylation dans le compartiment cytosolique jusqu'à la formation du $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_1$ linéaire. Après 8 heures de chasse, la quantité d'oligomannosides a considérablement chuté dans le cytosol.

D'une façon globale, les événements entre les cellules HepG2 et les cellules BW5147.3 sont comparables, les oligosaccharides $\text{Man}_{8,9}\text{GlcNAc}_2$ libérés dans le *reticulum*

endoplasmique sont transportés dans le compartiment cytosolique où ils perdent un résidu de N-acétylglucosamine puis sont élagués jusqu'à la formation du $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_1$ linéaire.

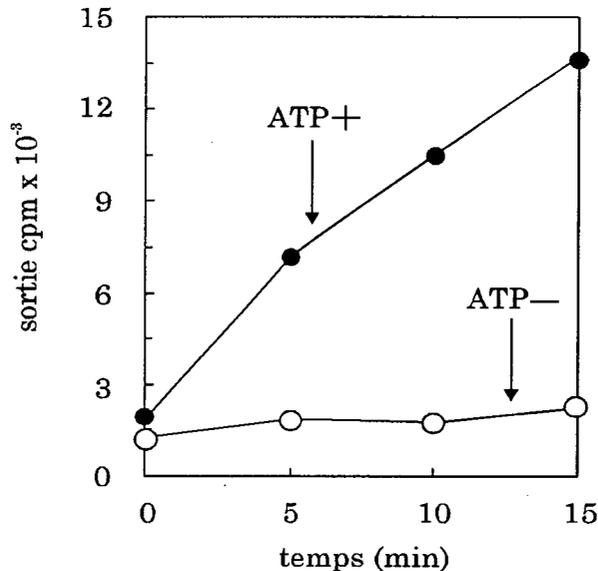


Figure 1: sortie des oligosaccharides libres $\text{Man}_{8-9}\text{GlcNAc}_2$ des compartiments vésiculaires des cellules BW5147.3.

Après un marquage de 20 minutes avec le $[2^3\text{H}]\text{Man}$, les cellules BW5147.3 sont perméabilisées. La sortie des oligosaccharides libres est mesurée selon la méthode mise au point par Moore *et al.* (1995).

Les oligosaccharides libres cytosoliques sont-ils transportés directement jusqu'aux lysosomes?

Est-il possible que le transport s'effectue d'abord dans un compartiment prélysosomique?

La macroautophagie n'est vraisemblablement pas impliquée dans le transport des oligosaccharides libres jusqu'aux compartiments lysosomiques (figure 7 des résultats). Il est donc probable qu'un transporteur soit impliqué pour le transfert des oligosaccharides dans les compartiments vésiculaires. Certaines des protéines de la membrane lysosomique sont également présentes sur la membrane des endosomes tardifs (Griffiths *et al.*, 1988; 1990). Dans le cas de l'hypothèse d'un transporteur membranaire des oligosaccharides libres, les données de Griffiths *et al.* (1988; 1990) suggèrent que ce transporteur puisse aussi se situer sur les endosomes et entraîner un transport « indirect ».

La concanamycine A inhibe les pompes ATPasiques du système endosome-lysosome. Elle engendre une augmentation du pH qui empêche les activités des hydrolases lysosomiques. Mais, la CCM A peut avoir d'autres effets: elle pourrait empêcher la fusion endosome-lysosome, comme le suppose van Weert *et al.* (1995) pour la bafilomycine A₁ dont l'effet sur la pompe ATPasique est similaire. Le traitement des cellules HepG2 par la CCM A provoque une répartition de l'activité hexosaminidase le long du gradient de Percoll dans la région *lysosomique* avec une quasi-disparition de l'activité au niveau des lysosomes (figure 9 des résultats). L'accumulation de l'activité hexosaminidase dans la région endosomique est en accord avec l'hypothèse de l'inhibition de la fusion endosome-lysosome par la bafilomycine A (van Weert *et al.*, 1995). Mais ceci n'explique pas pourquoi l'activité hexosaminidase, que nous suivons, n'est plus détectée dans la région *lysosomique*, alors que la demi-vie de cette enzyme est de plusieurs dizaines d'heures (figure 9 des résultats). Jahraus *et al.* (1994) ont montré l'existence d'un flux de membrane des lysosomes vers les endosomes. Il est donc possible que la fusion endosome-lysosome soit bloquée mais la fusion lysosome-endosome ne le soit pas (Lee et Marzella, 1992). Ceci expliquerait pourquoi l'activité hexosaminidase se déplace vers la région endosomique. Cette hypothèse peut également expliquer la répartition des oligosaccharides libres le long du gradient de Percoll, néanmoins une fraction des oligosaccharides libres est toujours présente dans la région *lysosomique* et ne présente pas la même répartition que l'activité hexosaminidase (figure 9 des résultats). Un changement de densité des lysosomes peut également expliquer nos résultats, la CCM A pourrait induire un gonflement des organites. Il faut également supposer que les effets soient variables entre les lysosomes, afin d'expliquer les différences de répartition entre les oligosaccharides libres et l'activité hexosaminidase. L'extrapolation de ces hypothèses conduit à l'hypothèse de l'existence de différents types de lysosomes.

La swainsonine 0,1 μM est utilisée pour inhiber les activités mannosidasiques de l'appareil de Golgi et du lysosome. Les résultats que nous avons obtenu après traitement des cellules HepG2 avec 0,1 μM de swainsonine pendant 4 heures, montrent une répartition de l'activité hexosaminidase identique à celle des cellules contrôles (figure 10 des résultats). La séparation des endosomes et des lysosomes est très bien visualisée après l'endocytose de la peroxydase de raifort ainsi que, la localisation des oligosaccharides libres d'origine cytosolique dans la région lysosomique (figure 10 et 11 des résultats). Toutefois, nous pouvons nous interroger sur la possibilité d'un transport des oligosaccharides cytosoliques dans un

compartiment prélysosomique précédant la dégradation dans les lysosomes. Qu'advindraient-ils des oligosaccharides libres transportés dans le système endosomal?

Les résultats de Stoorvogel *et al.* (1989; 1991) montrent que l'asialoglycoprotéine endocytée dans les cellules HepG2 et destinée aux lysosomes est colocalisée avec la transferrine (recyclée à la membrane plasmique) pendant 30 à 45 minutes. D'une façon comparable, la transferrine et l'EGF (destiné aux lysosomes) se séparent avec un temps de demi-vie de 30 minutes dans les cellules Hep-2 (Futter *et al.*, 1996). Dans les conditions de pulse-chasse contrôle, nous n'avons pas détecté de temps de latence entre la disparition des oligosaccharides libres du compartiment cytosolique et leur dégradation dans les compartiments vésiculaires (voir également Moore et Spiro, 1994). Dans l'hypothèse d'un transport prélysosomique, le transport des oligosaccharides libres de ce compartiment vers le lysosome, lieu de dégradation doit ainsi être rapide pour assurer l'hydrolyse des oligosaccharides, et, n'est pas compatible avec les cinétiques de dégradation des macromolécules endocytées. Nous ne pouvons cependant pas écarter l'hypothèse de la dégradation des oligosaccharides libres dans le compartiment prélysosomique lui-même, comme il a été montré pour certaines protéines (Authier *et al.*, 1994).

Quelle serait l'efficacité d'un transport prélysosomique? Pour aborder ce point, nous allons envisager le transport des oligosaccharides libres jusqu'aux endosomes précoces, endosomes tardifs et lysosomes (figure 2).

1. Les endosomes précoces sont les premiers organites rejoints par les macromolécules endocytées. L'endocytose de macromolécules libres (c.à.d non liées à un récepteur) pourrait nous servir de point de comparaison, les oligosaccharides libres devraient à priori se comporter d'une façon similaire. 30 à 40% de la peroxydase de raifort endocytée est recyclée vers la membrane plasmique, pendant que 60% transite jusqu'aux lysosomes (van Deurs *et al.*, 1989; Towbridge *et al.*, 1993). Ceci suppose, dans le cadre de notre hypothèse que 30 à 40% des oligosaccharides libres se retrouvent dans le milieu extracellulaire. Dans des conditions normales de culture, les oligosaccharides libres n'ont jamais été retrouvés dans le milieu extracellulaire. Même en tenant compte de la réinternalisation d'une part des oligosaccharides recyclés, la possibilité d'un transport au niveau des endosomes précoces reste faible.

2. Les données sur les communications endosomes tardifs-lysosomes longtemps discutées (Helenius, 1983; Murphy, 1991; Stoorvogel, 1993) sont maintenant partagées (van Deurs *et al.*, 1995; Futter *et al.*, 1996). Des « contacts directs » entre les lysosomes et les

endosomes tardifs ont été visualisés par microscopie électronique, et supposent la fusion entre ces deux compartiments (Futter *et al.*, 1996), fusion qui a pu être reconstituée *in vitro* (Mullock *et al.* 1989; 1994). Il est intéressant de noter que deux populations de lysosomes ont pu être distinguées, les 2 sont Lamp-1 positives et hydrolases acides positives mais seule une population est rejointe par la peroxydase de raifort et l'EGF. La fusion directe des endosomes tardifs et des lysosomes est vraisemblablement consécutive à un départ de vésicules de recyclage vers le réseau trans-Golgien (les récepteurs du mannose 6-phosphate ne sont pas détectés dans les lysosomes). Dans l'hypothèse d'un transport prélysosomal, une fuite des oligosaccharides libres vers le réseau trans-Golgien peut être envisagée et, l'efficacité de la dégradation serait ainsi réduite.

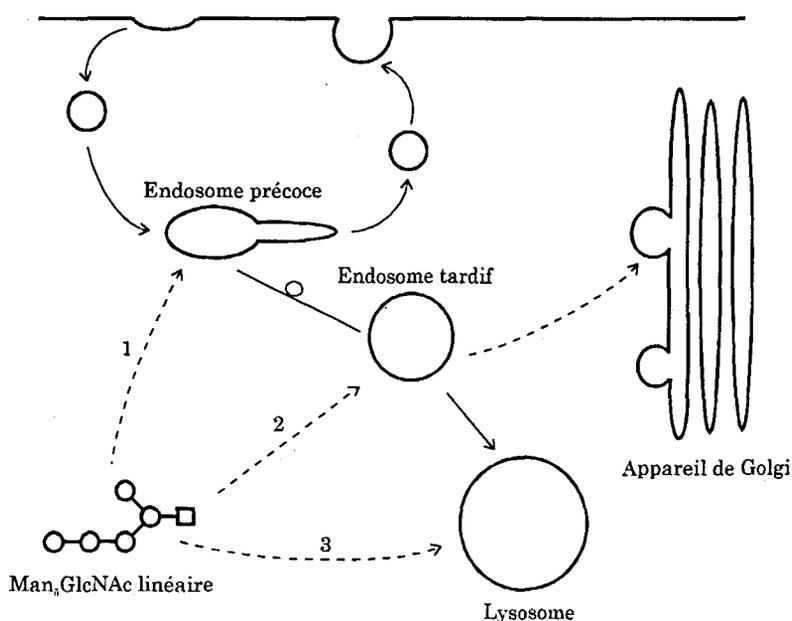


Figure 2

Représentation schématique de l'hypothèse d'un transport des oligosaccharides libres dans un compartiment prélysosomal

3. Le transport direct cytosol-lysosome reste le plus efficace. Les résultats que nous avons obtenus après le fractionnement cellulaire des cellules HepG2 traitées avec la swainsonine 0,1 μM privilégient le transport direct cytosol-lysosome (figure 10 et 11 des résultats). Après une heure de chasse, le seul oligosaccharide libre de petite taille observé le long du gradient est le $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_1$ linéaire, il est uniquement situé dans la région

lysosomique. Environ 30 minutes sont nécessaires pour le transport de macromolécules endocytées des endosomes jusqu'aux lysosomes, dans l'hypothèse d'un transport prélysosomique une fraction des oligosaccharides libres devrait être localisée dans la région endosomique. Ce n'est ni le cas après une heure, ni après 4 heures de chasse.

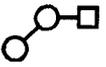
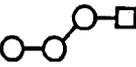
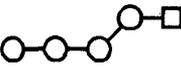
Si la dégradation des oligosaccharides libres a comme finalité de libérer des résidus de mannose et de N-acétylglucosamine, réutilisés pour la biosynthèse, la mise en place d'un transport prélysosomique se révélerait d'une faible efficacité.

Signification physiologique et physiopathologique de la production d'oligosaccharides libres cytosoliques.

A. Une fraction des oligosaccharides accumulés dans les cas de mannosidose ont une origine cytosolique.

La mannosidose est une pathologie rare dite de surcharge *lysosomique*. Elle est caractérisée par une absence d'activité mannosidasique dans les lysosomes de nombreuses cellules et tissus, le foie, le rein, le cerveau, les leucocytes et les fibroblastes (Caroll *et al.*, 1972; Mansson et Lundblad, 1974; Farriaux *et al.*, 1975). Les malades présentent un retard psychomoteur important et des anomalies vertébrales. Les organes touchés tels le foie, le cerveau montrent en microscopie électronique des inclusions, correspondant à des lysosomes ayant accumulés du matériel non digéré (Farriaux *et al.*, 1975). Cette pathologie est également caractérisée par une accumulation d'oligosaccharides mannosylés dans les fluides biologiques. Les quantités sont impressionnantes, par exemple, chez un patient environ 900 mg d'oligomannosides ont été dosés par litre d'urine (Strecker *et al.*, 1976).

L'oligomannoside majeur retrouvé à la structure suivante : $\text{Man}(\alpha 1-3)\text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$ (Norden *et al.*, 1973). Les structures des deux autres principaux oligosaccharides ont été élucidées par plusieurs équipes: $\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3)\text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$ et $\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3)\text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$ (Norden *et al.*, 1974; Strecker *et al.*, 1976; Matsura *et al.*, 1981). Le tableau suivant souligne l'impressionnante quantité de ces oligosaccharides présents dans l'urine de plusieurs patients

			
Matsura <i>et al.</i> (1981)	610	90	92
Strecker <i>et al.</i> (1976)	545	129	115
Norden <i>et al.</i> (1974)	185-430	58	60

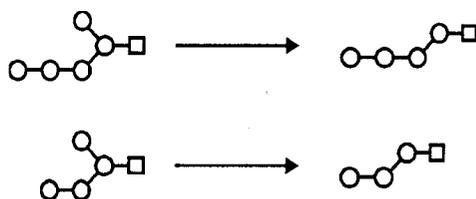
**Oligosaccharides majeurs accumulés
en cas de mannosidose (mg/l)**

Les deux oligosaccharides $\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3)\text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$ ($\text{Man}_3\text{GlcNAc}_1$ linéaire) et $\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3)\text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$ ($\text{Man}_4\text{GlcNAc}_1$ linéaire) représentent environ 20 à 30% des oligosaccharides accumulés dans l'urine (Strecker *et al.*, 1976; Yamashita *et al.*, 1980; Matsura *et al.*, 1981). Beaucoup d'interrogations se sont posées quant à l'origine de ces deux structures. Comme l'ont souligné Al Dahir *et al.* (1991), lors de l'étude de la spécificité de la mannosidase lysosomique du foie humain, ni les produits de digestion d'oligomannosides $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_1$, ni les intermédiaires ne correspondent à ces structures.

Dans les fibroblastes de patients atteints de mannosidose, environ 30% des oligosaccharides libres accumulés sont aussi de structure $\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3)\text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$ et $\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3)\text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$ (Daniel *et al.*, 1992). C'est l'utilisation de cette lignée qui a permis de mettre en évidence une activité α -1,6 mannosidasique, activité qui n'est pas affectée dans la mannosidose et, qui explique la nature des structures linéaires présentes dans l'urine des patients (Daniel *et al.*, 1992). Lorsque les fibroblastes déficients en mannosidase sont mis en culture en présence de 100 μM de swainsonine, les oligosaccharides libres $\text{Man}(\alpha 1-3)\text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$, $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_1$ linéaire et $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_1$ linéaire initialement présents disparaissent et les oligosaccharides libres $[\text{Man}(\alpha 1-6)]\text{Man}(\alpha 1-3)\text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$ et $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_1$ branché apparaissent progressivement. La disparition des premiers peut être associée à l'inhibition de la mannosidase cytosolique par une telle dose de swainsonine (Tulsiani et Touster, 1987), l'apparition du $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_1$ branché est liée à la formation de glycoprotéines de type hybride due à l'inhibition de la mannosidase II Golgienne (Elbein *et al.*, 1981). Enfin, le composé $[\text{Man}(\alpha 1-$

6)]Man(α 1-3)Man(β 1-4)GlcNAc est le précurseur du composé Man(α 1-3)Man(β 1-4)GlcNAc, issu de l'hydrolyse par l' α 1-6mannosidase. Ceci est confirmé après l'incubation de préparations lysosomiques de cellules saines et de cellules de patients avec le substrat [Man(α 1-6)]Man(α 1-3)Man(β 1-4)GlcNAc (Daniel *et al.*, 1992). La première préparation produit un mélange des structures Man(α 1-3)Man(β 1-4)GlcNAc et Man(α 1-6)Man(β 1-4)GlcNAc, alors que la seconde préparation produit exclusivement du Man(α 1-3)Man(β 1-4)GlcNAc. L'activité majeure est ainsi absente de la préparation des cellules de malade mais une seconde activité spécifique de la liaison en α 1-6 y est détectée. Cette activité a été purifiée, et elle est active *in vitro* sur les structures linéaires Man(α 1-2)Man(α 1-3)[Man(α 1-6)]Man(β 1-4)GlcNAc et Man(α 1-2)Man(α 1-2)Man(α 1-3)[Man(α 1-6)]Man(β 1-4)GlcNAc et, produit les structures Man(α 1-2)Man(α 1-3)Man(β 1-4)GlcNAc et Man(α 1-2)Man(α 1-2)Man(α 1-3)Man(β 1-4)GlcNAc (De Gasperi *et al.*, 1992b; voir schéma ci-dessous).

Les résultats que nous avons obtenus et présentés dans ce travail corrélés à ceux qui ont décrits l' α 1-6mannosidase lysosomique ont ainsi établi l'origine des Man₃GlcNAc₁ et Man₄GlcNAc₁ linéaires accumulés dans l'urine de patients atteints de mannosidose. Les oligosaccharides libres cytosoliques sont i) transportés dans le compartiment lysosomique dans ces pathologies, et ii) le résidu de mannose lié en α 1-6 est ensuite hydrolysé par l' α 1-6mannosidase lysosomique (De Gasperi *et al.*, 1992b).



Dégradation des oligosaccharides Man₅GlcNAc₁ et Man₄GlcNAc₁ linéaires par l' α 1-6mannosidase lysosomique *in vitro* (De Gasperi *et al.*, 1992b).

L'importance quantitative des oligosaccharides libres Man₃GlcNAc₁ et Man₄GlcNAc₁ accumulés dans l'urine et les tissus des patients souligne une nouvelle fois l'importance de la voie des oligosaccharides libres. Considérant que les autres oligosaccharides libres accumulés ont une origine glycoprotéique, les valeurs de 20 à 30% se rapprochent des valeurs que nous avons obtenues sur les cellules HepG2. Ainsi, le phénomène observé sur ces cellules peut être considéré comme physiologique et non relevant de l'état de cellules cancéreuses en culture.

B. Y a t'il sécrétion d'une partie des oligosaccharides libres sous l'effet de la concanamycine A?

Les quantités importantes d'oligosaccharides libres dans les urines des patients atteints de mannosidose sont le reflet du dysfonctionnement de la mannosidase lysosomique et de la fuite des oligosaccharides libres dans les liquides biologiques. Dans nos expériences, l'accumulation intralysosomique que nous avons décrite après l'addition de CCM A pourrait aussi être suivie d'une fuite des oligosaccharides libres dans le milieu extracellulaire.

Les expériences de pulse-chasse présentées précédemment, ont montré la stabilité des oligosaccharides libres dans les cellules HepG2, lorsqu'elles sont traitées avec 10 nM de CCM A. Après 8 heures de chasse, environ 8% des oligosaccharides libres est toutefois retrouvé dans le milieu extracellulaire. Nous avons voulu vérifier l'effet d'un prolongement du temps d'incubation.

Des expériences de pulse-chasse sont réalisées sur les cellules HepG2 dans les mêmes conditions que précédemment. Un marquage de 20 minutes avec 40 μ Ci de [2-³H]mannose est suivi d'une chasse dans le milieu de culture complet, additionné de 5 mM de mannose et 5 mM de fucose. Les temps de chasse sont de 2, 8 et 20 heures. Après chaque temps de chasse, les milieux et les cellules sont récupérés.

La figure 3B représente le pourcentage d'oligosaccharides libres retrouvés dans le milieu extracellulaire de cellules HepG2 traitées avec 10 nM de CCM A. Après 20 heures de chasse, 18% des oligosaccharides libres sont retrouvés dans le milieu extracellulaire. Ceux-ci sont essentiellement composés de Man₅GlcNAc₁, Man₄GlcNAc₁ et Man₃GlcNAc₁ et reflètent la composition des compartiments vésiculaires au même temps de chasse. Deux hypothèses sont envisagées: i) le traitement avec la CCM A provoque la lyse d'une partie des cellules et libère des oligosaccharides libres, ii) les lysosomes déversent leur contenu dans le milieu extracellulaire. Y a t'il aussi fuite d'activités hydrolases acides? La figure 3A montre le pourcentage de sécrétion de l'activité β -hexosaminidase en présence ou en absence de CCM A. Après 8 heures de traitement avec la CCM A, 12% de l'activité β -hexosaminidase est dans le milieu extracellulaire alors qu'elle est négligeable dans les cellules contrôles. Cette activité augmente jusqu'à 41% après 20 heures de traitement.

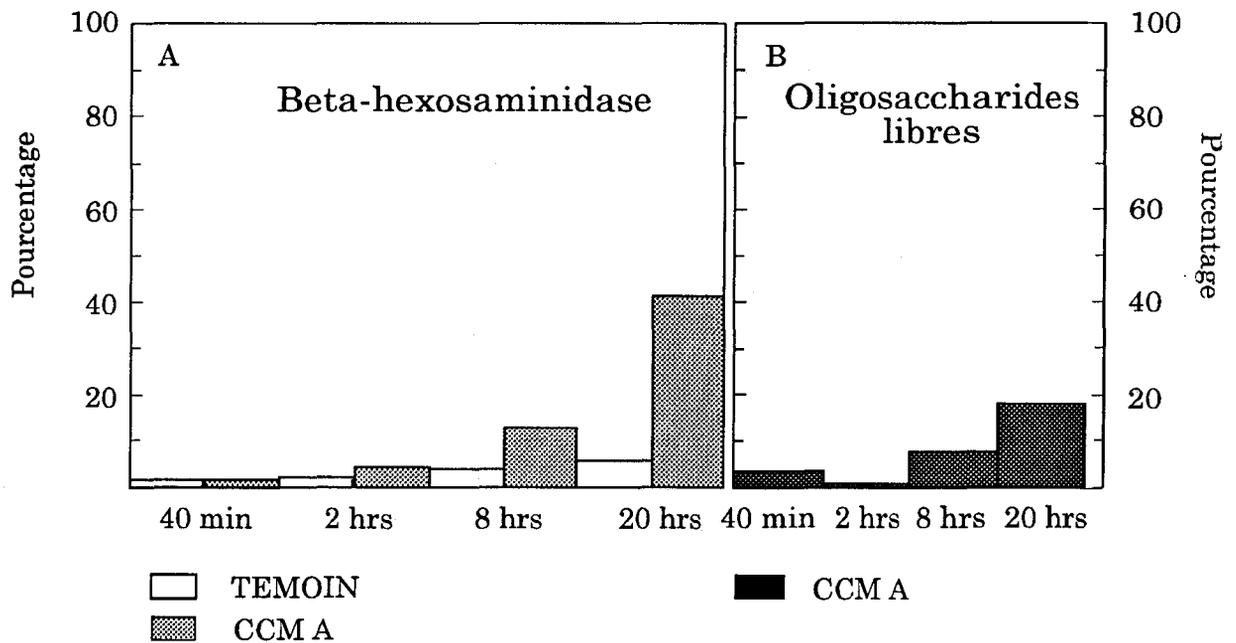


Figure 3

(A) Activité hexosaminidase retrouvée dans le milieu extracellulaire des cellules HepG2 en présence et en absence de CCM A 10 nM, après 40 min., 2, 8 et 20 heures d'incubation.

(B) Oligosaccharides libres retrouvés dans le milieu extracellulaire des cellules HepG2 en présence de CCM A 10 nM, après un marquage de 20 min. en présence de $[2^3\text{H}]$ mannose, 2, 8 et 20 heures de chasse.

L'effet d'agents perturbant le pH du système endosome-lysosome sur la sécrétion d'enzymes lysosomiques a été étudié. Par exemple, la chloroquine et le NH_4Cl stimulent la sécrétion de l'activité β -glucuronosidase dans des fibroblastes (Gonzales-Noriega, 1980). 33% de l'activité β -glucuronosidase est libérée dans le milieu après 48 heures de traitement avec 10 mM de NH_4Cl , alors que seulement 7% est libéré des cellules contrôles. Lorsque des fibroblastes déficients en activité β -glucuronosidase endocytent cette activité, le NH_4Cl ajouté ensuite n'a aucun effet sur la sécrétion de l'enzyme, indiquant que l'activité contenue dans le système *lysosomique* n'est pas libérée (Gonzales-Noriga, 1980). La sécrétion de l'activité β -hexosaminidase sous forme précurseur (de haut poids moléculaire et portant les résidus de Man 6-phosphate) est vérifiée sur les fibroblastes après addition de NH_4Cl 10 mM ou chloroquine 25 μM (Hasilik et Neufeld, 1980) et sur des macrophages après ajout de NH_4Cl 10 mM (Imort *et al.*, 1983). Récemment, la sécrétion de la mannosidase acide a été observée

après traitement de cellules de *Dictyostelium discoïdeum* avec 5 μ M de CCM A (soit une concentration 500 fois supérieure à celle que nous utilisons). Après deux heures de traitement, 20% de l'activité mannosidase est dans le milieu extracellulaire sous forme de précurseur uniquement (Temesvari *et al.*, 1996).

Nous n'avons pas vérifié si la β -hexosaminidase libérée par l'action de la CCM A est sous forme précurseur et/ou mature, s'appuyant sur les données bibliographiques, la sécrétion de la forme précurseur est favorisée. Ainsi, nous ne savons pas si la fuite d'activité β -hexosaminidase dans le milieu extracellulaire et celle des oligosaccharides libres résulte de deux phénomènes différents.

Les premiers résultats que nous avons obtenus sur la lignée de lymphoblastome de Souris, les cellules BW5147.3 sont différents. Si le pourcentage de libération de l'activité β -hexosaminidase est proche de celui obtenu pour les cellules HepG2, une fuite massive des oligosaccharides libres est observée après 8 et 20 heures de chasse en présence de 10 nM de CCM A.

Des expériences de pulse-chasse ont été entreprises en présence de CCM A, dans le but de caractériser le transport des oligosaccharides libres du cytosol vers les compartiments vésiculaires, comme nous l'avions fait pour les cellules HepG2. La figure 4B représente le pourcentage d'oligosaccharides libres dans le milieu après un pulse de 20 minutes, 2, 8 et 20 heures de chasse des cellules contrôles et des cellules traitées avec 10 nM de CCM A. 50,5 % des oligosaccharides libres présents après 8 heures de chasse en présence de CCM A sont retrouvés dans le milieu et 74% après 20 heures, alors que 14 et 20% sont présents dans les milieux des cellules contrôles. La fuite de ces oligosaccharides libres, essentiellement composés de $\text{Man}_{6-5-4}\text{GlcNAc}_1$ se révèle un phénomène majeur, contrairement aux cellules HepG2.

Au contraire, le pourcentage d'activité β -hexosaminidase dans le milieu est comparable à celui des cellules HepG2, après 20 heures de traitement avec 10 nM de CCM A 30% de l'activité hexosaminidase est dans le milieu extracellulaire (figure 4A). Si après 8 heures d'incubation en présence de CCM A 10 nM, un mélange de déoxyglucose/azide 10 mM est ajouté, seulement 12% de l'activité β -hexosaminidase est dans le milieu après 20 heures d'incubation, et indique l'absence de lyse des cellules. Il est donc probable que la sortie de matériel que nous observons ne résulte pas d'une altération des membranes de la cellule, due au traitement avec la CCM A.

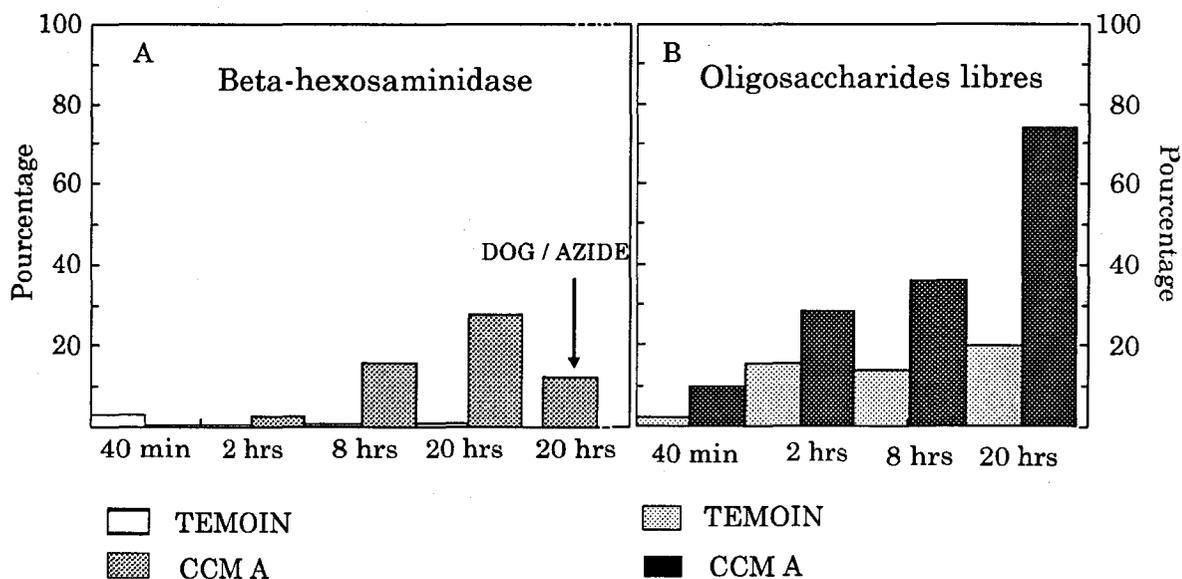


Figure 4

(A) Activité hexosaminidase retrouvée dans le milieu extracellulaire des cellules BW5147.3 en présence et en absence de CCM A 10 nM, après 40 min., 2, 8 et 20 heures d'incubation.

(B) Oligosaccharides libres retrouvés dans le milieu extracellulaire des cellules BW5147.3 en présence et en absence de CCM A 10 nM, après un marquage de 20 min. en présence de $[^3\text{H}]$ mannose, 2, 8 et 20 heures de chasse.

Ces résultats sont préliminaires et nécessitent d'être confirmés. Cependant, la fuite des oligosaccharides libres dans le milieu extracellulaire nous suggère la fusion du compartiment *lysosomique* avec la membrane plasmique. Griffiths (1996) a proposé l'existence de fusion de compartiments lysosomiques avec la membrane plasmique, fusion qui serait particulière aux cellules hématopoïétiques. Par exemple, sur des macrophages, le zymosan provoque certes la sécrétion de 48 à 55% de la β -hexosaminidase et de la cathepsine D nouvellement synthétisées (sous forme précurseur), mais provoque aussi la sécrétion de 72% de la radioactivité associée à la β -hexosaminidase « mature » après une expérience de pulse-chasse sur 20 heures (Imort *et al.*, 1983). Seulement 7% de la cathepsine D sous forme mature est retrouvée dans le milieu extracellulaire. Cette différence i) permet d'écarter l'hypothèse de la lyse cellulaire, ii) suggère que les vésicules renfermant les formes matures des deux enzymes (généralement les lysosomes) soient différemment impliquées dans la libération. Comme décrit précédemment,

l'addition de NH_4Cl sur les macrophages stimule uniquement la sécrétion des formes précurseurs de la β -hexosaminidase et de la cathepsine D (Imort *et al.*, 1983). Cependant, les travaux de Tapper et Sundler (1990; 1995) rapportent que les macrophages sont capables de sécréter le contenu *lysosomique*, processus qui est initié par des agents qui augmentent le pH intralysosomique. Notamment, 200 nM de bafilomycine A_1 induit la libération de 60 à 70% de l'activité N-acétylglucosaminidase après seulement deux heures d'incubation. Cette libération est dose-dépendante et ne semble pas résulter d'un gonflement des vésicules (Tapper et Sundler, 1995). Il serait intéressant de reproduire ces expériences sur les cellules BW5147.3, c'est à dire vérifier si l'augmentation de la concentration en CCM A provoque une sécrétion aussi brutale et rapide que celle décrite sur les macrophages (Tapper et Sundler, 1995).

La capacité de transfert des activités lysosomiques a été mesurée sur différentes lignées de lymphocytes T et B, dont la lignée BW5147.3 (Olsen *et al.*, 1993). Les lymphocytes sont cocultivés avec une lignée de fibroblastes déficients en activité β -glucuronosidase. Après 24 heures, la β -glucuronosidase associée aux fibroblastes témoigne du transfert d'activité. Deux mécanismes pour ce transfert semblent mis en place: i) les enzymes lysosomiques phosphorylées sont sécrétées et les fibroblastes endocytent ces enzymes via le récepteur du mannose 6-P présent sur la membrane plasmique. ii) Des interactions cellules-cellules autorisent un transfert direct des activités lysosomiques. Les cellules BW5147.3 sont capables de transférer une partie de leur activité β -glucuronosidase. Le transfert n'est absolument pas perturbé si des résidus de mannose 6-P libre sont ajoutés dans le milieu de coculture, alors qu'il est diminué pour des lignées lymphocytaires de type B (Olsen *et al.*, 1993). Lorsque les hydrolases acides purifiées des lymphocytes BW5147.3 sont ajoutées aux fibroblastes, l'endocytose de l'activité glucuronosidase est négligeable. Ces résultats indiquent que le transfert d'activité lysosomique des cellules BW5147.3 est possible, mais qu'il n'est pas dirigé par un mécanisme de sécrétion-endocytose d'hydrolases phosphorylées. Ils supportent ainsi l'existence de deux mécanismes reliés à la libération des enzymes lysosomiques. C'est un compartiment prélysosomique qui serait impliqué dans le transfert des activités lysosomiques jusqu'aux cellules acceptrices via la membrane plasmique.

Les données relatant une fusion potentielle des compartiments du système lysosomique avec la membrane plasmique, sont toujours obtenues après stimulation des cellules hématopoïétiques. Il est intéressant de noter que la fuite de contenu lysosomique n'est peut-être pas seulement réservée aux cellules hématopoïétiques. En effet, des dommages provoqués

au niveau de la membrane plasmique sont suivis d'une rapide et massive exocytose (Miyake et McNeil, 1995). Les endosomes et lysosomes semblent être recrutés au niveau de la zone altérée de la membrane plasmique par un mécanisme Ca^{2+} -dépendant (Miyake et Mc Neil, 1995; Coorsen *et al.*, 1996), dans le but de réparer la membrane plasmique, réparation effective après fusion avec la membrane.

La fusion de lysosomes avec la membrane plasmique provoquant la libération du contenu du système lysosomique est discutée, elle n'est pas établie. La mesure de la fuite d'oligosaccharides libres pourrait constituer un modèle d'étude intéressant. Par exemple, s'il existe une fusion des lysosomes avec la membrane plasmique, peut-on envisager une relocalisation transitoire de l'appareil de transport conduisant à la fuite des oligosaccharides libres directement du compartiment cytosolique vers le milieu extracellulaire?

C. Peut-on envisager une fonction pour les oligosaccharides libres cytosoliques?

Les oligosaccharides libérés dans le *reticulum* endoplasmique suivent une voie de dégradation particulière.

D'un premier compartiment vésiculaire (le *reticulum* endoplasmique), les oligosaccharides libres rejoignent un autre compartiment vésiculaire (le lysosome) via le cytosol. Deux systèmes de transport doivent assurer la traversée des membranes réticulaire et lysosomique. C'est donc une voie intracellulaire complexe qui assure finalement la dégradation des oligosaccharides libres.

Les travaux de Wieland *et al.* (1987) ont établi la demi-vie d'un glycotripeptide dans les cellules CHO et HepG2 à 10 minutes, témoignant d'une efficacité de la sécrétion. Ces travaux ont également conduit à la notion du « flux en masse », basée sur l'absence de signal sur les glycoprotéines destinées à être sécrétées, la sécrétion serait dans ces conditions une voie par défaut. Ce « flux en masse » est maintenant discuté. Wieland *et al.* (1987) avait observé que l'albumine sérique avait un temps de demi-vie d'environ 50 minutes dans les cellules HepG2, bien supérieur à celui des glycopeptides. Depuis, il a été montré que certaines protéines localisées dans le *reticulum* endoplasmique aident au repliement correct des protéines nouvellement synthétisées, ce qui pourrait ralentir leur vitesse de sécrétion (Helenius, 1994). Il est donc possible que les oligosaccharides libérés dans le *reticulum* endoplasmique soient

rapidement transportés dans le compartiment cytosolique afin d'éviter des interactions avec les lectines et enzymes présentes le long de la voie d'exocytose (Moore *et al.*, 1995).

La calnexine est une lectine membranaire du *reticulum* endoplasmique. C'est une protéine de 64 kDa largement répandue; la calréticuline, protéine soluble présente la même activité lectinique. La fonction de cette lectine tient dans son intervention dans le repliement des protéines nouvellement synthétisées. Elle interagit spécifiquement avec l'oligosaccharide $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ qui est dans un premier temps formé après l'intervention des glucosidases I et II (Helenius, 1994). Un cycle de déglucosylation-reglucosylation se met alors en place jusqu'à ce que la protéine nouvellement synthétisée soit correctement repliée (Helenius, 1994; Hammond et Helenius, 1995). Ce cycle fait intervenir i) la glucosidase II qui clive le résidu de glucose et provoque la dissociation calnexine-glycoprotéine et, ii) une UDP-glucose: glycoprotéine glucosyltransférase (Parodi, 1996) qui est chargée de reglucosyler la protéine et induit une nouvelle fixation de la calnexine. L'efficacité de ce mécanisme réside dans la reconnaissance spécifique d'une protéine mal repliée par la glucosyltransférase. En effet, les protéines mal repliées présentent des zones hydrophobes situées à l'extérieur, ce sont sans doute de telles interactions qui existent entre la glucosyltransférase et ces protéines (Parodi, 1996).

Il est intéressant de noter que des protéines non glycosylées ou non déglucosylées par les glucosidases I et II ne se fixent pas sur la calnexine (Kearse *et al.*, 1994; Ora et Helenius, 1995). Par contre, les oligosaccharides libres monoglucosylés reconnaissent la calnexine (Ware *et al.*, 1995). Ceci souligne que i) si la lectine reconnaît une séquence peptidique, elle reconnaît tout d'abord l'oligosaccharide monoglucosylé, ii) **les oligosaccharides libres présents dans le *reticulum* endoplasmique pourraient modifier les interactions des glycoprotéines avec la calnexine.**

ERGIC-53/MR60 est une lectine membranaire située dans le compartiment intermédiaire. Une lectine spécifique des résidus de mannose a été isolée de la lignée humaine HL60 (Pimpaneau *et al.*, 1991) et, localisée sur des vésicules intracellulaires (Carpentier *et al.*, 1994). Cette lectine a été identifiée comme la protéine ERGIC-53 après comparaison des séquences nucléotidiques (Arar *et al.*, 1995). ERGIC-53 est située le long de la voie de sécrétion et, plus particulièrement dans le compartiment intermédiaire à partir duquel elle est recyclée entre le *reticulum* endoplasmique et l'appareil de Golgi (Schweizer *et al.*, 1988; 1991).

De récents travaux (Itin *et al.*, 1996) montrent qu'ERGIC-53 présente effectivement des propriétés de lectine.

La découverte de cette lectine soulève la question de l'intervention des glycanes dans l'efficacité de la sécrétion et/ou la concentration des glycoprotéines. Ainsi, ERGIC-53 pourrait concentrer les glycoprotéines dans le *reticulum* endoplasmique avant le transport jusqu'à l'appareil de Golgi (Fiedler et Simons, 1995). La spécificité de la lectine sur les oligosaccharides polymannosylés n'est pas encore précisée. L'interaction des oligosaccharides libérés dans la lumière du *reticulum* endoplasmique peut être spéculée.

Au contraire, il semble que ni les oligosaccharides libres ni la mannosidase cytosoliques ne perturbent les étapes de la biosynthèse des intermédiaires lipidiques qui se déroulent du côté cytosolique, à savoir l'élaboration du $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$. Ce dernier présentant la même structure linéaire que le $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_1$, produit limite de la mannosidase cytosolique, est ainsi protégé de la dégradation par cette enzyme cytosolique (figure 2 de l'introduction, Kornfeld et Kornfeld, 1985; Haeuw *et al.*, 1991b). Il est donc possible que les oligosaccharides libres suivent une voie de dégradation complexe mise en place pour éviter les interactions avec la voie de biosynthèse des N-glycanes.

Les oligosaccharides libres cytosoliques pourraient avoir une fonction.

Certains produits de dégradation jouent un rôle cellulaire, c'est le cas par exemple de l'inositol 3-phosphate et du diacylglycérol, produits de dégradation du phosphatidylinositol 4,5 biphosphate (Divecha et Irvine, 1995) et c'est le cas des céramides, produits de dégradation des glycosphingolipides (Hakomori et Igarashi, 1995). Une fonction pour le $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_1$, produit limite de la dégradation des oligosaccharides libres cytosoliques peut de la même façon être envisagée.

Des travaux récents sur une protéine de liaison de l'actine, la comitine, suggèrent une fonction possible pour les oligosaccharides libres cytosoliques. La comitine est une protéine de 24 kDa, constituée de deux domaines, un domaine N-terminal présentant une homologie avec des lectines de plantes spécifiques des résidus de mannose (Jung *et al.*, 1996) et un petit domaine C-terminal. Weiner *et al.* (1993) ont révélé la localisation de la comitine au niveau de l'appareil de Golgi, du *reticulum* endoplasmique et de petites vésicules. De plus, la comitine possède un domaine de fixation sur l'actine, supposant qu'elle permet la liaison de l'appareil de Golgi et du *reticulum* endoplasmique sur les microfilaments d'actine (Weiner *et al.*, 1993). Des interactions de type ionique lient la comitine à l'actine (Jung *et al.*, 1996). L'inhibition de la

fixation de la comitine sur des préparations de membranes de *D. discoïdeum* par 100 mM de mannose suggère aux auteurs une reconnaissance de type lectinique entre la comitine et des macromolécules présentes au niveau de l'appareil de Golgi et/ou du *reticulum* endoplasmique; le glycanes serait orienté vers le compartiment cytosolique. L'interaction des oligosaccharides libres et particulièrement le $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_1$ avec la comitine peut être envisagée.

Sachant que la quantité d'oligosaccharides libres produites chaque jour par les cellules HepG2 représente 15% de la synthèse des glycoprotéines et sachant qu'une cellule hépatique élabore une quantité élevée de glycoprotéines plasmatiques, il est facile de supposer que la quantité d'oligosaccharides libres qui suit la voie *reticulum* endoplasmique-cytosol-lysosome est importante. Malheureusement, les expériences de pulse-chasse ne rendent pas compte de l'efficacité d'un tel système. Par exemple, le temps de demi-vie des oligosaccharides libres cytosoliques a été estimé à 3-4 heures. Or, la présence de 5 mM de mannose dans le milieu de chasse ralentit la démannosylation cytosolique et en conséquence surestime la demi-vie des oligosaccharides libres cytosoliques. Nous ne savons pas non plus si une dilution des oligosaccharides radiomarqués par des oligosaccharides libres non radiomarqués s'opère dans le compartiment cytosolique. De tels recherches pourraient nous apporter des éléments pour un rôle éventuel des oligosaccharides libres cytosoliques.

BIBLIOGRAPHIE

- ◊ **Al Daher S., De Gasperi R., Daniel P., Hall N., Warren C. D. et Winchester B.,** (1991) The substrate-specificity of human lysosomal α -D-mannosidase in relation to genetic α -mannosidosis, *Biochem. J.*, **277**, 743-751.
- ◊ **Al Daher S., De Gasperi R., Daniel P., Hirani S., Warren C. D. et Winchester B. G.,** (1992) Substrate specificity of human liver neutral α -mannosidase, *Biochem. J.*, **286**, 47-53.
- ◊ **Allen S., Naim H. Y. et Bulleid N. J.,** (1995) Intracellular folding of tissue-type plasminogen activator, effects of disulfide bond formation on N-linked glycosylation and secretion, *J. Biol. Chem.*, **270**, 4797-4804.
- ◊ **Aniento F., Emans N., Griffiths G. et Gruenberg J.,** (1993) Cytoplasmic dynein-dependent vesicular transport from early to late endosomes, *J. Cell Biol.*, **123**, 1373-1387.
- ◊ **Aniento F., Gu F., Parton R. G. et Gruenberg J.,** (1996) An endosomal β cop is involved in the pH-dependent formation of transport vesicles destined for late endosomes, *J. Cell Biol.*, **133**, 29-41.
- ◊ **Aniento F., Roche E., Cuervo A. M. et Knecht E.,** (1993) Uptake and degradation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by rat liver lysosomes, *J. Biol. Chem.*, **268**, 10463-10470.
- ◊ **Anumula K. R. et Spiro R. G.,** (1983) Release of glucose-containing polymannose oligosaccharides during glycoprotein biosynthesis, studies with thyroid microsomal enzymes and slices, *J. Biol. Chem.*, **258**, 15274-15282.
- ◊ **Arar C., Carpentier V., Le Caer J-P., Monsigny M., Legrand A. et Roche A-C.,** (1995) ERGIC-53, a membrane protein of the endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment, is identical to MR60, an intracellular mannose-specific lectin of myelomonocytic cells, *J. Biol. Chem.*, **270**, 3551-3553.
- ◊ **Authier F., Posner B. I. et Bergeron J. J. M.** (1994) Hepatic endosomes are a major physiological locus of insulin and glucagon degradation in vivo, *in Cellular proteolytic systems*, eds Ciechanover A. J. et Schwartz A. L., 89-113.
- ◊ **Baranski T., Koelsch G., Hartsuck J. A. et Kornfeld S.,** (1991) Mapping and molecular modeling of a recognition domain for lysosomal enzyme targeting, *J. Biol. Chem.*, **266**, 23365-23372.
- ◊ **Bause E.,** (1983) Structural requirements of N-glycosylation of proteins, studies with proline peptides as conformational probes, *Biochem. J.*, **209**, 331-336.
- ◊ **Bause E., Breuer W., Schweden J., Roeser R. et Geyer R.,** (1992) Effect of substrate structure on the activity of Man₉-mannosidase from pig liver involved in N-linked oligosaccharide processing, *Eur. J. Biochem.*, **208**, 451-457.
- ◊ **Bieberich E. et Bause E.,** (1995) Man₉-mannosidase from human kidney is expressed in COS cells as a Golgi-resident type II transmembrane N-glycoprotein, *Eur. J. Biochem.*, **233**, 644-649.
- ◊ **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.

- ◊ **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.
- ◊ **Bowman E. J., Siebers A. et Altendorf K.**, (1988) Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 7972-7976.
- ◊ **Bresciani R. et von Figura K.**, (1996) Dephosphorylation of the mannose 6-phosphate recognition marker is localized in late compartments of the endocytic route, identification of purple acid phosphatase (uteroferrin) as the candidate phosphatase, *Eur. J. Biochem.*, **238**, 669-674.
- ◊ **Breuer W. et Bause E.**, (1995) Oligosaccharyltransferase is a constitutive component of an oligomeric protein complex from pig liver endoplasmic reticulum, *Eur. J. Biochem.*, **228**, 689-696.
- ◊ **Bulleid N. J., Bassel-Duby R. S., Freedman R. B., Sambrook J. F. et Gething M.-J.**, (1992) Cell-free synthesis of enzymically active tissue-type plasminogen activator, protein folding determines the extent of N-linked glycosylation, *Biochem. J.*, **286**, 275-280.
- ◊ **Cacan R., Ceccheli R. et Verbert A.**, (1987) Catabolic pathway of oligosaccharide-diphospho-dolichol, study of the fate of the oligosaccharidic moiety in mouse splenocytes, *Eur. J. Biochem.*, **166**, 469-474.
- ◊ **Cacan R., Dengremont C., Labiau O., Kmiécik D., Mir A.-M. et Verbert A.**, (1996) Occurrence of a cytosolic neutral chitobiase activity involved in oligomannoside degradation: a study with Madin-Darby bovine kidney (MDBK) cells, *Biochem. J.*, **313**, 597-602.
- ◊ **Cacan R., Hoflack B. et Verbert A.**, (1980) Fate of oligosaccharide-lipid intermediates synthesized by resting rat-spleen lymphocytes, *Eur. J. Biochem.*, **106**, 473-479.
- ◊ **Cacan R., Lepers A., B elard M. et Verbert A.**, (1989) Catabolic pathway of oligosaccharide-diphospho-dolichol, subcellular sites of the degradation of the oligomannoside moiety, *Eur. J. Biochem.*, **185**, 173-179.
- ◊ **Cacan R., Villers C., B elard M., Kaiden A., Krag S. S. et Verbert A.**, (1992) Different fates of the oligosaccharide moieties of the lipid intermediates, *Glycobiology*, **2**, 127-136.
- ◊ **Carlsson S. R. et Fukuda M.**, (1992) The lysosomal membrane glycoprotein Lamp-1 is transported to lysosomes by two alternative pathways, *Arch. Biochem. Biophys.*, **296**, 630-639.
- ◊ **Caroll 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.
- ◊ **Carpentier V., Vassard C., Plessis C., Motta G., Monsigny M. et Roche A.-C.**, (1994) Characterization and cellular localization by monoclonal antibodies of the 60 kDa mannose specific lectin of human promyelocytic HL60, *Glycoconjugate J.*, **11**, 333-338.
- ◊ **Carson D. D., Tang J.-P. et Hu G.**, (1987) Estrogen influences dolichyl phosphate distribution among glycolipid pools in mouse uteri, *Biochemistry*, **26**, 1598-1606.

- ◊ **Chalifour R. et Spiro R. G.**, (1988) Effect of phospholipids on thyroid oligosaccharyltransferase activity and orientation, evaluation of structural determinants for stimulation of N-glycosylation, *J. Biol. Chem.*, **263**, 15673-15680.
- ◊ **Chapman A., Trowbridge I. S., Hyman R. et Kornfeld S.**, (1979) Structure of the lipid-linked oligosaccharides that accumulate in Class E Thy-1 negative mutant lymphomas, *Cell*, **17**, 509-515.
- ◊ **Chiang H-L., Terlecky S. R., Plant C. P. et Dice J. F.**, (1989) A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins, *Science*, **246**, 382-385.
- ◊ **Clague M. J., Urbé S., Aniento F. et Gruenberg J.**, (1994) Vacuolar ATPase activity is required for endosomal carrier vesicle formation, *J. Biol. Chem.*, **269**, 21-24.
- ◊ **Coorsen J. R., Scmitt H. et Almers W.**, (1996) Ca²⁺-triggers massive exocytosis in chinese hamster ovary cells, *EMBO J.*, **15**, 3787-3791.
- ◊ **Courtoy P. J.**, (1991) Dissection of endosomes, in *Intracellular trafficking of proteins*, Eds Steer C. J. and Hanover J. A., Cambridge University Press, 103-156.
- ◊ **Cuervo A. M. et Dice J. F.**, (1996) A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes, *Science*, **273**, 501-503.
- ◊ **Cuervo A. M., Knecht E., Terlecky S. R. et Dice J. F.**, (1995) Activation of a selective pathway of lysosomal proteolysis in rat liver by prolonged starvation, *Am. J. Physiol.*, **269**, C1200-C1208.
- ◊ **Daniel P. F., Evans J. E., De Gasperi R., Winchester B. et Warren C. D.**, (1992) A human lysosomal α (1-6)-mannosidase active on the branched trimannosyl core of complex glycans, *Glycobiology*, **2**, 327-336.
- ◊ **Daniel P. F., Winchester B. et Warren C. D.**, (1994) Mammalian α -mannosidases - multiple forms but a common purpose? *Glycobiology*, **4**, 551-566.
- ◊ **Datema R. et Schwarz R. T.**, (1981) Effect of energy depletion on the glycosylation of a viral glycoprotein, *J. Biol. Chem.*, **256**, 11191-11198.
- ◊ **De Duve C.**, (1963) The lysosome concept. In *Lysosomes*, Eds de Reuck S., Cameron M. P., Churchill London, 1-35.
- ◊ **De Gasperi R., Al Daher S., Winchester B. G. et Warren C. D.** (1992a) Substrate specificity of the bovine and feline neutral α -mannosidases, *Biochem. J.*, **286**, 55-63.
- ◊ **De Gasperi R., Daniel P. F. et Warren C. D.**, (1992b) A human lysosomal α -mannosidase specific for the core of complex glycans, *J. Biol. Chem.*, **267**, 9706-9712.
- ◊ **Dice J. F. et Chiang H-L.**, (1989) Peptide signals for protein degradation within lysosomes, *Biochem. Soc. Symp.*, **55**, 45-55.
- ◊ **Dice J. F. et Terlecky S. R.** (1994) Selective degradation of cytosolic proteins by lysosomes, in *Cellular proteolytic systems*, eds Ciechanover A. J. et Schwartz A. L., 55-64.
- ◊ **Divecha N. et Irvine R. F.**, (1995) Phospholipid signaling, *Cell*, **80**, 269-278.
- ◊ **Dunn K. W. et Maxfield F. R.**, (1992) Delivery of ligands from sorting endosomes to late endosomes occurs by maturation of sorting endosomes, *J. Cell Biol.*, **117**, 301-310.
- ◊ **Dunn W. A.**, (1994) Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation, *Trends in Cell Biol.*, **4**, 139-143.

- ◇ **Elbein A. D., Solf R., Dorling P. R. et Vosbeck K.,** (1981) Swainsonine: an inhibitor of glycoprotein processing, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 7393-7397.
- ◇ **Farriaux J-P., Legouis I., Humbel R., Dhondt J. L., Richard P., Strecker G., Fourmaintraux A., Ringel J. et Fontaine G.,** (1975) La mannosidose, à propos de 5 observations, *La nouvelle presse médicale*, **4**, 1867-1870.
- ◇ **Fiedler K. et Simmons K.,** (1995) The role of N-glycans in the secretory pathway, *Cell*, **81**, 309-312.
- ◇ **Fukuda M.,** (1991) Lysosomal membrane glycoproteins, structure, biosynthesis, and intracellular trafficking, *J. Biol. Chem.*, **266**, 21327-21330.
- ◇ **Futter C. E., Pearse A., Hewlett L. J. et Hopkins C. R.,** (1996) Multivesicular endosomes containing internalized EGF-EGF receptor complexes mature and then fuse directly with lysosomes, *J. Cell Biol.*, **132**, 1011-1023.
- ◇ **Gavel Y. et von Heijne G.,** (1990) Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering, *Prot. Engineering*, **3**, 433-442.
- ◇ **Gershman H. et Robbins P. W.,** (1981) Transitory effects of glucose starvation on the synthesis of dolichol-linked oligosaccharides in mammalian cells, *J. Biol. Chem.*, **256**, 7774-7780.
- ◇ **Gonzales-Noriega A., Grubb J. H., Talkad V. et Sly W.,** (1980) Chloroquine inhibits lysosomal enzyme pinocytosis and enhances lysosomal enzyme secretion by impairing receptor recycling, *J. Cell Biol.*, **85**, 839-852.
- ◇ **Granger B. L., Green S. A., Gabel S. A., Howe C. L., Mellman I. et Helenius A.,** (1990) Characterization and cloning of lgp110, a lysosomal membrane glycoprotein from mouse and rat cells, *J. Biol. Chem.*, **265**, 12036-12043.
- ◇ **Grard T., Herman V., Saint-Pol A., Haeuw J-F., Kmićik D., Labiau O., Mir A-M., Alonso C., Verbert A., Cacan R. et Michalski J-C.,** (1996) Oligomannosides or oligosaccharide-lipids as potential substrates for rat liver cytosolic α -D-mannosidase, *Biochem. J.*, **316**, 787-792.
- ◇ **Grard T., Saint-Pol A., Haeuw J-F., Alonso C., Wieruszkeski J-M., Strecker G. et Michalski J-C.,** (1994) Soluble forms of α -D-mannosidases from rat liver, separation and characterization of two enzymic forms with different substrate specificities, *Eur. J. Biochem.*, **223**, 99-106.
- ◇ **Griffiths G. M.** (1996) Secretory lysosomes- a special mechanism of regulated secretion in haemopoietic cells, *Trends Cell Biol.*, **6**, 329-332.
- ◇ **Griffiths G., Hoflack B., Simons K., Mellman I.,** (1988) The mannose 6-P receptor and the biogenesis of lysosomes, *Cell*, **52**, 329-341.
- ◇ **Griffiths G., Matteoni R., Back R. et Hoflack B.,** (1990) Characterisation of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor-enriched prelysosomal compartment in NRK cells, *J. Cell Sci.*, **95**, 441-461.
- ◇ **Gruenberg J., Griffiths G. et Howell K. E.,** (1989) Characterization of the early endosome and putative endocytic carrier vesicles in vivo and with an assay of vesicle fusion in vitro, *J. Cell Biol.*, **108**, 1301-1316.

- ◊ **Haeuw J-F., Michalski J-C., Strecker G., Spik G. et Montreuil J.,** (1991a) Cytosolic glycosidases: do they exist?, *Glycobiology*, **1**, 487-492.
- ◊ **Haeuw J-F., Strecker G., Wieruszkeski J-M., Montreuil J. et Michalski J-C.,** (1991b) Substrate specificity of rat liver cytosolic α -D-mannosidase, novel degradative pathway for oligomannosidic type glycans, *Eur. J. Biochem.*, **202**, 1257-1268.
- ◊ **Hakomori S. et Igarashi Y.,** (1995) Functional role of glycosphingolipids in cell recognition and signaling, *J. Biochem. Tokyo*, **118**, 1091-1103.
- ◊ **Hammond C. et Helenius A.,** (1995) Quality control in the secretory pathway, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **7**, 523-529.
- ◊ **Harding T. M., Morano K. A., Scott S. V. et Klionsky D. J.,** (1995) Isolation and characterization of yeast mutants in the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway, *J. Cell Biol.*, **131**, 591-602.
- ◊ **Hasilik A. et Neufeld E. F.,** (1980) Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts, synthesis as precursors of higher molecular weight, *J. Biol. Chem.*, **255**, 4937-4945.
- ◊ **Hayes S. A. et Dice J. F.,** (1996) Roles of molecular chaperones in protein degradation, *J. Cell Biol.*, **132**, 255-258.
- ◊ **Helenius A.,** (1994) How N-linked oligosaccharides affect glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum, *Mol. Biol. Cell*, **5**, 253-265.
- ◊ **Helenius A., Mellman I., Wall D. et Hubbard A.,** (1983) Endosomes, *Trends Biochem. Sci.*, **8**, 245-250.
- ◊ **Hille-Rehfeld A.,** (1995) Mannose 6-P receptors in sorting and transport of lysosomal enzymes, *Biochim. Biophys. Acta*, **1241**, 177-194.
- ◊ **Hiller M. H., Finger A., Schweiger M. et Wolf D. H.,** (1996) ER degradation of a misfolded luminal protein by the cytosolic ubiquitin-proteasome pathway, *Science*, **273**, 1725-1728.
- ◊ **Hirschberg C. B. et Snider M. D.,** (1987) Topography of glycosylation in the rough endoplasmic and Golgi apparatus, *Ann. Rev. Biochem.*, **56**, 63-87.
- ◊ **Hoflack B. et Kornfeld S.,** (1985) Purification and characterization of a cation-dependent mannose 6-phosphate receptor from murine P388D₁ macrophages and bovine liver, *J. Biol. Chem.*, **260**, 12008-12014.
- ◊ **Hoflack B., Cacan R. et Verbert A.,** (1981) Dolichol pathway in lymphocytes from rat spleen, influence of the glucosylation on the cleavage of dolichyl diphosphate oligosaccharides into phosphooligosaccharides, *Eur. J. Biochem.*, **117**, 285-290.
- ◊ **Hoflack B., Fujimoto K. et Kornfeld S.,** (1987) The interaction of phosphorylated oligosaccharides and lysosomal enzymes with bovine liver cation-dependent mannose 6-phosphate receptor, *J. Biol. Chem.*, **260**, 12008-12014.
- ◊ **Höning S. et Hunziker W.,** (1995) Cytoplasmic determinants involved in direct lysosomal sorting, endocytosis, and basolateral targeting of rat Igp120 (lamp-1) in MDCK cells, *J. Cell Biol.*, **128**, 321-332.
- ◊ **Houri J-J., Ogier-Denis E., De Stefanis D., Bauvy C., Baccino F. M., Isodoro C. et Codogno P.,** (1995) Differentiation-dependent autophagy controls the fate of newly

synthesized N-linked glycoproteins in the colon adenocarcinoma HT-29 cell line, **309**, 521-527.

- ◊ **Hsu A-F., Baynes J. W. et Heath E. C.**, (1974) The role of a dolichol-oligosaccharide as an intermediate in glycoprotein biosynthesis, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 2391-2395.
- ◊ **Hubbard C. S. et Robbins P. W.**, (1980) Synthesis of the N-linked oligosaccharides of glycoproteins, assembly of the lipid-linked precursor oligosaccharide and its relation to protein synthesis *in vivo*, *J. Biol. Chem.*, **255**, 11782-11793.
- ◊ **Hubbard S. C. et Ivatt R. J.**, (1981) Synthesis and processing of asparagine-linked oligosaccharides, *Ann. Rev. Biochem.*, **50**, 555-583.
- ◊ **Imort M., Zühlsdorf M., Feige U., Hasilik A. et von Figura K.**, (1983) Biosynthesis and transport of lysosomal enzymes in human monocytes and macrophages, effects of ammonium chloride, zymosan and tunicamycin, *Biochem J.*, **214**, 671-678.
- ◊ **Itin C., Roche A-C., Monsigny M. et Hauri H. P.**, (1996) ERGIC-53 is a functional mannose-selective and calcium-dependent human homologue of leguminous lectins, *Mol. Biol. Cell*, **7**, 483-493.
- ◊ **Jahraus A., Storrie B., Griffiths G. et Desjardins M.**, (1994) Evidence for retrograde traffic between terminal lysosomes and the prelysosomal/late compartment, *J. Cell Sci.*, **107**, 145-157.
- ◊ **Jonas A. J., Speller R. J., Conrad P. B. et Dubinsky W. P.**, (1989) Transport of N-acetyl-D-glucosamine and N-acetyl-D-galactosamine by rat liver lysosomes, *J. Biol. Chem.*, **264**, 4953-4956.
- ◊ **Jung E., Fucini P., Stewart M., Noegel A. A. et Schleicher M.**, (1996) Linking microfilaments to intracellular membranes: the actin-binding and vesicle-associated protein comitin exhibits a mannose-specific lectin binding, *EMBO J.*, **15**, 1238-1246.
- ◊ **Kadowaki M., Venerando R., Miotto G. et Mortimore G. E.**, (1994) *De novo* autophagic vacuole formation in hepatocytes permeabilized by *Staphylococcus aureus* α -toxin, *J. Biol. Chem.*, **269**, 3703-3710.
- ◊ **Karaoglu D., Kelleher D. J. et Gilmore R.**, (1995) Functional characterization of Ost3p. Loss of the 34-kD subunit of the *saccharomyces cerevisiae* oligosaccharyltransferase results in biased underglycosylation of acceptor substrates, *J. Cell Biol.*, **130**, 567-577.
- ◊ **Kasper D., Dittmer F., von Figura K. et Pohlman R.**, (1996) Neither type of mannose 6-phosphate receptor is sufficient for targeting of lysosomal enzymes along intracellular routes, *J. Cell Biol.*, **134**, 615-623.
- ◊ **Kean E. L.**, (1985) Stimulation by dolichol phosphate-mannose and phospholipids of the biosynthesis of N-acetylglucosaminylpyrophosphoryl dolichol, *J. Biol. Chem.*, **260**, 12561-12571.
- ◊ **Kearse K. P., Williams D. B. et Singer A.**, (1994) Persistence of glucose residues on core oligosaccharides prevents association of TCR α and TCR β proteins with calnexin and results specifically in accelerated degradation of nascent TCR α proteins within the endoplasmic reticulum, *EMBO J.*, **13**, 3678-3686.

- ◊ **Kelleher D. J. et Gilmore R.**, (1994) The *saccharomyces cerevisiae* oligosaccharyltransferase is a protein complex composed of Wbp1p, Sw1p, and four additional polypeptides, *J. Biol. Chem.*, **269**, 12908-12917.
- ◊ **Kelleher D. J., Kreibich G. et Gilmore R.**, (1992) Oligosaccharyltransferase activity is associated with a protein complex composed of ribophorins I and II and a 48 kd protein, *Cell*, **69**, 55-65.
- ◊ **Kitajima K., Suzuki T., Kouchi Z., Inoue S. et Inoue Y.**, (1995) Identification and distribution of peptide:N-glycanase (PNGase) in mouse organs, *Arch. Biochem. Biophys.*, **319**, 393-401.
- ◊ **Klionsky D. J., Cueva R. et Yaver D. S.**, (1992) Aminopeptidase I of *Saccharomyces cerevisiae* is localised to the vacuole independent of the secretory pathway, *J. Cell Biol.*, **119**, 287-299.
- ◊ **Klionsky D. J., Herman P. K. et Emr S. C.**, (1990) The fungal vacuole: composition, function and biogenesis, *Microbiol. Rev.*, **54**, 266-292.
- ◊ **Kmićik D., Herman V., Stroop C. J. M., Michalski J-C., Mir A-M., Labiau O., Verbert A. et Cacan R.**, (1995) Catabolism of glycan moieties of lipid intermediates leads to a single Man₅GlcNAc₂ oligosaccharide isomer: a study with permeabilised CHO cells, *Glycobiology*, **5**, 483-494.
- ◊ **Konrad M. et Merz W. E.**, (1994) Regulation of N-glycosylation, long term effect of cyclic AMP mediates enhanced synthesis of the dolichol pyrophosphate core oligosaccharide, *J. Biol. Chem.*, **269**, 8659-8666.
- ◊ **Konrad M. et Merz W. E.**, (1996) Long term effect of cyclic AMP on N-glycosylation is caused by an increase in the activity of the *cis*-prenyltransferase, *Biochem. J.*, **316**, 575-581.
- ◊ **Kornfeld R. et Kornfeld S.**, (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides, *Ann. Rev. Biochem.*, **54**, 631-664.
- ◊ **Kornfeld S. et Mellman I.**, (1989) The biogenesis of lysosomes, *Annu. Rev. Cell Biol.*, **5**, 483-525.
- ◊ **Kornfeld S.**, (1992) Structure and fonction of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptors, *Annu. Rev. Biochem.*, **61**, 307-330.
- ◊ **Kornfeld S., Gregory W. et Chapman A.**, (1979) Class E Thy-1 negative mouse lymphoma cells utilize an alternate pathway of oligosaccharide processing to synthesize complex-type oligosaccharides, *J. Biol. Chem.*, **254**, 11649-11654.
- ◊ **Kumar V., Scott Heinemann F. et Ozols J.**, (1994) Purification and characterization of avian oligosaccharyltransferase, complete amino acid sequence of the 50-kDa subunit, *J. Biol. Chem.*, **269**, 13451-13457.
- ◊ **Lee H-K. et Marzella L.**, (1992) Transport of macromolécules to lysosomes, *in Pathophysiology of lysosomal transport*, Eds Thoene J. G., CRC press, Inc, 231-293.
- ◊ **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.
- ◊ **Ludwig T., Griffiths G. et Hoflack B.**, (1991) Distribution of newly synthesized lysosomal enzymes in the endocytic pathway of NRK cells, *J. Cell Biol.*, **115**, 1561-1572.

- ◊ **Ludwig T., Le Borgne R. et Hoflack B.**, (1995) Roles for mannose 6-phosphate receptors in lysosomal enzyme sorting, IGF II binding and clathrin-coat assembly, *Trens Cell Biol.*, **5**, 202-206.
- ◊ **Ludwig T., Munier-Lehmann H., Bauer U., Hollinshead M., Ovitt C., Lobel P., et Hoflack B.**, (1994) Differential sorting of lysosomal enzymes in mannose 6-phosphate receptor-deficient fibroblasts, *EMBO J.*, **13**, 3430-3437.
- ◊ **Ludwig T., Ovitt C. E., Bauer U., Hollinshead M., Remmler J., Lobel P., Rütther U. et Hoflack B.**, (1993) Targeted disruption of the mouse cation-dependent mannose 6-phosphate receptor results in partial missorting of multiple lysosomal enzymes, *EMBO J.*, **12**, 5225-5235.
- ◊ **Luiken J. J. F. P., Aerts J. M. F. G. et Meijer A. J.**, (1996) The role of intralysosomal pH in the control of autophagic proteolytic flux in rat hepatocytes, *Eur. J. Biochem.*, **235**, 564-573.
- ◊ **Mac Intyre G. F. et Erickson A. H.**, (1993) The lysosomal proenzyme receptor that binds procathepsin L to microsomal membranes at pH 5 is a 43 kDa integral membrane protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 10588-10592.
- ◊ **Mancini G. M. S., Beerens C. E. M. T. et Verheijen F. W.**, (1990) Glucose transport in lysosomal membrane vesicles, kinetic demonstration of a carrier for neutral hexoses, *J. Biol. Chem.*, **265**, 12380-12387.
- ◊ **Mancini G. M. S., de Jonge H. R., Galjaard H. et Verheijen F. W.**, (1989) Characterization of a proton-driven carrier for sialic acid in the lysosomal membrane, evidence for a group-specific transport system for acidic monosaccharides, *J. Biol. Chem.*, **264**, 15247-15254.
- ◊ **Masson P. K. et Lundblad A.**, (1974) Mannosidosis: detection of the disease and of heterozygotes using serum and leucocytes, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **56**, 296-303.
- ◊ **Matsuura F., Nunez H. A., Grabowski G. A. et Sweeley C. C.**, (1981) Structural studies of urinary oligosaccharides from patients with mannosidosis, *Arch. Biochim. Biophys.*, **207**, 337-352.
- ◊ **Maxfield F. R. et Yamashiro D. J.**, (1991) Acidification of organelles and the intracellular sorting of proteins during endocytosis, in *Intracellular trafficking of proteins*, Eds Steer C. J. and Hanover J. A., Cambridge University Press, 157-182.
- ◊ **McElligott M. A., Miao P. et Dice J. F.**, (1985) Lysosomal degradation of ribonuclease A and ribonuclease S-protein microinjected into the cytosol of human fibroblasts, *J. Biol. Chem.*, **260**, 11986-11993.
- ◊ **Mellman I., Fuchs R. et Helenius A.**, (1986) Acidification of the endocytic and exocytic pathways, *Ann. Rev. Biochem.*, **55**, 663-700.
- ◊ **Miyake K. et Mc Neil P. L.**, (1995) Vesicle accumulation and exocytosis at sites of plasma membrane disruption, *J. Cell Biol.*, **131**, 1737-1745.
- ◊ **Moore S. E. H. et Spiro R. G.**, (1994) Intracellular compartmentalization and degradation of free polymannose oligosaccharides released during glycoprotein biosynthesis, *J. Biol. Chem.*, **269**, 12715-12721.

- ◊ **Moore S. E. H., Bauvy C. et Codogno P.,** (1995) Endoplasmic reticulum-to-cytosol transport of free polymannose oligosaccharides in permeabilized HepG2 cells, *EMBO J.*, **14**, 6034-6042.
- ◊ **Moremen K. W., Trimble R. B. et Herscovics A.,** (1994) Glycosidases of the asparagine-linked oligosaccharide processing pathway, *Glycobiology*, **4**, 113-125.
- ◊ **Moriyama Y. et Nelson N.,** (1989) Lysosomal H⁺-translocating ATPase has a similar subunit structure to chromaffin granule H⁺-ATPase complex, *Biochim. Biophys. Acta*, **980**, 241-247.
- ◊ **Mortimore G. E. et Kadowaki M.,** (1994) Autophagy: its mechanism and regulation, in *Cellular proteolytic systems*, eds Ciechanover A. J. et Schwartz A. L., 65-88.
- ◊ **Mostov K. E.,** (1994) Transepithelial transport of immunoglobulins, *Ann. Rev. Immunol.*, **12**, 63-84.
- ◊ **Mullock B. M., Branch W. J., van Schaik M., Gilbert L. K. et Luzio J-P.** (1989) Reconstitution of an endosome-lysosome interaction in a cell-free system, *J. Cell Biol.*, **108**, 2093-2099.
- ◊ **Mullock B. M., Perez J. H., Kuwama T., Gray S. R. et Luzio J-P.** (1994) Lysosomes can fuse with a late endosomal compartment in a cell-free system from rat liver, *J. Cell Biol.*, **126**, 1173-1182.
- ◊ **Munier-Lehmann H., Mauxion F., Bauer U., Lobel P. et Hoflack B.,** (1996) Re-expression of the mannose 6-phosphate receptors in receptor deficient fibroblasts, *J. Biol. Chem.*, **271**, 15166-15174.
- ◊ **Murphy R. F.,** (1991) Maturation models for endosome and lysosome biogenesis, *Trends Cell Biol*, **1**, 77-82.
- ◊ **Nabi I. R.,** (1993) Biosynthetic targeting pathway of lysosomal membrane glycoproteins, *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, **5**, 438-449.
- ◊ **Nilsson I. et von Heijne G.,** (1993) Determination of the distance between the oligosaccharyltransferase active site and the endoplasmic reticulum membrane, *J. Biol. Chem.*, **268**, 5798-5801.
- ◊ **Nishigaki M., Muramatsu T. et Kobata A.,** (1974) Endoglycosidases acting on carbohydrate moieties of glycoproteins: demonstration in mammalian tissue, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **59**, 638-645.
- ◊ **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.
- ◊ **Norden N. E., Lundblad 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.
- ◊ **Oda K., Nishimura Y., Ikehara Y. et Kato K.,** (1991) Bafilomycin A1 inhibits the targeting of lysosomal acid hydrolases in cultured hepatocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **178**, 369-377.

- ◊ **Oda M. N., Scott S. V., Hefner-Gravink A., Caffarelli A. D. et Klionsky D. J.,** (1996) Identification of a cytoplasm to vacuole targeting determinant in aminopeptidase I, *J. Cell Biol.*, **132**, 999-1010.
- ◊ **Ogier-Denis E., Couvineau A., Maoret J-J., Houri J-J., Bauvy C., De Stefanis D., Isidoro C., Laburthe M. et Codogno P.,** (1995) A heterotrimeric Gi3-protein controls autophagic sequestration in the human colon cancer cell line HT-29, *J. Biol. Chem.*, **270**, 13-16.
- ◊ **Ogier-Denis E., Houri J-J., Bauvy C. et Codogno P.,** (1996) Guanine nucleotide exchange on heterotrimeric Gi3 protein controls autophagic sequestration in HT-29 cells, *J. Biol. Chem.*, sous presse.
- ◊ **Oku H. et Hase S.,** (1991) Studies on the substrate specificity of neutral α -mannosidase purified from japenese quail oviduct by using sugar chains from glycoproteins, *J. Biochem.*, **110**, 982-989.
- ◊ **Oliver G. J. A., Harrison J. et Hemming F. W.** (1975) The mannosylation of dolichol-diphosphate oligosaccharides in relation to the formation of oligosaccharides and glycoproteins in pig-liver endoplasmic reticulum, *Eur. J. Biochem.*, **58**, 223-229.
- ◊ **Olsen I., Bou-Charios G., Abraham D. et Chain B.,** (1993) Lysosomal enzyme transfer from different types of lymphoid cell, *Exp. Cell Res.*, **209**, 133-139.
- ◊ **Ora A. et Helenius A.,** (1995) Calnexin fails to associate with substrate proteins in glucosidase-deficient cell lines, *J. Biol. Chem.*, **270**, 26060-26062.
- ◊ **Pan Y. T. et Elbein A. D.,** (1990) Control of N-linked oligosaccharide synthesis: cellular levels of dolichyl phosphate are not the only regulatory factor, *Biochemistry*, **29**, 8077-8084.
- ◊ **Parodi A.,** (1996) The UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase and the quality control of glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum, *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, **8**, 1-12.
- ◊ **Pedemonte C. H., Sachs G. et Kaplan J. H.,** (1990) An intrinsic membrane glycoprotein with cytosolically oriented N-linked sugars, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 9789-9793.
- ◊ **Pedemonte C. H. et Kaplan J. H.,** (1992) A monosaccharide is bound to the sodium pump α -subunit, *Biochemistry*, **31**, 10465-10470.
- ◊ **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.
- ◊ **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.
- ◊ **Pimpaneau V., Midoux P., Monsigny M. et Roche A-C.,** (1991) Characterization and isolation of an intracellular D-mannose-specific receptor from human promyelocytic HL60, *Carbohydr. Res.*, **213**, 95-108.
- ◊ **Pisoni R. L. et Thoene J. G.,** (1991) The transport systems of mammalian lysosomes, *Biochim. Biophys Acta*, **1071**, 351-373.
- ◊ **Pisoni R. L., Acker T. L., Lisowski K. M., Lemons R. M. et Thoene J. G.,** (1990) A cysteine-specific lysosomal transport system provides a major route for the delivery of thiol

- to human fibroblast lysosomes: possible role in supporting lysosomal proteolysis, *J. Cell Biol.*, **110**, 327-335.
- ◇ **Pisoni R. L., et Vellila V. Q.**, (1995) Evidence for an essential histidine residue located in the binding site of the cysteine-specific lysosomal transport protein, *Biochim. Biophys. Acta*, **1236**, 23-30.
 - ◇ **Pohlman R., Wendland M., Boeker C. et von Figura K.**, (1995) The two mannose 6-phosphate receptors transport distinct complements of lysosomal proteins, *J. Biol. Chem.*, **270**, 27311-27318.
 - ◇ **Rearick J. I., Chapman A. et Kornfeld S.**, (1981) Glucose starvation alters lipid-linked oligosaccharide biosynthesis in Chinese Hamster Ovary cells, *J. Biol. Chem.*, **256**, 6255-6261.
 - ◇ **Robinson M. S., Watts C. et Zerial M.**, (1996) Membrane dynamics in endocytosis, *Cell*, **84**, 13-21.
 - ◇ **Rohrer J., Schweizer A., Russell D. et Kornfeld S.**, (1996) The targeting of Lamp-1 to lysosomes is dependent on the spacing of its cytoplasmic tail tyrosine sorting motif relative to the membrane, *J. Cell Biol.*, **132**, 565-576.
 - ◇ **Rosenwald A. G., Stoll J. et Krag S. S.**, (1990) Regulation of glycosylation, three enzymes compete for a common pool of dolichyl phosphate *in vivo*, *J. Biol. Chem.*, **265**, 14544-14553.
 - ◇ **Roth J.**, (1987) Subcellular organization of glycosylation in mammalian cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **906**, 405-436.
 - ◇ **Roth J., Brada D., Lackie P.M., Schweden J. et Bause E.** (1990) Oligosaccharides trimming Man₉-mannosidase is a resident ER protein and exhibits a more restricted and local distribution than glucosidase II, *Eur. J. Cell Biol.*, **53**, 131-141.
 - ◇ **Rothman J. E.**, (1994) Mechanisms of intracellular protein transport, *Nature*, **372**, 55-63.
 - ◇ **Sanders S. L. et Sheckman R.**, (1992) Polypeptide translocation across the endoplasmic reticulum membrane, *J. Biol. Chem.*, **267**, 13791-13794.
 - ◇ **Schmitt J. W. et Elbein A. D.**, (1979) Inhibition of protein synthesis also inhibits synthesis of lipid-linked oligosaccharides, *J. Biol. Chem.*, **254**, 12291-12294.
 - ◇ **Schneider D. L.** (1981) ATP-dependent acidification of intact and disrupted lysosomes, evidence for an ATP-driven proton pump, *J. Biol. Chem.*, **256**, 3858-3864.
 - ◇ **Schwartz A. L. et Geuze H. J. et Strous G. J. A. M.**, (1991) The asialoglycoprotein receptor: intracellular fate of ligand and receptor, in *Intracellular trafficking of proteins*, Eds Steer C. J. and Hanover J. A., Cambridge University Press, 279-301.
 - ◇ **Schwarze P. E. et Seglen P. O.**, (1985) Reduced autophagic activity, improved protein balance and enhanced *in vitro* survival of hepatocytes isolated from carcinogen-treated rats, *Exp. Cell Res.*, **157**, 15-28.
 - ◇ **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.

- ◇ **Schweden J., Legler. G. et Bause E.,** (1986) Purification and characterization of a neutral processing mannosidase from calf liver acting on (Man)₉(GlcNAC₂) oligosaccharides, *Eur. J. Biochem.*, **157**, 563-570.
- ◇ **Schweizer A., Fransen J. A. M., Bächli T., Ginsel L. et Hauri H-P.,** (1988) Identification by a monoclonal antibody, of a 53 kDa protein associated with a tubular-vesicular compartment at the *cis*-side of the Golgi apparatus, *J. Cell Biol.*, **108**, 1643-1653.
- ◇ **Schweizer A., Matter K., Ketcham C. M. et Hauri H-P.,** (1991) The isolated ER-Golgi intermediate compartment exhibits properties that are different from ER and *cis*-Golgi, *J. Cell Biol.*, **113**, 45-54.
- ◇ **Scott S. V. et Klionsky D. J.,** (1995) In vitro reconstitution of cytoplasm to vacuole protein targeting in yeast, *J. Cell Biol.*, **131**, 1727-1735.
- ◇ **Seaman M. N. J., Burd C. G. et Emr S. D.,** (1996) Receptor signalling and the regulation of endocytic membrane transport, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **8**, 549-556.
- ◇ **Seglen P. O. et Bohley P.,** (1992) Autophagy and other vacuolar protein degradation mechanisms, *Experientia*, **48**, 158-172.
- ◇ **Segui-Real B., Martinez M. et Sandoval I. V.,** (1995) Yeast aminopeptidase is post-translationally sorted from the cytosol to the vacuole by a mechanism mediated by its bipartite N-terminal extension, *EMBO J.*, **14**, 5476-5484.
- ◇ **Shakin-Eshleman S. H., Wunner W. H. et Spitalnik S. L.,** (1993) Efficiency of N-linked core glycosylation at Asparagine-319 of Rabies virus glycoprotein is altered by deletions C-terminal to the glycosylation sequon, *Biochemistry*, **32**, 9465-9472.
- ◇ **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.
- ◇ **Silberstein S., Collins P. G., Kelleher D. J., et Gilmore R.,** (1995a) The essential OST2 gene encodes the 16-kD subunit of the yeast oligosaccharyltransferase, a highly conserved protein expressed in diverse eukaryotic organisms, *J. Cell Biol.*, **131**, 371-383.
- ◇ **Silberstein S., Collins P. G., Kelleher D. J., Rapiejko P. J. et Gilmore R.,** (1995b) The α subunit of the *Saccharomyces cerevisiae* oligosaccharyltransferase complex is essential for vegetative growth of yeast and homologous to mammalian ribophorin I, *J. Cell Biol.*, **128**, 525-536.
- ◇ **Spiro M. J. et Spiro R. G.,** (1986) Control of N-linked carbohydrate unit synthesis in thyroid endoplasmic reticulum by membrane organization and dolichyl phosphate availability, *J. Biol. Chem.*, **261**, 14725-14732.
- ◇ **Spiro M. J., Spiro R. G. et Bhoyroo V. D.,** (1979a) Glycosylation of proteins by oligosaccharide-lipids, studies on a thyroid enzyme involved in oligosaccharide transfer and the role of glucose in this reaction, *J. Biol. Chem.*, **254**, 7668-7674.
- ◇ **Spiro M.J. et Spiro R.G.,** (1991) Potential regulation of N-glycosylation precursor through oligosaccharide-lipid hydrolase action and glucosyltransferase-glucosidase shuttle, *J. Biol. Chem.*, **266**, 5311-5317.
- ◇ **Spiro R. G., Spiro M. J. et Bhoyroo V. D.,** (1979b) Processing of carbohydrate units of glycoproteins, characterization of a thyroid glucosidase, *J. Biol. Chem.*, **254**, 7659-7667.

- ◊ **Spiro R. G., Spiro M. J. et Bhojroo V. D.,** (1983) Studies on the regulation of the biosynthesis of glucose-containing oligosaccharide-lipids, effect of energy deprivation, *J. Biol. Chem.*, **258**, 9469-9476.
- ◊ **Stoorvogel W.,** (1993) Arguments in favour of endosome maturation, *Biochem. Soc. Trans.*, **21**, 711-715.
- ◊ **Stoorvogel W., Geuze H. J. Griffith J. M., Schwartz A. L. et Strous G. J.,** Relations between the intracellular pathways of the receptors for transferrin, asialoglycoprotein and mannose 6-phosphate in human hepatoma cells, *J. Cell Biol.*, **108**, 2137-2148.
- ◊ **Stoorvogel W., Geuze H. J., et Strous G. J.** (1987) Sorting of endocytosed transferrin and asialoglycoprotein occurs immediately after internalization in HepG2 cells, *J. Cell Biol.*, **104**, 1261-1268.
- ◊ **Stoorvogel W., Strous G. J., Geuze H. J., Oorschot V. et Schwartz A. L.,** (1991) Late endosomes derive from early endosomes by maturation, *Cell*, **65**, 417-427.
- ◊ **Strauss W.,** (1964) *J. Cell Biol.*, **21**, 295-308.
- ◊ **Strecker G., Fournet B., Bouquelet S., 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.
- ◊ **Suzuki T., Kitijima K., Inoue S. et Inoue Y.,** (1995) N-glycosylation/deglycosylation as a mechanism for the post-translational modification/remodification of proteins, *Glycoconjugate J.*, **12**, 183-193.
- ◊ **Suzuki T., Seko A., Kitijima K., Inoue Y. et Inoue S.,** (1994) Purification and enzymatic properties of peptide:N-glycanase from C3H mouse-derived L-929 fibroblast cells, possible widespread occurrence of post-translational remodification of proteins by N-deglycosylation, *J. Biol. Chem.*, **269**, 17611-17618.
- ◊ **Tachibana Y, Yamashita K. et Kobata A.,** (1982) Substrate specificity of mammalian endo- β -N-acetylglucosaminidase study with the enzyme if rat liver, *Arch. Biochem. Biophys.*, **214**, 199-210.
- ◊ **Tapper H. et Sundler R.,** (1990) Role of lysosomal and cytosolic pH in the regulation of macrophage lysosomal enzyme secretion, *Biochem. J.*, **272**, 407-414.
- ◊ **Tapper H. et Sundler R.,** (1995) Bafilomycin A₁ inhibits lysosomal, phagosomal, and plasma membrane H⁺-ATPase and induces lysosomal enzyme secretion in macrophages, *J. Cell Phys.*, **163**, 137-144.
- ◊ **Te Heesen S., Janetzky B., Lehle L. et Aebi M.** (1992) The yeast WBP1 is essential for OST activity in vivo and in vitro, *EMBO J.*, **11**, 2071-2075.
- ◊ **Te Heesen S., Knauer R., Lehle L. et Aebi M.** (1993) Yeast Wbp1p and Swp1p form a protein complex essential for OST activity, *EMBO J.*, **12**, 279-284.
- ◊ **Temesvari L. A., Rodriguez-Paris J. M., Bush J. M., Zhang L. et Cardelli J. A.,** (1996) Involvement of the vacuolar proton-translocating ATPase in multiple steps of the endo-lysosomal system and in contractile vacuole system of *Dictyostelium discoideum*, *J. Cell Sci.*, **109**, 1479-1495.
- ◊ **Terlecky S. R. et Dice J. F.,** (1993) Polypeptide import and degradation by isolated lysosomes, *J. Biol. Chem.*, **268**, 23490-23495.

- ◇ **Terlecky S. R.**, (1994) Hsp70s and lysosomal proteolysis, *Experientia*, **50**, 1021-1025.
- ◇ **Terlecky S. R., Chiang H-L., Olson T. S. et Dice J. F.**, (1992) Protein and peptide binding and stimulation of in vitro lysosomal proteolysis by the 73-kDa heat shock cognate protein, *J. Biol. Chem.*, **267**, 9202-9209.
- ◇ **Trowbridge I. S., Collawn J. F. et Hopkins C. R.**, (1993) Signal-dependent membrane protein trafficking in the endocytic pathway, *Annu. Rev. Cell Biol.*, **9**, 129-161.
- ◇ **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.
- ◇ **Turco S. J. et Pickard J. L.** (1982) Altered G-protein glycosylation in vesicular stomatitis virus-infected glucose-deprived Baby Hamster Kidney cells, *J. Biol. Chem.*, **257**, 8674-8679.
- ◇ **Turco S. J., Stetson B. et Robbins P. W.**, (1977) Comparative rates of transfer of lipid-linked oligosaccharides to endogenous glycoprotein acceptors *in vitro*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 4411-4414.
- ◇ **van Deurs B., Holm P. K. et Sandvig K.**, (1996) Inhibition of the vacuolar H^+ -ATPase with bafilomycin reduces delivery of internalized molecules from mature multivesicular endosomes to lysosomes in Hep-2 cells, *Eur. J. Cell Biol.*, **69**, 343-350.
- ◇ **van Deurs B., Holm P. K., Kayser L. et Sandvig K.**, (1995) Delivery to lysosomes in the human carcinoma cell line Hep-2 involves an actin filament-facilitated fusion between mature endosomes and preexisting lysosomes, *Eur. J. Cell Biol.*, **66**, 309-323.
- ◇ **Van Deurs B., Petersen O. W., Olsnes S. et Sandvig K.**, (1989) The ways of endocytosis, *Int. Rev. Cyt.*, **117**, 131-177.
- ◇ **van Dyke R. W.**, (1993) Acidification of rat liver lysosomes: quantitation and comparison with endosomes, *Am. J. Physiol.*, **265**, C901-C917.
- ◇ **van Weert A. W. M., Dunn W. K., Geuze H. J. et Maxfield F. R.**, (1995) Transport from late endosomes to lysosomes, but not sorting of integral membrane proteins in endosomes, depends on the vacuolar proton pump, *J. Cell Biol.*, **130**, 821-834.
- ◇ **Villers C., Cacan R., Mir A-M., Labiau O. et Verbert A.**, (1994) Release of oligomannoside-type glycans as a marker of the degradation of newly synthesized glycoproteins, *Biochem. J.*, **298**, 135-142.
- ◇ **Wang Z-Q. et Gluck S.**, (1990) Isolation and properties of ovine kidney border vacuolar H^+ -ATPase, a proton pump with enzymatic and structural differences from kidney microsomal H^+ -ATPase, *J. Biol. Chem.*, **265**, 21957-21965.
- ◇ **Ware F. E., Vassilakos A., Peterson P. A., Jackson M. R., Lehrman M. A. et Williams D. B.**, (1995) The molecular chaperone calnexin binds $Glc_1Man_9GlcNAc_2$ oligosaccharides as an initial step in recognizing unfolded glycoproteins, *J. Biol. Chem.*, **270**, 4697-4704.
- ◇ **Weiner O. H., Murphy J., Griffiths G., Schleicher M. et Noegel A. A.**, (1993) The actin-binding protein comitin (p24) is a component of the golgi apparatus, *J. Cell Biol.*, **123**, 23-34.

- ◊ **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.
- ◊ **Weng S. et Spiro R. G.**, (1996) Endoplasmic reticulum kifunensine-resistant α -mannosidase is enzymatically and immunologically related to the cytosolic α -mannosidase, *Arch. Biochem. Biophys.*, **325**, 113-123.
- ◊ **Wieland F. T., Gleason M. L., Serafini T. A. et Rothman J. E.**, (1987) The rate of bulk flow from the endoplasmic reticulum to the cell surface, *Cell*, **50**, 289-300.
- ◊ **Wiertz E. J. H. J., Jones T. R., Sun L., Bogoy M., Geuze H. J. et Ploegh H. L.**, (1996) The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol, *Cell*, **84**, 769-779.
- ◊ **Woo J-T., Shinohara C., Sakai K., Hasumi K. et Endo A.** (1992) Isolation, characterisation and biological activities of concanamycins as inhibitors of lysosomal acidification, *J. Antibiotics*, **45**, 1108-1116.
- ◊ **Yamashita K., Tachibana Y., Mihara K., Okada S., Yabuuchi H. et Kobata A.**, (1980) Urinary oligosaccharides of mannosidosis, *J. Biol. Chem.*, **255**, 5126-5133.
- ◊ **Yoshihisa T. et Anraku Y.**, (1990) A novel pathway of import of α -mannosidase, a marker enzyme of vacuolar membrane in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.*, **265**, 22418-22425.

