

B00 20 202-495

50376
1999
1

Université des Sciences et Technologies de Lille

N° d'ordre : 2435

THÈSE

présentée par

Sandrine DUVET

pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université

Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé



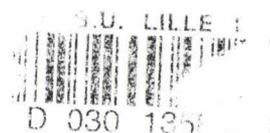
Les Oligomannosides : témoins de la destinée des glycoprotéines nouvellement synthétisées

Présentée le 15 janvier 1999 devant la commission d'examen :

Président : Professeur André VERBERT

Rapporteurs : Docteur Ingrid G. HAAS
Professeur Philippe ROUSSEL

Examineurs : Docteur Jean DUBUISSON
Professeur René CACAN



A mes parents,

*A Isabelle et Patrice,
et les petits, Anouk et Youenn*

*Avec toute ma reconnaissance
pour m'avoir soutenue et encouragée tout au long de mes études.*

A monsieur le Professeur André Verbert,

pour m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire et pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail. Je tiens particulièrement à vous remercier de m'avoir encouragée à effectuer un stage à l'Institut Pasteur de Paris chez le Dr Myriam Ermonval et d'avoir permis la collaboration avec l'équipe du Dr Jean Dubuisson à l'Institut de Biologie de Lille.

A monsieur le Professeur René Cacan

pour avoir dirigé ce travail durant ces quatre années : vos encouragements constants, votre grande disponibilité et nos nombreuses discussions aussi diverses soient-elles m'ont beaucoup apporté. Je tiens également à vous remercier pour vos qualités pédagogiques qui ont, sans aucun doute, contribué à me donner goût à l'enseignement.

A monsieur le Docteur Jean Dubuisson,

pour m'avoir accueillie aussi chaleureusement au sein de ton équipe : ta disponibilité et tes précieux conseils en terme de « virologie » m'ont beaucoup apporté.

Aussi, je te remercie d'accepter de juger ce travail.

A madame le Docteur Ingrid Haas,

Mes profonds remerciements de m'avoir invitée à participer au meeting à Heidelberg en mai dernier : ce fut l'occasion de rencontres et de discussions scientifiques qui m'ont beaucoup aidée à la rédaction de ce mémoire.

Je te suis très reconnaissante d'accepter de juger ce travail en qualité de rapporteur.

A monsieur le Professeur Philippe Roussel,

Je vous remercie d'avoir accepté avec bienveillance de juger ce travail en qualité de rapporteur.

Soyez assuré de mes profonds remerciements.

Je tiens à remercier particulièrement,

Les membres de l'équipe du O20 pour leur soutien et la gentillesse qu'ils me témoignent, une attention particulière à *Odette et Anne-Marie*, pour avoir pris soin de mes petites cellules et pour leur précieuse aide technique : ce travail est aussi le vôtre.

Daniel, pour ses nombreux conseils en terme d'informatique
Ingrid, pour son agréable compagnie et la sympathie qu'elle me témoigne
Et *Frédéric*, à qui je souhaite la bienvenue dans le cercle des dolichols !

Carine, Marie-Ange, Isabelle, Vincent, Frédéric Page, Frédéric Krzewinski,
sans oublier *Silvia*

pour leur soutien et les bons moments que nous avons passés ensemble.

Les membres de l'équipe du Dr Jean Dubuisson,
Czeslaw, André, Sophana, Jean-Christophe, Amélie et Laurence,
pour m'avoir si gentiment accueillie au sein de leur équipe
mais également pour leurs nombreux conseils, leur disponibilité et
leur bonne humeur quotidienne.

Le Dr *Myriam Ermonval*,
pour les nombreuses discussions scientifiques que nous avons eues ensemble et pour m'avoir accueillie quelques jours au sein de son laboratoire (Institut Pasteur-Paris).

Le Dr *Dominique Legrand*, le Dr *Annick Pierce* et le Dr *Joël Mazurier*,
pour leur aide dans mes premiers pas de traduction *in vitro* de la lactoferrine humaine.

Enfin, je tiens à remercier *Brigitte Macquart* ainsi que tous les membres du laboratoire de Chimie Biologique qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Ce travail a été réalisé sous la direction du Professeur René Cacan dans le laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Technologies de Lille (Unité Mixte de Recherche n°8576 du CNRS, Directeur : Professeur André Verbert).

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

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

Publications :

René Cacan, **Sandrine Duvet**, Daniel Kmiécik, Odette Labiau, Anne-Marie Mir et André Verbert

" « Glyco-deglyco » processes during the synthesis of N-glycoproteins "

Biochimie, (1998), **80**, 59-68.

Sandrine Duvet, Odette Labiau, Anne-Marie Mir, Daniel Kmiécik, Sharon S. Krag, André Verbert et René Cacan

" Cytosolic deglycosylation process of newly synthesized glycoproteins generates oligomannosides possessing one GlcNAc residue at their reducing end "

Biochemical Journal, (1998), **335**, 389-396.

Sandrine Duvet, Laurence Cocquerel, André Pillez, René Cacan, André Verbert, Darius Moradpour, Czeslaw Wychowski et Jean Dubuisson

" Hepatitis C virus glycoprotein complex localization in the endoplasmic *reticulum* involves a determinant for retention and not retrieval "

The Journal of Biological Chemistry (1998), **273**, 32088-32095.

Laurence Cocquerel, **Sandrine Duvet**, Jean-Christophe Meunier, André Pillez, René Cacan, Czeslaw Wychowski et Jean Dubuisson

" The transmembrane domain of Hepatitis C virus glycoprotein E1 is a signal for static retention in the endoplasmic *reticulum* "

publication acceptée dans *Journal of Virology*.

Communications orales :

Sandrine Duvet, Odette Labiau, Anne-Marie Mir, Daniel Kmiécik, René Cacan et André Verbert

"Dégradation d'oligomannosides solubles lors du processus de N-glycosylation"

2^{ième} Colloque Lille - Université Libre de Bruxelles, Campus Erasme Bruxelles, 9 janvier 1997.

René Cacan, **Sandrine Duvet**, Daniel Kmiécik et André Verbert

"Origin, catabolism and subcellular trafficking of free oligomannosides released during the N-glycosylation process"

International Symposium on Glycosyltransferases and Cellular Communications, Osaka, (Japon), 26-28 mars 1997.

Myriam Ermonval, **Sandrine Duvet**, René Cacan et Gérard Buttin

"Fate of newly synthesized proteins loaded with mono- or triglycosylated truncated N-glycans in CHO mutants thermosensitive in secretion"

GlycoXIV, XIV International Symposium on Glycoconjugates, Zurich, 7-12 septembre 1997.

Laurence Cocquerel, **Sandrine Duvet**, Jean-Christophe Meunier, Amélie Choukhi, André Pillez, René Cacan, André Verbert, Czesław Wychowski et Jean Dubuisson

"Endoplasmic *reticulum* retention of Hepatitis C virus glycoprotein complex : a role for the transmembrane domain of E2"

Colloque de la Société de Biologie Cellulaire de France, Paris, 8-10 mars 1998.

Sandrine Duvet

"Relationships between the fate of newly synthesized glycoproteins and release of soluble oligomannosides in a CHO mutant cell line"

First European Meeting on Cells as Protein Factories, Heidelberg, 20-23 mai 1998.

Laurence Cocquerel, **Sandrine Duvet**, André Pillez, Jean-Christophe Meunier, René Cacan, André Verbert, Czesław Wychowski et Jean Dubuisson

"Endoplasmic *reticulum* retention of Hepatitis C virus glycoprotein complex : a role for the transmembrane domain of E2"

Vth International Meeting on Hepatitis C virus and related virus, Venise, 25-28 juin 1998.

Myriam Ermonval, **Sandrine Duvet**, Ineke Braakman, René Cacan et Gérard Buttin.

"Effet de N-glycannes tronqués sur la maturation et le repliement de glycoprotéines néosynthétisées dans des mutants dérivés de cellules CHO"

Journées départementales d'Immunologie, Institut Pasteur de Paris, octobre 1998.

Sandrine Duvet, René Cacan et André Verbert

" Cytosolic deglycosylation process of newly synthesized glycoproteins generates oligomannosides possessing one GlcNAc residue at the reducing end "

10th Joint Meeting of the 'Netherlands Society for Glycobiology', the 'Studiengruppe Glykokonjugate der Gesellschaft für Biologische Chemie', the 'Groupe Lillois de Glycobiologie', Nuland (The Netherlands), 2-3 novembre 1998.

André Verbert, **Sandrine Duvet**, Jean Dubuisson et René Cacan

"Retention and degradation of N-glycoproteins in the rough endoplasmic *reticulum*"

5th International Symposium on Biochemical Roles of Eukaryotic Cell Surface Macromolecules, Bangalore (Inde), 4-8 janvier 1999.

Communications par affiche :

Sandrine Duvet, Dominique Legrand, Annick Pierce, Odette Labiau, Joël Mazurier et René Cacan

"Etude *in vivo* & *in vitro* de la glycosylation de la lactotransferrine humaine recombinante"

XXIIIe Forum des Jeunes Chercheurs de la Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire, Poitiers, 2-5 juillet 1996.

André Verbert, **Sandrine Duvet**, Sharon S. Krag et René Cacan

"Cytosolic deglycosylation process of newly synthesized glycoproteins"

Third Annual Conference of the Society for Glycobiology, Baltimore (Maryland), 11-14 novembre 1998.

ABREVIATIONS

ALLN	: N-acétyl-leucyl-leucyl-norleucinal
ATP	: Adénosine triphosphate
α 1-AP	: α 1-antitrypsine
α -MEM	: Milieu Minimum Essentiel
BFA	: Bréfeldine A
BiP	: Binding immunoglobulin Protein
CFTR	: Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
CHO	: Chinese Hamster Ovary
CM	: Phase chloroforme/méthanol
CMH I	: Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
CMW	: Phase chloroforme/méthanol/eau contenant les oligosaccharides pyrophosphodolichol amphipolaires
DMEM	: Milieu d'Eagle modifié par Dulbecco
DTT	: Dithiothréitol
EDTA	: Acide Ethylène Diamine Tétracétique
endo H	: Endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase H
endo D	: Endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase
ERGIC	: Endoplasmic <i>Reticulum</i> Golgi Intermediate Compartment
Glc	: Glucose
GalNAc	: N-acétylgalactosamine
GlcNAc	: N-acétylglucosamine
Glc-P-Dol	: glucosyl phosphodolichol
HPLC	: Chromatographie Liquide Haute Performance
Hsp	: Heat shock protein
Ig	: Immunoglobuline
IRES	: Internal ribosome entry site
kDa	: kilodalton
Man	: Mannose
Man-P-Dol	: Mannosyl phosphodolichol
OS	: Oligosaccharides neutres
OSGn ₁	: Oligosaccharides neutres possédant un résidu de N-acétylglucosamine en position terminale réductrice
OSGn ₂	: Oligosaccharides neutres possédant deux résidus de N-acétylglucosamine en position terminale réductrice
OSP	: Oligosaccharides phosphates
OSRM	: Matériel oligosaccharidique soluble
PAGE	: Polyacrylamide Gel electrophoresis
PBS	: Phosphate Buffer saline
PDI	: Peptide Disulfure Isomérase
P-Dol	: Phosphodolichol
PNGase	: Peptide N-glycosidase
RER	: <i>Reticulum</i> Endoplasmique Rugueux
SDS	: Sodium Dodécyl Sulfate
SeAP	: Phosphatase Alcaline exprimée sous sa forme sécrétée
SRP	: Signal Recognition Particle
SVF	: Sérum de veau foetal

TBS	: Tris Buffered Saline
TCR	: T Cell Receptor
TPCK	: <i>N</i> -tosyl-L-phenylalanine chloromethylketone
TRAM	: Translocating chain-associated membrane protein
Tris	: Tris (hydroxyméthyl) aminométhane
UDP-G	: UDP-glucose : glycoprotéine glucosyltransférerase
UFP	: Unités formant plage
VHC	: Virus de l'hépatite C
VSV	: Virus de la stomatite vésiculaire

NOMENCLATURE DES ACIDES AMINES

Acide aspartique	Asp	D	Leucine	Leu	L
Acide glutamique	Glu	E	Lysine	Lys	K
Alanine	Ala	A	Méthionine	Met	M
Arginine	Arg	R	Phénylalanine	Phe	F
Asparagine	Asn	N	Proline	Pro	P
Cystéine	Cys	C	Sérine	Ser	S
Glutamine	Glu	Q	Thréonine	Thr	T
Glycine	Gly	G	Tryptophane	Trp	W
Histidine	His	H	Tyrosine	Tyr	Y
Isoleucine	Ile	I	Valine	Val	V

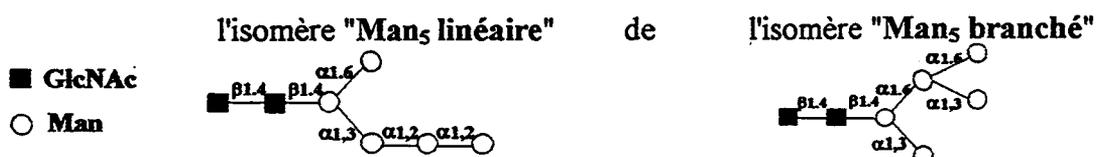
Certains termes utilisés dans ce mémoire n'ayant pas d'équivalent français seront définis de la façon suivante :

"Chaperonne" : traduit par protéine chaperon ou molécule chaperon

"Retrotranslocation" : traduit par rétro-transport (il représente le processus impliqué dans le transport du RER vers le cytosol des protéines destinées à la voie de dégradation cytosolique)

Ne pas confondre avec Transport rétrograde

Dans notre jargon, au laboratoire nous distinguons :



SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
Chapitre I : La biosynthèse des N-glycosylprotéines	1
Introduction	1
I. Les principales structures N-glycanniques	1
II. La synthèse du précurseur glycannique	3
A. Face cytosolique	5
B. Face luminale	5
III. La synthèse d'une N-glycosylprotéine	6
A. La ségrégation des protéines en voie de synthèse	6
1. La particule de reconnaissance du signal (SRP)	6
2. La machinerie du translocon	7
2.1. Le complexe Sec61	7
2.2. La protéine TRAM	8
2.3. Les autres constituants du translocon	8
2.3.1. Les récepteurs ribosomiques	8
2.3.2. La signal peptidase	9
3. Le contrôle de l'ouverture du pore de translocation	9
B. La réaction de transfert du glycanne	9
1. L'oligosaccharyltransférase	9
2. Le transfert « en bloc » du précurseur glycannique sur une protéine naissante	10
2.1. Spécificité de reconnaissance vis-à-vis du peptide accepteur	10
2.2. Spécificité vis-à-vis du donneur lipidique	11
3. L'activité hydrolytique de l'oligosaccharyltransférase	11
IV. La maturation des N-glycosylprotéines	13
A. La maturation réticulaire	13
1. Les glucosidases I et II	13
2. Les mannosidases du RER	14
2.1. La mannosidase I du RER	14
2.2. La mannosidase II du RER	14
2.3. La Man ₉ -mannosidase	15
B. La maturation golgienne	16
V. Catabolisme des oligomannosides libérés par l'activité hydrolytique de l'oligosaccharyltransférase	18
A. Etapes réticulaires	18
B. Transport dans le cytosol	18
C. Etapes cytosoliques	19
1. Action de la chitobiase cytosolique	19
2. Action de la mannosidase cytosolique	19
D. Etapes lysosomiques	20
VI. Conclusion : la diversité des structures oligomannosidiques : signaux de reconnaissance impliqués dans le trafic intracellulaire	21

A. Compartimentation des oligomannosides liés aux glycoprotéines	21
1. Espèces réticulaires	21
2. Espèces golgiennes	22
3. Espèces lysosomiques	22
B. Les oligomannosides solubles	23
1. Espèces réticulaires	23
2. Espèces cytosoliques	23
3. Espèces lysosomiques	24

Chapitre II : Mise en conformation des N-glycosylprotéines **25**

I. Le RER : compartiment subcellulaire impliqué dans le contrôle de qualité des protéines	25
A. L'environnement oxydant du RER	26
B. Les protéines chaperons	26
1. La protéine BiP	27
2. La protéine PDI	27
3. Principe d'action	27
4. Rôles des protéines chaperons	28
II. Rôles des glycannes dans la mise en conformation des N-glycosylprotéines	29
A. Rôle des glycannes dans la stabilisation de certaines conformations	29
B. Rôle des glycannes dans le contrôle de qualité des N-glycosylprotéines	30
1. Les acteurs	30
1.1. Les protéines chaperons à activité lectinique	30
1.1.1. La calnexine	31
1.1.2. La calréticuline	31
1.1.3. Spécificité de reconnaissance de la calnexine et de la calréticuline	31
1.1.4. Interactions de type protéine-protéine	32
1.2. La protéine ERp57	32
1.3. Les enzymes	33
1.3.1. L'UDP-glucose : glycoprotéine glucosyltransférase (UDPG)	33
<i>a. Description</i>	33
<i>b. Spécificité de la glucosyltransférase</i>	33
1.3.2. La glucosidase II	33
<i>a. Description</i>	33
<i>b. Spécificité de la glucosidase II</i>	33
2. Le cycle de déglucosylation-reglucosylation	34
2.1. Description	34
2.2. La glucosyltransférase : élément-clé de la navette déglucosylation-reglucosylation	35
2.3. Le rôle potentiel de ERp57 dans le repliement des chaînes peptidiques au cours du cycle de déglucosylation-reglucosylation	36
Conclusion	36

Chapitre III : Destinées des N-glycosylprotéines nouvellement synthétisées	38
I. La rétention des glycoprotéines dans le RER	39
A. La voie de sécrétion	39
B. Rétention par adressage	40
1. Les facteurs susceptibles de perturber le trafic RER-Golgi	40
1.1. La température	40
1.2. La bréfeldine A	40
1.3. Le nocodazole	41
2. Rétention par recyclage	41
2.1. Le motif KDEL des protéines solubles	42
2.2. Le motif double-lysine	43
2.3. Le motif double-arginine	43
3. Rétention RER stricte	43
C. Rétention par défaut de mise en conformation	44
1. Rétention par agrégation des glycoprotéines immatures	44
2. Rétention par recyclage des glycoprotéines immatures	45
II. La dégradation des N-glycosylprotéines nouvellement synthétisées	45
A. La dégradation des protéines et des glycoprotéines intracellulaires	46
1. La dégradation lysosomique et l'autophagie	46
1.1. Les lysosomes	46
1.2. Les inhibiteurs de la dégradation lysosomique	46
1.3. La voie autophagique	46
1.3.1. La formation des vacuoles autophagiques	46
1.3.2. Les inhibiteurs de l'autophagie	47
2. La dégradation associée au protéasome	47
2.1. Le protéasome	47
2.1.1. La particule 20S	47
2.1.2. La particule « cap » 19S	48
2.2. Les inhibiteurs du protéasome	49
2.2.1. L'ALLN	49
2.2.2. La lactacystine	49
B. La dégradation des glycoprotéines nouvellement synthétisées	50
1. Dégradation lysosomique	50
2. Dégradation associée au RER	50
2.1. Arguments en faveur d'une dégradation réticulaire	50
2.2. Arguments en faveur d'une dégradation pré-golgienne	51
3. Dégradation cytosolique impliquant le protéasome	52
3.1. Les caractéristiques générales	52
3.2. Les différentes étapes du processus général de la dégradation cytosolique	53
3.3. Le rétro-transport des glycoprotéines vers le cytosol	54
3.3.1. Implication du complexe Sec61	54
3.3.2. Les mécanismes de réassociation des glycoprotéines au complexe Sec61	55

3.3.2.1. Les protéines membranaires	55
<i>a. Une association prolongée avec le complexe Sec61</i>	55
<i>b. Une réassociation avec le complexe Sec61</i>	56
3.3.2.2. Les protéines solubles	56
3.4. La déglycosylation des glycoprotéines	57
3.4.1. Mise en évidence d'intermédiaires déglycosylés dans le compartiment cytosolique	58
3.4.2. Les différentes activités glycosidases impliquées dans la déglycosylation des glycoprotéines	58
<i>a. Les activités peptide N-glycanase (PNGase)</i>	58
<i>b. L'activité endo-N-acétylglucosaminidase</i>	59
3.4.3. L'activité glycosidase potentiellement impliquée dans la dégradation des glycoprotéines	60
3.5. Polyubiquitination des glycoprotéines	60
3.5.1. L'ubiquitine	60
3.5.1.1. L'ubiquitination des protéines destinées à la dégradation	60
3.5.1.2. Polyubiquitination	61
3.5.2. Mise en évidence de l'ubiquitination des glycoprotéines mal conformées	61
3.5.3. Discrimination des glycoprotéines destinées à être dégradées	62
3.6. Implication du protéasome dans la dégradation des glycoprotéines mal conformées	62
3.7. Les ressources d'énergie potentielles utilisées pour le rétro-transport des glycoprotéines	63
3.7.1. Face luminale	63
3.7.2. Face cytosolique	63
3.8. Pathologies liées au processus de dégradation des néoglycoprotéines	65
3.8.1. Déficience en α 1-antitrypsine	65
3.8.2. Le modèle de la mucoviscidose	65
Conclusion des généralités - Objectifs du travail	66
RÉSULTATS	68
Article I	68
Introduction	68
I. Présentation du modèle d'étude B3F7	68
II. Origine et destinée des OSGn₂ libérés dans les B3F7	69
Article I : « Cytosolic deglycosylation process of newly synthesized glycoproteins generates oligomannosides possessing one GlcNAc residue at the reducing end »	71
I. Discussion de l'article I	79
A. Effet de l'anisomycine sur la nature et la destinée des produits générés par le cycle des dolichols dans le modèle B3F7	79

B. Populations oligomannosidiques libérées à partir des glycoprotéines en présence de castanospermine	80
C. Localisation subcellulaire des OSGn ₁ libérés à partir des glycoprotéines	81
II. Nature et localisation de l'enzyme de déglycosylation	81
III. Signification biologique de la déglycosylation des glycoprotéines dans le modèle B3F7	83
A. Rétention des glycoprotéines dans le RER	84
B. Interactions prolongées avec les protéines chaperons du RER : témoins du caractère immature des glycoprotéines synthétisées dans les B3F7	84
C. Relation rétention/dégradation des glycoprotéines	84
IV. Conclusion : destinée des oligomannosides libérés au cours de la dégradation des glycoprotéines	86
Articles II et III	88
Présentation du modèle du virus de l'hépatite C	88
I. L'hépatite C	88
II. Le virus de l'hépatite C	88
III. Assemblage des glycoprotéines E1 et E2	89
A. Les glycoprotéines du virus de l'hépatite C	89
1. Voie d'assemblage des complexes E1E2 natifs	90
2. Voie d'assemblage non productive	90
B. Rétention des complexes E1E2 natifs dans le RER	92
C. Le domaine transmembranaire de E2 : signal de rétention réticulaire	92
Article II : « Hepatitis C virus glycoprotein complex localization in the endoplasmic reticulum involves a determinant for retention and not retrieval »	94
I. Discussion de l'article II	102
A. Approche biologique du phénomène de rétention des complexes E1E2 natifs dans le RER	102
1. Etude de la localisation subcellulaire des complexes E1E2 natifs	103
2. Influence du nocodazole sur la répartition subcellulaire des complexes E1E2	103
B. Nature des glycannes liés aux glycoprotéines natives du VHC	104
C. Analyse structurale des oligomannosides portés par les hétérodimères E1E2 natifs	104
D. Influence de la brefeldine A sur la maturation des glycannes portés par les glycoprotéines E1 et E2	107
E. Implication du domaine transmembranaire de E2 dans la rétention des complexes E1E2 natifs	107
II. Le domaine transmembranaire de E1 : signal de rétention du RER ?	108
Article III : « The transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E1 is a signal for static retention in the endoplasmic reticulum »	109

I. Discussion de l'article III	118
A. Etude de la localisation subcellulaire de CD4-E1 ₃₅₃	118
B. Etude de la localisation subcellulaire de CD8-E1 ₃₅₃	119
II. Comment expliquer l'implication d'un domaine transmembranaire comme signal de rétention stricte ?	119
III. Conclusion : intérêt biologique	121
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	123
I. Conclusion générale	123
A. Les oligomannosides solubles : témoins de la dégradation des glycoprotéines	123
B. Les oligomannosides : témoins d'une rétention réticulaire stricte	125
II. Perspectives	126
APPENDICE TECHNIQUE	128
RÉFÉRENCES	140
ANNEXE	154
Sommaire des figures et tableaux	154

INTRODUCTION

Chapitre I : La biosynthèse des N-glycosylprotéines

Introduction

Diverses modifications covalentes co- ou post-traductionnelles accompagnent bien souvent la synthèse des protéines. Parmi celles-ci, la glycosylation est l'une des plus fréquemment rencontrées chez les eucaryotes. Les glycoprotéines résultent, en effet, de l'association covalente d'un oligosaccharide appelé glycanne avec une protéine. Selon la nature de la liaison glycanne-protéine, on peut distinguer les O-glycosylprotéines des N-glycosylprotéines auxquelles nous nous intéresserons plus particulièrement.

Le rôle des glycannes concerne essentiellement les phénomènes de reconnaissance. Bien que l'activité biologique soit généralement portée par la partie protéique, les glycannes apportent des informations supplémentaires en modifiant, non seulement, les propriétés physico-chimiques de la protéine : sa solubilité, sa conformation et sa résistance à la protéolyse mais également en modulant sa fonction biologique puisqu'ils représentent des déterminants antigéniques, des signaux de reconnaissance intercellulaire ou encore des signaux du trafic intracellulaire.

La multiplicité des structures glycaniques retrouvées sur les N-glycosylprotéines témoigne de l'action séquentielle d'une diversité de glycosyltransférases dont la présence dans un compartiment subcellulaire donné s'avère déterminante.

Après avoir rappelé les principales structures de N-glycannes, nous étudierons plus particulièrement les différentes étapes de la biosynthèse des N-glycosylprotéines ainsi que les mécanismes de régulation qui y sont associés.

I. Les principales structures N-glycaniques

La liaison covalente du glycanne à la protéine s'établit entre le carbone anomérique d'un résidu de N-acétylglucosamine (GlcNAc) et l'azote de la fonction amide d'un résidu asparagine. Toutes les structures N-glycaniques font apparaître un noyau commun appelé « core » branché sur le résidu asparaginyll (Figure 1).

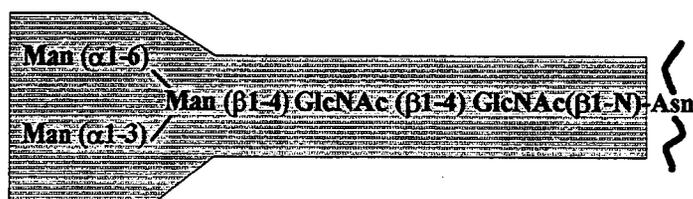


Figure 1 : "core" ou noyau commun à toute N-glycosylprotéine

D'une façon générale, les structures N-glycanniques sont classées en trois types représentés dans la figure 2. Sur ce noyau, viennent ainsi s'additionner des squelettes particuliers à chaque type de glycoprotéine :

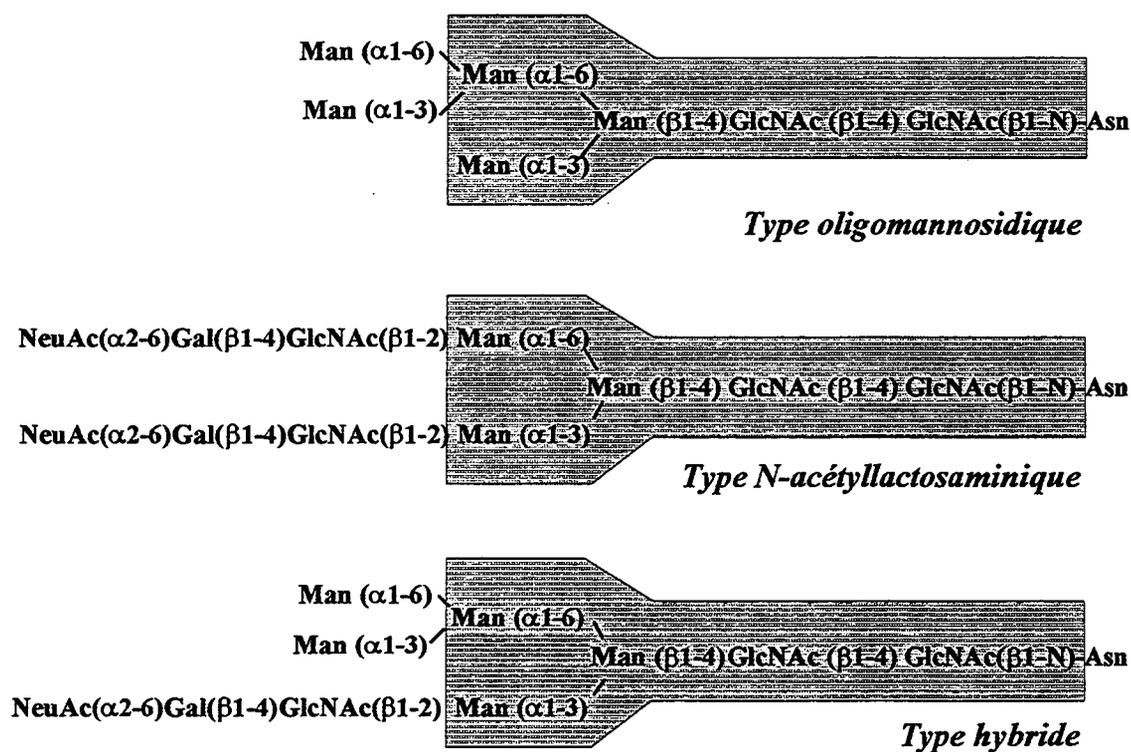


Figure 2 : Les trois principaux types de structures N-glycanniques.

- ① Le type oligomannosidique qui ne renferme que des résidus de mannose (Man) et de GlcNAc.
- ② Le type N-acétyllactosaminique ou type complexe dans lequel, le chaînon Gal β 1,4GlcNAc est branché à la fois sur les Man en α 1,3 et en α 1,6 et qui, selon le nombre de substitutions, donne naissance à des structures mono- à pentaantennées.

③ **Le type hybride** qui représente un compromis entre les deux structures précédentes : seule la branche en α 1,3 est substituée comme le type complexe tandis que la branche en α 1,6 demeure de type oligomannosidique.

Ainsi, en périphérie, c'est une multiplicité de possibilités, tant en ce qui concerne la nature des monosaccharides que le type de liaison formée, qui explique la diversité des N-glycosylprotéines. C'est la connaissance de ces structures qui a contribué à la compréhension des étapes de leur biosynthèse. En effet, la N-glycosylation est un processus complexe qui s'effectue de manière cotraductionnelle dans la lumière du *reticulum* endoplasmique rugueux (RER) pour se terminer dans l'appareil de Golgi.

Ainsi, on peut distinguer deux étapes :

- l'élaboration d'une structure oligosaccharidique unique qui sera greffée « en bloc » sur une protéine naissante.
- la maturation de cette néoglycoprotéine conduisant à la diversité des structures retrouvées.

Nous étudierons successivement ces différentes parties : à savoir, la synthèse du précurseur glycannique qui s'effectue grâce au cycle des dolichols, puis l'étape de transfert catalysée par l'oligosaccharyltransférase, et finalement la maturation de la glycoprotéine en nous intéressant plus particulièrement aux premières étapes qui ont lieu dans le RER.

II. La synthèse du précurseur glycannique

La synthèse d'une N-glycosylprotéine nécessite l'élaboration préalable d'un glycanne de 14 monosaccharides sur un lipide de type polyisoprénique intégré dans les membranes du RER : le dolichol-phosphate (P-Dol). A la différence de la biosynthèse des autres polymères biologiques (acides nucléiques ou protéines), la synthèse des glycannes ne suit pas un modèle. Elle est le fruit d'une organisation précise de diverses glycosyltransférases dont la spécificité étroite restreint leurs activités à un donneur et à un accepteur spécifique en créant une liaison précise.

L'assemblage de l'oligosaccharide s'effectue de manière séquentielle par l'intermédiaire d'un cycle métabolique bien particulier : le cycle des dolichols. Ce cycle métabolique dont les principales étapes sont représentées dans la figure 3, s'effectue à l'interface de deux compartiments subcellulaires : le cytosol et la lumière du RER (Abeijon et Hirschberg, 1992).

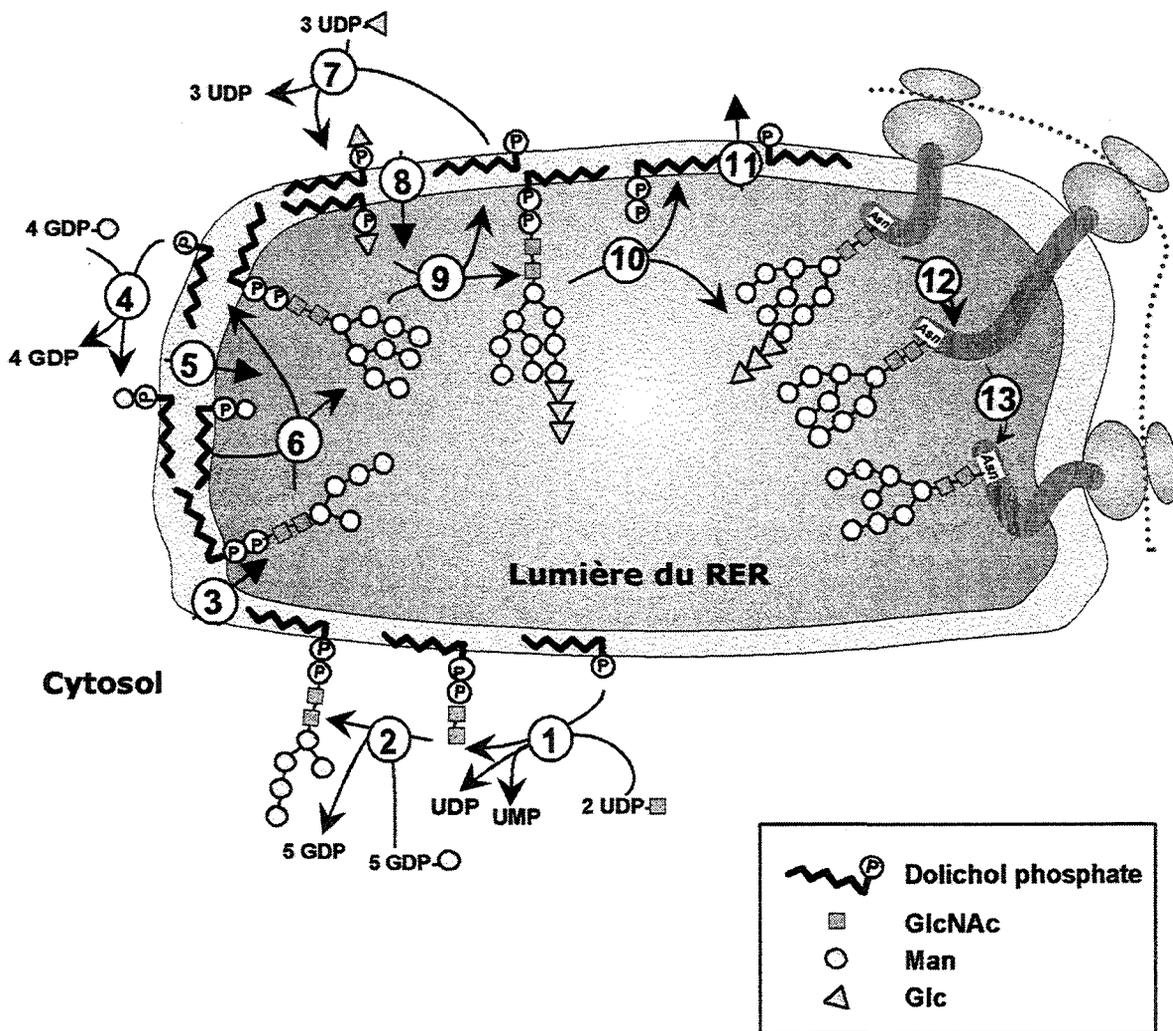


Figure 3 : Topographie du cycle des dolichols (d'après Abeijon et Hirschberg, 1992)

Les enzymes impliquées sont :

- | | |
|---|-----------------------------|
| ① N-acétylglucosaminyl-1-P-transférase et N-acétylglucosaminyltransférase | |
| ② cinq Mannosyltransférases | |
| ③ "flipase" | |
| ④ ⑤ Man-P-Dol synthétase | ⑩ oligosaccharyltransférase |
| ⑥ quatre mannosyltransférases | ⑪ Dol-pyrophosphatase |
| ⑦ ⑧ Glc-P-Dol synthétase | ⑫ glucosidases I et II |
| ⑨ trois glucosyltransférases | ⑬ α1,2 mannosidase |

Avant d'étudier la réaction de transfert du précurseur glycanne, nous allons rappeler les mécanismes impliqués dans la ségrégation des protéines dans la lumière du RER.

III. La synthèse d'une N-glycosylprotéine

A. La ségrégation des protéines en voie de synthèse

Toute protéine destinée à être N-glycosylée est amenée à entrer en contact avec la lumière du *reticulum* endoplasmique puisque l'étape de transfert du glycanne précurseur s'effectue précisément sur la face luminale du RER. Pour ce faire, la protéine en voie de synthèse présente un peptide signal à son extrémité N-terminale dont la reconnaissance spécifique permettra le transport du complexe ribosomique au niveau de la membrane du RER. Ce processus met en jeu différents acteurs cellulaires : d'une part, l'implication de la particule de reconnaissance du signal et d'autre part, la mise en place d'un complexe multiprotéique dans la membrane du RER.

1. La particule de reconnaissance du signal (SRP)

La particule SRP pour « signal recognition particle » est un petit complexe ribonucléoprotéique cytosolique composé d'une molécule d'ARN de 300 nucléotides et de 6 polypeptides. En se fixant sur le peptide signal émergent du ribosome, la SRP suspend la progression de la traduction. Le complexe ribosome-SRP se rapproche alors de la membrane du RER au sein de laquelle se trouve un récepteur spécifique de la particule SRP : la protéine d'amarrage encore appelée « docking protein ». La SRP s'y fixe tandis que le ribosome s'arrime à la membrane à l'aide de récepteurs spécifiques. La SRP se détache du peptide signal alors que la traduction de la protéine redémarre (pour revue voir Lütcke, 1995).

La fixation du ribosome à la surface de la membrane du RER induit l'assemblage d'un pore aqueux à travers lequel la protéine en voie de synthèse s'acheminera pour entrer dans la lumière du RER (Hanein *et al.*, 1996). Ce pore aqueux est principalement représenté par le complexe Sec61 auquel viennent s'associer de nombreuses protéines pour constituer un complexe particulier : le translocon.

Les fonctions de Sec61 β et Sec61 γ restent assez mal définies. Cependant, Kalies *et al.* (1998) suggèrent que Sec61 β faciliterait la ségrégation cotraductionnelle de la protéine naissante. Sec61 β semble également interagir avec la signal peptidase lui suggérant un rôle dans le recrutement de l'enzyme sur le site de ségrégation.

2.2. La protéine TRAM

La protéine TRAM « translocating chain-associated membrane protein » est bien souvent associée à la machinerie du translocon, néanmoins, elle ne semble pas indispensable au processus de ségrégation. En effet, il est suggéré que seules certaines structures du peptide signal soient reconnues spécifiquement par la protéine TRAM (Voigt *et al.*, 1996). Selon Mothes *et al.* (1994), la protéine TRAM interviendrait dans l'étape d'insertion des chaînes polypeptidiques dans le pore aqueux. Récemment, Hedge *et al.* (1998) ont montré qu'elle présenterait également un rôle dans la pause traductionnelle en protégeant les chaînes naissantes des facteurs cytosoliques.

2.3. Les autres constituants du translocon

2.3.1. Les récepteurs ribosomiques

L'arrimage du complexe ribosomique au sein de la membrane du RER implique la présence de plusieurs protéines intégrées dans la machinerie du translocon. Parmi celles-ci, on retrouve les ribophorines RI (66 kDa) et RII (63 kDa) très largement représentées dans la membrane du RER. Elles semblent avoir une fonction double : d'une part, dans la reconnaissance du complexe ribosomique et son maintien au niveau de la membrane du RER et d'autre part, dans la N-glycosylation des protéines naissantes puisqu'elles appartiennent au complexe formé par l'enzyme de transfert : l'oligosaccharyltransférase.

Deux autres protéines membranaires de 180 kDa (p180) et 34 kDa (p34) participent également à l'arrimage du complexe ribosomique au niveau de la membrane réticulaire. Cependant, elles ne sont pas systématiquement retrouvées au sein du translocon. Les études de Savitz et Meyer (1993) ont pourtant démontré que des protéoliposomes dépourvus en p180, présentent une activité de translocation considérablement réduite. Ainsi, les récepteurs ribosomiques seraient essentiellement impliqués dans la stabilisation du complexe ribosomique au niveau du pore aqueux.

2.3.2. La signal peptidase

Au cours du processus de ségrégation des protéines à travers la membrane du RER, le peptide signal est éliminé par une enzyme spécifique, la signal peptidase. Celle-ci est un complexe constitué de cinq sous-unités protéiques intégrées dans la membrane (Evans *et al.*, 1986). Seules deux d'entre elles sont impliquées dans l'activité propre de l'enzyme puisqu'elles en contiennent le site actif. La fonction des trois autres sous-unités reste à déterminer, cependant, parmi celles-ci, deux présentent un large domaine cytosolique qui pourrait faciliter l'intégration du complexe au sein de la machinerie du translocon.

3. Le contrôle de l'ouverture du pore de translocation

L'ouverture du pore aqueux s'effectue de manière très contrôlée, à la fois sur la face cytosolique et sur la face luminale de la membrane réticulaire. Il est fortement suggéré que la longueur du polypeptide émergent du ribosome conditionne l'ouverture du pore de part et d'autre de la membrane du RER (Crowley *et al.*, 1994). En effet :

- dans un premier temps, les chaînes naissantes courtes présentant le peptide signal interagissent avec SRP qui dirige alors le complexe ribosomique vers la membrane réticulaire. Le pore s'ouvre sur la **face cytosolique** afin d'initier la ségrégation du polypeptide à travers la membrane.
- dans un second temps, les polypeptides naissants suffisamment longs permettent l'ouverture du pore sur la **face luminale** de la membrane réticulaire : environ 70 résidus d'acides aminés sont nécessaires.

Le polypeptide qui apparaît ainsi dans la lumière du RER peut être alors glycosylé spécifiquement par l'oligosaccharyltransférase.

B. La réaction de transfert du glycanne

1. L'oligosaccharyltransférase

L'oligosaccharyltransférase purifiée à partir de cellules de mammifères se présente sous la forme d'un complexe protéique ancré dans la membrane du RER. Trois protéines transmembranaires de type I ont été isolées : une protéine de 48 kDa (OST48) et les ribophorines RI et RII. Elles présentent toutes un large domaine situé dans la lumière du RER à l'aide duquel OST48 interagit respectivement avec RI et RII (Fu *et al.*, 1997). Une quatrième

sous-unité de 40 kDa, Dad1, pourrait également participer à la formation du complexe (Breuer et Bause, 1995 ; Kelleher et Gilmore, 1997) mais son rôle reste à déterminer.

Ainsi, la présence des ribophorines au sein du complexe de l'oligosaccharyltransférase rend non seulement compte, de la proximité des constituants de la machinerie de ségrégation des protéines en voie de synthèse et du complexe de l'oligosaccharyltransférase, mais permet également de justifier le fait que la N-glycosylation est un processus cotraductionnel.

Il est suggéré que le transfert du glycanne soit catalysé par la protéine OST48 (Brauer et Bause, 1995) tandis que le site de fixation du précurseur lipidique serait porté par RI (Kelleher *et al.*, 1992). En effet, la séquence transmembranaire de RI présente un alignement de séquence avec le site de fixation des diverses glycosyltransférases connues pour fixer le dolichol (Albright *et al.*, 1989).

2. Le transfert « en bloc » du précurseur glycanne sur une protéine naissante

L'oligosaccharyltransférase catalyse une liaison β 1-N-glycosidique entre la N-acétylglucosamine terminale du $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ et un résidu d'asparagine intégré dans une séquence consensus tripeptidique d'une protéine en voie de synthèse (Pless et Lennarz, 1977).

Pour assurer le transfert du glycanne, l'oligosaccharyltransférase doit présenter une double spécificité de reconnaissance, à la fois vis-à-vis du peptide accepteur et du lipide donneur.

2.1. Spécificité de reconnaissance vis-à-vis du peptide accepteur

Le tripeptide accepteur appelé sequon est constitué d'Asn-X-Thr/Ser où X est un acide aminé quelconque excepté la proline (Hart *et al.*, 1979). Bause (1983) a montré que les séquences acceptrices s'organisent en structure en coude β (« β turn ») qui favorise la réaction de transfert en augmentant l'accessibilité du site de N-glycosylation. Néanmoins, tous les sequons potentiels ne sont pas glycosylés, leur présence est une condition nécessaire mais non suffisante. En effet, il faut savoir que la présence d'un résidu de thréonine en position +2 de la séquence consensus représente un bien meilleur substrat de l'oligosaccharyltransférase que lorsque ce résidu est une sérine (Gavel et von Heijne, 1990). L'existence de diverses glycoformes pour une même glycoprotéine peut également s'expliquer par une accessibilité plus ou moins bonne des sequons au site catalytique de l'enzyme ou encore par des phénomènes de compétition entre la formation cotraductionnelle de ponts disulfures qui

modifient la conformation du polypeptide et le transfert de l'oligosaccharide (Holst *et al.*, 1996).

2.2. Spécificité vis-à-vis du donneur lipidique

La nature du donneur lipidique représente également un élément important traduisant l'efficacité de transfert de l'oligosaccharyltransférase. En effet, des études effectuées sur différentes lignées cellulaires ont montré que les résidus de Man liés sur la branche en α 1,6 de l'oligosaccharide-lipide ne sont pas indispensables pour assurer le transfert de l'oligosaccharide sur la protéine naissante (Spiro *et al.*, 1979 ; Gershman et Robbins, 1981 ; Turco et Pickard, 1982). De cette façon, certains mutants de glycosylation qui présentent une déficience en Man-P-Dol synthétase et qui ne peuvent élaborer que des structures à $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, transfèrent sans problème ces glycanes tronqués sur leurs protéines. De tels mutants ont été isolés à partir de cellules Thy 1 (Chapman *et al.*, 1979) ou encore à partir de cellules d'ovaires de hamster chinois (CHO) comme le mutant B3F7 (Stoll, 1986).

Par contre, il semble que la présence des 3 résidus de glucose (Glc) ait une importance considérable sur le transfert : en effet, seul 10 % du précurseur oligosaccharidique non-glucosylé est transféré sur les protéines (Spiro *et al.*, 1979).

Ainsi, la double spécificité de l'oligosaccharyltransférase conditionne le transfert efficace du glycanne sur une protéine. Cependant, des études ont montré que l'oligosaccharyltransférase présente également une activité hydrolytique qui libère le précurseur oligosaccharidique sous forme soluble dans la lumière du RER.

3. L'activité hydrolytique de l'oligosaccharyltransférase

Dès 1980, Cacan *et al.* ont montré que le processus de N-glycosylation s'accompagnait de la libération d'oligosaccharides solubles de type oligomannosidique dans la lumière du RER. L'étude de la nature de ces oligomannosides a montré qu'une partie d'entre eux possédait 2 résidus de N-acétylglucosamine en position terminale réductrice (OSGn_2) (Anumula et Spiro, 1983 ; Cacan *et al.*, 1987). Ces études préliminaires ont amené certains auteurs à s'intéresser à l'origine de ce matériel (pour revue Cacan et Verbert, 1997). Des études *in vitro* ont montré que la libération de ces OSGn_2 était fortement diminuée en présence d'un large excès d'accepteur peptidique exogène (Spiro et Spiro, 1991) suggérant que la même enzyme, l'oligosaccharyltransférase, pouvait catalyser, à la fois, le transfert en bloc de l'oligosaccharide sur un accepteur protéique et produire des OSGn_2 en utilisant une molécule d' H_2O comme

accepteur. Depuis, différentes études ont montré que la libération des OSGn₂ augmentait proportionnellement à la diminution du taux d'accepteur protéique observée en présence d'inhibiteur de synthèse protéique tel que la cycloheximide ou par l'utilisation de cellules perméabilisées (Villers *et al.*, 1994 ; Kmićik *et al.*, 1995). Ainsi, l'ensemble de ces résultats a confirmé la double activité de l'oligosaccharyltransférase illustrée dans la figure 6.

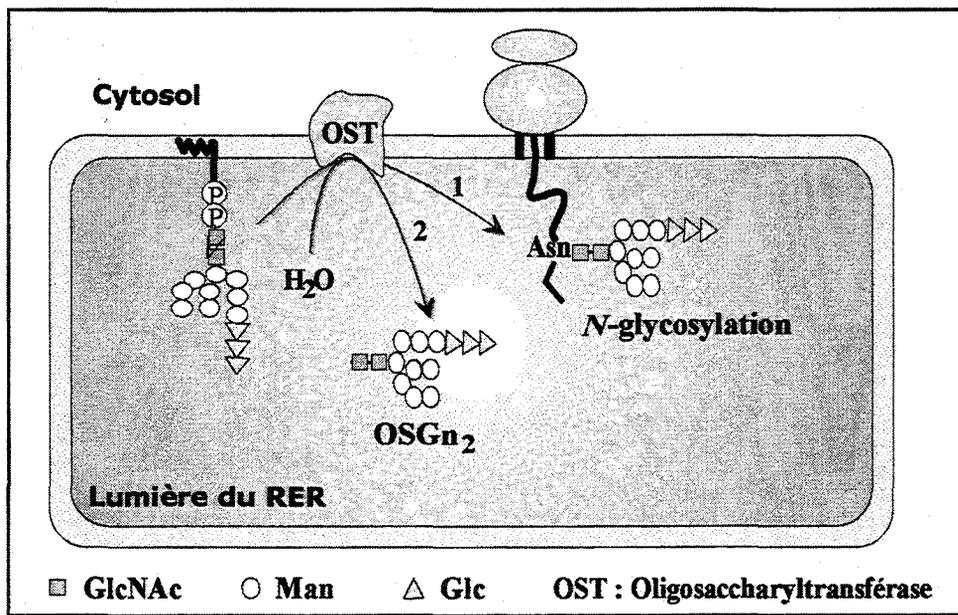


Figure 6 : La double activité de l'oligosaccharyltransférase : transfert "en bloc" du précurseur oligosaccharidique sur une protéine en voie de synthèse (1) et sur une molécule d'H₂O (2).

A l'heure actuelle, la fonction de cette double activité n'a pas été déterminée, mais on peut suggérer que la libération des OSGn₂ corresponde à un contrôle de l'ajustement du taux d'intermédiaires lipidiques par rapport à la disponibilité de protéines destinées à être glycosylées.

Selon qu'il soit transféré sur une protéine en voie de synthèse ou sur une molécule d'H₂O, le glycanne prendra deux destinations bien distinctes. Alors que les glycoprotéines pourront s'engager dans la voie de maturation, les oligosaccharides solubles seront séquentiellement hydrolysés par une voie catabolique qui leur est propre. Nous étudierons successivement ces deux voies métaboliques.

IV. La maturation des N-glycosylprotéines

Le précurseur glycanique transféré, commun à toute néoglycoprotéine, va subir une étape de maturation ou « processing » qui commence dans le RER mais dont les principales étapes sont effectuées dans l'appareil de Golgi.

A. La maturation réticulaire

Les modifications effectuées au sein du RER reposent essentiellement sur l'hydrolyse séquentielle des résidus glucosyl et des résidus mannosyl les plus externes. Il faut savoir que ces premières étapes de la maturation glycanique se déroulent simultanément à l'étape essentielle de mise en conformation de la néoglycoprotéine dont nous reparlerons dans le deuxième chapitre et dans lequel nous verrons que les deux phénomènes sont très intimement liés. La séquence des événements de la maturation réticulaire déterminera le transport des glycoprotéines dans l'appareil de Golgi.

1. Les glucosidases I et II

Le dernier résidu de Glc transféré sur le précurseur glycanique est très rapidement retiré par la glucosidase I. La glucosidase II peut alors retirer les deux derniers résidus de Glc liés en $\alpha 1,3$. Cette enzyme semble opérer en deux temps : l'hydrolyse du premier résidu glucosyl est très efficace, elle fera ainsi apparaître la structure $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ qui est spécifiquement impliquée dans le contrôle de qualité de la mise en conformation. Nous verrons que l'hydrolyse définitive du dernier résidu de Glc par la glucosidase II, traduit la fin de l'étape de mise en conformation de la glycoprotéine.

Il est intéressant de noter qu'il est possible d'inhiber spécifiquement ces premières étapes de la maturation glycanique. L'inhibiteur le plus utilisé est la castanospermine, un alcaloïde isolé de *Castanospermum australe*. En bloquant l'action des glucosidases I et II du RER, elle empêche non seulement le processing de la glycoprotéine mais elle en perturbe également l'étape de mise en conformation.

2. Les mannosidases du RER

Différentes $\alpha 1,2$ mannosidases réticulaires interviennent au cours de la maturation des glycanes des N-glycoprotéines. Elles présentent toutes une spécificité très étroite vis-à-vis du $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ pour donner les différents intermédiaires oligomannosidiques schématisés dans la figure 7 (pour revue voir Daniel *et al.*, 1994).

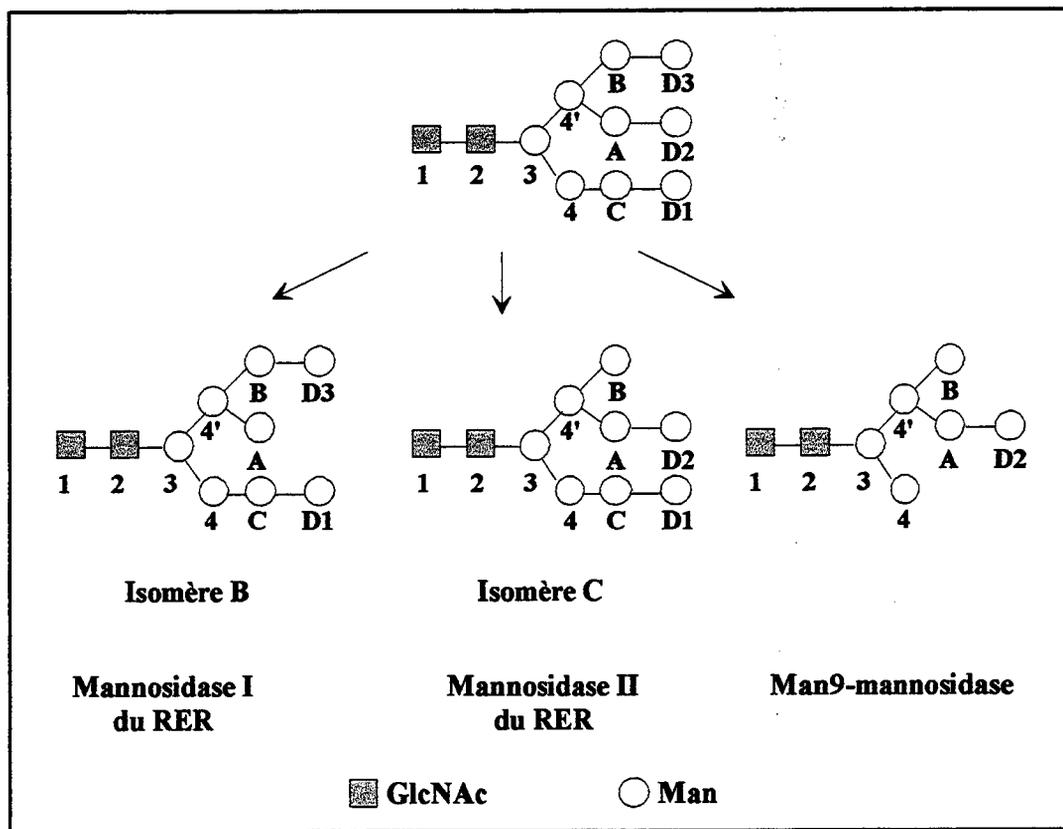


Figure 7 : Structures oligomannosidiques obtenues par les différentes mannosidases du RER.

2.1. La mannosidase I du RER

La mannosidase I du RER ou mannosidase kifunensine-sensible a été mise en évidence dans le foie de rat par Bischoff et Kornfeld (1983). C'est une protéine membranaire qui, en hydrolysant le résidu de Man D2 produit l'isomère B de $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$. Il semble qu'elle soit la première enzyme à intervenir dans l'hydrolyse des résidus de Man des N-glycosylprotéines.

2.2. La mannosidase II du RER

Weng et Spiro (1993) ont déterminé l'existence d'une autre mannosidase dans le foie de rat, la mannosidase II du RER qui se distingue de la mannosidase I par le fait qu'elle soit résistante à

la kifunensine. Elle présente une spécificité de substrat très étroite puisqu'elle hydrolyse le résidu de Man D3 pour libérer l'isomère C de l'oligomannoside $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$.

2.3. La Man_9 -mannosidase

La Man_9 -mannosidase est une protéine membranaire de type II qui hydrolyse trois des quatre résidus de Man liés en $\alpha 1,2$ du précurseur glycanique $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ pour donner l'oligomannoside final $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$. La spécificité de l'enzyme indiquerait qu'elle intervient immédiatement après les glucosidases I et II (Elting *et al.*, 1980).

Cependant, l'activité de la Man_9 -mannosidase semble beaucoup plus efficace vis-à-vis de l'oligosaccharide libre présentant un seul résidu de GlcNAc en position terminale réductrice $\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ sur lequel elle peut alors hydrolyser les quatre Man liés en $\alpha 1,2$. Curieusement, Schweden et Bause (1989) ont purifié une forme soluble de 49 kDa de l'enzyme qui semble provenir de la protéolyse de la forme membranaire de 65 kDa. Suite à l'ensemble de ces observations, Daniel *et al.* (1994) ont suggéré que la Man_9 -mannosidase pourrait avoir une double fonction, à savoir :

- un rôle dans la maturation des glycannes liés aux glycoprotéines qu'elle assumerait sous sa forme membranaire.
- sous sa forme soluble, elle pourrait être impliquée dans le catabolisme des oligosaccharides susceptibles d'être libérés au cours du processus de N-glycosylation.

Les différentes étapes de la maturation des glycannes dans le RER sont résumées dans la figure 8.

Les glycoprotéines déglucosylées et partiellement démannosylées peuvent alors s'engager dans l'appareil de Golgi où s'effectue la deuxième partie de la maturation des glycannes.

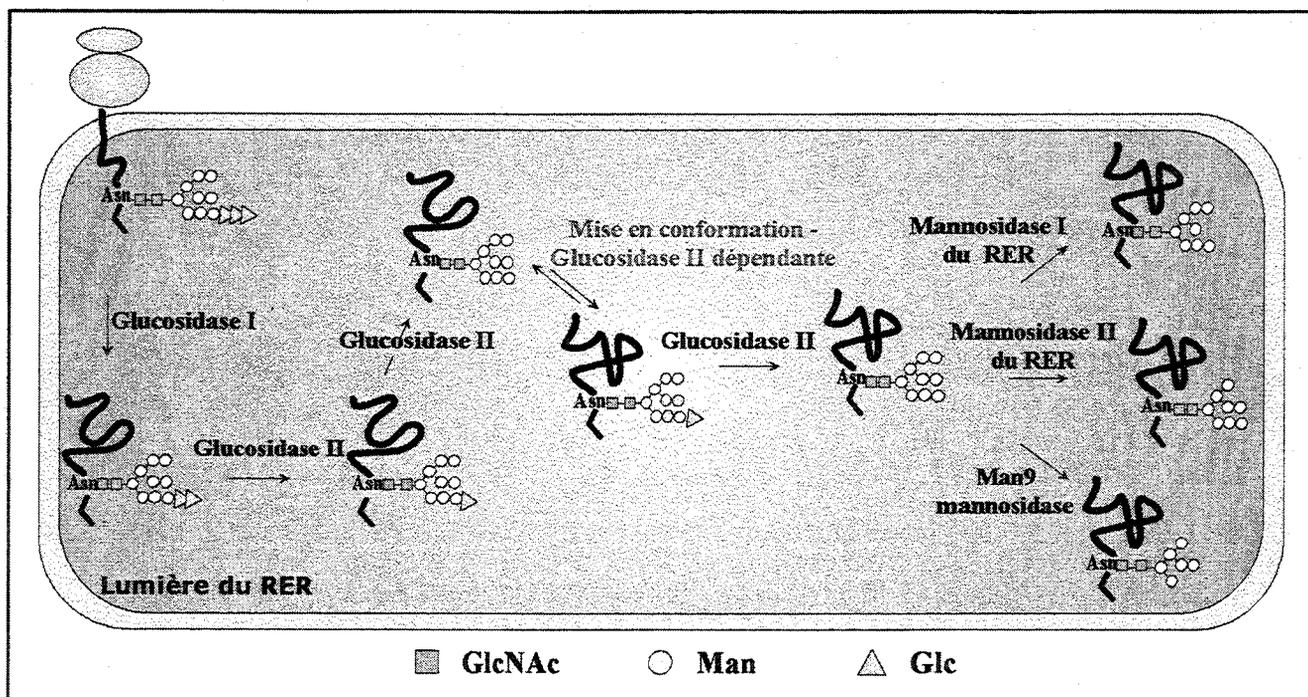


Figure 8 : Maturation réticulaire des N-glycannes.

B. La maturation golgienne

La maturation golgienne commence dans le *cis*-Golgi où les derniers résidus de Man liés en α 1,2 sont élagués par la mannosidase I golgienne pour donner l'oligomannoside $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ encore appelé « Man_5 branché ». Les glycoprotéines destinées à être de type complexe ou hybride s'engagent alors dans le *median*-Golgi où la N-acétylglucosaminyltransférase I branche un résidu de GlcNAc en β 1,2 sur le Man en α 1,3 du « core ». La mannosidase II golgienne qui reconnaît spécifiquement cette structure, retire les résidus de Man de la branche en α 1,6 : son action déterminera la présence de glycannes de type complexe, dans l'alternative, ils demeureront de type hybride. Le glycanne est finalement remanié par diverses glycosyltransférases : N-acétylglucosaminyl-, galactosyl-, fucosyl- et sialyltransférases dont l'action permet d'expliquer la grande diversité glycanne rencontrée sur les N-glycosylprotéines. La figure 9 représente les différentes étapes de la maturation golgienne des N-glycannes.

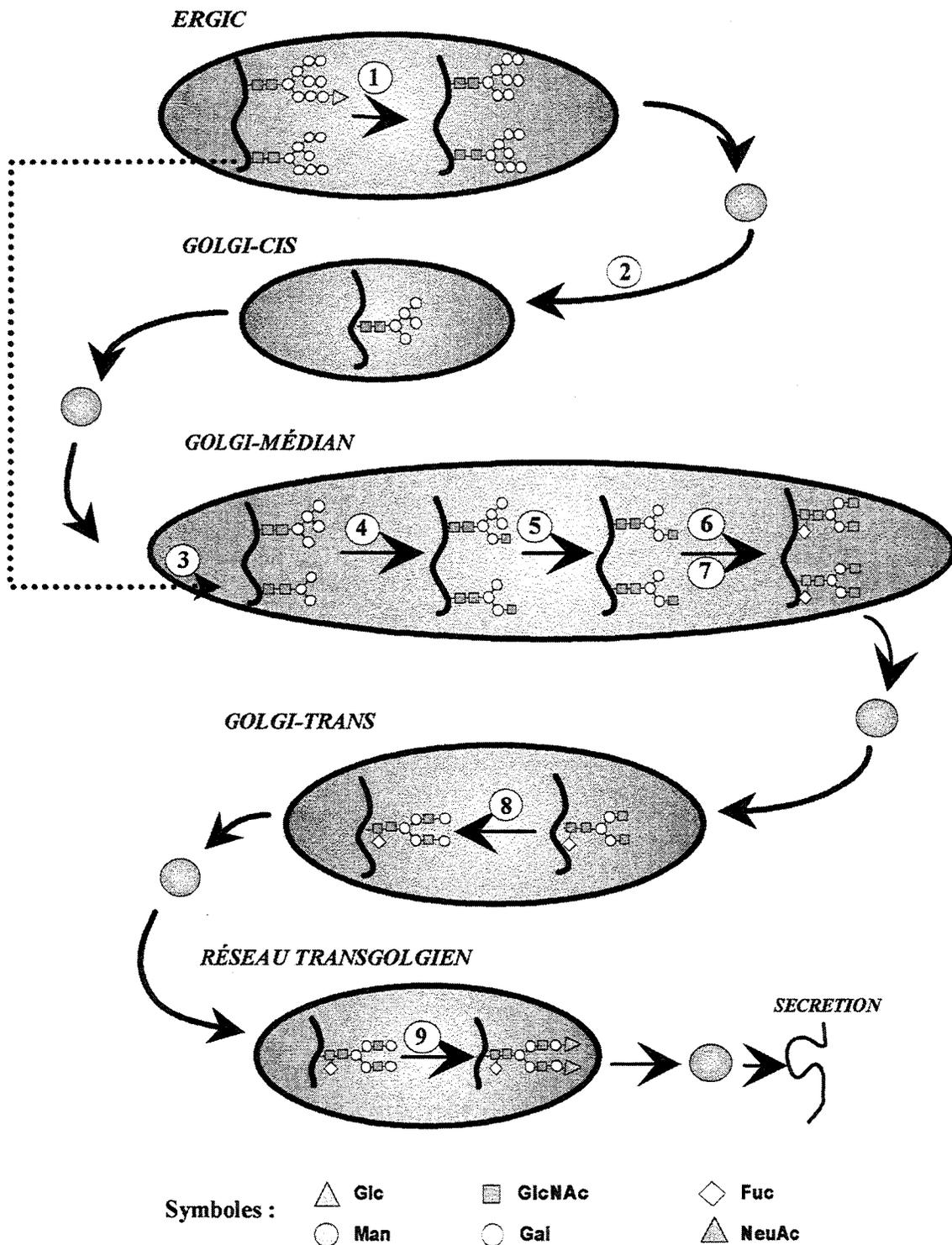


Figure 9 : Maturation golgienne des N-glycosylprotéines

Les enzymes impliquées sont :

- | | |
|--|------------------------------|
| ① Endomannosidase golgienne (Moore et spiro, 1990) | ⑥ Fucosyltransférase |
| ② Mannosidase I golgienne | ⑦ Glucosaminyltransférase II |
| ③ Mannosidase golgienne (Bonay et Hugues, 1991) | ⑧ Galactosyltransférase |
| ④ Glucosaminyltransférase I | ⑨ Sialyltransférase |
| ⑤ Mannosidase II golgienne | |

V. Catabolisme des oligomannosides libérés par l'activité hydrolytique de l'oligosaccharyltransférase

Parce qu'ils sont susceptibles d'entrer en compétition vis-à-vis des activités de glycosidases, glycosyltransférases et de lectines cellulaires, la cellule est amenée à éliminer les oligomannosides libérés dans la lumière du RER. Les nombreux travaux qui ont porté sur l'étude du catabolisme des oligomannosides, ont montré qu'il impliquait successivement trois compartiments subcellulaires : la lumière du RER, le cytosol et les lysosomes. Nous allons rappeler succinctement les principales étapes du trafic intracellulaire des oligomannosides.

A. Etapes réticulaires

Le catabolisme des oligomannosides implique l'action séquentielle de glycosidases spécifiques situées dans chacun des compartiments subcellulaires. Sitôt libéré dans la lumière du RER, le précurseur glycanique subit l'étape de maturation réticulaire de façon identique à celle des glycanes portés par les N-glycoprotéines. Ainsi, les glucosidases I et II hydrolysent très rapidement les résidus de Glc pour donner le $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$: en effet, l'utilisation de la castanospermine comme inhibiteur de la maturation glycanique, conduit à l'accumulation des espèces glucosylées dans la lumière du RER (Kmiécik *et al.*, 1995 ; Moore *et al.*, 1995). La mannosidase I du RER entre en jeu pour donner le $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ qui semble quitter très rapidement le RER pour rejoindre le compartiment cytosolique.

B. Transport dans le cytosol

Le transport de l'oligomannoside dans le compartiment cytosolique reste assez mal défini. Cependant, les travaux qui ont abordé le mécanisme mis en jeu suggèrent l'existence d'un transporteur spécifique. S'il n'a pas été identifié, certaines caractéristiques lui ont été déterminées :

- **le transport est spécifique des espèces déglucosylées** (Moore *et al.*, 1995). Cette spécificité a été récemment confirmée par le fait que le Man et ses analogues (α -benzyl-mannose et α -méthyl-mannose) inhibent fortement le transport de l'oligomannoside vers le

cytosol (Moore, 1998). De ce fait, l'auteur suggère que les résidus de Man soient directement impliqués dans l'interaction avec la machinerie de transport.

- le transport serait directement associé à la pompe ATPasique d'échange d'ions $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$. En effet, une forte concentration calcique favorise le transport des oligomannosides tandis que l'utilisation de la thapsigargine comme puissant inhibiteur de la pompe $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ perturbe efficacement ce transport (Moore, 1998). Ainsi, la concentration calcique intraluminaire semble représenter un facteur important dans le transport des oligomannosides vers le cytosol.

C. Etapes cytosoliques

1. Action de la chitobiase cytosolique

D'une manière générale, les OSGn₂ cytosoliques semblent rapidement convertis en OSGn₁. Le fait que les OSGn₂ soient équitablement répartis dans les compartiments réticulaire et cytosolique alors que les OSGn₁ sont exclusivement retrouvés dans le cytosol, suggère une relation substrat-produit entre les deux espèces (Kmiécik *et al.*, 1995 ; Moore *et al.*, 1995). Une telle conversion OSGn₂ → OSGn₁ peut être attribuée à l'activité chitobiase cytosolique mise en évidence par Cacan *et al.* (1996).

2. Action de la mannosidase cytosolique

Les OSGn₁ sont ensuite progressivement démannosylés pour former l'oligomannoside unique Man₅GlcNAc₁ encore appelé « Man₅ linéaire » dont l'isomérisation structurale est à opposer au « Man₅ branché » issu de la maturation golgienne. De par leur spécificité, la présence de mannosidases cytosoliques permettrait d'expliquer la formation de cet intermédiaire (Haeuw *et al.*, 1991a ; 1991b ; Weng et Spiro, 1996). Le Man₅GlcNAc₁ linéaire correspond effectivement au produit final de ces mannosidases. De plus, des études ont montré qu'elles présentent une spécificité très étroite vis-à-vis des espèces OSGn₁ confirmant une action consécutive à celle de la chitobiase (Oku et Hase, 1991 ; Gard *et al.*, 1996).

L'isomère Man₅GlcNAc₁ représente le produit final du catabolisme cytosolique : il est ensuite transporté dans le compartiment lysosomique.

D. Etapes lysosomiques

Saint-Pol *et al.* (1997) ont montré que le catabolisme des oligomannosides se terminait dans les lysosomes où le $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_1$ est hydrolysé en Man et GlcNAc. Ce transport a été montré ATP-dépendant. L'utilisation de la swainsonine qui représente un inhibiteur des hydrolases lysosomiques, conduit à l'accumulation de l'espèce $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_1$ dans le cytosol, confirmant l'implication des lysosomes dans la phase terminale de dégradation des oligomannosides (Kang *et al.*, 1993). La figure 10 est une illustration du trafic des oligomannosides issus de l'activité hydrolytique de l'oligosaccharyltransférase.

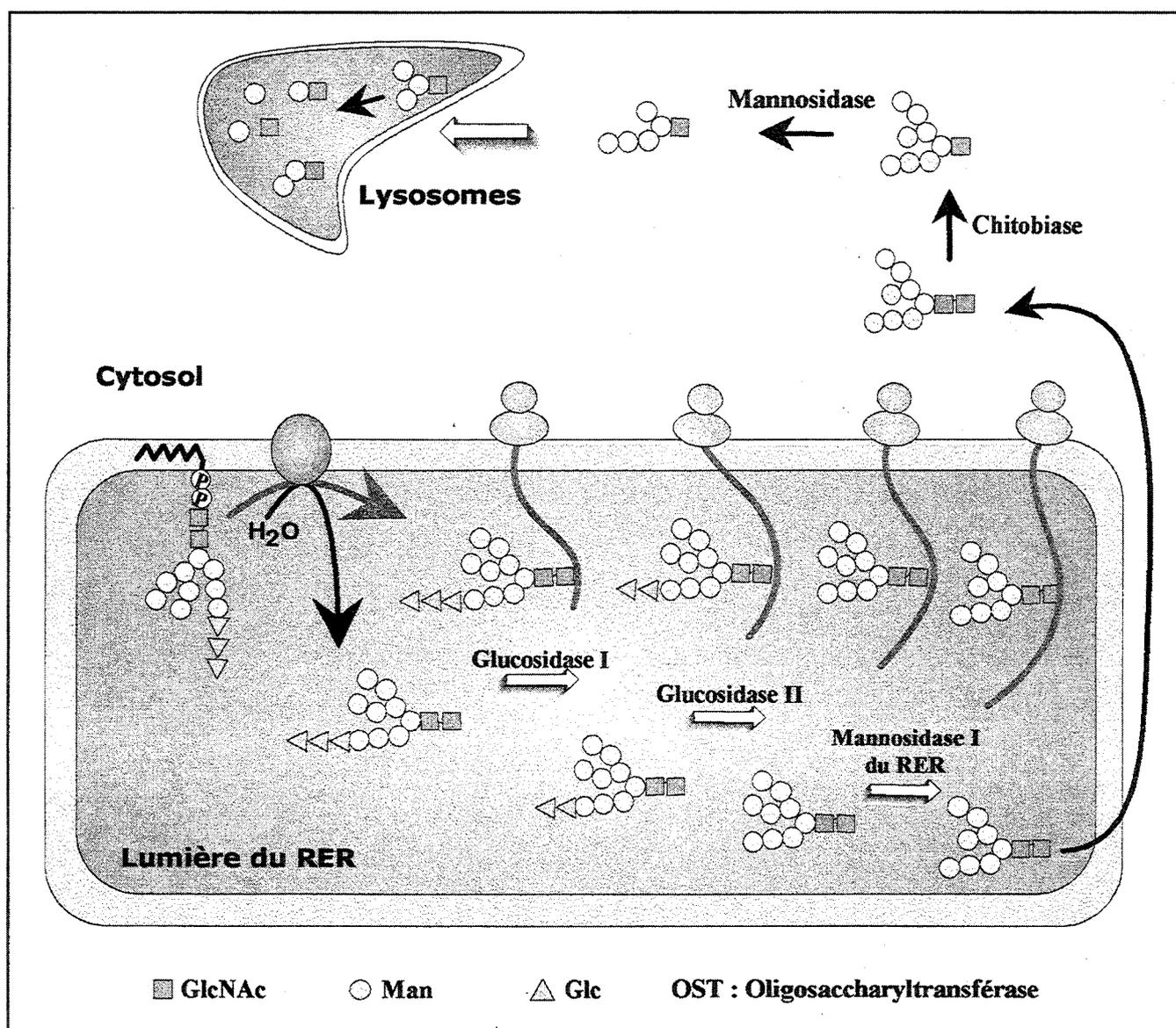


Figure 10 : Le trafic intracellulaire des oligomannosides libérés par l'activité hydrolytique de l'oligosaccharyltransférase.

VI. Conclusion : la diversité des structures oligomannosidiques : signaux de reconnaissance impliqués dans le trafic intracellulaire

Les premières étapes de la biosynthèse des N-glycosylprotéines sont associées à la présence d'oligomannosides. Si le type oligomannosidique ne renferme que des résidus de Glc, Man et de GlcNAc, il n'en présente pas moins une très grande diversité structurale. Cette diversité est d'autant plus remarquable que certains intermédiaires oligomannosidiques peuvent être assimilés à de véritables signaux de reconnaissance impliqués dans le trafic intracellulaire. Nous allons rappeler les principales structures oligomannosidiques qui témoignent d'une localisation subcellulaire donnée.

La diversité des oligomannosides peut être envisagée sous divers aspects :

- d'une part, les oligomannosides liés aux glycoprotéines dont le nombre de résidus de Man témoigne d'une localisation subcellulaire précise.
- d'autre part, les oligomannosides retrouvés sous forme soluble dont la compartimentation est déterminée par la présence de résidus de Glc et selon le nombre de résidus de GlcNAc présents à l'extrémité terminale réductrice.

A. Compartimentation des oligomannosides liés aux glycoprotéines

Certaines structures oligomannosidiques liées aux glycoprotéines peuvent, dans certains cas, représenter un élément déterminant de leur localisation subcellulaire. Ainsi, selon l'état d'avancement de la maturation du glycanne et la destinée des glycoprotéines qui les portent, certains motifs oligomannosidiques représentent des marqueurs d'une localisation réticulaire, golgienne ou lysosomique (figure 11).

1. Espèces réticulaires

Les espèces oligomannosidiques glucosylées ou partiellement glucosylées témoignent d'une localisation strictement réticulaire. En effet, seule la lumière du RER présente les activités glucosidases susceptibles d'hydrolyser les résidus de Glc terminaux.

2. Espèces golgiennes

Au cours de la maturation golgienne, le précurseur oligomannosidique subira diverses modifications pour donner les types complexes et hybrides. Avant de s'engager irréversiblement dans cette voie de maturation, la glycoprotéine présente l'isomère $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ ou « Man_5 branché » : seules les glycoprotéines ayant rejoint le *median*-Golgi peuvent présenter une telle structure au sein de leur molécule.

3. Espèces lysosomiques

Les hydrolases acides lysosomiques sont des N-glycoprotéines. L'adressage de ces molécules s'effectue par l'intermédiaire d'un signal glycanne particulier : le Man-6-P. L'élaboration du signal s'effectue au cours de la maturation golgienne : les glycoprotéines présentant ce motif sont alors spécifiquement reconnues par des récepteurs situés dans les saccules *trans*-golgiens qui en permettent l'adressage vers le compartiment lysosomique (pour revue voir Figura et Hasilik, 1986). Ainsi, le signal Man-6-P est l'illustration la plus remarquable de l'utilisation des oligomannosides comme marqueur du trafic intracellulaire.

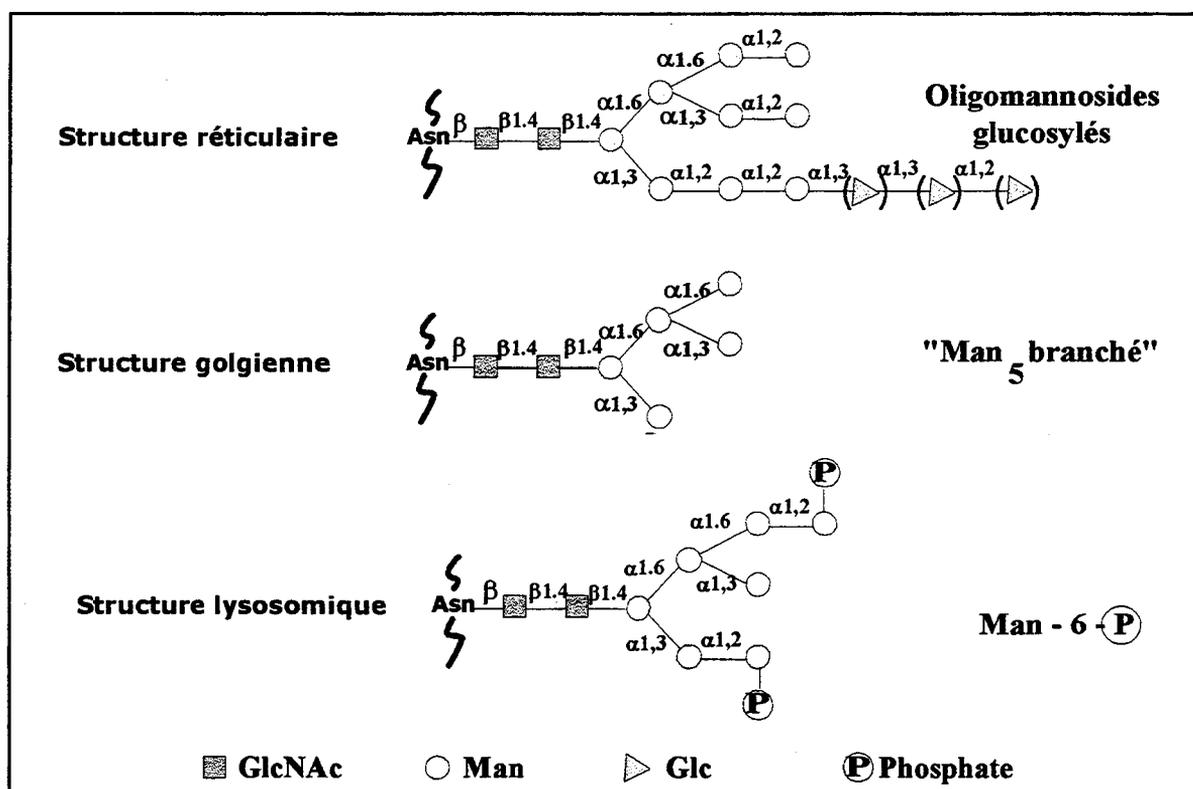


Figure 11 : Structures oligomannosidiques portées par les glycoprotéines marqueurs d'une localisation réticulaire, golgienne ou lysosomique.

B. Les oligomannosides solubles

La figure 12 présente trois exemples de structures oligomannosidiques retrouvées sous forme soluble et témoignant d'une localisation subcellulaire précise.

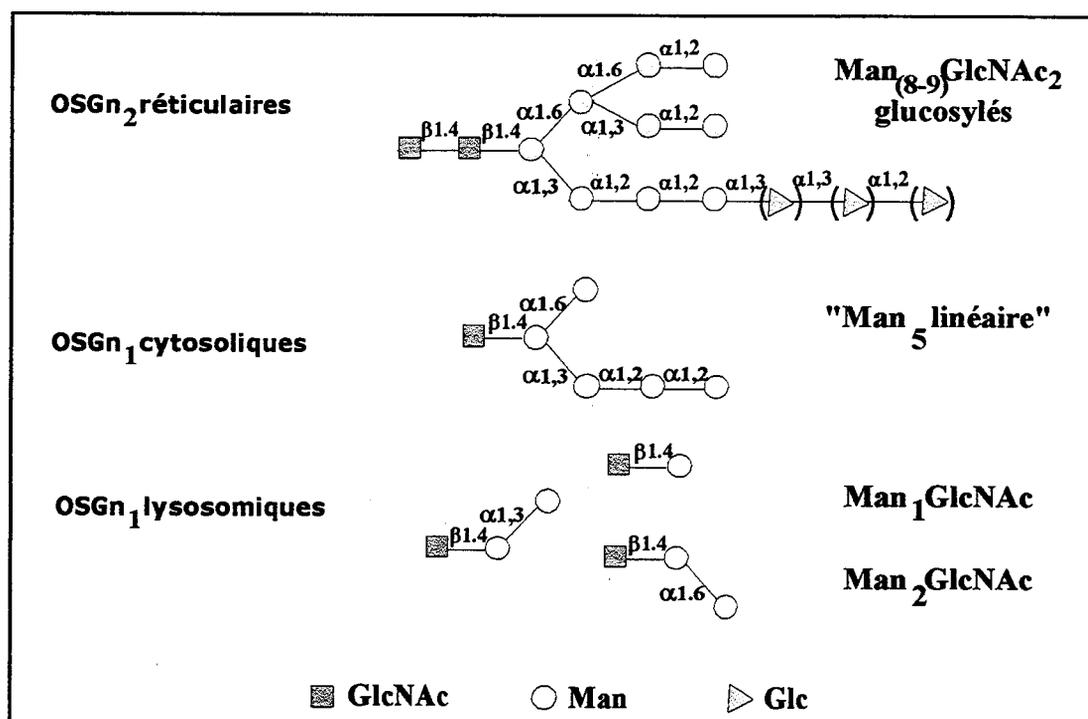


Figure 12 : Structures oligomannosidiques solubles marqueurs d'une localisation réticulaire, cytosolique ou lysosomique.

1. Espèces réticulaires

Le trafic des oligomannosides issus de l'activité hydrolytique de l'oligosaccharyltransférase s'effectue successivement dans les trois compartiments RER, cytosolique et lysosomique. Comme les oligomannosides glucosylés portés par les glycoprotéines, les OSGn₂ glucosylés sont exclusivement retrouvés dans la lumière du RER. En effet, comme l'a montré Moore *et al.* (1995), seuls les oligomannosides déglucosylés peuvent être transportés vers le cytosol.

2. Espèces cytosoliques

Une fois déglucosylés et transportés dans le cytosol, les OSGn₂ sont convertis en OSGn₁ : ces derniers représentent quant à eux de véritables marqueurs du compartiment cytosolique puisque l'activité chitobiase qui les génère y est exclusive.

Le produit final du catabolisme cytosolique est l'isomère $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_1$ ou « Man_5 linéaire ». Celui-ci est à opposer à l'isomère $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ ou « Man_5 branché » issu de la maturation golgienne qui est spécifiquement retrouvé sur les glycoprotéines. Ainsi, des structures identiques qui diffèrent uniquement par leur isomérisation sont les témoins d'une compartimentation et d'une destinée très distinctes.

3. Espèces lysosomiques

Les lysosomes représentent la destination finale des oligomannosides solubles : de cette façon, les espèces $\text{Man}_2\text{GlcNAc}$ et $\text{Man}_1\text{GlcNAc}$ marquent les étapes finales de leur catabolisme et témoignent d'une localisation strictement lysosomique.

Ainsi, les oligomannosides ont une importance considérable dans le trafic intracellulaire des glycoprotéines mais également au cours de leur catabolisme. Nous verrons dans le chapitre II que ces oligomannosides sont également directement impliqués dans l'étape de mise en conformation des glycoprotéines : cette étape indispensable est déterminante pour la destinée des molécules.

Chapitre II : Mise en conformation des N-glycosylprotéines

Il fut longtemps admis que le contrôle de l'expression des protéines relevait d'un processus pré-traductionnel. En effet, on pensait que le niveau d'expression des protéines était uniquement lié à l'abondance de leurs ARN messagers (Berdoz *et al.*, 1987 ; Cotner *et al.*, 1989). Cependant, ces dernières années, de nombreuses études ont montré l'existence d'un contrôle post-traductionnel, appelé « contrôle de qualité » dont l'efficacité permet de vérifier la qualité des protéines nouvellement synthétisées.

I. Le RER : compartiment subcellulaire impliqué dans le contrôle de qualité des protéines

C'est dans la lumière du RER que sont réunis les conditions et les éléments nécessaires à la mise en conformation des protéines et glycoprotéines nouvellement synthétisées. Le tableau 1 présente les caractéristiques essentielles qui favorisent ou non le repliement progressif des protéines.

Facteurs favorisant la mise en conformation	Facteurs perturbant la mise en conformation
Basse température	Température élevée
Taux d'expression faible	Taux d'expression élevé
Système homologue	Système hétérologue
Forte concentration en Ca ⁺⁺	Faible concentration en Ca ⁺⁺
Conditions oxydantes	Conditions rédox déséquilibrées
ATP	Apport énergétique insuffisant
Présence de molécules chaperons et enzymes de structuration	molécules chaperons insuffisantes

Tableau 1 : Principaux facteurs qui favorisent ou perturbent l'étape de mise en conformation des protéines.

Parmi ces différents facteurs, nous étudierons particulièrement l'importance des conditions rédox, des enzymes et des protéines chaperons impliquées dans ce processus.

A. L'environnement oxydant du RER

L'environnement oxydant du RER favorise la formation des ponts disulfures qui stabilisent la structure tertiaire des protéines. Braakman *et al.* (1992) ont montré que le RER est capable de rétablir en quelques minutes l'oxydation des protéines après une réduction totale des ponts disulfures effectuée en présence de DTT. Ainsi, l'homéostasie de ce compartiment semble extrêmement régulée afin qu'il puisse assurer, de façon optimale, ses potentialités d'oxydoréduction : on y détermine un rapport constant glutathion oxydé/glutathion réduit $GSSG/GSH = 3/1$. Récemment, Pollard *et al.* (1998) ont identifié une nouvelle protéine essentielle, Ero1p « endoplasmic reticulum oxidoreductin 1p » résidente du RER. Ces auteurs ont, en effet, montré que l'environnement du RER devient particulièrement sensible au DTT lorsque Ero1p n'est plus fonctionnelle. Par contre, lorsque Ero1p est surexprimée, l'environnement du RER devient résistant au DTT. Cette protéine pourrait représenter un facteur essentiel dans le maintien de l'environnement oxydant du RER favorable à l'action de diverses molécules chaperons impliquées dans l'étape de mise en conformation des glycoprotéines nouvellement synthétisées.

B. Les protéines chaperons

Les protéines chaperons représentent la majorité des protéines retrouvées dans la lumière du RER. Leur concentration estimée proche de 100 mg/ml donne une idée des grandes probabilités et potentialités d'interaction avec les protéines nouvellement synthétisées.

Parmi celles-ci, on retrouve majoritairement la « binding immunoglobulin protein » (BiP), la peptide disulfure isomérase (PDI), ainsi que la calnexine et la calréticuline auxquelles nous nous intéresserons plus particulièrement par la suite.

1. La protéine BiP

Encore appelée grp78, la BiP est une protéine soluble qui peut représenter jusqu'à 7 % des protéines totales du RER. Appartenant à la famille des « heat shock proteins », sa synthèse peut être induite lorsque la cellule est en état de stress, conduisant à l'accumulation de protéines adoptant une conformation incorrecte. A l'origine, elle fut mise en évidence par sa fixation aux chaînes lourdes (H) des immunoglobulines (Haas et Wabl, 1983). En s'associant de façon transitoire à des polypeptides immatures, elle participe à la formation du complexe H₂L₂ des immunoglobulines natives.

2. La protéine PDI

La PDI est une protéine résidente du RER dont la masse moléculaire est d'environ 114 kDa. Elle représente une enzyme de structuration mais peut être considérée comme faisant partie des protéines chaperons. L'enchaînement proximal de résidus de cystéine situés dans sa séquence d'acides aminés pourrait avoir un rôle d'agent réducteur favorisant le clivage des liaisons disulfures formées de façon incorrecte (Edman *et al.*, 1985). De cette façon, le remaniement des ponts disulfures catalysé par la PDI se produit jusqu'à ce que le processus de mise en conformation soit terminé.

3. Principe d'action

Les protéines chaperons représentent une famille de molécules particulières qui interviennent par un jeu d'interactions transitoires avec les protéines nouvellement synthétisées. Ainsi, leur fonction majeure serait d'interagir avec les surfaces ou les séquences hydrophobes des chaînes polypeptidiques naissantes, lesquelles apparaissent transitoirement durant les processus d'acquisition de la forme fonctionnelle des protéines. D'une manière générale, cette association a été montrée ATP-dépendante : l'hydrolyse de l'ATP permettrait une association plus étroite protéine chaperon-substrat favorisant le repliement de la protéine immature (Hendrick et Hartl, 1995). Le changement de conformation favoriserait une dissociation des complexes. Durant ce processus de structuration, les interactions hydrophobes entre les chaperons et les chaînes polypeptidiques se poursuivent jusqu'à ce que les protéines atteignent l'état d'énergie libre le plus bas excluant toute possibilité d'interaction avec les molécules chaperons (Hammond et Helenius, 1995). La figure 13 est une illustration du mode d'interaction général des protéines chaperons avec leur substrat.

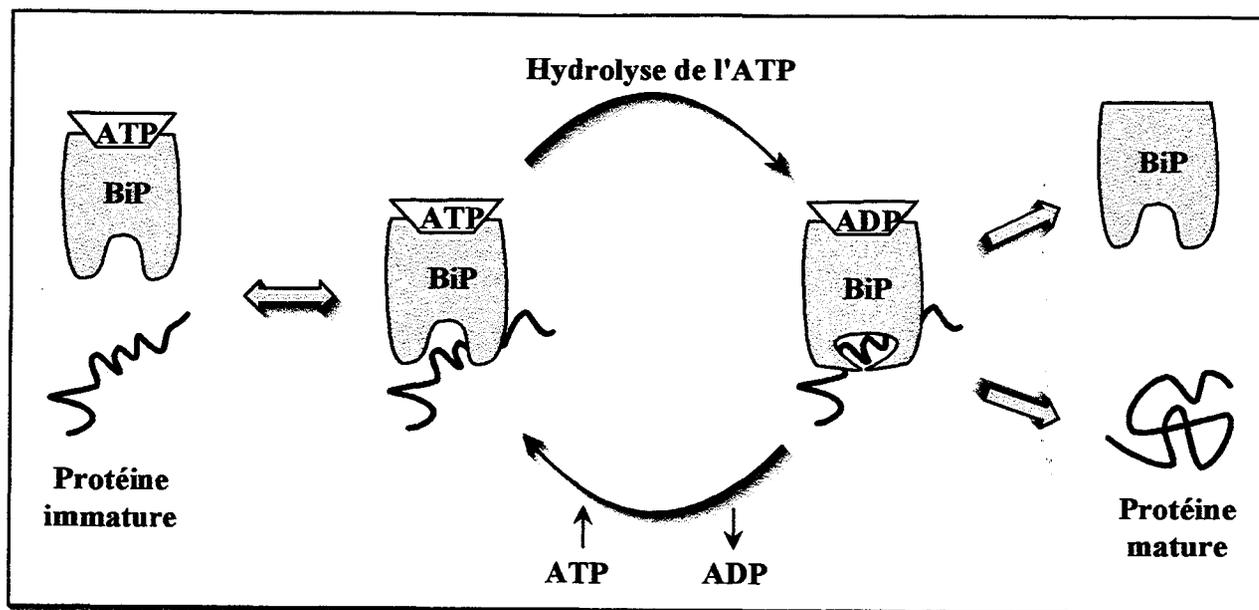


Figure 13 : Mode d'interaction général des protéines chaperons.

4. Rôles des protéines chaperons

Outre le rôle majeur dans le contrôle du repliement progressif des protéines nouvellement synthétisées, l'association transitoire avec les protéines chaperons peut également correspondre à une protection des protéines immatures. En effet, la rétention dans la lumière du RER des protéines immatures permet :

- d'éviter qu'elles ne s'engagent trop prématurément dans la voie de sécrétion.
- de faciliter l'assemblage des protéines oligomériques sous une forme stable et biologiquement active.
- d'éviter qu'elles ne s'engagent dans une voie de dégradation.

Ce contrôle de qualité est donc un prérequis pour que les protéines ayant adopté leur conformation native puissent alors s'engager dans la voie de sécrétion.

En ce qui concerne les N-glycoprotéines, il est maintenant clairement établi que la présence des N-glycannes est également impliquée dans l'étape de mise en conformation.

II. Rôles des glycanes dans la mise en conformation des N-glycosylprotéines

L'influence des glycanes sur la conformation des protéines natives est connue depuis longtemps. Elle se traduit notamment, par une résistance des glycoprotéines à la protéolyse, par une diminution de la solubilité voire une précipitation de la molécule lorsque le glycanne est retiré (pour revue voir Montreuil, 1984).

Par contre, le rôle du glycanne au cours de la mise en conformation est moins bien connu. Cependant, des études préliminaires réalisées en présence de tunicamycine, un inhibiteur de la N-glycosylation, ont montré dans certains modèles, une agrégation des protéines non glycosylées sur le lieu même de leur synthèse (Elbein, 1984).

Ces dernières années, de nombreuses études ont permis d'évaluer l'importance que pouvait avoir la présence d'un glycanne sur le contrôle de qualité des néoglycoprotéines. Son rôle est double puisqu'il peut modifier à la fois la stabilisation de certaines conformations et interagir spécifiquement avec certaines protéines chaperons à activité lectinique.

A. Rôle des glycanes dans la stabilisation de certaines conformations

Le transfert d'un N-glycanne sur une chaîne peptidique en voie de synthèse induit un changement local de la conformation. Des études spectroscopiques ont déterminé l'impact de la N-glycosylation sur la dynamique de la conformation d'oligopeptides en observant les variations d'énergie de transfert de fluorescence. En effet, Imperiali et Rickert (1995) ont montré que des oligopeptides isolés de l'hémagglutinine A, adoptent diverses conformations dont certaines sont favorisées par les N-glycanes. Les conformations des glycopeptides (figure 14) sont plus compactes que celles des peptides correspondants et se rapprochent de celles observées dans les glycoprotéines natives.

Ces mêmes auteurs (Rickert et Imperiali, 1995) ont également montré que la N-glycosylation d'un oligopeptide issu du récepteur de l'acétylcholine pouvait également avoir une influence significative sur la formation des ponts disulfures et l'isomérisation des résidus de proline. En effet, des études spectroscopiques montrent que la présence des glycanes altère la formation d'un pont disulfure et que l'isomérisation en *trans* de la proline est nettement favorisée. Il

paraît donc évident que le transfert d'un N-glycane sur une protéine joue un rôle important entraînant des répercussions notables sur le repliement d'une glycoprotéine.

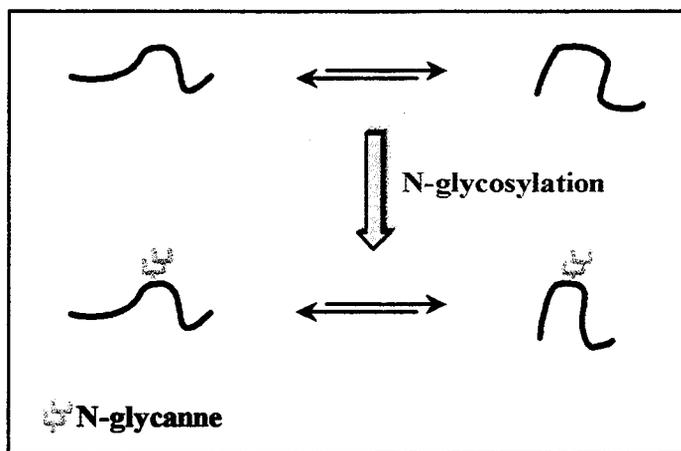


Figure 14 : Impact dynamique de la N-glycosylation sur le repliement d'oligopeptides issus de l'hémagglutinine (d'après Imperiali et Rickert, 1995)

B. Rôle des glycannes dans le contrôle de qualité des N-glycosylprotéines

Ainsi, l'addition d'un N-glycane sur une protéine est un facteur supplémentaire qui entre en jeu dans l'étape de mise en conformation. Il est clairement établi que l'acquisition de N-glycannes augmente la solubilité de la glycoprotéine et facilite, par conséquent, les interactions protéine-protéine dans la lumière du RER.

1. Les acteurs

Au sein du RER, il existe un contrôle de qualité spécifique des glycoprotéines. Il fait intervenir différentes protéines chaperons et enzymes qui s'impliquent dans une véritable machinerie visant à amener progressivement la glycoprotéine sous sa forme native.

1.1. Les protéines chaperons à activité lectinique

A côté des protéines chaperons qui interviennent dans la mise en conformation des protéines telles que la PDI ou la BiP, trois protéines ont été décrites spécifiques des N-glycoprotéines : la calnexine, la calréticuline et la protéine ERp57.

1.1.1. La calnexine

La calnexine est une protéine transmembranaire de type I résidente du RER. L'étude de sa séquence en acides aminés montre la présence d'une séquence RKPRRE en position C-terminale qui serait un signal de rétention de cette protéine dans le RER (Rajagolapan *et al.*, 1994). Elle a pour originalité de reconnaître spécifiquement les N-glycoprotéines dont le glycanne possède un seul résidu de Glc en position terminale non réductrice $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (Ou *et al.*, 1993). Cette reconnaissance qui a été démontrée calcium-dépendante lui a valu la dénomination de protéine chaperon à activité lectinique. En effet, lorsqu'on inhibe la maturation des glycanes à l'aide de la castanospermine, l'interaction calnexine-glycoprotéine n'est plus observée (Hammond *et al.*, 1994).

1.1.2. La calréticuline

Elle représente un analogue de la calnexine retrouvée sous une forme soluble dans la lumière du RER. Elle en possède les mêmes propriétés lectiniques. Elle contient une séquence KDEL qui correspond au signal de rétention par recyclage des protéines solubles du RER. Cette forme soluble pourrait faciliter les interactions avec les néoglycoprotéines éloignées de la membrane du RER et se trouvant donc dans l'impossibilité d'interagir avec la calnexine.

1.1.3. Spécificité de reconnaissance de la calnexine et de la calréticuline

Ces deux lectines interagissent avec un large éventail de glycoprotéines telles que les chaînes lourdes du CMH I, l'hémagglutinine du virus de l'influenza ou encore avec la ribonucléase B. De toute évidence, la nature des glycoprotéines (membranaires ou solubles) n'est pas un critère de sélection au niveau de l'association lectine-substrat, par contre la nature de l'espèce oligosaccharidique semble avoir davantage d'importance.

En effet, des études *in vitro* ont permis d'analyser l'affinité de la calnexine et de la calréticuline vis-à-vis de différentes espèces d'oligomannosides monoglucosylés obtenues après divers traitements enzymatiques. Spiro *et al.* (1996) ont montré que le résidu de Glc terminal était effectivement indispensable à la fixation de la calréticuline. D'autre part, il semble que les résidus de Man externes liés en $\alpha 1,2$ situés sur la branche en $\alpha 1,6$ ne soient pas directement impliqués dans l'association (Ware *et al.*, 1995). En effet, la plus petite espèce retrouvée associée à la lectine est le $\text{Glc}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$. Par contre, aucune affinité n'est observée lorsque le Man lié en $\alpha 1,6$ est retiré. Les auteurs suggèrent que le Man lié en $\alpha 1,6$ est directement

impliqué dans le site de reconnaissance de la lectine (figure 15). Des résultats similaires ont été récemment observés avec la calnexine (Vassilakos *et al.*, 1998).

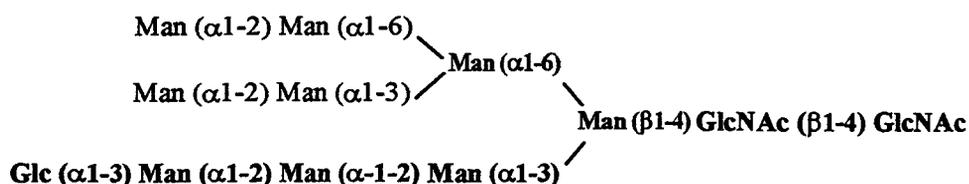


Figure 15 : Spécificité de reconnaissance de la calnexine et de la calréticuline d'après Ware *et al.* (1995) (la structure représentée en gras est la structure glycanne indispensable à la spécificité d'interaction)

1.1.4. Interactions de type protéine-protéine

Ware *et al.* (1995) ont montré que l'association calnexine avec l' α -1 antitrypsine est maintenue après traitement à l'endoglycosidase H suggérant ainsi des interactions de type protéine-protéine indépendantes des N-glycannes. De cette façon, l'association lectine-glycoprotéine s'effectuerait en deux étapes :

- une étape initiale de reconnaissance des oligomannosides monoglucosylés.
- l'interaction serait ensuite stabilisée par l'intermédiaire de déterminants peptidiques situés à proximité des N-glycannes.

Cependant, la mise en évidence de l'interaction protéine-protéine est sujet à controverse. En effet, seules les glycoprotéines membranaires ont présenté de telles interactions. Helenius *et al.* (1997) suggèrent que l'interaction lectine-glycoprotéine maintenue après déglycosylation pourrait être artificielle et correspondrait tout simplement à un problème d'insolubilité du complexe.

1.2. La protéine ERp57

Encore appelée ER60 ou GRP58, ERp57 est une protéine soluble d'environ 60 kDa résidente du RER. L'étude de sa séquence en acides aminés a permis de mettre en évidence une homologie de séquence avec la PDI (Freedman *et al.*, 1994) d'où son appellation « PDI-like » mais contrairement à celle-ci, elle semble spécifique des N-glycoprotéines (Oliver *et al.*, 1997). Une activité d'oxydo-réductase lui a été clairement attribuée (Hirano *et al.*, 1995). Otsu *et al.* (1995) lui suggèrent également une activité protéolytique. Sa spécificité réside sur le fait qu'elle soit généralement retrouvée en association avec la calnexine ou la calréticuline.

1.3. Les enzymes

1.3.1. L'UDP-glucose : glycoprotéine glucosyltransférase (UDPG)

a. Description

C'est une glycoprotéine (150 kDa) résidente du RER. C'est l'unique glycosyltransférase présente dans la lumière du *reticulum* endoplasmique sous une forme soluble. Sa principale fonction consiste à ajouter un résidu de glucose sur les glycoprotéines immatures possédant des glycannes de type oligomannosidique.

b. Spécificité de la glucosyltransférase

Des études *in vitro* ont permis de déterminer la spécificité de reconnaissance de l'UDPG. Sousa *et al.* (1992) ont montré qu'elle reglucosyle plus efficacement les espèces oligomannosidiques $\text{Man}_{(8,9)}\text{GlcNAc}_2$ que l'espèce $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$. La spécificité de l'enzyme semble donc plus étroite que celle observée pour les lectines, calnexine et calréticuline.

1.3.2. La glucosidase II

a. Description

C'est une α 1,3 glucosidase (104 kDa) qui est retrouvée sous forme soluble dans la lumière du RER. Elle est composée de deux sous-unités, α qui contient le site actif et la sous-unité β qui contient les séquences de rétention du RER. Elle représente l'une des premières enzymes qui intervient dans la maturation de l'oligosaccharide transféré sur une protéine. Elle a pour fonction de retirer les deux résidus de Glc liés en α 1,3 et situés en position terminale non réductrice pour donner le $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$.

b. Spécificité de la glucosidase II

Grinna et Robbins (1980) ont montré que la glucosidase II présentait une spécificité très étroite pour le $\text{Glc}_{(1-2)}\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$. Il semble que les quatre résidus de Man liés sur la branche en α 1,6 soient directement impliqués dans l'interaction avec l'enzyme : l'absence d'un seul résidu de Man réduit son activité de 80 %. Ces résultats sont confirmés par le fait que l'oligosaccharide soluble $\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ se présente comme un très bon inhibiteur de l'enzyme.

2. Le cycle de déglucosylation-reglucosylation

2.1 Description

Le modèle de déglucosylation-reglucosylation proposé par Hammond et Helenius (1993) fait à présent l'unanimité. La figure 16 en donne les principales étapes.

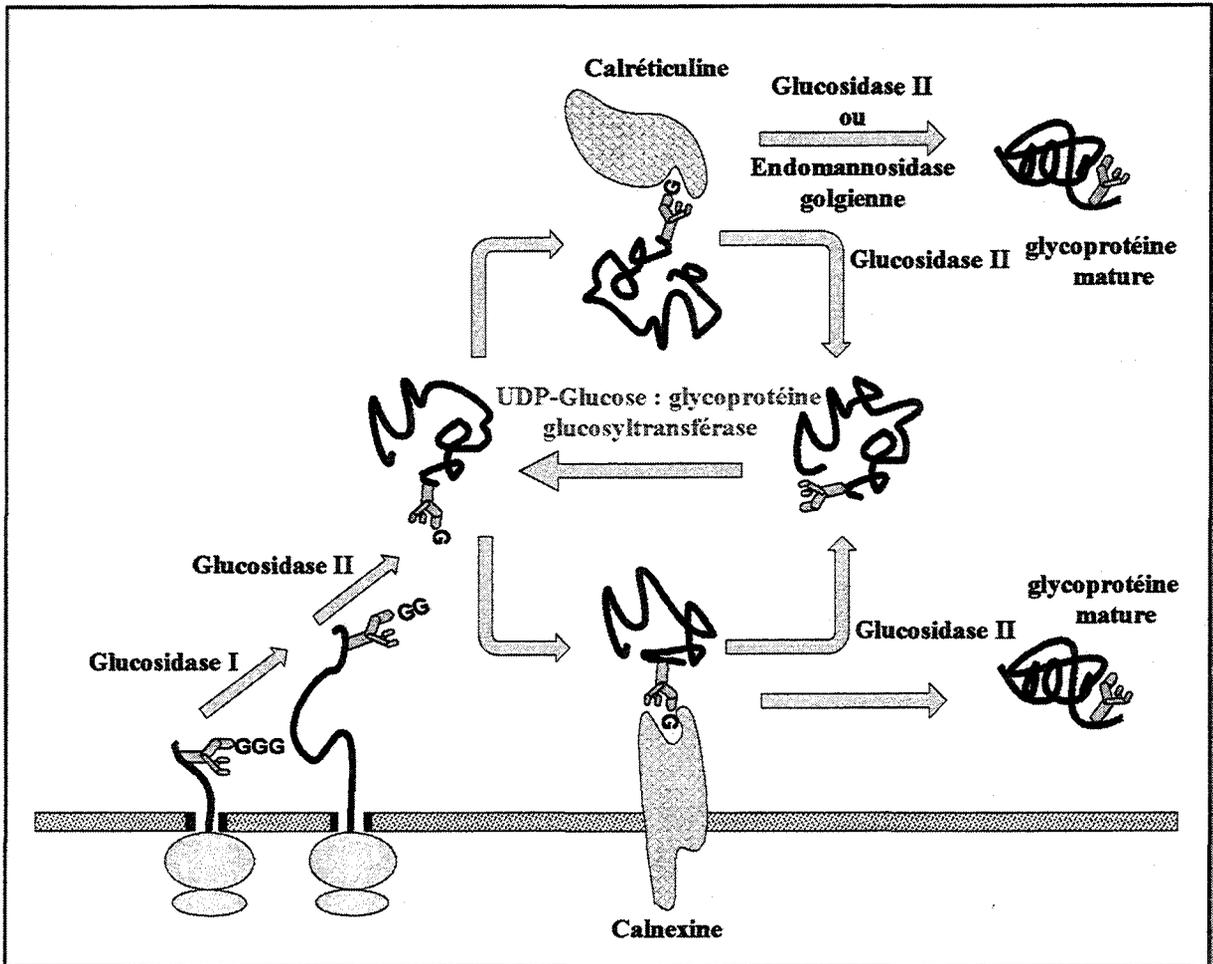


Figure 16 : Cycle de déglucosylation-reglucosylation (d'après Hammond et Helenius (1995) et modifié d'après Spiro *et al.*, 1996)

Ainsi, après l'action de la glucosidase I et l'action partielle de la glucosidase II, la glycoprotéine immature monoglucosylée est reconnue spécifiquement par la calnexine ou la calréticuline. L'association de la lectine à son substrat facilite le repliement des chaînes peptidiques. Ce changement de conformation induit la dissociation des complexes lectine-glycoprotéine qui donne ainsi la possibilité à la glucosidase II de retirer le dernier résidu de Glc. A ce niveau, deux voies peuvent être empruntées selon l'état conformationnel de la N-glycoprotéine :

- la glycoprotéine ne possède pas encore sa conformation finale, la glucosyltransférase reglucosyle la glycoprotéine qui peut alors s'engager, à nouveau, dans le cycle jusqu'à l'obtention de sa forme native.

- par contre, une fois correctement conformée, la glycoprotéine devient inaccessible à la glucosyltransférase et peut alors s'engager vers sa destinée finale.

Il est intéressant de noter que la déglucosylation des glycoprotéines associées à la calréticuline pourrait également s'effectuer à l'aide de l'endomannosidase golgienne qui retire le disaccharide Glc α 1,3Man. En effet, Spiro *et al.* (1996) ont montré que la calréticuline se retrouve copurifiée avec l'endomannosidase golgienne. Il est donc possible d'envisager cette deuxième voie de déglucosylation lorsque les complexes calréticuline-glycoprotéine seraient déjà engagés dans la voie de sécrétion. Cette déglucosylation pourrait avoir lieu dans le compartiment intermédiaire ERGIC (endoplasmic *reticulum*-Golgi intermediate compartment) ou dans le compartiment *cis*-golgien.

2.2. La glucosyltransférase : élément-clé de la navette déglucosylation-reglucosylation

Trombetta et Parodi (1992) ont montré que l'UDP-glucose : glycoprotéine glucosyltransférase distinguait les glycoprotéines natives des glycoprotéines immatures. Elle posséderait ainsi une double propriété de reconnaissance impliquant à la fois, la reconnaissance d'un environnement hydrophobe (plutôt qu'une séquence peptidique) proche d'une liaison N-glycosidique et le glycanne par l'intermédiaire du résidu de GlcNAc lié au point d'attache de la glycoprotéine. Ces observations ont été confirmées, *in vitro*, par Sousa et Parodi (1995) qui ont montré que la glucosyltransférase ne reglucosyle que les glycoprotéines dénaturées. De cette façon, la glycoprotéine native déglucosylée par la glucosidase II échappe à la glucosyltransférase.

Par contre, il semble que la calnexine et la calréticuline se fixent aux glycoprotéines indépendamment de leur état conformationnel. En effet, Rodan *et al.* (1996) ont montré que les deux lectines se fixent indifféremment à la RNase (de pancréas bovin) native ou dénaturée lorsqu'elle est exprimée dans des microsomes. Ainsi, contrairement aux protéines chaperons traditionnelles, elles ne sélectionnent pas leurs substrats sur la base de leur état de conformation mais uniquement sur la présence d'oligomannosides monoglucosylés.

2.3 Le rôle potentiel de ERp57 dans le repliement des chaînes peptidiques au cours du cycle de déglucosylation-reglucosylation.

Jusqu'à présent, bien que l'on ait démontré que la calnexine et la calréticuline s'associent avec les glycoprotéines immatures, leur implication directe dans le repliement des glycoprotéines n'a jamais été clairement définie. Comme nous l'avons précédemment décrit, les deux lectines pourraient également agir par interaction de type protéine-protéine. Cependant, aucune étude n'a permis d'attribuer une activité propre de chaperon à l'une ou l'autre de ces deux lectines.

Les récentes études d'Elliott *et al.* (1997) et de Zapun *et al.* (1998) ont permis de mettre en évidence la présence d'une oxydo-réductase, ERp57, qui se retrouve uniquement coprécipitée en présence de l'une ou l'autre des deux lectines calnexine et calréticuline. Ces résultats ont été confirmés par le fait que l'interaction de la protéine ERp57 avec les glycoprotéines nouvellement synthétisées est inhibée en présence de castanospermine (Van der Wal *et al.*, 1998). Ces observations permettent d'envisager la possibilité que cette protéine représenterait l'élément actif du changement de conformation induit durant les étapes d'association transitoire lectine-glycoprotéine en favorisant la formation des ponts disulfures. Le fait que sa présence soit conditionnée par celle de la calnexine ou de la calréticuline suggère qu'elle possède un domaine de reconnaissance spécifique de ces deux lectines. La figure 17 illustre le mode d'action de la protéine ERp57 durant le processus de déglucosylation-reglucosylation.

Conclusion

Longtemps, on s'est interrogé sur la signification du transfert en bloc d'un tétradéca-saccharide ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) sur une protéine en voie de synthèse puisqu'il était, par la suite, en grande partie modifié pour donner une très grande diversité de structures complexes. Les nombreuses études de ces dernières années ont montré que ces oligomannosides semblent avoir un rôle important dans le contrôle de qualité des glycoprotéines nouvellement synthétisées : les espèces oligomannosidiques monoglucosylées sont spécifiquement reconnues par les protéines chaperons lectiniques dans le but de favoriser l'étape essentielle de mise en conformation. Ainsi, la mise en place d'un tel mécanisme semble montrer que les oligomannosides monoglucosylés représentent de véritables acteurs de la mise en conformation des glycoprotéines.

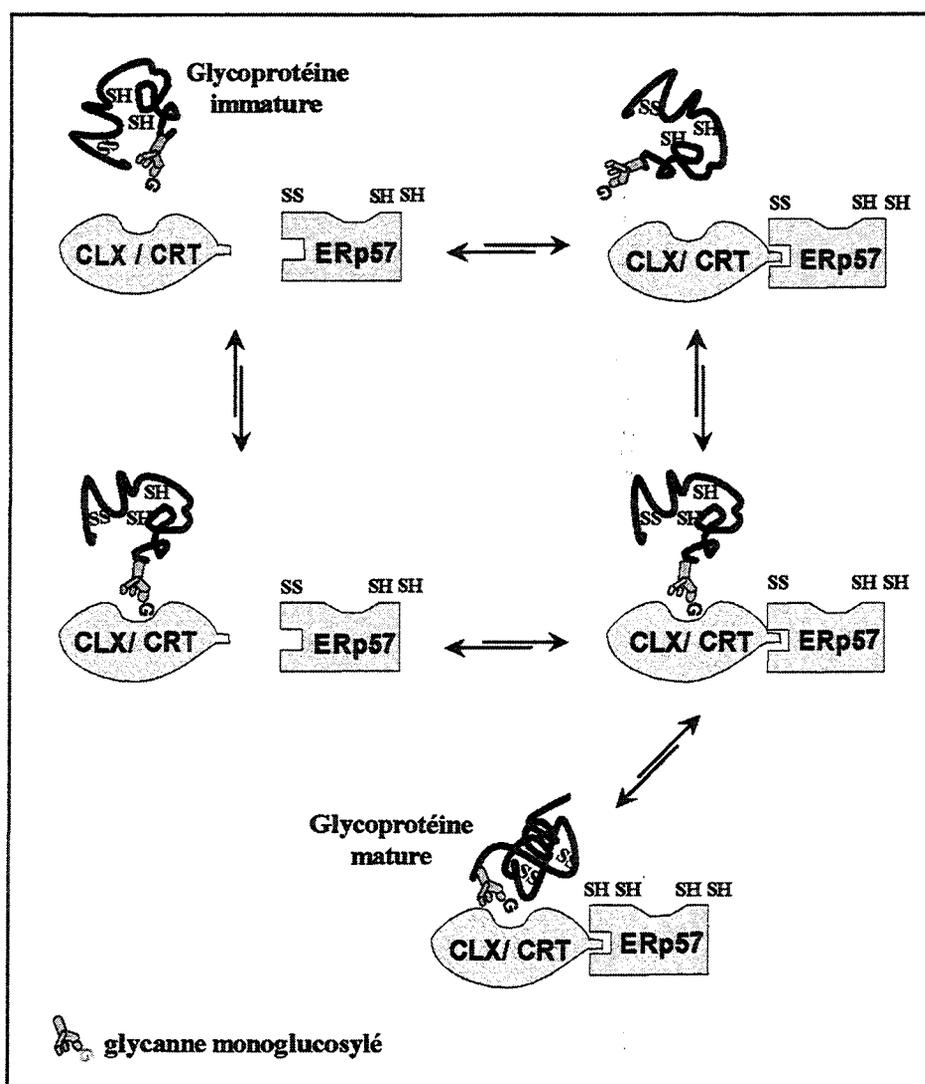


Figure 17 : Rôle potentiel de ERp57 dans le repliement des N-glycosylprotéines au cours du cycle de déglucosylation-reglycosylation (d'après Zapun *et al.*, 1998).
G : Glc ; CLX : Calnexine ; CRT : Calréticuline.

L'efficacité du contrôle de qualité autorise les glycoprotéines natives à quitter le compartiment de synthèse pour s'engager dans la voie de sécrétion au cours de laquelle elles pourront rejoindre le compartiment subcellulaire ou extracellulaire qui leur est affecté pour assurer leur rôle biologique.

Chapitre III : Destinées des N-glycosylprotéines nouvellement synthétisées

D'une manière générale, la destinée d'une glycoprotéine nouvellement synthétisée dépend de la présence des informations portées, soit par la partie protéique, soit par la partie glycanique. Le long de la voie de sécrétion, ces informations lui permettent de rejoindre le compartiment subcellulaire dans lequel elle assurera son rôle biologique. Pour illustration, on peut citer l'exemple des hydrolases qui sont spécifiquement adressées vers le lysosome grâce au motif Man-6-P qui leur est propre. Les glycoprotéines ainsi étiquetées sont reconnues par des récepteurs spécifiques du Man-6-P qui sont situés sur le trajet de la voie de sécrétion et qui permettent le tri des glycoprotéines à destinée lysosomique. De cette manière, une glycoprotéine qui ne possède aucun signal intrinsèque sera sécrétée dans le milieu ou exportée à la surface de la membrane plasmique. D'une façon générale, on peut alors considérer la sécrétion comme une voie par défaut mais il faut cependant admettre que certaines protéines membranaires peuvent présenter un signal positif de sécrétion (pour revue Kaiser et Ferro-Novik, 1998). Les trois principales destinées des glycoprotéines nouvellement synthétisées sont représentées dans la figure 18.

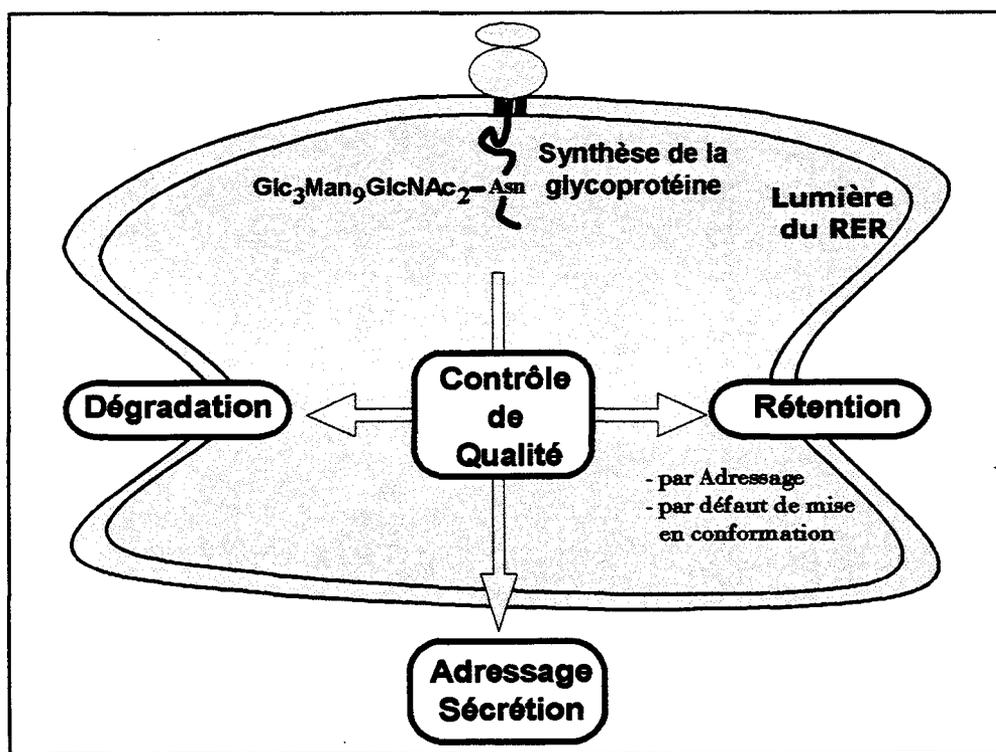


Figure 18 : Destinées des N-glycosylprotéines nouvellement synthétisées.

Dans ce chapitre, nous nous limiterons à l'étude de la destinée des glycoprotéines dont les glycannes demeurent de type oligomannosidique. Ceux-ci, qui témoignent d'une localisation réticulaire voire pré-golgienne, peuvent être retrouvés sur des glycoprotéines dont les destinées sont pourtant bien distinctes. Parmi celles-ci, on distingue :

- les **glycoprotéines résidentes** du RER : le compartiment réticulaire représente leur compartiment d'adressage.
- les **glycoprotéines immatures** qui sont maintenues dans le RER.
- les **glycoprotéines mal conformées** qui seront dégradées.

Nous allons aborder successivement l'étude des mécanismes impliqués dans la caractérisation de ces trois destinées.

I. La rétention des glycoprotéines dans le RER

A. La voie de sécrétion

La plupart des glycoprotéines nouvellement synthétisées vont rejoindre leur compartiment cible en empruntant la voie de sécrétion. Ainsi, elles s'engagent dans l'appareil de Golgi qui dispose, non seulement d'une panoplie considérable de glycosyltransférases permettant la maturation des glycannes mais également de tous les facteurs impliqués dans l'adressage des glycoprotéines vers leur compartiment cible. La disposition ordonnée en saccules distincts, *cis-median-* et *trans-*golgiens témoigne de la rigueur de la séquence des événements.

Le transport inter-compartiment est de type vésiculaire : des vésicules de sécrétion bourgeonnent à la surface de la membrane du compartiment d'origine et sont acheminées jusqu'au compartiment suivant (pour revues voir Rothman, 1994 ; Kaiser et Ferro-Novick, 1998). On parle de **transport antérograde** puisqu'il est effectué dans le sens de la voie de sécrétion.

Cependant, les pertes membranaires qui en découlent nécessitent un renouvellement permanent de la membrane. Pour remédier à ce problème, la cellule a mis en place un transport inverse à la voie de sécrétion. On parle alors de la **voie rétrograde de transport** qui fait intervenir la formation d'un réseau tubulovésiculaire entre chaque compartiment de la voie de sécrétion (Lewis et Pelham, 1996).

B. Rétention par adressage

On détermine deux types de signaux qui témoignent d'une localisation par compartimentation :

- un signal qui assure une **rétention par recyclage**. Ce recyclage, a lieu uniquement si la protéine a quitté le compartiment dans lequel elle est supposée rester. Le transport rétrograde est impliqué dans le recyclage de la protéine vers son compartiment d'origine.

Un tel type de rétention est, à présent, clairement établi au sein du RER.

- un signal impliqué dans une **rétention stricte** de la protéine. Ce signal assurerait véritablement la rétention de la protéine dans son compartiment cible. Les mouvements rétrogrades ne semblent pas impliqués dans ce type de rétention.

Pour discriminer les deux types de rétention, on a bien souvent recours à l'utilisation de facteurs physiques ou chimiques, susceptibles de perturber le trafic intracellulaire.

1. Les facteurs susceptibles de perturber le trafic RER - Golgi

1.1. La température

Dans les cellules de mammifères, il est possible de bloquer sélectivement le trafic entre le RER et l'appareil de Golgi. En effet, le transport vésiculaire entre les deux compartiments se déroule à des températures supérieures à 16°C. Ainsi, en se plaçant à 15°C, les protéines s'accumulent alors dans des structures pré-golgiennes.

1.2. La bréfeldine A

La Bréfeldine A (BFA) est une lactone hétérocyclique isolée de *Penicillium brefeldianum*. Elle a pour effet de perturber le trafic intracellulaire de manière réversible. Très rapidement, la BFA provoque à 37°C, la dissociation et le gonflement des saccules golgiens suivis d'une fragmentation progressive du compartiment. On assiste alors à une redistribution du compartiment qui se traduit par un transport rétrograde des constituants du Golgi (excepté du *trans*-Golgi) vers le RER (Lippincott-Schwartz *et al.*, 1990). On obtient :

- d'une part, « le compartiment BFA » qui contient à la fois les constituants du RER, du *cis*-Golgi et du *median*-Golgi. On y retrouve notamment les diverses glycosyltransférases golgiennes impliquées dans la maturation des N-glycannes.

- d'autre part, le compartiment *trans*-golgien isolé.

1.3. Le nocodazole

Le nocodazole a pour principal effet de détruire les microtubules impliqués dans le transport rétrograde du compartiment golgien vers le RER. On observe une désintégration de l'appareil de Golgi empêchant tout trafic entre le Golgi, le compartiment intermédiaire et le RER (Cole *et al.*, 1996).

La figure 19 représente l'effet de la BFA et le point d'impact du nocodazole sur le trafic intracellulaire.

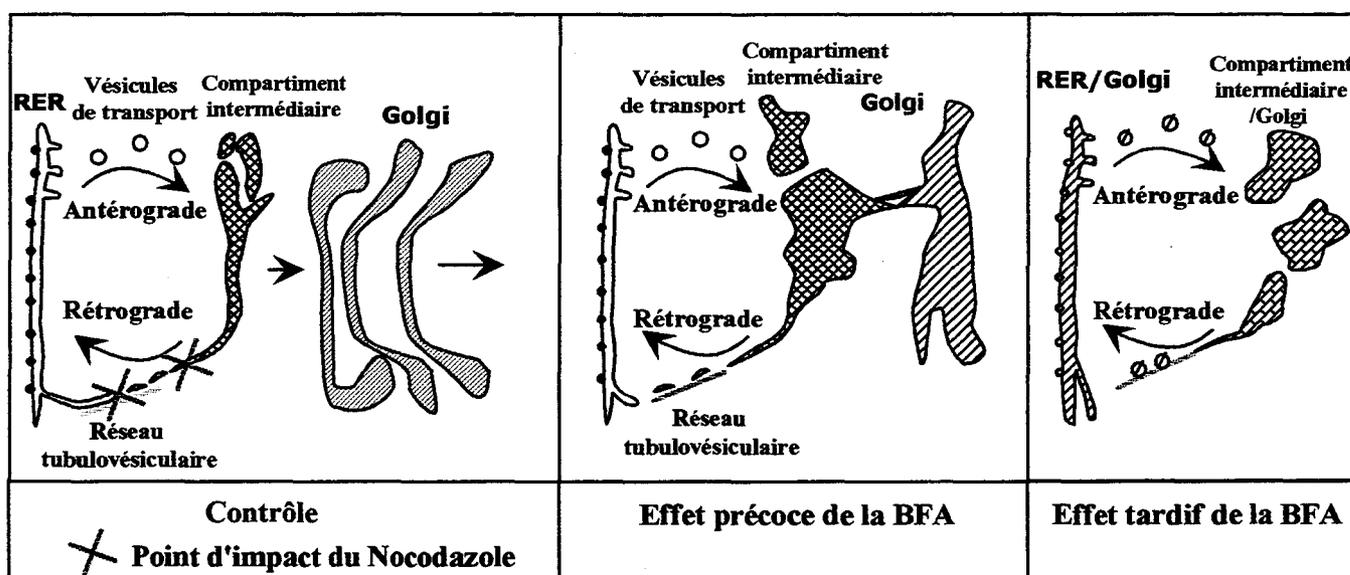


Figure 19 : Action de la BFA (d'après Lippincott-Schwartz *et al.*, 1990) et point d'impact du nocodazole sur le trafic intracellulaire.

2. Rétention par recyclage

Pour les glycoprotéines, la nature des glycannes représente un facteur supplémentaire pour distinguer une rétention par recyclage d'une rétention réticulaire stricte. En effet, les diverses glycosidases et glycosyltransférases golgiennes diversifient la nature des glycannes tout au long de la voie de sécrétion. De ce fait, la maturation progressive des glycannes représente un excellent témoin du degré d'avancement de la glycoprotéine dans la voie de sécrétion.

De cette façon, différents motifs peptidiques ont été déterminés responsables d'une rétention réticulaire par recyclage.

2.1. Le motif KDEL des protéines solubles

Une séquence de quatre acides aminés KDEL ou HDEL en position C-terminale des protéines solubles suffit pour maintenir spécifiquement les molécules dans le RER. Les protéines chaperons du RER telles que la BiP, la PDI ou la calréticuline présentent ce motif. Les protéines ainsi étiquetées seront spécifiquement retenues dans le RER et, si elles s'échappent, elles seront ramenées par la voie rétrograde de transport depuis un compartiment post-réticulaire (Pelham, 1991). Le mécanisme de tri s'effectue à l'aide d'un récepteur fixant la séquence KDEL ou HDEL qui a été identifié dans les cellules de mammifères (Tang *et al.*, 1993). La caractérisation biochimique de ce récepteur a montré qu'il fixe son ligand de manière pH-dépendante avec un optimum à pH 5 caractéristique du *cis*-Golgi (Wilson *et al.*, 1993). Auparavant, Pelham (1988) avait montré que le recyclage vers le RER s'effectuait bien à partir du réseau *cis*-golgien. L'étude avait consisté à ajouter une séquence KDEL à la cathepsine D, une glycoprotéine normalement adressée au compartiment lysosomique par le signal Man-6-P. La première étape de la synthèse du signal est réalisée par une enzyme caractéristique du réseau *cis*-golgien : la N-acétylglucosaminyl-1-phosphotransférase. Comme prévu, la cathepsine étiquetée par le motif KDEL n'atteint pas le lysosome mais elle est retenue dans le RER. Cependant, la modification de son glycanne par l'enzyme témoigne de son passage dans le *cis*-Golgi. La figure 20 décrit le mécanisme de rétention des protéines du RER par le motif KDEL sur le modèle de la protéine BiP (Kelly, 1990).

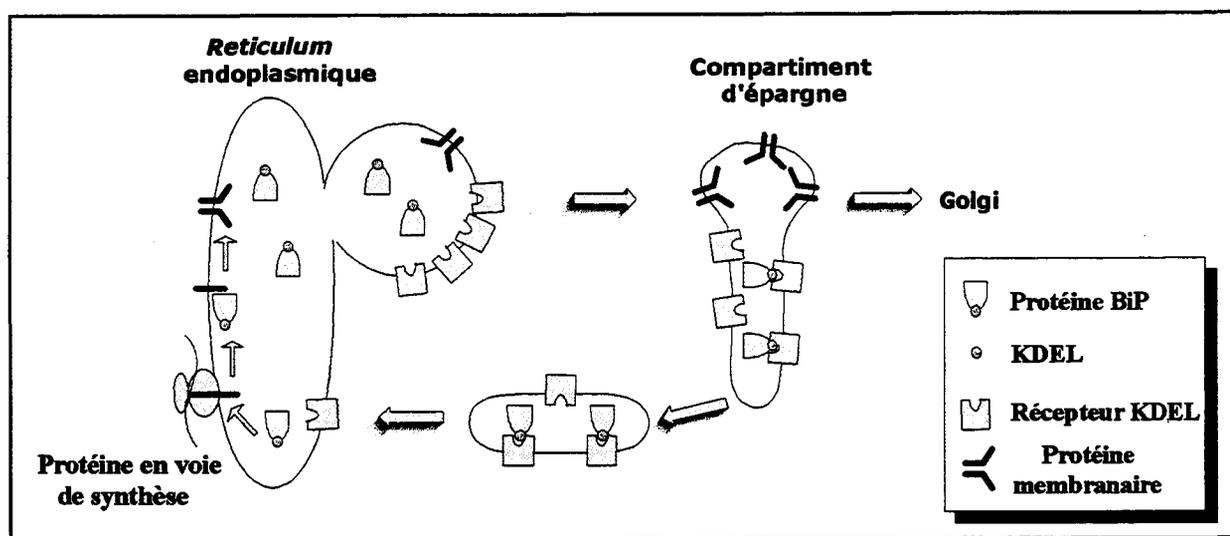


Figure 20 : Mécanisme de rétention par recyclage des protéines solubles dans le RER par le signal KDEL (d'après Kelly, 1990).

De nombreuses protéines transmembranaires résidentes du RER, présentent également un motif de rétention situé dans leur domaine cytoplasmique : les plus communément décrits sont les motifs double-lysine et double-arginine.

2.2. Le motif double-lysine

Pour les protéines transmembranaires de type I, le signal de rétention est représenté par un doublet de résidus de lysine (motif KK) situé dans les quatre à cinq derniers résidus de l'extrémité C-terminale. L'ajout d'un motif KK suffit pour retenir spécifiquement une glycoprotéine marqueur dans le RER. Cependant, la nature de ses glycannes témoigne qu'elle peut avoir transité jusqu'au réseau *cis*- voire *median*-golgien (Jackson *et al.*, 1993). Ces caractéristiques suggèrent donc que le motif KK est impliqué dans une rétention réticulaire par recyclage.

2.3. Le motif double-arginine

De la même façon, un motif de rétention a été mis en évidence pour les protéines transmembranaires de type II. C'est un doublet de résidus d'arginine (motif RR) situé dans les cinq premiers résidus d'acides aminés de l'extrémité N-terminale de la protéine qui serait responsable de la rétention dans le RER. Il présente les mêmes caractéristiques de rétention que le motif KK, cependant les structures des glycannes portés par les molécules suggèrent que celles-ci n'ont pas transité plus loin que le compartiment intermédiaire (ERGIC) (Schutze *et al.*, 1994).

Cependant, il n'a pas été clairement établi que le recyclage des protéines portant les motifs KK et RR soit dépendant d'un récepteur comme celui démontré pour le motif KDEL des protéines luminales. Le contexte dans lequel sont situés les motifs KK et RR semble représenter un déterminant important pour la destinée des protéines (Jackson *et al.*, 1990). Des études effectuées en présence de nocodazole ont cependant montré que le transport rétrograde semble bien impliqué dans le recyclage.

3. Rétention RER stricte

A ce jour, seuls Shenkman *et al.* (1997) ont clairement décrit l'existence d'une rétention stricte sur le modèle du récepteur des asialoglycoprotéines. Cette rétention serait liée à la présence d'un pentapeptide (EGHRG) retrouvé dans l'ectodomaine de la sous-unité H2a du récepteur.

Dans les conditions normales, la protéine transmembranaire H2a est clivée pour donner une forme sécrétée de la protéine, les molécules non clivées restent maintenues dans le RER. Ils ont observé que le pentapeptide, ajouté à la sous-unité H1 du récepteur permet de la maintenir dans le RER. Les glycannes restent sensibles à l'endoglucosaminidase H (endo H) et à l' α -mannosidase suggérant la présence d'oligomannosides. De plus, des expériences de co-immunolocalisation effectuées après un traitement au nocodazole, ont montré que la répartition de la glycoprotéine est exclusivement réticulaire et qu'elle ne fait intervenir, *à priori*, aucun recyclage.

Ce pentapeptide est situé à proximité de la séquence peptidique ancrée dans la membrane du RER. On ne connaît pas le rôle exact qu'il joue dans cette rétention stricte mais on peut suggérer que la nature des acides aminés qui le composent ait une importance particulière dans le phénomène.

Diverses études ont montré que la rétention spécifique de protéines au sein du RER impliquait la présence de leur domaine transmembranaire (Ahn *et al.*, 1993 ; Yang *et al.*, 1997). Cependant, la nature exacte de la rétention n'a pas été déterminée. Dans ces modèles, la longueur du domaine d'ancrage et la nature des acides aminés qui le composent semblent directement impliqués dans le mécanisme de rétention.

Certaines glycoprotéines sont maintenues dans la lumière du RER sans présenter pour autant de motif de rétention spécifique de ce compartiment. En fait, une telle rétention est à relier au caractère immature de la molécule. Nous verrons que la présence des glycannes est étroitement impliquée dans ce type de rétention qui peut être de deux natures : une rétention par agrégation dans la lumière du RER et une rétention par recyclage.

C. Rétention par défaut de mise en conformation

1. Rétention par agrégation des glycoprotéines immatures

D'une manière générale, le phénomène d'agrégation des protéines traduit un problème de solubilité. Pour exemple, l'utilisation de la tunicamycine en tant qu'inhibiteur de la N-glycosylation conduit bien souvent à l'accumulation des protéines non-glycosylées sous forme d'agrégats insolubles dans la lumière du RER (Olden *et al.*, 1982 ; pour revue Montreuil, 1984). Ainsi, l'absence de N-glycannes sur des protéines destinées à être glycosylées, peut se

traduire, dans les cas extrêmes, par une accumulation irréversible des molécules sur le lieu même de leur synthèse.

2. Rétention par recyclage des glycoprotéines immatures

Des expériences de chasse métabolique ont montré que certaines glycoprotéines peuvent être maintenues dans le RER durant 4 à 6 heures. C'est le cas de la protéine G du virus de la stomatite vésiculaire (VSV) qui est retenue dans le RER associée à la BiP et la calnexine (Hammond et Helenius, 1994). Cependant, des complexes protéine G - BiP sont également retrouvés dans l'ERGIC et le *cis*-Golgi évoquant une rétention par recyclage. Ainsi, la BiP qui présente le motif KDEL participerait activement au recyclage des glycoprotéines immatures.

Ermonval *et al.* (1997) ont observé des résultats similaires sur le modèle de la phosphatase alcaline placentaire humaine exprimée sous une forme sécrétée (SeAP) lorsqu'elle est exprimée dans des cellules mutantes de glycosylation. Dans ce modèle, l'étape de mise en conformation semble compromise par la présence de N-glycannes tronqués ($\text{Glc}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ au lieu de $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$). En effet, de tels glycannes seraient susceptibles de perturber l'efficacité du cycle de déglucosylation-reglucosylation impliqué dans le contrôle de qualité des glycoprotéines.

De cette façon, une interaction prolongée avec les molécules chaperons pose le problème de la rétention qui, à plus ou moins long terme, semble conduire à un processus de dégradation.

II. La dégradation des N-glycosylprotéines nouvellement synthétisées

On sait depuis longtemps, que le contrôle de qualité peut aboutir à la dégradation des protéines mal conformées. De nombreux travaux ont porté sur la localisation du phénomène et sur les protéases susceptibles d'y être impliquées. Après avoir rappelé les différents compartiments subcellulaires connus pour être impliqués dans la dégradation des protéines et des glycoprotéines intracellulaires, nous étudierons plus précisément les mécanismes pressentis pour la dégradation des glycoprotéines mal conformées.

A. La dégradation des protéines et des glycoprotéines intracellulaires.

Au sein de la cellule, on distingue deux principales voies de dégradation des molécules intracellulaires : la voie lysosomique *via* l'autophagie et la voie cytosolique impliquant le protéasome. Chacune d'entre elles présente des caractéristiques qui leur sont propres et susceptibles d'être mises en évidence à l'aide d'inhibiteurs spécifiques.

1. La dégradation lysosomique et l'autophagie

1.1. Les lysosomes

Les lysosomes sont des vésicules digestives retrouvées dans la plupart des cellules animales. Ils contiennent une panoplie d'enzymes capables de dégrader du matériel exogène comme les bactéries ingérées, de même que les molécules propres à la cellule, les protéines et les acides nucléiques. La caractéristique essentielle de ce compartiment est son pH acide (pH 4,5 à 5,5 selon les types cellulaires) nécessaire à l'action des diverses hydrolases qu'il renferme.

1.2. Les inhibiteurs de la dégradation lysosomique

De par son acidité, l'activité d'un tel compartiment peut être inhibée sous l'effet de bases faibles telles que la chloroquine ou le chlorure d'ammonium. Celles-ci augmentent le pH intraluminal entraînant une inhibition des hydrolases acides impliquées dans la dégradation des macromolécules. Il est également possible d'utiliser certains inhibiteurs protéasiques tel que la leupeptine qui inhibe spécifiquement les cathepsines B présentes dans les lysosomes.

D'une façon générale, la dégradation des protéines intracellulaires s'effectue par une voie étroitement liée à la dégradation lysosomique : il s'agit de la voie autophagique.

1.3. La voie autophagique

1.3.1. La formation des vacuoles autophagiques

L'autophagie se traduit par la formation progressive d'une vacuole intracellulaire en véritable organe de digestion. La formation des vacuoles digestives s'effectue en 2 étapes :

- elle commence par la séquestration d'une région cytoplasmique par invagination des membranes d'un compartiment qui pourrait être le RER (pour revue Dunn, 1994). Il se forme alors un autophagosome.

- l'autophagosome évolue ensuite en vacuole digestive en fusionnant avec des organites préexistants qui semblent correspondre aux endosomes tardifs. La vacuole ainsi formée, fusionne finalement avec les lysosomes. Ainsi, la vacuole s'acidifie progressivement par l'acquisition d'hydrolases.

1.3.2. Les inhibiteurs de l'autophagie

Il est possible de perturber spécifiquement les différentes étapes de la formation de la vacuole digestive. La 3-méthyladénine permet d'inhiber l'étape de séquestration (Seglen et Gordon, 1982), le mécanisme impliqué reste, cependant, à déterminer. D'autre part, la fusion de la vacuole avec les lysosomes peut être inhibée à l'aide d'une forte concentration d'asparagine (Hoyvik *et al.*, 1991). Dans ce cas, on observe une accumulation des molécules destinées à être dégradées dans les endosomes tardifs.

La deuxième voie de dégradation des protéines intracellulaires s'effectue dans le compartiment cytosolique où elle fait intervenir un complexe multiprotéasique bien particulier : le protéasome.

2. La dégradation associée au protéasome

2.1. Le protéasome

C'est en 1988 que le terme de « protéasome » fut proposé pour définir un complexe multiprotéasique largement représenté dans la cellule (=1% des protéines cellulaires). Depuis, de nombreuses études ont montré que le protéasome présente un rôle majeur dans la dégradation cytosolique des protéines cellulaires. Dans les cellules eucaryotes, il n'est retrouvé que dans le cytosol et dans le noyau.

La masse moléculaire du protéasome est d'environ 2000 kDa ce qui témoigne de sa complexité structurale. En effet, le protéasome dont le coefficient de sédimentation est de 26S est composé de deux complexes distincts : la particule 20S et la particule « cap » 19S.

2.1.1. La particule 20S

La particule 20S représente la partie centrale du protéasome : c'est elle qui en détient l'activité protéolytique. Dans le modèle simplifié d'*Archebacterium thermoplasma*, elle se présente sous une forme cylindrique composée de quatre anneaux superposés les uns aux autres. On distingue les anneaux de type α et de type β selon qu'ils soient constitués de polypeptides α ou β . Ainsi, chaque anneau contient sept polypeptides α ou β , la masse moléculaire de chaque

polypeptide étant de 25-30 kDa. Ces anneaux sont associés dans l'ordre $\alpha\beta\beta\alpha$ pour former la particule cylindrique 20S. Dans les cellules eucaryotes, il existe 14 à 17 polypeptides différents mais la structure de la particule a été montrée identique à celle du modèle d'*Archebacterium thermoplasma*. Des études de cristallographie (Löwe *et al.*, 1995) effectuées sur le modèle d'*Archebacterium thermoplasma*, ont déterminé la structure de la cavité interne de la particule 20S. En effet, ils ont montré que la cavité était plus étroite au niveau des anneaux α que celle des anneaux internes β . Cette structuration particulière pourrait avoir un rôle dans le mécanisme d'accessibilité des protéines destinées à la dégradation : seuls les polypeptides immatures ou dénaturés auraient accès à la cavité interne du protéasome. D'autre part, il a été clairement défini que ce sont les polypeptides β qui sont responsables de l'activité protéolytique, tandis que les polypeptides α auraient plutôt un rôle dans la reconnaissance des protéines polyubiquitinées destinées à être dégradées.

2.1.2. La particule « cap » 19S

La particule « cap » 19S est constituée d'environ 18 protéines dont la masse moléculaire varie de 35 à 110 kDa. Des études *in vitro* ont montré que ce complexe peut se fixer, de façon ATP-dépendante, aux deux extrémités de la particule 20S pour former le complexe 26S. Le rôle précis de chacune des protéines reste encore à déterminer mais des activités ATPases ont été mises en évidence pour certaines d'entre elles. Dubiel *et al.* (1992) suggèrent que ces ATPases pourraient catalyser la dénaturation des protéines destinées à la dégradation afin d'en faciliter l'accès dans la cavité cylindrique de la particule 20S.

La figure 21 est une illustration de l'assemblage des différents complexes qui participent à la formation du protéasome 26S.

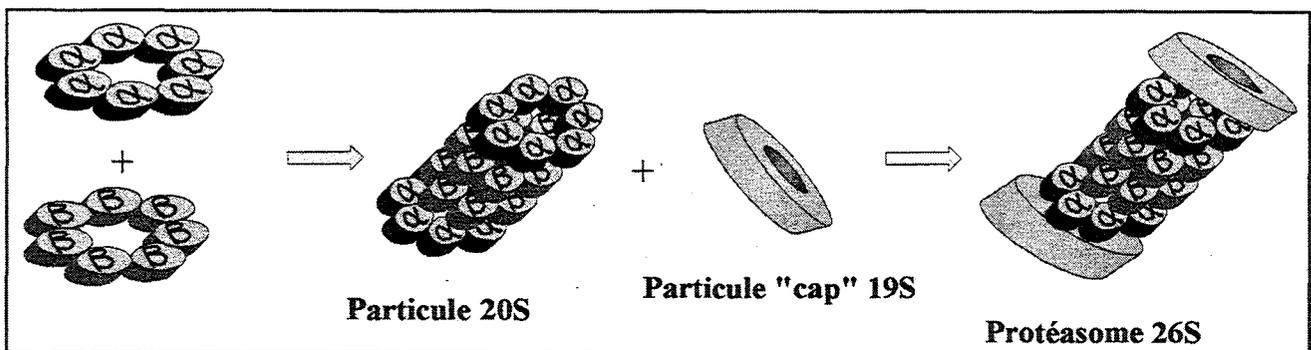


Figure 21 : Assemblage du protéasome 26S (sur le modèle d'*Archebacterium thermoplasma*).

2.2. Les inhibiteurs du protéasome

Dans les cellules eucaryotes, diverses activités protéolytiques sont retrouvées au sein du protéasome : parmi celles-ci, des activités « trypsine-like », « chymotrypsine-like » et une activité peptide peptidyl glutamyl hydrolase ont été largement démontrées.

Il est possible d'inhiber spécifiquement certaines de ces activités à l'aide de deux inhibiteurs qui sont, à présent, couramment utilisés : le N-acétyl-leucyl-leucyl-norleucinal (ALLN) et la lactacystine.

2.2.1. L'ALLN

L'ALLN et ses nombreux analogues représentent des inhibiteurs spécifiques des protéases à cystéine. Cependant, son activité n'est pas spécifique du protéasome puisqu'il inhibe, non seulement les calpaïnes du protéasome mais également la cathepsine B lysosomique (Rock *et al.*, 1994 ; Tsubuki *et al.*, 1996)).

2.2.2. La lactacystine

En 1995, Fenteany *et al.* ont montré qu'un métabolite bactérien, la lactacystine, présentait une inhibition spécifique des activités « trypsine-like » et « chymotrypsine-like » du protéasome. Son mode d'action est basé sur la fixation covalente de la lactacystine au niveau d'un résidu de Thr situé dans la partie N-terminale des sous-unités β de la particule 20S du protéasome. La fixation du métabolite inhibe irréversiblement l'activité protéolytique du protéasome.

Très tôt, la dégradation des glycoprotéines nouvellement synthétisées, qui nous intéresse, s'est révélée comme un processus très efficace : les glycoprotéines présentent des temps de demi-vie d'environ 1 heure après le début de la traduction. Trois processus de dégradation ont été décrits : la dégradation lysosomique, la dégradation associée au RER et la dégradation impliquant le protéasome. D'une façon générale, c'est l'étude de la sensibilité aux différents inhibiteurs spécifiques de chacune de ces voies de dégradation qui a permis d'étudier leur implication dans la dégradation des néoglycoprotéines.

B. La dégradation des glycoprotéines nouvellement synthétisées

1. Dégradation lysosomique

Trugnan *et al.* (1991) ont mis en évidence la dégradation de glycoprotéines nouvellement synthétisées dans les cellules cancéreuses de côlon humain HT-29. Cette dégradation s'est montrée dépendante de l'état de différenciation cellulaire : en effet, alors que les cellules différenciées présentent des glycoprotéines ayant subi la maturation golgienne de leurs glycannes, les cellules indifférenciées synthétisent des glycoprotéines dont les glycannes restent de type oligomannosidique ($\text{Man}_{9-8}\text{GlcNAc}_2$) et qui sont finalement dégradées. L'étude du mécanisme de dégradation suggère une dégradation lysosomique *via* l'autophagie puisqu'elle est sensible à la swainsonine, la 3-méthyladénine et à une forte concentration en asparagine (Houry *et al.*, 1995).

Cependant, si ce processus de dégradation concerne effectivement les glycoprotéines nouvellement synthétisées, il est à considérer comme spécifique et particulier aux cellules en voie de différenciation cellulaire et, d'une manière générale, aux cellules cancéreuses.

2. Dégradation associée au RER

Longtemps, on a pensé que la dégradation des protéines nouvellement synthétisées avait lieu sur le lieu même de leur synthèse à savoir dans le RER ou dans un compartiment proche, le compartiment pré-golgien. Un premier argument en faveur de ce type de dégradation repose sur le fait que les glycoprotéines destinées à la dégradation demeurent sensibles à l'endo H : la présence d'oligomannosides témoignant d'une localisation réticulaire ou pré-golgienne.

Les diverses études effectuées pour préciser la localisation exacte de cette dégradation ont fait l'objet de nombreuses controverses (Klausner et Sitia, 1990 ; Bonifacino et Lippincott, 1991). S'agissait-il d'une dégradation réticulaire ou pré-golgienne ?

2.1. Arguments en faveur d'une dégradation réticulaire

La description de la dégradation associée au compartiment réticulaire repose sur la persistance de ce phénomène dans des conditions où tout trafic intracellulaire est empêché, par exemple dans des cellules perméabilisées ou dans des fractions isolées de RER. La perméabilisation

sélective de la membrane plasmique permet de modifier le contenu du cytosol sans modifier outre mesure la composition des organites. Stafford et Bonifacino (1991) ont montré que la protéine de fusion Tac-TCR nouvellement synthétisée se dégradait dans des cellules perméabilisées à la streptolysine O et que l'apport énergétique n'était pas requis pour la dégradation. Ainsi, ces résultats suggéraient que le changement de compartimentation n'était pas nécessaire au processus de dégradation. Wikström et Lodish (1993) ont observé des résultats identiques sur le modèle des sous-unités H2b du récepteur des asialoglycoprotéines.

2.2. Arguments en faveur d'une dégradation pré-golgienne

A l'opposé, une dégradation non lysosomique mais qui nécessite le transport intracellulaire, a été décrite. Cette dégradation a été mise en évidence puisqu'il est possible de bloquer sélectivement le trafic entre le RER et l'appareil de Golgi : en se plaçant à 15°C, les glycoprotéines s'accumulent alors dans les vésicules pré-golgiennes. Une telle accumulation a été observée par Ciccarelli *et al.* (1993) sur le modèle d'une forme mutante de l' α 1-antitrypsine (α 1-AYZ) qui se dégrade dans les conditions normales d'incubation. Cette accumulation témoigne que la glycoprotéine a bien atteint le compartiment pré-golgien à partir duquel elle se dégrade. De ce fait, ces résultats suggèrent l'implication du trafic intracellulaire dans ce type de dégradation.

Par la suite, une solution permettant de relier les deux voies fut d'envisager que les glycoprotéines ayant quitté le RER pourraient y retourner au moyen du transport rétrograde entre le RER et l'appareil de Golgi. Dans ce cas, les glycoprotéines présentes dans le pré-Golgi pourraient rejoindre le RER où elles seraient dégradées.

Dans l'objectif de préciser davantage la localisation du phénomène, certains auteurs se sont intéressés à la nature des protéases éventuellement impliquées dans cette dégradation. Seuls, Otsu *et al.* (1995) ont montré l'implication d'une protéase à cystéine, ER60 (encore appelée ERp57) dans la dégradation des formes incorrectes du lysosyme. Cependant, le lysosyme est le seul substrat qui a été montré hydrolysé par ER60. A ce jour, c'est l'unique protéase qui a été mise en évidence dans le RER.

Ainsi, aucune étude n'a véritablement permis d'identifier le RER ou le compartiment pré-golgien comme site de dégradation.

Ces deux dernières années, un bon nombre de travaux ont révélé que, bien que la dégradation débute dans le RER, le phénomène nécessite ensuite la présence du cytosol. En effet, il semble

à présent clairement établi que le protéasome est impliqué dans la dégradation des glycoprotéines mal conformées.

3. Dégradation cytosolique impliquant le protéasome

A l'origine, ce sont les travaux de Wiertz *et al.* (1996a) qui ont suggéré l'existence de la dégradation cytosolique impliquant le protéasome. Depuis, de nombreuses études ont permis de comprendre plus précisément le mécanisme mis en jeu dans la dégradation cytosolique des néoglycoprotéines mal conformées.

3.1. Les caractéristiques générales

La dégradation des néoglycoprotéines par le protéasome est un processus très efficace. En effet, la majorité des modèles étudiés ont des temps de demi-vie de d'environ $\frac{3}{4}$ h -1 h après avoir quitté la machinerie de traduction. Le tableau 2, proposé ci-dessous, présente les temps de demi-vie de diverses glycoprotéines.

Glycoprotéines	Temps de demi-vie	Références
CMH I (système viral)	1-2 min	Wiertz et al., 1996a
CFTR	30 min	Ward et al., 1995
α 1-antitrypsine Z	1 h30-2 h	Qu et al., 1996
Apolipoprotéine B-100	45 min	Fisher et al., 1997
CMH I	30 min	Hughes et al., 1997
Ribophorine I 332	1 h	de Virgilio et al., 1998
Sous-unité α du TCR	50 min	Yu et al., 1997

Tableau 2 : Temps de demi-vie de divers modèles de glycoprotéines dégradées par la voie cytosolique.

D'une façon générale, le temps nécessaire pour qu'une glycoprotéine adopte une conformation biologiquement stable est d'environ 30-45 min après le début de sa traduction, le processus de dégradation se met ensuite rapidement en place en vue d'éliminer les glycoprotéines mal conformées. L'efficacité de ce processus est d'autant plus remarquable puisqu'il suppose une source d'énergie importante pour assurer, d'une part, le changement de compartimentation (du RER vers le cytosol) et d'autre part, la mise en place d'un certain nombre d'éléments qui favoriseront la reconnaissance de la glycoprotéine à dégrader, son exportation vers le cytosol et sa dégradation.

3.2. Les différentes étapes du processus général de la dégradation cytosolique

La figure 22 est une illustration des connaissances actuelles que nous avons sur le mécanisme général de la dégradation cytosolique des néoglycoprotéines mal conformées.

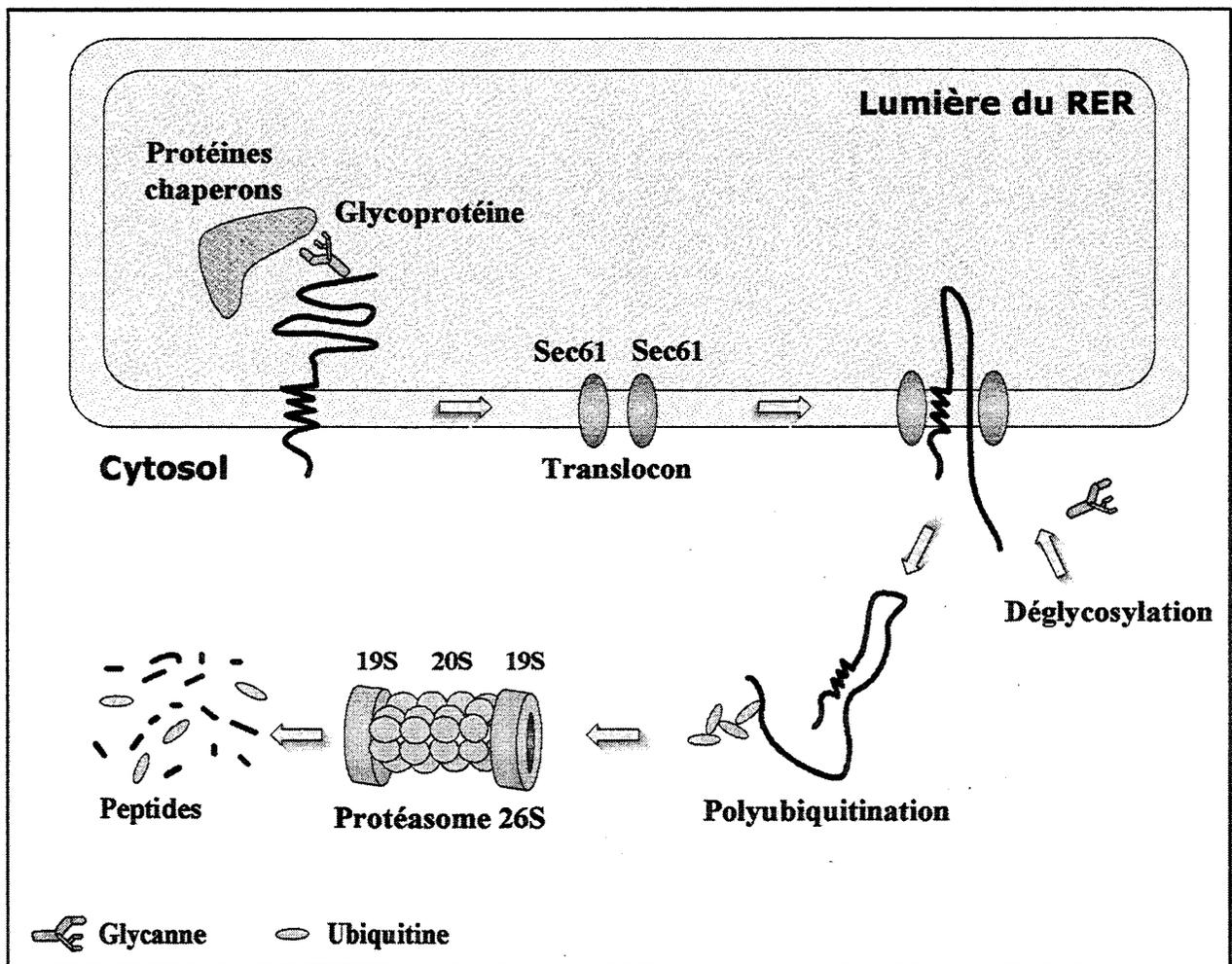


Figure 22 : Processus général de la dégradation cytosolique des glycoprotéines mal conformées (d'après Bonifacino, 1996).

Après ségrégation dans la membrane du RER et interactions prolongées avec les protéines chaperons, la glycoprotéine dont la conformation est incorrecte se réassocie avec les protéines du complexe Sec61 formant le translocon. La glycoprotéine est alors transportée vers le cytosol où elle est successivement déglycosylée, polyubiquitinée pour finalement être dégradée par le protéasome. La glycoprotéine est hydrolysée en peptides et l'ubiquitine peut être recyclée.

Ainsi, ce processus de dégradation requiert la mise en place d'un certain nombre d'éléments pour en assurer le bon déroulement, à savoir :

- le « rétro-transport » de la glycoprotéine vers le cytosol
- l'étape de déglycosylation
- l'étiquetage de la glycoprotéine par l'ubiquitine
- la protéolyse assurée par le protéasome

Si ce mécanisme est, à présent, admis par tous, de nombreuses interrogations subsistent encore concernant chacune de ces étapes. Nous allons successivement étudier et discuter ces différents points.

3.3. Le rétro-transport des glycoprotéines vers le cytosol

3.3.1. Implication du complexe Sec61

Comme nous l'avons précédemment mentionné dans le chapitre I, le complexe Sec61 représente un facteur important dans le processus de ségrégation dans la lumière du RER des protéines en voie de synthèse. Ce sont les travaux de Wiertz *et al.* (1996b) qui ont suggéré, pour la première fois, l'implication du complexe Sec61 dans la dégradation cytosolique des protéines mal conformées. En effet, ces auteurs ont montré que les molécules du CMH I nouvellement synthétisées dans des cellules infectées par le cytomégalovirus humain, se retrouvent transitoirement associées avec la protéine Sec61 β avant d'être dégradées dans le cytosol par le protéasome. Ainsi, le complexe Sec61 semble directement impliqué dans le transport des protéines mal conformées vers le cytosol. Récemment, Pillon *et al.* (1997) ont confirmé ces résultats en exprimant des mutants du complexe Sec61 chez la levure. Bien que la ségrégation des protéines soit elle-même affectée, ils ont clairement montré que l'expression de ces mutants inhibe fortement le rétro-transport des glycoprotéines destinées à la dégradation : celles-ci restent associées au complexe Sec61 et sont maintenues dans la lumière du RER.

3.3.2. Les mécanismes de réassociation des glycoprotéines au complexe Sec61

Si la participation du complexe Sec61 dans le transport des glycoprotéines mal conformées vers le cytosol est à présent, clairement établie (Wiertz *et al.*, 1996b ; Pillon *et al.*, 1997), le mécanisme de réassociation des glycoprotéines au complexe reste à déterminer. En effet, la dégradation cytosolique n'est pas limitée aux protéines transmembranaires, plusieurs modèles de glycoprotéines sécrétées sont également concernés par ce type de dégradation (Qu *et al.*, 1996 ; Hiller *et al.*, 1996). Il est donc vraisemblable que le mécanisme impliqué soit sensiblement différent selon que la glycoprotéine est ancrée dans la membrane ou ségrégée dans la lumière du RER.

3.3.2.1. Les protéines membranaires

Une question majeure se pose concernant les glycoprotéines transmembranaires qui vont s'engager dans la voie de dégradation : de quelle manière se réassocient-elles aux protéines du complexe Sec61 ? Nous allons décrire brièvement les deux possibilités qui semblent les plus probables.

a. Une association prolongée avec le complexe Sec61

La première possibilité consiste à admettre que la glycoprotéine ne s'est jamais dissociée du complexe Sec61. Dans ce cas, il est envisageable de penser que le processus de dégradation se met en place très rapidement après la fin de la traduction ou durant les premières étapes de repliement de la glycoprotéine. Ce mécanisme est intéressant puisqu'il ne requiert aucun facteur supplémentaire. Dans cette perspective, Wiertz *et al.* (1996b) ont proposé un modèle de dégradation dans lequel les molécules du CMH I, exprimées dans des cellules infectées par le cytomegalovirus humain, restent associées au translocon. Dans ce modèle, une protéine virale US2 serait directement impliquée, à la fois dans le maintien des glycoprotéines du CMH I au sein de la machinerie de translocation et dans leur transport dans le compartiment cytosolique. Ce modèle particulier puisqu'il nécessite la participation d'une protéine d'origine virale pourrait cependant être envisageable dans un système cellulaire normal où le rôle de US2 serait tenu par une protéine cellulaire.

b. Une réassociation avec le complexe Sec61

La deuxième possibilité est d'envisager que la glycoprotéine mal conformée s'est dissociée de la machinerie de translocation et se retrouve donc ségréguée dans la membrane du RER. Dans ce cas, si la glycoprotéine s'engage dans la voie de dégradation, un mécanisme supplémentaire est nécessaire afin de permettre la réassociation avec le complexe Sec61. Mothes *et al.* (1997) ont montré que le processus d'ancrage des séquences peptidiques membranaires au sein de la bicouche lipidique du RER s'effectue par déplacement latéral à partir de la machinerie du translocon. Les auteurs suggèrent que ce déplacement latéral permettrait également la réassociation des protéines membranaires destinées à la dégradation au complexe Sec61. D'autre part, Pillon *et al.* (1997) suggère la participation de certaines protéines chaperons comme la calnexine qui est une protéine transmembranaire située à proximité du translocon (Mc Cracken et Brodsky, 1996). Ainsi, la calnexine permettrait, non seulement de maintenir la glycoprotéine proche du complexe Sec61 mais elle faciliterait également leur réassociation.

3.3.2.2. Les protéines solubles

Qu *et al.* (1996) ont montré que la forme mutante de l' α 1-antitrypsine (α 1-APZ) s'engageait dans la voie de dégradation cytosolique. Des résultats similaires ont été observés par Hiller *et al.* (1996) sur le modèle de la carboxypeptidase Y. La dégradation de ces deux glycoprotéines sécrétées est sensible aux inhibiteurs du protéasome et elle a été montrée dépendante de l'ubiquitination ce qui semble confirmer qu'elles soient également concernées par ce type de dégradation.

L'implication du complexe Sec61 n'a pas été mise en évidence dans la dégradation de ces deux glycoprotéines. Cependant, si les protéines du translocon sont effectivement impliquées dans le changement de compartiment, la réassociation avec ces dernières est indispensable. Qu *et al.* (1996) ont montré que la calnexine participait activement à la dégradation de l' α 1-APZ. En effet, des formes ubiquitinées de la calnexine sont retrouvées coprécipitées avec l' α 1-APZ destinée à être dégradée. Ces résultats semblent confirmer l'importance de la calnexine dans le recrutement des glycoprotéines mal conformées en vue d'en faciliter l'interaction avec le complexe Sec61. La figure 23 propose les différentes possibilités de réassociation des glycoprotéines avec le complexe Sec61.

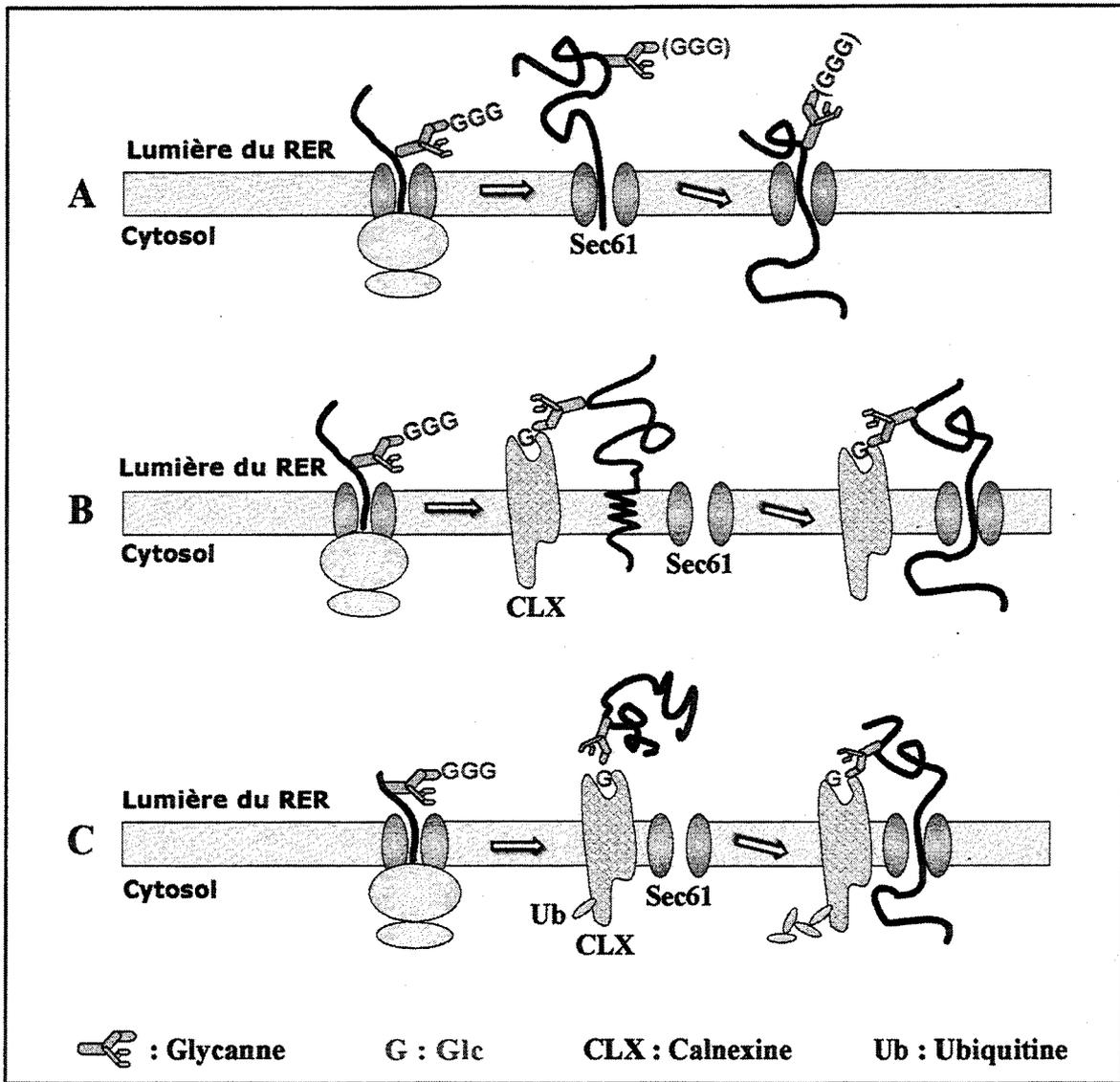


Figure 23 : Mécanismes potentiels de réassociation des glycoprotéines au complexe Sec61.

A : Association prolongée au complexe Sec61 ; B : Réassociation d'une protéine membranaire ;
 C : Réassociation d'une protéine soluble.

3.4. La déglycosylation des glycoprotéines

Une glycoprotéine destinée à la dégradation protéasomale est préalablement déglycosylée. L'efficacité du mécanisme de dégradation est un facteur limitant pour étudier précisément les différentes étapes du processus. Cependant, des études ont permis de mettre en évidence, dans certaines conditions, la présence d'intermédiaires de dégradation déglycosylés.

3.4.1. Mise en évidence d'intermédiaires déglycosylés dans le compartiment cytosolique

Wiertz *et al.* (1996a) ont réussi à mettre en évidence la présence de molécules déglycosylées de CMH I au cours du processus de dégradation. De tels intermédiaires ont été observés en utilisant des inhibiteurs spécifiques du protéasomes comme la lactacystine ou l'ALLN. Ainsi, l'inhibition de la dégradation permet d'accumuler artificiellement les intermédiaires déglycosylés. En outre, l'utilisation du fractionnement subcellulaire a permis à Wiertz *et al.* de montrer que les intermédiaires déglycosylés sont majoritairement retrouvés sous forme soluble témoignant d'une localisation cytosolique.

De Virgilio *et al.* (1998) ont récemment observé, dans les mêmes conditions, des résultats similaires sur le modèle de la ribophorine exprimée sous une forme soluble (RI₃₃₂). Ils observent précisément deux intermédiaires de déglycosylation :

- un premier intermédiaire partiellement déglycosylé qui semble provenir de l'action des mannosidases présentes dans la lumière du RER. Cet intermédiaire est retrouvé associé aux membranes témoignant d'une localisation intraluminale.
- le deuxième intermédiaire correspond à la déglycosylation totale de la glycoprotéine.

Il est exclusivement retrouvé sous forme soluble dans le cytosol.

Concernant l'enzyme impliquée dans la déglycosylation des glycoprotéines destinées à la dégradation, plusieurs activités glycosidasiques ont été décrites : deux activités peptide N-glycanase et une activité endoglucosaminidase.

3.4.2. Les différentes activités glycosidases impliquées dans la déglycosylation des glycoprotéines

a. Les activités peptide N-glycanase (PNGase)

Suzuki *et al.* (1994) ont purifié une peptide N-glycanase (PNGase) à partir de fibroblastes de souris. Une PNGase hydrolyse la liaison N-glycosidique en libérant des oligosaccharides possédant deux résidus de GlcNAc en position terminale réductrice (OSGn₂), le résidu Asn du point d'attache est quant à lui converti en Asp (voir Figure 24). Cette PNGase présente une activité optimale à pH 7 et une spécificité assez large puisqu'elle permet la libération de divers N-glycannes qu'ils soient de type oligomannosidique, de type complexe ou hybride. La localisation de cette activité PNGase n'a pas été déterminée de façon précise, cependant, les récents travaux de Suzuki *et al.* (1998) ont montré l'existence d'une PNGase cytosolique chez

la levure qui en présente les mêmes caractéristiques d'activité et de spécificité. Ainsi, une localisation cytosolique est fortement suggérée.

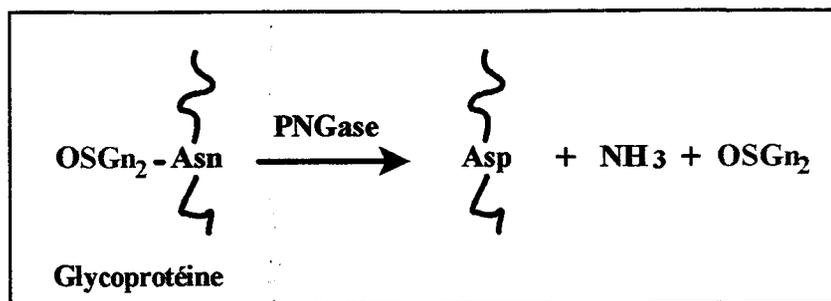


Figure 24 : Nature des glycanes libérés par une activité PNGase.

Une deuxième activité PNGase a été décrite dans le foie de rat (Weng et Spiro, 1997). Elle se distingue de la précédente puisqu'elle est montrée située dans la lumière du RER mais également parce qu'elle présente une spécificité plus étroite des glycopeptides présentant des glycanes de type oligomannosidique qu'ils soient glucosylés ou non.

b. L'activité *endo N-acétylglucosaminidase*

Pierce *et al.* (1979 ; 1980) ont mis en évidence une activité endoglucosaminidasique cytosolique dans le foie de rat qui libère dans ce cas, des oligomannosides possédant un seul résidu de GlcNAc en position terminale réductrice (OSGn₁) (Figure 25). L'enzyme hydrolyse les glycopeptides de type oligomannosidique et de type N-acétyllactosaminique.

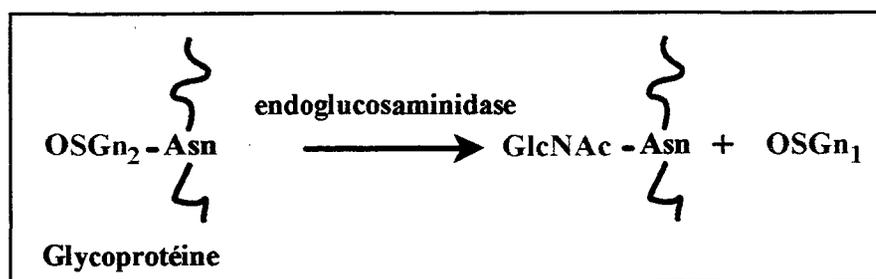


Figure 25 : Nature des glycanes libérés par une activité endoglucosaminidase.

3.4.3. L'activité glycosidase potentiellement impliquée dans la dégradation des glycoprotéines.

La mise en évidence d'un intermédiaire de dégradation déglycosylé du CMH I a conduit l'équipe de Wiertz *et al.* (1996a) à s'intéresser à la nature de la glycosidase impliquée dans le processus de dégradation de la glycoprotéine. Leur approche a consisté à analyser par électrofocalisation sur gel d'acrylamide, la migration des molécules de CMH I déglycosylées en prenant pour témoin des molécules de CMH I déglycosylées par l'endo H. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, un traitement à l'endoglucosaminidase conserve l'Asn du point d'attache sur lequel subsiste un résidu de GlcNAc, alors que l'action de la PNGase convertit l'Asn en Asp. Une telle conversion doit se traduire par un changement du point isoélectrique de la molécule. C'est de cette façon que Wiertz *et al.* (1996a) ont observé une différence de migration entre l'intermédiaire déglycosylé et les molécules de CMH I traitées à l'endo H suggérant une activité PNGase. Etant donné que l'intermédiaire déglycosylé est retrouvé majoritairement dans le compartiment cytosolique, ces résultats sont en faveur de l'activité PNGase cytosolique de Suzuki *et al.* (1994 ; 1998).

La protéine ainsi déglycosylée est ensuite dégradée par le protéasome. Dans la plupart des cas, la molécule subit une modification covalente avant d'être adressée au complexe multiprotéasique : c'est l'étape de polyubiquitination des protéines.

3.5. Polyubiquitination des glycoprotéines

3.5.1. L'ubiquitine

L'ubiquitine est présente dans toutes les cellules eucaryotes. Sa séquence de 76 résidus d'acides aminés y est pratiquement invariante. Elle possède un rôle majeur dans les mécanismes de dégradation des protéines cellulaires impliquant le protéasome en permettant la régulation de fonctions cellulaires très diverses telles que la présentation des antigènes, la modification de récepteurs cellulaires ou encore dans le contrôle du cycle cellulaire.

L'ubiquitine a pour principale fonction de se fixer de façon covalente aux protéines destinées à être dégradées : cet étiquetage est, dans la plupart des cas, indispensable à la reconnaissance par le protéasome.

3.5.1.1. L'ubiquitination des protéines destinées à la dégradation

La fixation de l'ubiquitine à une protéine cible s'effectue en plusieurs étapes (Scheffner *et al.* 1995) où interviennent successivement trois enzymes désignées E1, E2 et E3 :

- la première étape fait intervenir l'enzyme E1 qui catalyse, de façon ATP-dépendante, la formation d'une liaison thioester, riche en énergie, la liant à l'ubiquitine.
- l'ubiquitine, ainsi activée, est alors transférée de E1 à E2 par une réaction de trans-thioestérification.
- finalement, E2 transfère l'ubiquitine sur un groupement ϵ -aminé d'une lysine d'une protéine cible préalablement reconnue par l'enzyme E3 et sur laquelle elle s'est liée. La liaison ainsi formée est de type isopeptidique.

3.5.1.2. Polyubiquitination

Une protéine n'est dégradée que si plusieurs molécules d'ubiquitine sont liées à au moins un résidu de lysine de la protéine cible. L'ubiquitine peut donner lieu à une polyubiquitination car elle possède elle-même une lysine en position 48 sur laquelle peuvent se fixer, par leur glycine C-terminale, une ou plusieurs molécules d'ubiquitine formant un complexe (ubiquitine)_n-protéine. La figure 26 présente le mécanisme d'ubiquitination des protéines.

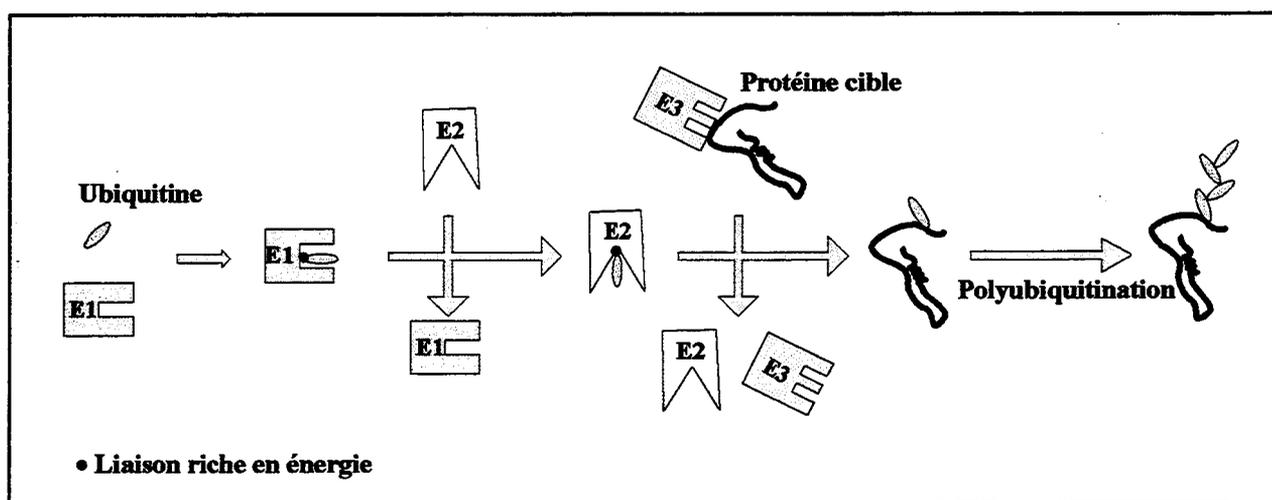


Figure 26 : Ubiquitination des protéines destinées à la dégradation protéasomale.

La protéine, ainsi étiquetée, est alors spécifiquement reconnue par le protéasome.

3.5.2. Mise en évidence de l'ubiquitination des glycoprotéines mal conformées

L'implication de l'ubiquitine dans la dégradation des glycoprotéines mal conformées a été mise en évidence dans de nombreux modèles. Une méthode a consisté à utiliser une lignée cellulaire

mutante, ts20 exprimant l'enzyme E1 qui présente une activité thermodépendante. Ainsi, l'inhibition de l'activité de E1 à des températures supérieures à 40°C empêche le mécanisme d'ubiquitination. D'autres méthodes (de Virgilio *et al.*, 1998) ont consisté à maintenir les glycoprotéines sous forme polyubiquitinées à l'aide du N-éthylmaléimide qui représente un puissant inhibiteur des isopeptidases.

Cependant, certaines études ont montré que l'ubiquitination n'était pas indispensable à la dégradation protéasomale (Wiertz *et al.*, 1996a ; Werner *et al.*, 1996). Une dégradation ubiquitine-indépendante est effectivement, envisageable si l'on prend en considération l'implication active de protéines chaperons qui favoriseraient l'interaction avec le protéasome.

Quoi qu'il en soit, l'ubiquitination présente un intérêt dans l'efficacité du processus en favorisant la reconnaissance des glycoprotéines mal conformées par le protéasome.

3.5.3. Discrimination des glycoprotéines destinées à être dégradées

A ce jour, le mécanisme qui conditionne l'ubiquitination des glycoprotéines mal conformées reste à déterminer.

Parce qu'il existe différents types d'enzyme E3 dans la cellule, on peut penser que cette diversité permettrait d'élargir ses potentialités de reconnaissance des glycoprotéines à dégrader (Ciechanover, 1994).

3.6. Implication du protéasome dans la dégradation des glycoprotéines mal conformées

L'utilisation de l'ALLN et de la lactacystine comme inhibiteurs de l'activité protéolytique du protéasome a largement contribué à la mise en évidence de son implication dans le processus de dégradation des glycoprotéines mal conformées. Dans tous les modèles étudiés, on observe une accumulation des glycoprotéines dans le cytosol. Dans la plupart des cas, les molécules sont retrouvées sous une forme déglycosylée (Wiertz *et al.*, 1996a ; Hughes *et al.*, 1997 ; Yu *et al.*, 1997 ; de Virgilio *et al.*, 1998) dont la présence confirme que l'étape de déglycosylation anticipe la dégradation proprement dite de la protéine. Parmi ces modèles, certains présentent également des formes polyubiquitinées (Hughes *et al.*, 1997 ; de Virgilio *et al.*, 1998).

Ainsi, la mise en place d'un tel processus catabolique nécessite d'importantes dépenses énergétiques. C'est, sans aucun doute, le changement de compartimentation RER-cytosol qui nécessite l'énergie la plus importante. Nous allons discuter les différentes ressources d'énergie susceptibles de promouvoir le rétro-transport des glycoprotéines.

3.7. Les ressources d'énergie potentielles utilisées pour le rétro-transport des glycoprotéines

Actuellement, il est fortement suggéré que différents acteurs, situés de part et d'autre de la membrane du RER, agissent en synergie pour favoriser le transport des glycoprotéines du RER vers le cytosol.

3.7.1. Face luminale

Comme nous l'avons précédemment énoncé, la calnexine participe étroitement à l'exportation des glycoprotéines vers le cytosol. Située à proximité de la machinerie de translocation, elle semble représenter le « candidat » idéal qui pourrait diriger la glycoprotéine *via* le complexe Sec61 (Pillon *et al.*, 1997).

3.7.2. Face cytosolique

Les travaux de Fisher *et al.* (1997) ont montré que la protéine cytosolique Hsp70 participait activement à la dégradation par le protéasome de l'apolipoprotéine B100 (Apo B100). En effet, ils ont observé que la protéine Hsp70 se retrouve fortement associée à l'Apo B100 destinée à la dégradation. Le deuxième argument dont ils disposent sur le rôle prépondérant de cette protéine chaperon repose sur le fait que la surexpression de Hsp70 accélère le processus de dégradation de la glycoprotéine. L'association de Hsp70 qui a été montrée ATP-dépendante, permettrait de lui suggérer un rôle dans la progression de la glycoprotéine à accéder au compartiment cytosolique.

Dans le cytosol, la particule « cap » 19S du protéasome pourrait également représenter un élément important dans le recrutement des glycoprotéines vers le cytosol. En effet, Mayer *et al.* (1998) ont clairement démontré chez la levure que le rétro-transport des protéines membranaires et la dégradation étaient deux phénomènes directement liés. C'est en exprimant un mutant du protéasome, qui ne possède pas le gène PRE 1 codant une protéine essentielle de la particule 20S du protéasome, qu'ils ont observé que la protéine restait maintenue dans la

membrane du RER. Les ATPases retrouvées au sein de la particule « cap » 19S pourraient représenter l'élément actif de ce processus en favorisant « l'extraction » des glycoprotéines de la membrane du RER. La figure 27 propose un modèle hypothétique qui permettrait d'expliquer les potentialités énergétiques dont dispose la cellule pour le rétro-transport d'une glycoprotéine à dégrader.

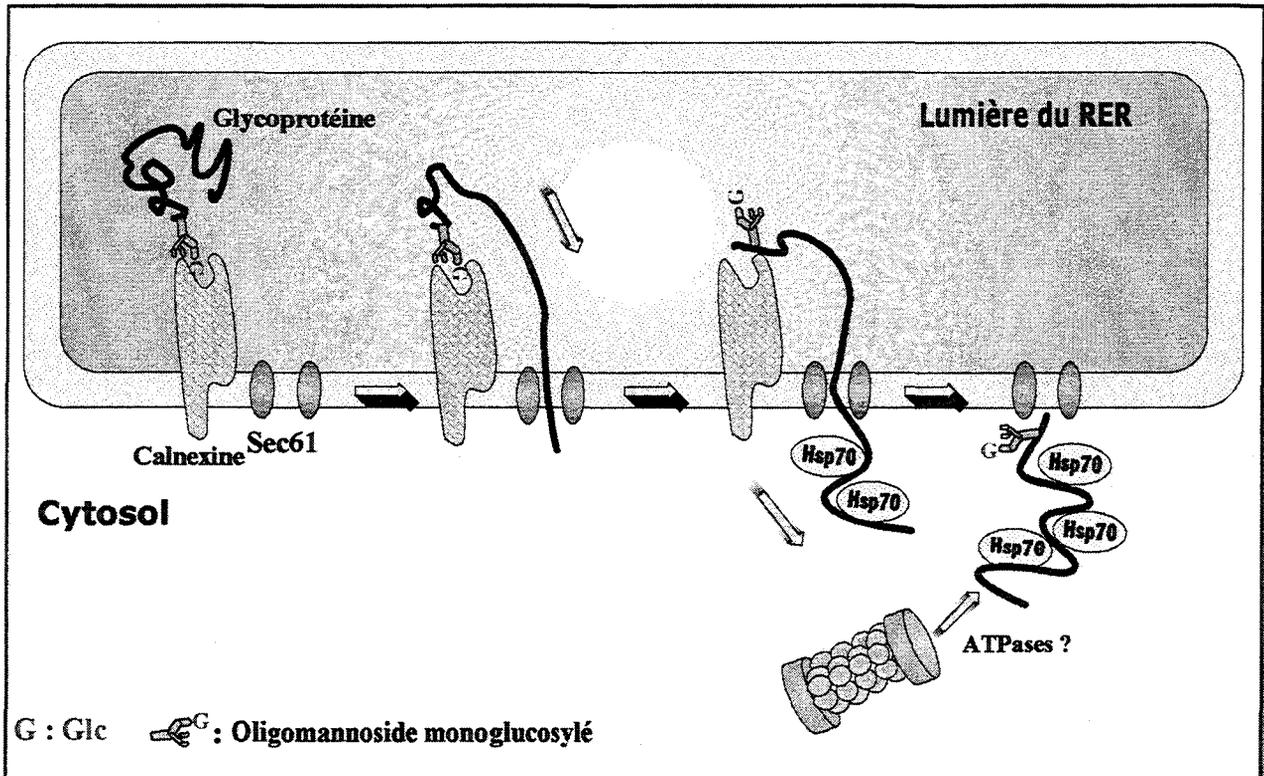


Figure 27 : Modèle hypothétique du rétro-transport des glycoprotéines destinées à la dégradation cytosolique.

L'ensemble des connaissances que nous avons, à la fois, sur le contrôle de qualité des glycoprotéines et sur la mise en place d'un processus de dégradation lorsque celles-ci ne sont pas conformes au point de vue structural, montre l'importance de ces mécanismes mis en place dans la cellule. En effet, il a été montré qu'un dysfonctionnement du contrôle de qualité ou de la voie de dégradation peut avoir, dans certains cas, de graves répercussions du point de vue physiologique. Nous allons citer deux exemples de pathologie concernées par ce phénomène : la déficience en α 1-antitrypsine et le modèle de la mucoviscidose.

3.8. Pathologies liées au processus de dégradation des néoglycoprotéines

3.8.1. Déficience en α 1-antitrypsine

Le modèle de l' α 1-antitrypsine (α 1-AP) permet, en effet, d'expliquer l'intérêt physiologique de la dégradation des glycoprotéines mal conformées dans certaines maladies génétiques. Les enfants qui présentent une déficience en cette glycoprotéine vont, dans certains cas, développer une maladie chronique du foie pouvant entraîner l'apparition d'un carcinome hépatocellulaire. Des études génétiques ont montré que la mutation de la Glu 342 par une Lys se traduit par l'expression de l' α 1-APZ anormalement conformée et qui est très largement retenue dans la lumière du RER. Cette rétention est responsable de l'effet hépatotoxique observés chez les individus hôtes. En fait, il a été clairement défini que certains individus présentent une protection contre l'effet cytotoxique de l' α 1-APZ en dégradant ces formes mutées de la glycoprotéine. Cette dégradation qui a été montrée dépendante du protéasome permettrait ainsi de limiter l'effet cytotoxique de la glycoprotéine. Il est suggéré que les sujets malades présenteraient une défectuosité dans le système de dégradation qui concernerait précisément un problème d'interaction avec la calnexine (Wu *et al.*, 1994). Ainsi, cet exemple témoigne de l'importance du processus de dégradation des glycoprotéines mal conformées.

3.8.2. Le modèle de la mucoviscidose

La mucoviscidose est une maladie héréditaire qui met en cause l'absence fonctionnelle d'une glycoprotéine membranaire qui facilite le transport des ions chlorures à travers la membrane plasmique des cellules épithéliales : ce canal est appelé CFTR pour « cystic fibrosis transmembrane conductance regulator ». Dans la plupart des cas, cette absence est causée par la délétion d'un seul résidu de Phe (Δ F508) situé dans le domaine cytoplasmique de la glycoprotéine. Chez les sujets sains, une partie des molécules de CFTR s'engagent dans la voie de sécrétion pour être exprimées à la surface de la membrane plasmique. Par contre, chez les individus hôtes, l'étape de mise en conformation de la glycoprotéine est sensiblement altérée : 99 % des molécules sont retenues dans le RER en association avec la calnexine et la chaperonne cytosolique Hsp70, avant d'être dégradées. L'étude du mécanisme de dégradation mis en jeu a montré qu'il impliquait le protéasome (Jensen *et al.* 1995) et qu'il était ubiquitine-dépendant (Ward *et al.*, 1995). Ainsi, dans ce deuxième cas, la dégradation empêche l'expression de la glycoprotéine mutée à la surface de la membrane plasmique.

Conclusion des généralités

Depuis sa synthèse jusqu'à sa destination finale, les glycanes représentent de véritables témoins de la localisation subcellulaire et de la destinée d'une glycoprotéine. Ainsi, les oligomannosides, auxquels nous nous intéressons plus particulièrement, représentent des marqueurs du RER ou du compartiment proche *cis*-golgien.

En effet, d'une part, ces oligomannosides peuvent témoigner de la nature de la rétention au sein du compartiment RER :

- les oligomannosides de type $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ sont directement impliqués dans le contrôle de qualité : ils témoignent du caractère immature de la glycoprotéine.
- les oligomannosides peuvent également témoigner des différents types de rétention d'une glycoprotéine native dans le compartiment RER : une rétention stricte peut se traduire par l'apparition d'espèces $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ voire $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ due à l'action des mannosidases réticulaires. Par contre, une rétention par recyclage peut faire apparaître des espèces $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ ou de type complexe qui traduisent un passage dans le compartiment golgien.

D'autre part, lorsqu'une glycoprotéine nouvellement synthétisée est destinée à être dégradée, la libération des oligomannosides est un préalable à toute protéolyse de la molécule. Cependant, à l'heure actuelle, la nature, la localisation et la destinée de ces oligomannosides restent à préciser.

C'est précisément sur le concept de l'utilisation des oligomannosides comme marqueurs de la destinée des glycoprotéines que nous avons orienté nos recherches.

La première partie de notre travail s'est portée sur l'étude de la dégradation des glycoprotéines. En effet, lors du processus de dégradation, nous avons évoqué l'étape de déglycosylation. Si certains auteurs se sont intéressés à la nature de l'enzyme impliquée, aucune étude n'a porté sur la destinée des oligosaccharides libérés au cours du phénomène. Au laboratoire, nous disposons d'une lignée cellulaire dérivée de CHO mutante dans la glycosylation qui présente une déficience en Man-P-Dol synthétase et ne peuvent qu'élaborer des glycanes de type $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ sur leurs protéines : les cellules B3F7. L'intérêt de ce modèle repose sur le fait qu'il libère une quantité importante d'oligomannosides solubles dont une partie a été montrée provenir de la dégradation des glycoprotéines nouvellement

synthétisées. Or, d'un point de vue métabolique, il est difficile de suivre la destinée des oligomannosides libérés durant le processus de dégradation des glycoprotéines parce qu'ils se retrouvent incorporés parmi les oligomannosides solubles provenant de l'activité hydrolytique de l'oligosaccharyltransférase. En effet, comme nous l'avons montré, le catabolisme de ces oligomannosides implique à la fois le RER, le cytosol et les lysosomes.

Ainsi, nous avons utilisé des inhibiteurs limitant le catabolisme des oligomannosides provenant de l'activité hydrolytique de l'oligosaccharyltransférase, de manière à préciser la nature, la localisation et la destinée des glycannes libérés au cours du processus de dégradation des glycoprotéines dans le modèle B3F7.

La deuxième partie de notre travail s'est effectuée dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Dr Jean Dubuisson (CNRS-UMR 319, Institut de Biologie de Lille) dont la thématique de travail repose sur l'étude de l'assemblage du virus de l'hépatite C. La plupart des virus enveloppés ont développé une stratégie qui consiste à se doter de protéines d'enveloppe présentant un signal d'adressage et de rétention spécifique de compartiments subcellulaires à partir desquels s'effectue l'assemblage de la particule virale. Le virus de l'hépatite C présente deux glycoprotéines structurales E1 et E2 à la surface de son enveloppe. Au cours de leur biosynthèse, ces deux glycoprotéines s'assemblent et sont retenues spécifiquement dans le RER. Pour déterminer les caractéristiques de cette rétention, nous avons étudié l'influence d'agents perturbant le trafic intracellulaire sur la répartition subcellulaire des glycoprotéines E1 et E2. Nous avons également étudié la nature des glycannes portés par ces glycoprotéines de manière à préciser la nature et l'origine de cette rétention.

RÉSULTATS

ARTICLE I

Introduction

Comme nous l'avons décrit dans les généralités, toute glycoprotéine nouvellement synthétisée destinée à la voie de dégradation est préalablement déglycosylée. En effet, certains auteurs ont observé une forme intermédiaire déglycosylée de la glycoprotéine étudiée avant qu'elle ne soit hydrolysée. Si Wiertz *et al.* (1996a) se sont intéressés à la nature de l'enzyme impliquée, aucune étude n'a porté sur la nature et la destinée des glycanes libérés au cours du phénomène.

D'un point de vue expérimental, l'étude de la nature et de la destinée des glycanes libérés à partir d'une glycoprotéine donnée est limitée par le fait qu'elle nécessite, au préalable, une incorporation suffisante du marqueur radioactif ([2-³H] mannose) sur la glycoprotéine. Au laboratoire, nous nous sommes intéressés à un modèle d'étude cellulaire qui présente la particularité de libérer une quantité importante d'oligomannosides solubles : les cellules B3F7. Brièvement, nous allons décrire ce modèle d'étude afin d'expliquer l'intérêt de son utilisation dans l'étude de la dégradation des glycoprotéines nouvellement synthétisées.

I. Présentation du modèle d'étude B3F7

Les cellules B3F7 sont dérivées d'une lignée d'ovaires de hamster chinois (CHO). L'étude de ces cellules a montré qu'elles présentent une déficience en Man-P-Dol synthétase : de cette façon, elles ne peuvent qu'élaborer des glycanes tronqués de type Glc₃Man₅GlcNAc₂ sur leurs protéines (Stoll, 1986). La particularité de ce modèle repose sur le fait qu'il libère une quantité importante d'oligomannosides solubles par rapport aux cellules CHO dont il a pour origine. Ce phénomène est sensiblement exacerbé lorsque les cellules sont cultivées à 39°C et en concentration réduite en Glc (0,5 mM) suggérant un phénomène thermodépendant.

Des études préliminaires ont très rapidement montré que les oligomannosides libérés sous forme soluble comprenaient deux populations bien distinctes :

- une partie de ces oligomannosides présente deux résidus de GlcNAc en position terminale réductrice (**OSG_{n2}**)
- la grande majorité présente un seul résidu de GlcNAc en position terminale réductrice (**OSG_{n1}**)

A l'aide de marquages métaboliques au $[2\text{-}^3\text{H}]$ mannose et de la mise au point d'un protocole d'extraction lipidique (voir appendice technique), il est possible de séparer les différents produits générés par le cycle des dolichols : les intermédiaires lipidiques, les oligosaccharides solubles et les oligosaccharides liés aux glycoprotéines nouvellement synthétisées. De cette manière, des études préliminaires ont permis de préciser l'origine et la destinée des OSGn₂.

II. Origine et destinée des OSGn₂ libérés dans les B3F7

A l'aide d'expériences de pulse-chase, Villers *et al.* (1994) ont montré que les OSGn₂ apparaissent de façon proportionnelle à la disparition des précurseurs lipidiques Glc₃Man₅GlcNAc₂-PP-Dol, suggérant une relation produit-substrat. Ainsi, ces résultats semblent indiquer que les OSGn₂ ont pour origine l'activité hydrolytique de l'oligosaccharyltransférase précédemment mise en évidence (pour revue voir Cacan et Verbert, 1997). Compte tenu des connaissances actuelles que nous avons du catabolisme des oligomannosides libérés par l'activité hydrolytique de l'oligosaccharyltransférase, il est possible d'envisager une destinée identique pour les OSGn₂ libérés par les B3F7. La figure 28 représente les différentes étapes du catabolisme des oligomannosides adapté au modèle B3F7.

Ainsi, dans le modèle B3F7, le trafic des oligomannosides issus de l'hydrolyse des oligosaccharides-PP-Dol est sensiblement simplifié. Le précurseur Glc₃Man₅GlcNAc₂ est séquentiellement déglucosylé par les glucosidases I et II avant d'être transporté dans le cytosol où il subit l'action de la chitobiase cytosolique pour donner le Man₅GlcNAc₁. Celui-ci est directement envoyé dans les lysosomes pour être hydrolysé en résidus de Man et GlcNAc.

Cependant, ces études ont très rapidement montré que la quantité d'OSGn₂ libérés par l'activité hydrolytique de l'oligosaccharyltransférase ne pouvait expliquer, à elle seule, l'origine de la totalité des OSGn₁ observés. Villers *et al.* (1994) ont montré que l'inhibition de la synthèse protéique par le cycloheximide conduit à une diminution significative de la quantité d'OSGn₁, suggérant qu'une partie de ces oligomannosides aurait pour origine la déglycosylation des glycoprotéines.

Ainsi, pour distinguer les deux origines de la formation des OSGn₁, nous avons utilisé des inhibiteurs limitant le catabolisme des oligomannosides provenant de l'activité hydrolytique de l'oligosaccharyltransférase. De cette façon, notre étude a permis de préciser la nature, la

localisation et la destinée des glycanes libérés à partir des glycoprotéines dans le modèle B3F7.

Ce travail a fait l'objet de l'article publié dans *Biochemical Journal* « Cytosolic deglycosylation process of newly synthesized glycoproteins generates oligomannosides possessing one GlcNAc residue at the reducing end » (1998), 335, 389-396.

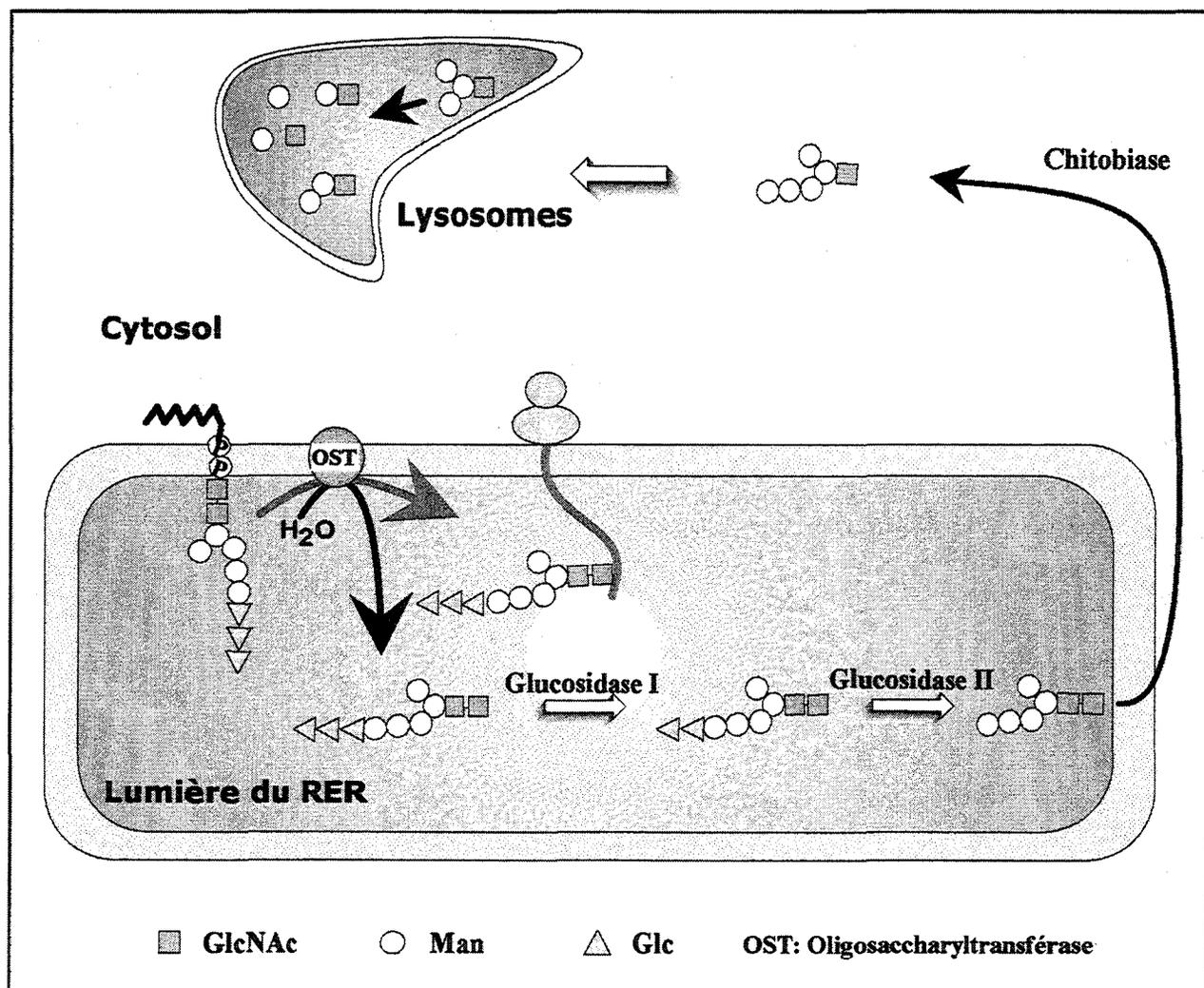


Figure 28 : Trafic des oligomannosides libérés par l'activité hydrolytique de l'oligosaccharyltransférase dans le modèle B3F7.

Cytosolic deglycosylation process of newly synthesized glycoproteins generates oligomannosides possessing one GlcNAc residue at the reducing end

Sandrine DUVET*, Odette LABIAU*, Anne-Marie MIR*, Daniel KMIČEK*, Sharon S. KRAG†, André VERBERT* and René CACAN*¹

*Laboratoire de Chimie Biologique, UMR no. 111 du CNRS, Université des Sciences et Technologies, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France, and †Department of Biochemistry, School of Hygiene and Public Health, The Johns Hopkins University, 615 North Wolfe Street, Baltimore, MD 21205, U.S.A.

Recent studies on the mechanism of degradation of newly synthesized glycoproteins suggest the involvement of a retrotranslocation of the glycoprotein from the lumen of the rough endoplasmic reticulum into the cytosol, where a deglycosylation process takes place. In the studies reported here, we used a glycosylation mutant of Chinese hamster ovary cells that does not synthesize mannosylphosphoryldolichol and has an increased level of soluble oligomannosides originating from glycoprotein degradation. In the presence of anisomycin, an inhibitor of protein synthesis, we observed an accumulation of glucosylated oligosaccharide-lipid donors (Glc₃Man₅GlcNAc₂-PP-Dol), which are the precursors of the soluble neutral oligosaccharide material. Inhibition of rough endoplasmic reticulum glucosylase(s) by castanospermine led to the formation of Glc₃Man₅GlcNAc₂(OSGn2) (in which OSGn2 is an oligo-

mannoside possessing two GlcNAc residues at its reducing end), which was then retained in the lumen of intracellular vesicles. Thus they were protected during an 8 h chase period from the action of cytosolic chitobiase, which is responsible for the conversion of OSGn2 to oligomannosides possessing one GlcNAc residue at the reducing end (OSGn1). In contrast, when protein synthesis was maintained in the presence of castanospermine, glucosylated oligomannosides (Glc₃Man₅GlcNAc₁) were recovered in cytosol. Except for monoglucosylated Man₅ species, which are potential substrates for luminal calnexin and calreticulin, the pattern of oligomannosides was similar to that observed on glycoproteins. The occurrence in the cytosol of glucosylated species with one GlcNAc residue at the reducing end implies that the deglycosylation process that generates glucosylated OSGn1 from glycoproteins occurs in the cytosol.

INTRODUCTION

The N-glycosylation process is accomplished through the co-translational transfer of a preassembled oligosaccharide (Glc₃Man₅GlcNAc₂) from a lipid carrier, dolichol, to a nascent polypeptide chain. It is now well established that the biosynthesis of N-glycosylproteins is accompanied by the release of free oligosaccharides. In various biological models, this material is composed mainly of oligomannosides possessing one or two GlcNAc residue(s) at the reducing end (OSGn1 and OSGn2) that are rapidly cleared from the rough endoplasmic reticulum (ER) lumen and degraded. Three subcellular compartments are involved in this catabolic pathway, i.e. rough ER, cytosol and lysosomes. Glucosylated OSGn2 originating from lipid intermediate cleavage are first deglycosylated in the rough ER and transported via a specific carrier into the cytosol [1,2], where the action of a cytosolic chitobiase [3] produces OSGn1 species, which are potential substrates for cytosolic α -D-mannosidase [4] leading to a single Man₅GlcNAc isomer: Man α 1-2Man α 1-2Man α 1-3(Man α 1-6)Man β 1-4GlcNAc. This oligomannoside enters into the lysosome [5] to be further degraded into smaller species and monosaccharides.

Even though the main steps of this oligomannoside trafficking are known, the origin of these oligosaccharides is still questionable. By using radiolabelling of oligomannosides and with different biological models, two origins have been suggested: they originate either from the hydrolysis of oligosaccharide-PP-Dol [6] or from the degradation of newly synthesized glycoproteins [7,8].

The degradation of newly synthesized proteins and glyco-

proteins has been recently documented (reviewed in [9,10]). Recent studies have shown that misfolded glycoproteins are retrotranslocated from the rough ER lumen into the cytosol, then degraded by the proteasome after ubiquitination. This mechanism has been demonstrated for membrane glycoproteins [11–14] and soluble glycoproteins [15]. It has to be noted that this degradation process is the result of the action of a viral protein [11,12], of a quality control mechanism induced by a defect in the amino acid sequence [13,15] or by impaired association of subunits [14]. As a prerequisite of this degradation process, a deglycosylated intermediate has been observed in some models [11,12,14] and the action of a cytosolic peptide N-glycanase (PNGase) releasing OSGn2 has been suggested.

The B3F7 cell line is a glycosylation mutant of Chinese hamster ovary (CHO) cells that does not synthesize mannosylphosphoryldolichol, producing only truncated Glc₃Man₅GlcNAc₂-PP-Dol [16]. At a low glucose concentration (0.5 mM) and when cultured at 40 °C, the level of soluble oligomannosides released is higher in B3F7 cells than in wild-type CHO cells. This has been correlated with an increased glycoprotein degradation [8]. By using this model we demonstrate in the present paper that a cytosolic deglycosylation process of oligomannoside-type glycoproteins produces OSGn1.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Mutant cell line B3F7 was isolated from B 4-2-1, Lec15.1, which does not synthesize mannosylphosphoryldolichol [16]. [²⁻³H]Mannose (429 Gbq/mmol) was from Amersham (Little

Abbreviations used: CHO, Chinese hamster ovary; ER, endoplasmic reticulum; OSGn1, oligomannoside possessing one GlcNAc residue at its reducing end; OSGn2, oligomannoside possessing two GlcNAc residues at its reducing end; PNGase, peptide N-glycanase.

¹ To whom correspondence should be addressed (e-mail Rene.Cacan@univ-lille1.fr).

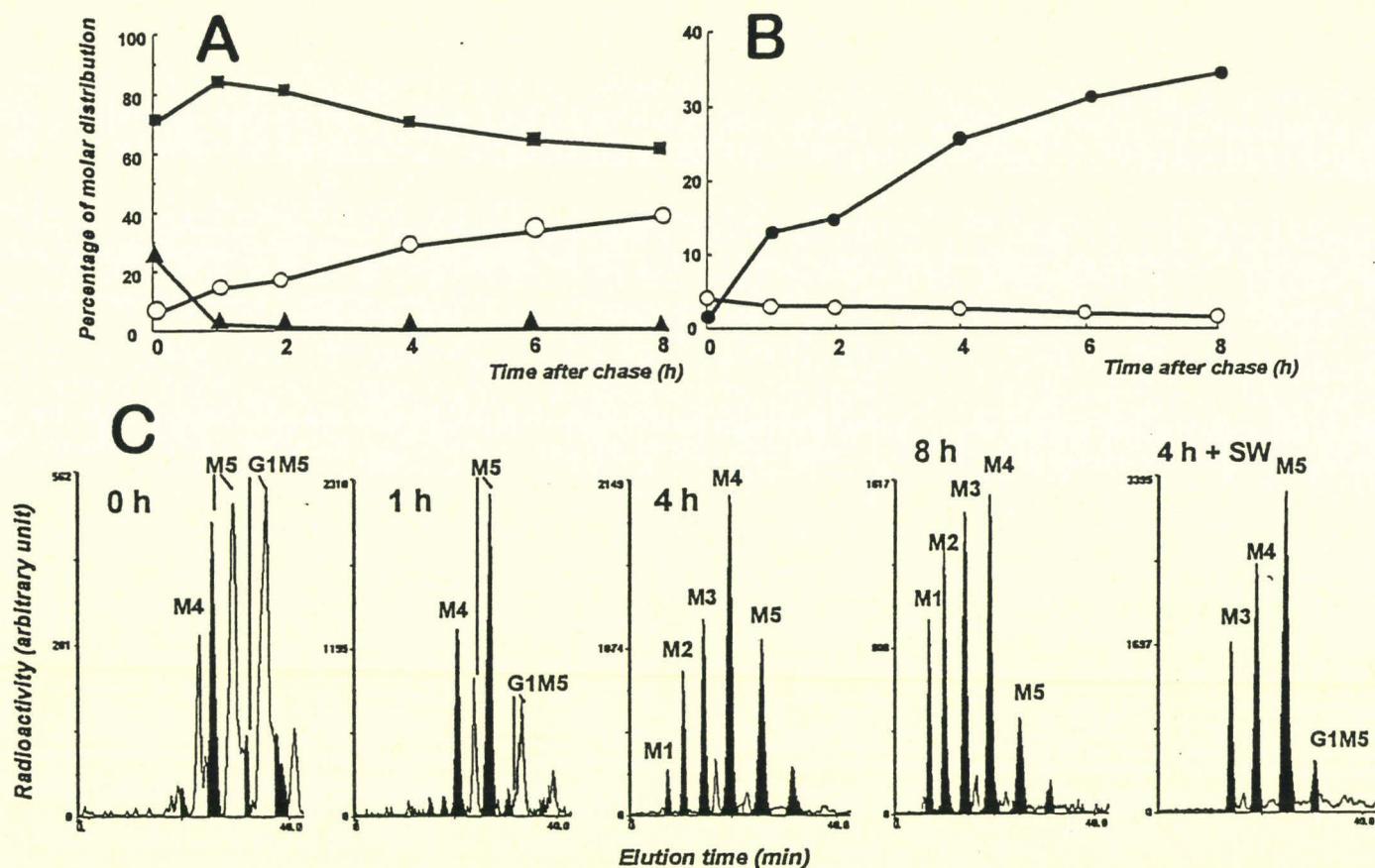


Figure 1 Oligomannoside trafficking in B3F7

B3F7 cells were pulsed with $[2\text{-}^3\text{H}]\text{mannose}$ in the presence of 0.5 mM Glc for 30 min and chased for 1, 2, 4, 6 and 8 h at 40 °C. (A) Percentage molar distribution of the various fractions: oligosaccharide-lipids (▲), proteins (■) and soluble neutral oligomannosides (○). The molar equivalents of the fractions were calculated after HPLC analysis, taking into account the specific radioactivity of each peak. (B) Kinetics of the liberation of the free neutral oligosaccharide species expressed as a percentage of the molar distribution: ○, OSGn2; ●, OSGn1. (C) HPLC profiles of free neutral oligosaccharides after 0, 1, 4 and 8 h of chase respectively; 4 h + SW represents an HPLC profile of free oligosaccharides after a 4 h chase in the presence of 0.1 mM swainsonine. M1, M2, M3, M4, M5 and G1M5 indicate oligosaccharide species possessing one (filled peaks) or two (open peaks) GlcNAc residues at the reducing end, and one, two, three, four or five Man residues respectively.

Chalfont, Bucks., U.K.). PNGase F, castanospermine and swainsonine were purchased from Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany). Anisomycin and trypsin were obtained from Sigma (St. Louis, MO, U.S.A.). Concanavalin A–Sepharose was from Pharmacia.

Metabolic labelling of oligosaccharides, and chase experiments

B3F7 cells were routinely cultured in monolayers in α -minimal essential medium with 10% (v/v) fetal calf serum at 34 °C in 10 cm Petri dishes under air/CO₂ (19:1).

For labelling of bound and free oligomannosides, B3F7 cells, cultured in 10 cm Petri dishes, were preincubated overnight at 40 °C. Cells were labelled at 40 °C with 100 μCi of $[2\text{-}^3\text{H}]\text{mannose}$ per dish in α -minimal essential medium without glucose and 10% (v/v) dialysed fetal calf serum. After incubation, the medium was removed and the cell layer was washed rapidly three times with ice-cold PBS. When a chase was performed, pulse-labelled cells were washed twice with PBS and incubated for different durations in α -minimal essential medium containing 5 mM glucose. When used, castanospermine was maintained throughout the incubation and the chase periods at a final concentration of 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Sequential extraction was then achieved as described previously [1].

The radioactivity bound to oligosaccharide-PP-Dol and to glycoproteins was measured by liquid-scintillation counting. The free oligosaccharide material was purified as described [8].

Analysis of oligosaccharide material

The protein pellet was digested overnight at room temperature with 0.2 mg of trypsin treated with 1-chloro-4-phenyl-3-L-toluene-*p*-sulphonamidobutan-2-one in 0.1 M ammonium bicarbonate, pH 7.9. The glycan moiety linked to protein was cleaved by PNGase F as follows: the trypsin-treated protein was boiled for 10 min to destroy the trypsin activity and the peptides were dried and dissolved in 20 mM sodium phosphate, pH 7.5, containing 50 mM EDTA, 50% (v/v) glycerol and 0.02% Na₂S₂O₅. PNGase F was then added (0.5 unit, corresponding to 0.5 mIU) for incubation overnight at 37 °C.

Size analysis of the glycan moieties and of the oligosaccharide material was achieved by HPLC on an amino-derivatized Asahipak NH2P-50 (250 mm \times 4.6 mm) column (Asahi, Kawasaki-ku, Japan) with a solvent system of acetonitrile/water from 70:30 (v/v) to 50:50 (v/v) at a flow rate of 1 ml/min over 80 min. Under these conditions the oligomannosides can be resolved by their numbers of mannose, glucose and GlcNAc residues from Man₁GlcNAc to Glc₃Man₃GlcNAc₂. Oligo-

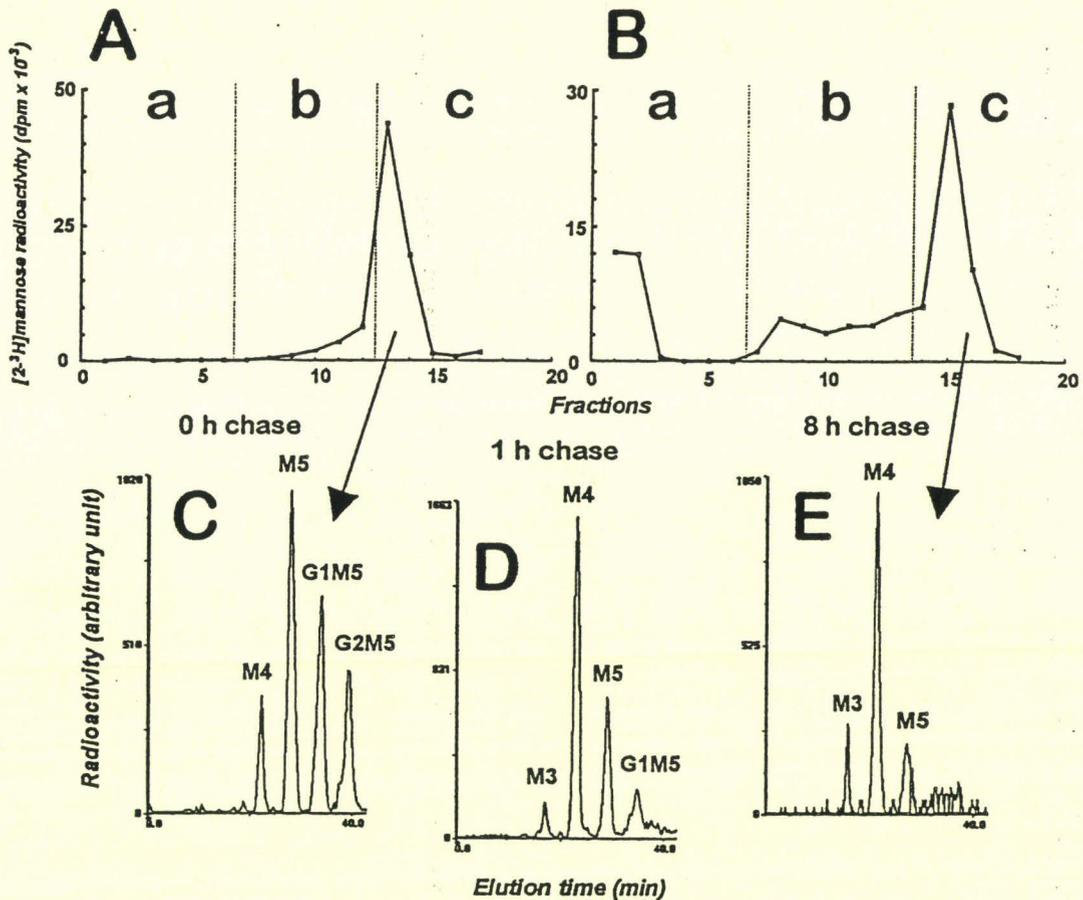


Figure 2 Concanavalin A-Sepharose chromatography and HPLC analysis of glycoproteins during a pulse-chase experiment

B3F7 cells were pulsed with $[2\text{-}^3\text{H}]\text{mannose}$ in the presence of 0.5 mM Glc for 30 min and chased for 8 h at 40 °C. After sequential extraction the glycoprotein fraction was treated with PNGase and then subjected to concanavalin A-Sepharose chromatography. Regions labelled a, b and c represent the equilibration buffer alone (a), with 10 mM methyl $\alpha\text{-D-glucoside}$ (b) or 100 mM $\alpha\text{-D-mannoside}$. (A, B) Affinity chromatography of glycan fractions after 0 h (pulse, A) and 8 h chase (B). (C-E) HPLC analysis of the fraction eluted in buffer c after 0 h (C), 1 h (D) and 8 h (E) of chasing. Peaks are identified as for Figure 1.

mannosides were identified as described previously [1] by their retention times; separation of the labelled oligosaccharides was monitored by continuous-flow detection of the radioactivity with a Flo-one β detector (Packard).

Cell permeabilization

B3F7 cells were routinely permeabilized by the method of Beckers et al. [17]. In brief, adherent cells were washed three times with an ice-cold swelling buffer made of 10 mM Hepes, pH 7.2, and 15 mM KCl. After incubation for 10 min on ice, the swelling buffer was replaced with 3 ml of breaking buffer [50 mM Hepes (pH 7.2)/90 mM KCl]. Cells were immediately scraped from the plate and resuspended in an isotonic buffer [30 mM Tris/HCl (pH 7.5)/120 mM KCl/4 mM magnesium acetate]. We have shown previously that this permeabilization technique does not affect intracellular membranes [1].

Affinity chromatography of labelled N-glycans

The lectin column (concanavalin A-Sepharose, 5 cm \times 0.5 cm) was equilibrated in 5 mM sodium acetate buffer, pH 5.2, containing 0.1 M NaCl, 1 mM MnCl_2 , 1 mM CaCl_2 and 1 mM MgCl_2 at room temperature. The glycan fraction resulting from PNGase F action on the glycoprotein fraction was applied to the

column, which was then eluted with the equilibration buffer (buffer a). The weakly retained glycans were eluted with 10 mM methyl $\alpha\text{-D-glucoside}$ in the equilibration buffer (buffer b); strongly retained glycans were eluted with 100 mM $\alpha\text{-D-mannoside}$ (buffer c).

RESULTS

Formation and trafficking of oligomannosides in B3F7 cells

The liberation of oligomannosides originating from the deglycosylation of newly synthesized glycoprotein was shown during a pulse-chase experiment with B3F7 cells. Figure 1 shows an 8 h chase experiment performed after a 30 min pulse with $[2\text{-}^3\text{H}]\text{mannose}$ in the presence of 0.5 mM glucose. Figure 1(A) shows the percentage molar distribution of the various fractions after HPLC analysis. The molar equivalent of the resolved components was calculated by dividing the radioactivity of each peak by the number of mannosyl residues in the oligomannoside species; the molar equivalents were then summed and the percentage molar distribution was calculated. The oligosaccharide-PP-Dol fraction was chased rapidly (1 h) but it is clear that the molar equivalent of the soluble oligosaccharides continued to increase after 1 h, reaching 40% of the total incorporation after an 8 h chase. This liberation of an increasing

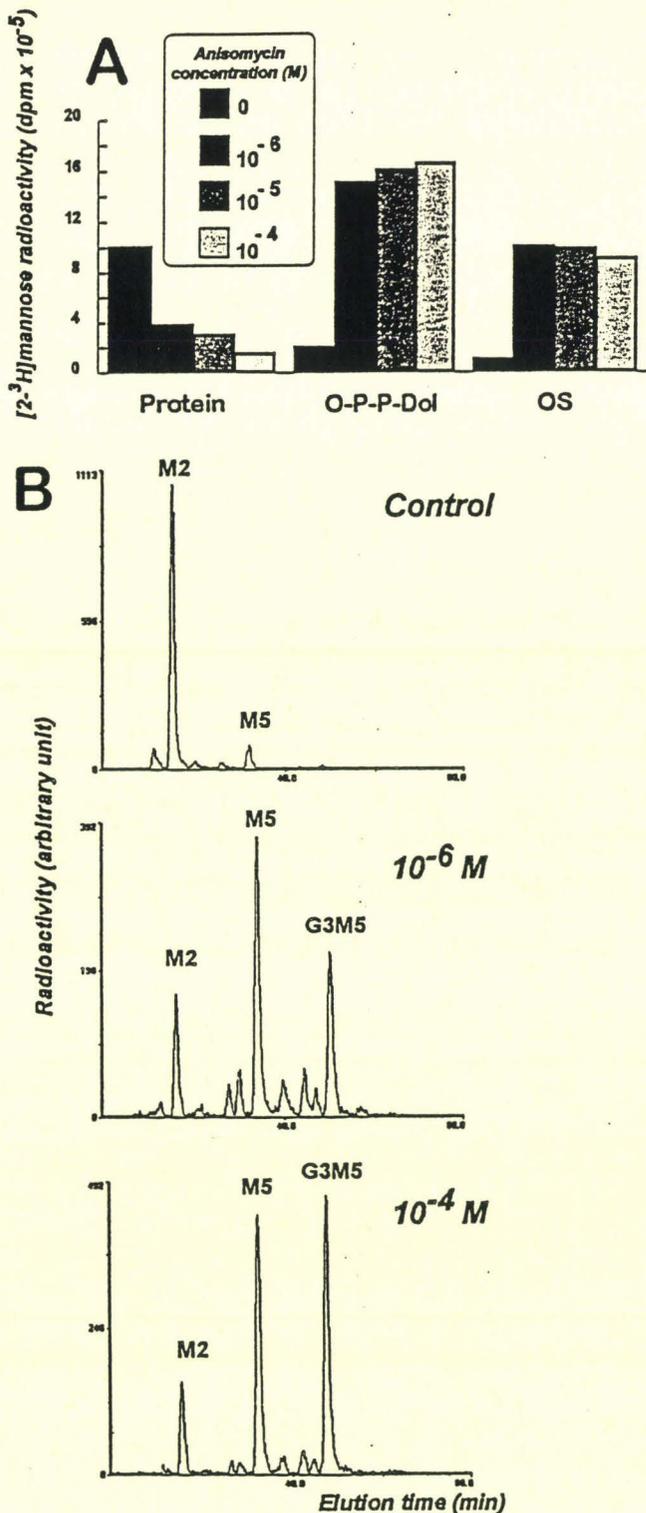


Figure 3 Effect of anisomycin on lipid-linked oligosaccharide synthesis in B3F7 cells

B3F7 cells were incubated with [2-³H]mannose for 30 min under the conditions described in the Materials and methods section in an incubation medium without glucose, in the presence of various concentrations of anisomycin: 0, 1, 10 and 100 μ M. (A) Effect of anisomycin on the incorporation into protein, oligosaccharide-PP-Dol (O-P-P-Dol) and soluble neutral oligomannosides (OS). (B) HPLC analysis of the oligosaccharide fraction released from oligosaccharide-lipid for the control and for 1 μ M and 100 μ M anisomycin. Peaks are identified as for Figure 1.

quantity of soluble oligosaccharides could not have originated uniquely from oligosaccharide-PP-Dol cleavage and was concomitant with the deglycosylation of the glycoprotein fraction. The analysis of the soluble oligosaccharide fractions in terms of OSGn1 or OSGn2 underlines the difference in the time progress curves for these two species (Figures 1B and 1C). From the beginning of the chase to 1 h, the OSGn2 species (mainly $\text{Glc}_{0-1}\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$) were released from the lipid intermediates pool and further converted into OSGn1 as shown at 1 and 4 h of chasing. The smaller species ($\text{Man}_2\text{GlcNAc}_1$ and $\text{Man}_1\text{GlcNAc}_1$) that appeared at 4 h corresponded to lysosomal degradation products, as demonstrated by Saint-Pol et al. [5] and by the fact that their formation was inhibited when the chase was performed in the presence of 0.1 mM swainsonine (see Figure 1C; 4 h + SW). From 4 to 8 h of chasing the only possible precursor for the formation of OSGn1 was the pool of glycoproteins. As is shown in Figure 1(B), a striking fact is that OSGn2, produced by oligosaccharide-PP-Dol hydrolysis during the first hour of chase, could not be the sole precursor of the large amount of OSGn1 liberated between 4 and 8 h.

In B3F7 cells the glycoprotein deglycosylation process seems to be rather slow compared with the high degradation rate described in some other models (a half-time of 1 or 2 min has been described for MHC class I heavy chains [11]). Figure 2 illustrates the type of glycan bound to glycoproteins by using affinity chromatography on a concanavalin A-Sepharose column. When analysed after a 30 min pulse, 90% of the glycans were tightly retained by the lectin (Figure 2A) and the HPLC analysis revealed non-glucosylated ($\text{Man}_{4-5}\text{GlcNAc}_2$) and glucosylated ($\text{Glc}_{2-1}\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$) species (Figure 2C). After a 1 h chase, processing occurred leading to deglycosylation and partial demannosylation, because the main species was $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$ (Figure 2D). After an 8 h chase, 48% of the glycans were still retained by concanavalin A (Figure 2B), and the pattern of oligomannosides was similar to that observed after a 1 h chase (Figure 2E). This result demonstrated that sufficient amounts of oligomannoside-type glycoproteins are retained in B3F7 to generate OSGn1, for at least 8 h, by a deglycosylation process.

Thus both the oligosaccharide-PP-Dol and glycoprotein deglycosylation processes generate oligomannosides in B3F7. To discriminate between these two origins we studied oligomannoside formation in the presence of anisomycin, a protein synthesis inhibitor.

Effect of anisomycin on the pattern and fate of the lipid-linked oligosaccharide precursors

Figure 3(A) shows the effect of various concentrations of anisomycin, an inhibitor of the ribosomal translocation reaction, on the synthesis, composition and fate of oligosaccharide-PP-Dol. As expected, when B3F7 cells were incubated in the absence of glucose with various concentrations (from 1 to 100 μ M) of this protein synthesis inhibitor, the transfer of the radiolabelled oligosaccharide-PP-Dol to protein was decreased, leading to an 8-fold accumulation of the precursor. Part of this excess of labelled lipid intermediates was used by the oligosaccharyl-transferase to generate neutral oligosaccharides, because a 10-fold increase in the radioactivity bound to the soluble neutral oligosaccharide material was observed in the presence of anisomycin (Figure 3A). The analysis of glycans bound to lipid intermediates is shown in Figure 3B. The main species recovered in the control were $\text{Man}_2\text{GlcNAc}_2$ (80%) and $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ (7%), as described previously [18]. As already observed with puromycin or cycloheximide [19], anisomycin-treated cells accumulated

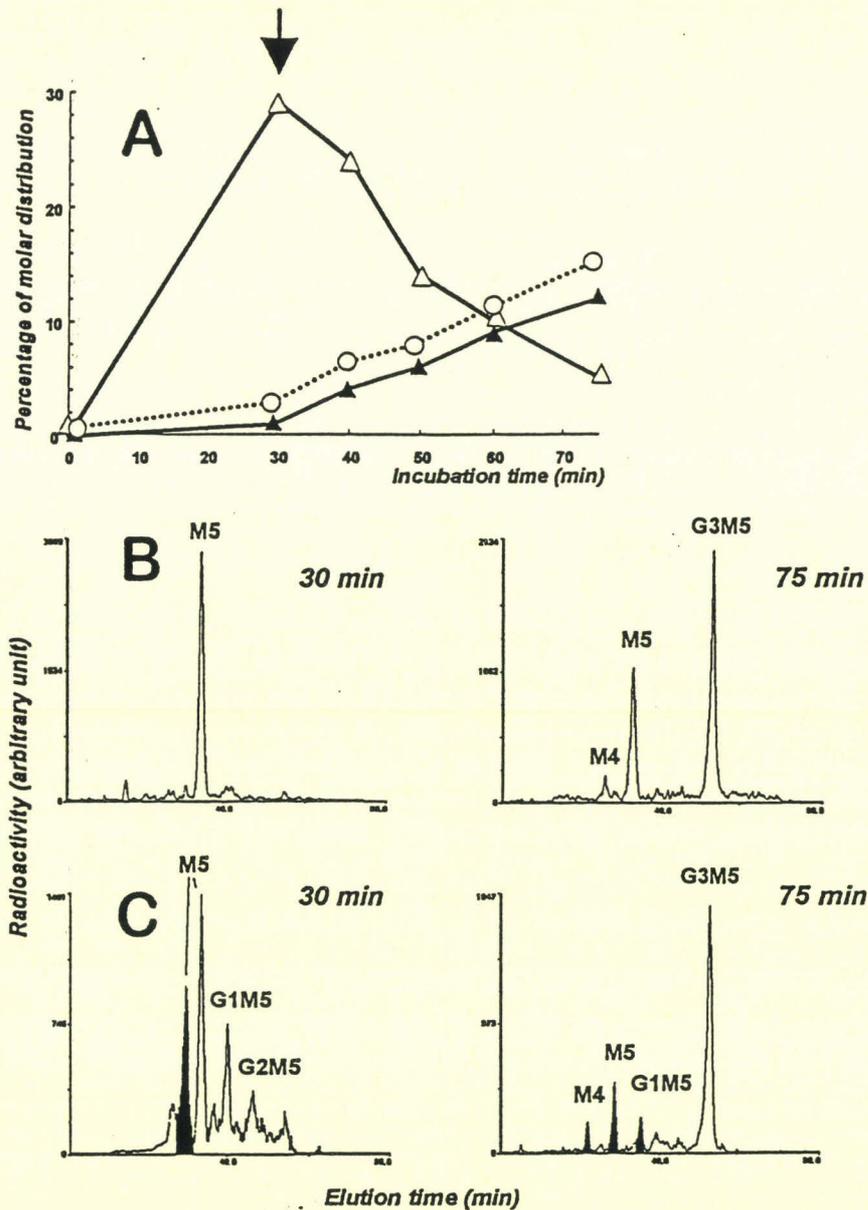


Figure 4 Fate of glucosylated oligomannosides in B3F7

(A) B3F7 cells were pulsed with [^3H]mannose under the conditions described in the Materials and methods section. After 30 min, 100 μM anisomycin and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ castanospermine (arrow) were added for a further 10, 20, 30 and 45 min of incubation. After the incubation, cells were subjected to sequential extraction and the oligosaccharide-lipids were submitted to mild acid hydrolysis and analysed by HPLC. (A) Percentage molar distributions of Man₃GlcNAc₂-PP-Dol (Δ), Glc₃Man₅GlcNAc₂-PP-Dol (\blacktriangle) and neutral soluble oligomannosides (\circ). (B) HPLC analysis at 30 and 75 min of the oligosaccharide moieties linked to oligosaccharide-PP-Dol. (C) HPLC analysis of the neutral oligomannoside material after 30 and 75 min of incubation. Peaks are identified as for Figure 1.

predominantly a glucosylated species, Glc₃Man₅GlcNAc₂, reaching 45% of the radioactivity at 100 μM anisomycin. This species is the metabolic end product of the lipid intermediate synthesis in this Man-P-Dol-deficient cell line. It demonstrated that anisomycin-treated cells exhibit an accumulation of glucosylated species. These glucosylated species, which are more efficiently transferred to protein acceptor [20], are not used under these conditions of protein synthesis inhibition.

In the absence of protein synthesis, Glc₃Man₅GlcNAc₂-PP-Dol is the only precursor of soluble neutral oligosaccharide material

B3F7 cells were metabolically labelled with radioactive mannose in the presence of 0.5 mM glucose at 40 °C. After 30 min of

incubation, 100 μM anisomycin and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ castanospermine (an inhibitor of rough ER glucosidases) were added. The incubation then continued for 0–45 min. Figures 4(A) and 4(B) show the analysis of glycans bound to oligosaccharide-lipids before and after the addition of anisomycin. As observed in Figure 4(B), after the first 30 min of incubation Man₃GlcNAc₂-PP-Dol was the only species detected. The addition of anisomycin produced very rapidly (half-time 20 min) the accumulation of fully glucosylated end product: Glc₃Man₅GlcNAc₂-PP-Dol at the expense of the non-glucosylated intermediate species Man₃GlcNAc₂-PP-Dol. After 45 min in the presence of anisomycin, only 12% (expressed as a molar distribution) of Glc₃Man₅GlcNAc₂-PP-Dol was detected at the expense of 24% of Man₃GlcNAc₂-PP-Dol. The difference was entirely recovered

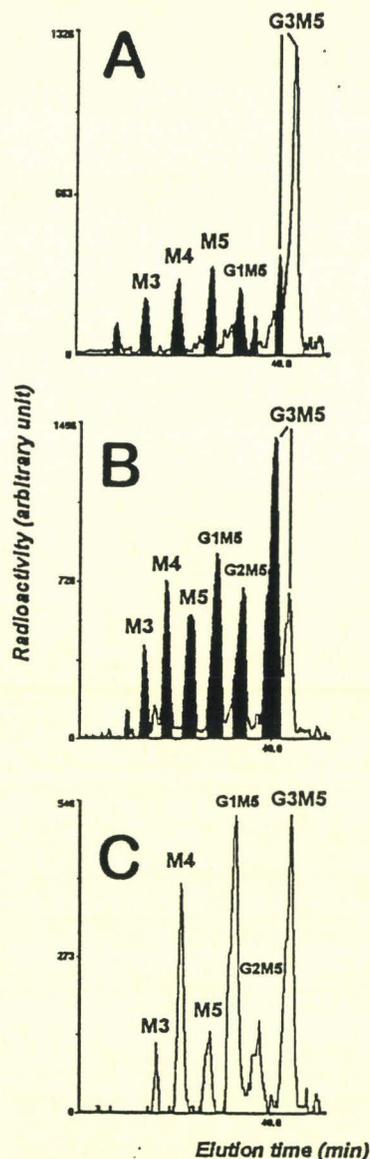


Figure 5 Pattern of soluble oligomannosides originating from the deglycosylation of glycoproteins in the presence of castanospermine

B3F7 cells were pulsed with [^3H]mannose under the conditions described in the Materials and methods section in the presence of 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ castanospermine, with (A) or without (B, C) 100 μM anisomycin. After a 4 h chase the neutral oligosaccharide fraction was analysed by HPLC. (A) HPLC analysis of the neutral oligomannoside material synthesized in the presence of anisomycin and castanospermine. (B) HPLC analysis of the neutral oligomannoside material synthesized in the absence of anisomycin. (C) HPLC analysis after a 4 h chase of the glycan moieties bound to proteins synthesized in the presence of castanospermine. M3, M4, M5, G1M5, G2M5 and G3M5 indicate oligosaccharide species possessing one (filled peaks) or two (open peaks) GlcNAc residues at the reducing end, and three, four or five Man residues or one, two or three Glc plus five Man residues respectively.

as soluble $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$. As demonstrated in Figure 4(C), $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ represented 80% of the radioactivity in the soluble oligomannoside fraction, the remaining 20% having been released during the first 30 min of incubation. Thus the experiment with anisomycin and castanospermine was in agreement with the fact that the fate of glucosylated oligosaccharide-PP-Dol was hydrolysis to glucosylated OSGn2. Owing to the inhibition of glycosidases by castanospermine, these glucosylated oligomannosides could not be deglycosylated and therefore could

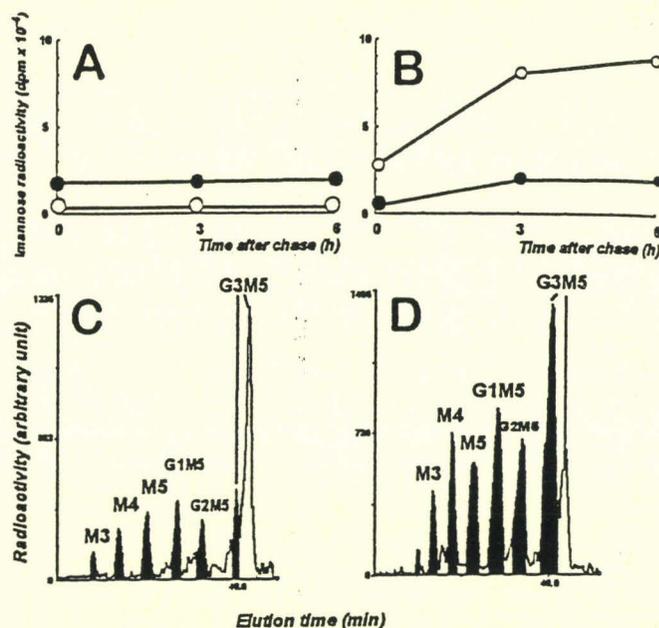


Figure 6 Subcellular location of OSGn1 and OSGn2 synthesized in the presence of castanospermine

B3F7 cells were pulsed with [^3H]mannose in the presence of 0.5 mM Glc and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ castanospermine for 30 min and chased for 0, 3 or 6 h at 40 $^{\circ}\text{C}$. After the chase, cells were permeabilized as described in the Materials and methods section and washed by low-speed centrifugation. The free oligomannoside material was purified from the supernatant (\circ). The cell pellet was subjected to sequential lipid extraction and the soluble cell-associated oligosaccharides were recovered from the aqueous phase (\bullet). In these two compartments the kinetics of the liberation of OSGn2 (A) and OSGn1 (B) was determined. (C, D) HPLC analysis, at 6 h of chase, of the cell-associated (C) and cytosolic (supernatant) (D) neutral free oligomannosides. Peaks are identified as for Figure 1.

not be transported into the cytosol to be precursors of OSGn1, as has been observed in HepG2 cells [2].

Pattern of oligomannosides originating from glycoprotein deglycosylation in the presence of castanospermine

Figure 5 shows the pattern of soluble oligosaccharide material released after a 4 h chase period in the presence of castanospermine and in the presence (Figure 5A) or absence (Figure 5B) of anisomycin. When protein synthesis was inhibited (5% of the incorporated radioactivity was bound to glycoproteins) 80% of the released oligomannoside species was $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, as demonstrated above and illustrated in Figure 5(A). In contrast, when protein synthesis was maintained (61.5% of the radioactivity was incorporated into glycoproteins during the 30 min pulse), the soluble oligomannosides were mainly composed of OSGn1 species (80%), of which 60% were glucosylated (Figure 5B). The pattern was similar to that recovered on glycoproteins (Figure 5C). Because the chitobiase activity responsible for the conversion of OSGn2 into OSGn1 is located in the cytosol [3], and because glucosylated species are not transported into the cytosol, the occurrence of glucosylated OSGn1 when protein synthesis is allowed seems questionable. Thus we decided to study the subcellular location of the oligosaccharides released during glycoprotein synthesis in the presence of castanospermine.

Subcellular location of the released oligomannosides

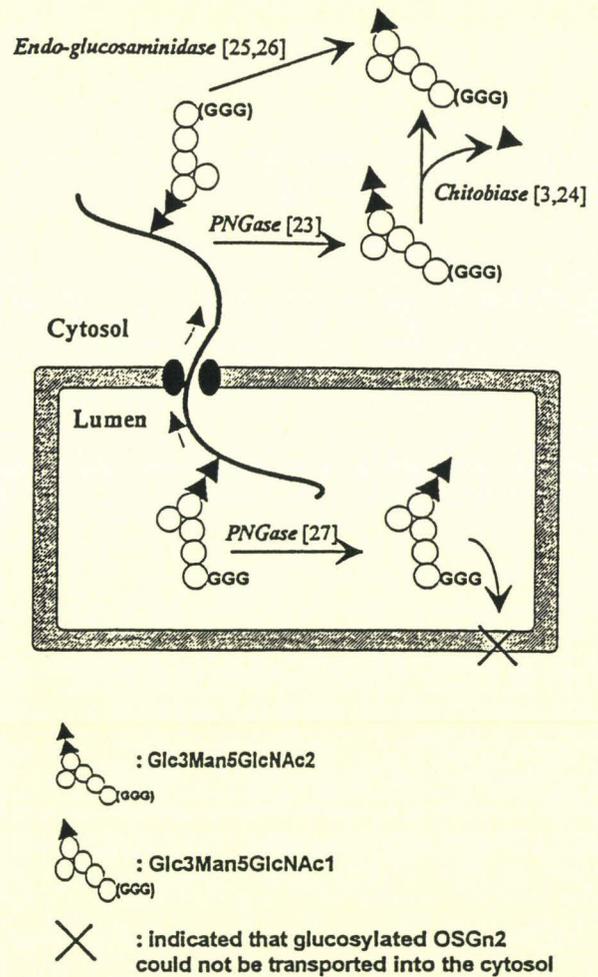
Figure 6 shows the results of a pulse-chase experiment achieved with [^3H]mannose in the presence of castanospermine. After a

30 min pulse the cells were chased for 0, 3 or 6 h. Before sequential extraction, cells were permeabilized and the oligomannosides were recovered either from the supernatant (cytosolic location) or from the cell pellet (vesicular compartment), as demonstrated previously [1]. OSGn2 species were recovered predominantly from the vesicular compartment (75%) (Figure 6A). The level was constant during the chase, demonstrating that they could not exit from rough ER because they consisted mainly of $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ (Figure 6C) originating from oligosaccharide-PP-Dol hydrolysis. In contrast, OSGn1 were mainly recovered from the cytosol (85%), the total amount increasing during the chase. The pattern of OSGn1 observed in the cytosol (Figure 6D) was similar to that obtained by analysing glycans of glycoproteins under the same conditions (Figure 5C). This result is in complete agreement with the fact that deglycosylation of newly synthesized glycoprotein occurs in the cytosol, releasing oligomannosides terminating in a single GlcNAc residue.

DISCUSSION

During the N-glycosylation process, the mature glucosylated oligosaccharide-PP-Dol is utilized by oligosaccharyltransferase for transfer to acceptor proteins or for generating luminal OSGn2. In addition it has been shown that OSGn2 could be converted to OSGn1 via a cytosolic chitobiase, which implies the transfer of OSGn2 into the cytosol. B3F7 is a Man-P-Dol synthase-deficient CHO cell line and consequently these cells synthesize Man_5 -type glycans. This glycosylation defect seems to induce the retention of some glycoproteins, as previously demonstrated for a recombinant human alkaline phosphatase (SeAP) when expressed in the CHO glycosylation mutant MadIA214. In this model, SeAP bearing truncated glycans ($\text{Glc}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$) was maintained for at least 8 h in the cell and the glycoprotein co-precipitated with a marker for rough ER, the molecular chaperone BiP [21], indicating that impaired glycosylation could affect some folding steps in the rough ER. This retention could supply the glycoprotein substrates for a slow deglycosylation process as a prerequisite of the degradation of misfolded proteins, as demonstrated for some models [11,12,14].

The nature and location of oligomannoside species originating from the deglycosylation process has been studied by using anisomycin and castanospermine. These inhibitors led to the accumulation of the fully glucosylated oligosaccharide-PP-Dol, which was not used for protein glycosylation. The oligomannoside part of the oligosaccharide lipid was released (presumably by the hydrolytic activity of the oligosaccharyltransferase [6]) and was accumulated in the lumen of intracellular vesicles as $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ owing to the inhibition of the glucosidases by castanospermine and because the chitobiase activity responsible for the cleavage of the chitobiosyl-unit of OSGn2 has been demonstrated to be cytosolic [3]. After a 4 h chase in the presence of both inhibitors, only a small percentage (10%) of $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_1$ was detected; this demonstrated that, as previously described, glucosylated oligomannosides cannot be transported out of the rough ER [2]. When the chase experiment was performed without anisomycin, 60% of the radioactivity bound to soluble oligomannosides was from the OSGn1 species, even when these species were glucosylated. In addition the same oligomannoside species were found in glycoproteins and in OSGn1, suggesting a substrate-product relationship, but there are some differences in their proportions. When the pattern of protein-linked glycans (Figure 5C) and the pattern of OSGn1 recovered in the cytosol (Figure 6D) are compared, the major difference is in the Glc_1Man_5 species. It can be proposed that glycoproteins bearing Glc_1Man_5



Scheme 1 Retrotranslocation of glycoproteins and location of the various oligosaccharide-releasing enzymes

The scheme has been adapted for the B3F7 model from the results of Wiertz et al. [11,12]. References corresponding to the demonstration of the subcellular location and isolation of enzymes are shown.

species are protected from deglycosylation. As recently demonstrated by Vassilakos et al. [22], the $\text{Glc}\alpha 1\text{-3Man}\alpha 1\text{-2Man}\alpha 1\text{-2Man}$ structure extending from the $\alpha 1,3$ branch of the oligosaccharide core is sufficient for recognition by calnexin and calreticulin. This motif is present in glycans synthesized by B3F7. The association between glycoprotein and these molecular chaperones could allow their retention, thus avoiding their retrotranslocation and deglycosylation.

The subcellular location of the released oligomannosides has been studied by using the permeabilization method. Analysis of the free neutral oligomannosides from the vesicular and from the cytosolic compartment shows that $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ was again the main species remaining within the intracellular vesicles throughout the chase; in contrast, $\text{Glc}_1\text{-3Man}_5\text{GlcNAc}_1$ were the main species detected in the cytosol and their quantities increased during the chase. This indicates that OSGn1 originated from glycoprotein deglycosylation but were not produced in the lumen of rough ER.

This raises questions about the nature of the enzyme involved in the deglycosylation process and its subcellular location. We observed the degradation of a rough ER/*cis*-Golgi-located glycoprotein releasing OSGn1 into the cytosol. According to

Wiertz et al. [11,12], deglycosylation occurs in the cytosol by the action of a PNGase releasing OSGn2 after translocation of glycoprotein in the cytosol. If a PNGase such as that described by Suzuki et al. [23] is involved, the intermediate OSGn2, which was not detectable in our model, should be immediately converted to OSGn1 by a chitobiase, which has been shown to be present in the cytosol [3] and isolated recently from hen oviduct [24]. Another possibility is the action of the cytosolic endoglucosaminidase demonstrated in the rat liver by Pierce et al. [25,26]. This latter hypothesis, which fits best with our observations, remains to be addressed by following the fate and trafficking of a given misfolded glycoprotein. A PNGase activity has recently been described in the lumen of rat liver microsomes [27]. This enzyme could liberate luminal OSGn2, precursors of OSGn1, after transportation into the cytosol. In our view the presence of glucosylated OSGn1 in the cytosol is not in accord with this hypothesis because glucosylated species are not translocated. A proposal for the retrotranslocation of glycoproteins and the location of the various oligosaccharide-releasing enzymes is given in Scheme 1.

Whatever enzymes were involved, the released glycans followed the catabolic pathway of free oligomannosides until they reached the lysosome for the final degradation steps.

This work was in part supported by EEC contract number ERB FMRX CT96 0025 (Carenet-2) by CNRS and USTL, and by NIH grant CA20421.

REFERENCES

- Kmićik, D., Herman, V., Stroop, C. J. M., Michalski, J. C., Mir, A. M., Labiau, O., Verbert, A. and Cacan, R. (1995) *Glycobiology* **5**, 483–494
- Moore, S.E. H., Bauvy, C. and Codogno, P. (1995) *EMBO J.* **14**, 6034–6042
- Cacan, R., Dengremont, C., Labiau, O., Kmićik, D., Mir, A. M. and Verbert, A. (1996) *Biochem. J.* **313**, 597–602
- Grard, T., Herman, V., Saint-Pol, A., Kmićik, D., Labiau, O., Mir, A. M., Alonso, C., Verbert, A., Cacan, C. and Michalski, J. C. (1996) *Biochem. J.* **316**, 787–792
- Saint-Pol, A., Bauvy, C., Codogno, P. and Moore, S. E. H. (1997) *J. Cell. Biol.* **136**, 45–49
- Spiro, M. J. and Spiro, R. G. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 5311–5317
- Anumula, K. R. and Spiro, R. G. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 15274–15282
- Villers, C., Cacan, R., Mir, A. M., Labiau, O. and Verbert, A. (1994) *Biochem. J.* **298**, 135–142
- Bonifacino, J. S. and Lippincott-Schwartz, J. (1991) *Curr. Opin. Cell. Biol.* **3**, 592–600
- Bonifacino, J. S. (1996) *Nature (London)* **384**, 405–406
- Wiertz, E. J. H. J., Jones, T. R., Sun, L., Bogyo, M., Geuze, H. J. and Ploegh, H. L. (1996) *Cell* **84**, 769–779
- Wiertz, E. J. H. J., Tortorella, D., Bogyo, M., Yu, J., Mothes, W., Jones, T. R., Rapoport, T. A. and Ploegh, H. L. (1996) *Nature (London)* **384**, 432–438
- Ward, C.L., Omura, S. and Kopito, R. R. (1995) *Cell* **83**, 121–127
- Hughes, E. A., Hammond, C. and Cresswell, P. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 1896–1901
- Qu, D., Teckman, J. H., Omura, S. and Perlmutter, D. H. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 22791–22795
- Stoll, J. (1986) PhD thesis, School of Hygiene and Public Health, The Johns Hopkins University, Baltimore
- Beckers, C. J. M., Keller, D. S. and Balch, W. E. (1987) *Cell* **50**, 523–534
- Cacan, R., Villers, C., Béliard, M., Kaiden, A., Krag, S. S. and Verbert, A. (1992) *Glycobiology* **2**, 127–136
- Chapman, A. E. and Calhoun, J. C. (1988) *Arch. Biochem. Biophys.* **260**, 320–333
- Turco, S. J., Stetson, B. and Robbins, P. W. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**, 4411–4414
- Ermorval, M., Cacan, R., Gorgas, K., Haas, I. G., Verbert, A. and Buttin, G. (1997) *J. Cell. Science* **110**, 323–336
- Vassilakos, A., Michalak, M., Lehrman, M. A. and Williams, D. B. (1998) *Biochemistry* **37**, 3480–3490
- Suzuki, T., Seko, A., Kitajima, K., Inoue, Y. and Inoue, S. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 17611–17618
- Kato, T., Hatanaka, K., Mega, T. and Hase, S. (1997) *J. Biochem.* **122**, 1167–1173
- Pierce, R. J., Spik, G. and Montreuil, J. (1979) *Biochem. J.* **180**, 673–676
- Pierce, R. J., Spik, G. and Montreuil, J. (1980) *Biochem. J.* **185**, 261–264
- Weng, S. and Spiro, R. G. (1997) *Biochem. J.* **322**, 655–661

I. Discussion de l'article I

D'une façon générale, la libération des oligomannosides solubles dans le modèle B3F7 présente deux particularités :

- d'une part, une proportion plus importante d'OSG_{n1} que d'OSG_{n2} (figure 1 de l'article I).
- d'autre part, la présence d'une quantité faible mais notable d'OSG_{n1} glucosylés (Glc₁Man₅GlcNAc₁).

Ces observations ne sont pas en accord avec les caractéristiques mises en évidence au cours de trafic des oligomannosides libérés par l'activité hydrolytique de l'oligosaccharyltransférase. En effet, dans les cellules CHO qui synthétisent l'oligomannoside mature Glc₃Man₉GlcNAc₂, il est clairement établi que :

- les OSG_{n2} glucosylés libérés dans la lumière du RER doivent être impérativement déglucosylés pour être transportés vers le compartiment cytosolique (Moore *et al.*, 1995).
- une fois transportés dans le cytosol, les OSG_{n2} déglucosylés sont à l'origine des OSG_{n1} (Kmiécik *et al.*, 1995 ; Moore *et al.*, 1995).

Dans le but de déterminer si le trafic des oligomannosides tronqués libérés dans les B3F7 présente ces mêmes caractéristiques, nous avons voulu vérifier, dans un premier temps, si le Glc₃Man₅GlcNAc₂ pouvait être transporté ou non dans le cytosol.

A. Effet de l'anisomycine sur la nature et la destinée des produits générés par le cycle des dolichols dans le modèle B3F7.

Pour ce faire, nous avons utilisé l'anisomycine qui présente un double intérêt dans notre étude :

- elle représente un inhibiteur de la réaction de translocation des ribosomes au cours de la traduction des protéines.
- elle supprime l'hétérogénéité des populations glycaniques générées par le cycle des dolichols. En effet, dans les CHO sauvages, l'inhibition de la synthèse protéique conduit à l'accumulation du précurseur lipidique Glc₃Man₉GlcNAc₂-PP-Dol. Cette accumulation est corrélée à l'apparition d'une quantité importante d'oligomannosides

solubles $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$. De tels résultats ont été notamment observés par Spiro et Spiro (1991) à l'aide de la puromycine sur des coupes de thyroïde.

Dans le modèle B3F7, la présence d'anisomycine nous a permis de mettre en évidence :

- une accumulation progressive des espèces glucosylées $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ -PP-Dol au dépend des espèces non-glucosylées (figures 3 et 4 de l'article I).
- une augmentation considérable du matériel libéré sous forme soluble (figure 3A de l'article I). En présence de castanospermine qui représente un puissant inhibiteur des glucosidases I et II du RER, nous observons une nette accumulation de l'espèce $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$.

Le fait que l'apparition de $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ est concomitante à l'accumulation progressive du précurseur lipidique $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ -PP-Dol suggère une relation produit-substrat. Ces résultats indiquent que le $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ est libéré exclusivement par l'activité hydrolytique de l'oligosaccharyltransférase. Ainsi, l'accumulation du $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ observée en présence de castanospermine nous permet de confirmer le fait que les OSGn_2 glucosylés libérés dans les B3F7 ne peuvent quitter la lumière du RER pour rejoindre le compartiment cytosolique.

Prenant en compte cette considération, nous avons étudié, dans un deuxième temps, la nature des oligomannosides libérés en présence de castanospermine.

B. Populations oligomannosidiques libérées à partir des glycoprotéines en présence de castanospermine

En présence d'anisomycine et de castanospermine, 80 % de la radioactivité retrouvée sur le matériel soluble correspondent au $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$.

En présence de castanospermine seule, 80 % des oligomannosides solubles sont représentés cette fois par les OSGn_1 dont 60 % sont glucosylés (figure 5 de l'article I). Dans ces conditions, les populations observées sont identiques à celles retrouvées sur les glycoprotéines indiquant que les OSGn_1 auraient pour seule origine la déglycosylation des glycoprotéines.

Ainsi ces résultats nous confirment que les OSGn_1 peuvent avoir deux origines :

- les OSGn_2 libérés par l'activité hydrolytique de l'oligosaccharyltransférase qui génèrent des OSGn_1 après transport dans le compartiment cytosolique

- la déglycosylation des glycoprotéines

Ces résultats nous ont donc conduit à étudier la localisation subcellulaire des OSGn₁ libérés à partir des glycoprotéines.

C. Localisation subcellulaire des OSGn₁ libérés à partir des glycoprotéines

La perméabilisation sélective de la membrane plasmique des cellules permet de distinguer les oligomannosides solubles retrouvés dans le cytoplasme des oligomannosides solubles situés dans les vésicules intracellulaires. Pour déterminer la localisation des oligomannosides libérés, les cellules ont été perméabilisées après une expérience de pulse-chase au [2-³H] mannose effectuée en présence de castanospermine. Ainsi, cette étude nous a permis de montrer que :

- les OSGn₂ glucosylés sont majoritairement retrouvés dans les vésicules intracellulaires (75 %). Leur présence est constante durant la chasse métabolique indiquant qu'il ne peuvent quitter le RER du fait de la présence de castanospermine.
- les OSGn₁ glucosylés ou non, sont principalement retrouvés dans le cytosol (85 %) et leur quantité ne cesse d'augmenter tout au long de la chasse métabolique de façon proportionnelle à la diminution de la radioactivité liée aux glycoprotéines (figure 6 de l'article I).

II. Nature et localisation de l'enzyme de déglycosylation

Ainsi, la déglycosylation des glycoprotéines synthétisées dans les B3F7 nous a permis de mettre en évidence la libération d'OSGn₁ cytosoliques. Si la déglycosylation représente un préalable au processus proprement dit de la dégradation des glycoprotéines nouvellement synthétisées, nos résultats sont en faveur de la dégradation cytosolique impliquant le protéasome.

Cependant, la présence d'OSGn₁ cytosoliques permet de considérer à nouveau la nature de l'enzyme de déglycosylation impliquée que nous avons évoquée dans les généralités (page 58).

La figure 29 est une illustration des différentes activités glycosidases susceptibles de conduire à la formation de ces OSGn₁ (sur le modèle B3F7).

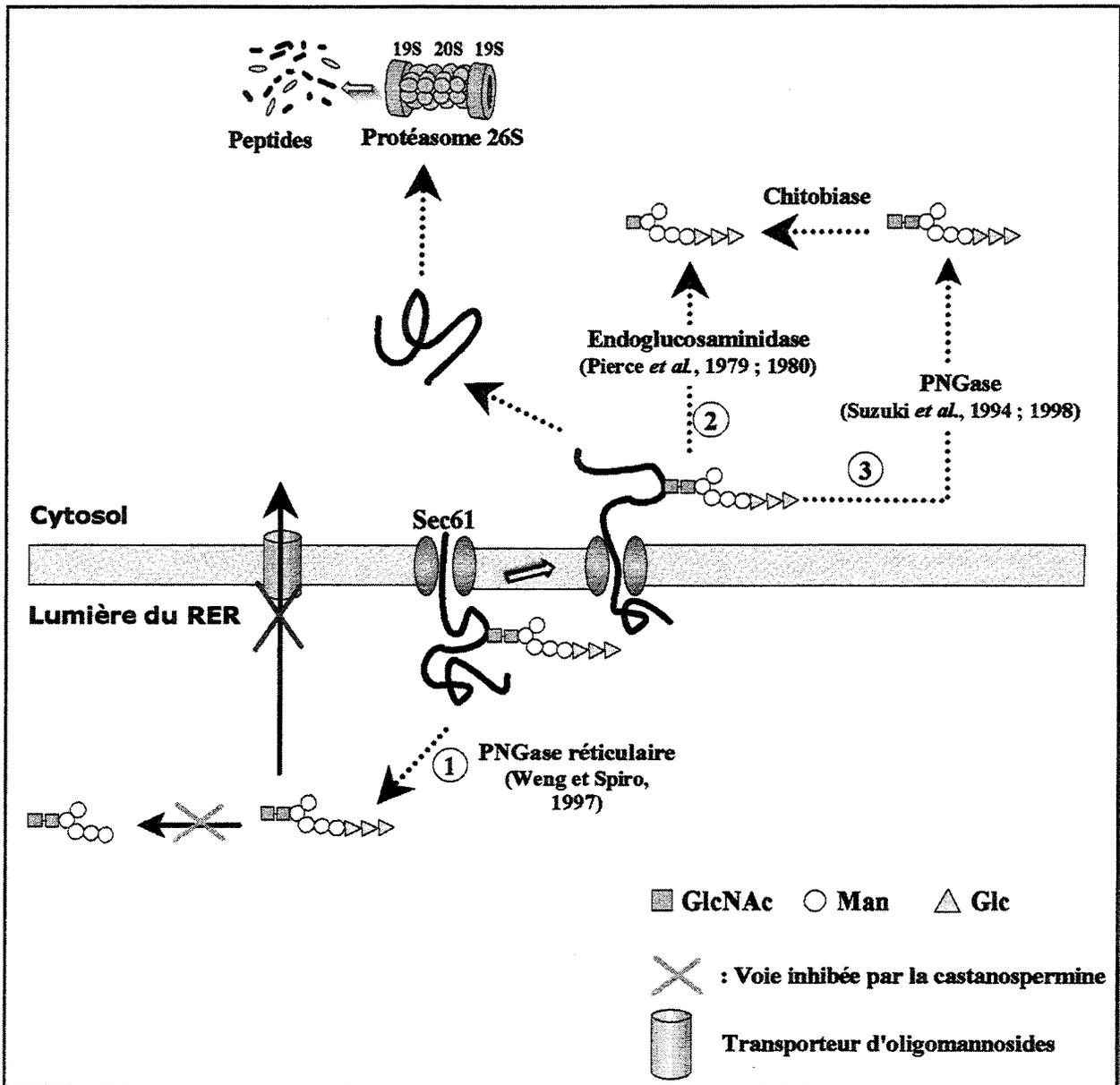


Figure 29 : Les trois voies de déglycosylation des glycoprotéines destinées à la dégradation (adapté au modèle B3F7).

•La première enzyme susceptible de conduire à la formation des OSGn₁ cytosoliques est la PNGase du RER mise en évidence par Weng et Spiro (1997) (voie 1). Dans ce cas, on peut envisager que les OSGn₂ ainsi libérés dans la lumière du RER subissent la même destinée que les OSGn₂ libérés par l'activité hydrolytique de l'oligosaccharyltransférase : après déglucosylation, ils sont transportés vers le cytosol

pour être convertis en OSGn₁. Cependant, cette première possibilité n'expliquerait pas la présence d'OSGn₁ glucosylés observés en présence de castanospermine (figure 5 de l'article I). Il paraît donc improbable qu'une activité PNGase réticulaire soit impliquée dans le mécanisme de déglycosylation.

Ainsi, seule une glycosidase cytosolique pourrait expliquer la libération des OSGn₁ glucosylés dans le cytosol : dans ce cas, la déglycosylation nécessite le rétro-transport *via* le translocon de la glycoprotéine vers le cytosol. La déglycosylation peut alors s'effectuer :

- soit par l'activité endoglucosaminidase cytosolique (voie 2) (Pierce *et al.*, 1979 ; 1980) qui produit directement les OSGn₁ observés.
- soit par l'activité PNGase cytosolique (voie 3) (Suzuki *et al.*, 1994 ; 1998) : celle-ci libère, dans un premier temps les OSGn₂ qui après action de la chitobiase donnent les OSGn₁ observés. Les études de Wiertz *et al.* (1996a) suggèrent fortement l'action de cette PNGase cytosolique, cependant, dans notre étude, nous n'avons jamais observé l'intermédiaire OSGn₂. Si cette activité est effectivement impliquée dans la déglycosylation des glycoprotéines, il faut admettre que l'efficacité de la chitobiase cytosolique empêche de mettre en évidence les OSGn₂ libérés.

III. Signification biologique de la déglycosylation des glycoprotéines dans le modèle B3F7

Ainsi, dans le modèle B3F7, nous avons montré qu'une partie des OSGn₁ retrouvés dans le compartiment cytosolique a pour origine la déglycosylation des glycoprotéines. Compte tenu des connaissances actuelles que nous avons de la dégradation des glycoprotéines nouvellement synthétisées impliquant le protéasome, la déglycosylation serait un préalable à l'étape proprement dite de protéolyse. Dans les B3F7, la déficience en Man-P-Dol synthétase implique le transfert sur les protéines de glycannes tronqués de type Glc₃Man₅GlcNAc₂ : ainsi, la présence de tels glycannes serait susceptible :

- ① de perturber, d'une part, l'étape de mise en conformation en favorisant la rétention des glycoprotéines immatures.
- ② de favoriser, d'autre part, le processus de dégradation des molécules.

A. Rétention des glycoprotéines dans le RER

Dans cette étude, nous avons montré que les glycoprotéines synthétisées dans les B3F7 sont très largement retenues dans le RER ou le compartiment proche *cis*-golgien puisque 50 % d'entre elles portent des glycanes de type oligomannosidique (espèce $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$ majoritaire) après 8 h de chasse (figure 2 de l'article I). Comme nous l'avons discuté dans les généralités (page 44), le phénomène de rétention dans le compartiment de synthèse peut être lié au caractère immature des protéines et se traduit par une interaction prolongée avec les protéines chaperons du RER.

B. Interactions prolongées avec les protéines chaperons du RER : témoins du caractère immature des glycoprotéines synthétisées dans les B3F7

Dans cette perspective, nous avons étudié la biosynthèse d'une glycoprotéine exprimée dans les B3F7 : la phosphatase alcaline placentaire humaine exprimée sous sa forme sécrétée (SeAP). Comme précédemment observé dans le mutant MadIA214 (dérivé de CHO) qui élabore des structures glycaniques tronquées de type $\text{Glc}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ sur les protéines (Ermonval *et al.*, 1997), la SeAP est très largement retenue dans les B3F7 en association avec la BiP marqueur d'une localisation réticulaire (Ermonval *et al.*, en préparation). Ces résultats semblent indiquer que l'étape de mise en conformation de la SeAP et d'une manière générale de la totalité des glycoprotéines synthétisées par les B3F7, est altérée.

D'autre part, si la spécificité de reconnaissance des lectines calnexine et calréticuline permet l'interaction des deux lectines avec des glycanes tronqués de type $\text{Glc}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ (Ware *et al.*, 1995 ; Vassilakos *et al.*, 1998), il est possible d'envisager que la présence de tels glycanes sur les glycoprotéines perturbe l'efficacité du repliement des glycoprotéines sous leur forme native.

C. Relation rétention / dégradation des glycoprotéines

De cette façon, il est envisageable qu'une rétention prolongée dans la lumière du RER puisse conduire, à plus ou moins long terme, au processus de dégradation. Récemment, Jacob *et al.* (1998) ont montré chez la levure, que les glycanes ($\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ et $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$)

pouvaient être des signaux permettant de diriger les glycoprotéines mal conformées vers la voie de dégradation. La figure 30 est une illustration des mécanismes potentiels de rétention des glycoprotéines dans les B3F7 susceptibles de conduire à la dégradation.

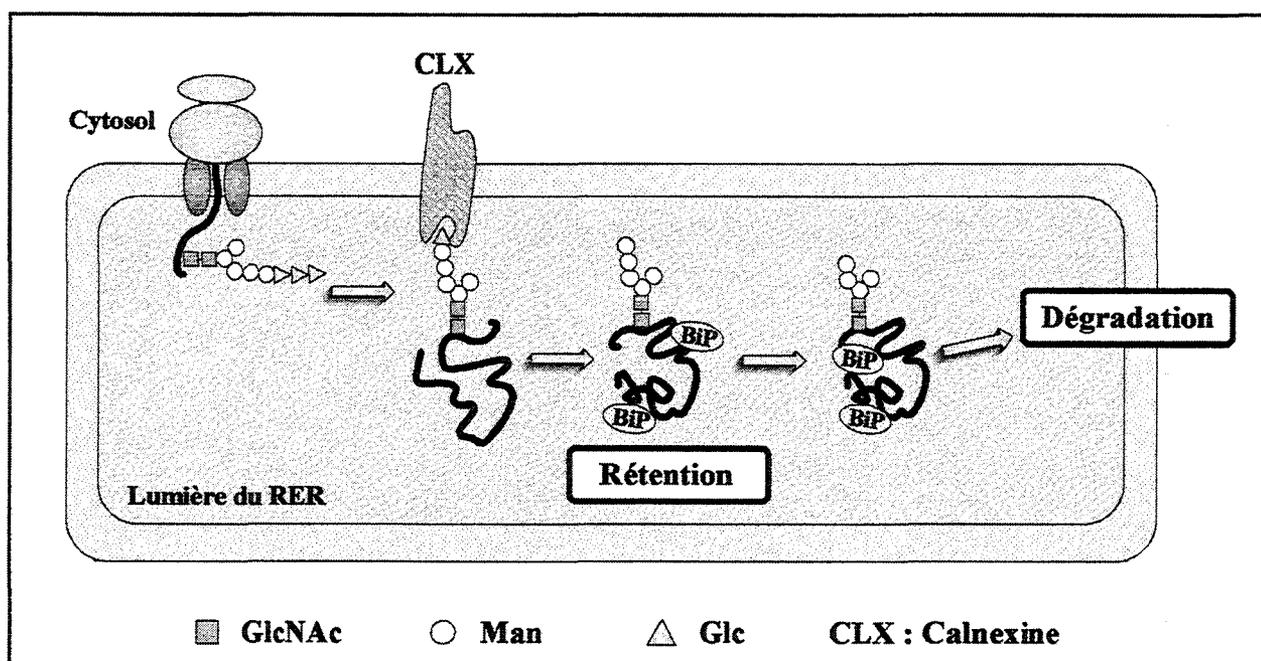


Figure 30 : La rétention des glycoprotéines nouvellement synthétisées dans le modèle B3F7 : origine potentielle de la dégradation.

Cette rétention est corrélée à l'apparition de l'espèce majoritaire $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$. Suite à l'action successive des glucosidases I et II du RER, le $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$ peut résulter de l'action de deux mannosidases :

- dans le cas d'une rétention par recyclage, l'endomannosidase golgienne située dans l'ERGIC pourrait conduire au $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$: cependant, Karaivanova *et al.* (1998) ont récemment montré que cette enzyme est absente du modèle CHO. Une deuxième enzyme qui peut être envisagée est la mannosidase I golgienne qui traduirait un recyclage à partir du *cis*-Golgi.
- dans le cas d'une rétention stricte dans le RER, le $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$ peut avoir pour origine l'action de la Man_9 -mannosidase du RER dont l'activité témoigne, d'une manière générale, d'une rétention importante des molécules dans le compartiment de synthèse.

Le fait que des oligomannosides cytosoliques soient libérés à partir des glycoprotéines maintenues dans le RER montre que :

- une grande partie de ces glycoprotéines ont pour destinée la voie de dégradation.
- cette dégradation n'implique pas la voie autophagique mais plutôt la voie cytosolique par le protéasome.

IV. Conclusion : destinée des oligomannosides libérés au cours de la dégradation des glycoprotéines

Il est vraisemblable que les OSGn₁ ayant pour origine la déglycosylation des glycoprotéines rejoignent le catabolisme des oligomannosides libérés par l'activité hydrolytique de l'oligosaccharyltransférase.

Dans le mutant de glycosylation B3F7 :

les OSGn₁, majoritairement représentés par les espèces Man₅GlcNAc₁ et Man₄GlcNAc₁, rejoignent directement le compartiment lysosomique pour être hydrolysés en Man et GlcNAc.

Dans les CHO sauvages :

les espèces Man₍₉₋₈₎GlcNAc₁ doivent préalablement subir l'action de la mannosidase cytosolique pour donner le Man₅GlcNAc₁ ou « Man₅ linéaire » avant d'être transportés dans les lysosomes.

Basée sur l'ensemble des connaissances que nous avons du modèle B3F7, la figure 31 est une illustration de l'origine et de la destinée des oligomannosides libérés au cours du processus de dégradation des glycoprotéines nouvellement synthétisées.

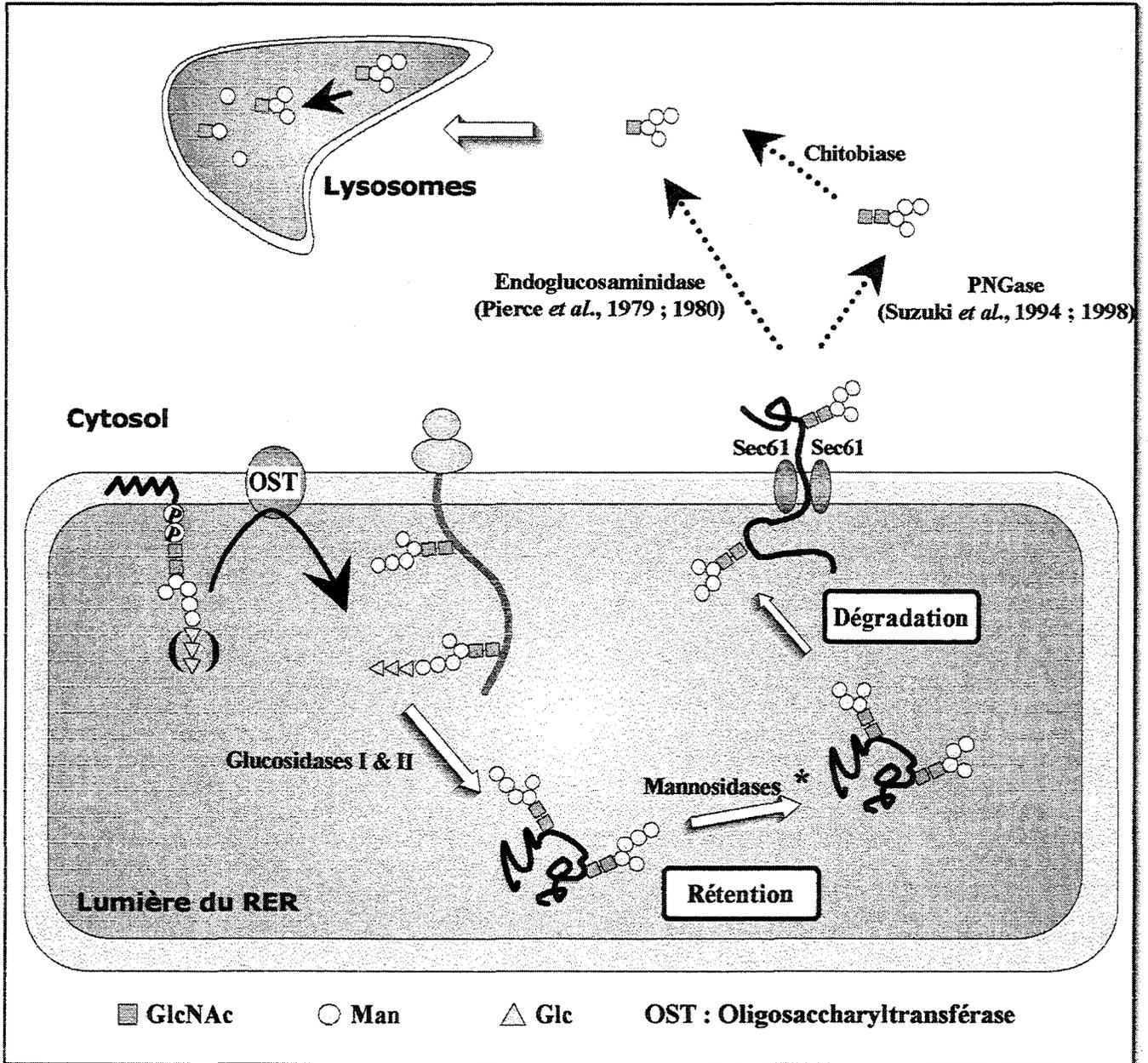


Figure 31 : Mécanismes potentiels du processus de déglycosylation des glycoprotéines nouvellement synthétisées et destinée des oligomannosides libérés (sur le modèle B3F7).

Mannosidases * :

dans le cas d'une rétention stricte : Man₉ mannosidase du RER

dans le cas d'une rétention avec recyclage : Mannosidase I golgienne

ARTICLES II ET III

Présentation du modèle du virus de l'hépatite C

I. L'hépatite C

L'hépatite C est une maladie répandue dans le monde entier. En France, on estime que 500 000 à 1 million de personnes seraient contaminées. Parmi les sujet infectés, 75 % vont développer une hépatite chronique avec une possibilité de complication en cirrhose pour 20 % d'entre eux. A long terme, l'évolution de la cirrhose peut conduire à l'apparition d'un carcinome hépatocellulaire. Actuellement, le seul traitement utilisé est l'interféron α dont l'efficacité est estimée à 10-15 % à long terme.

Longtemps appelée hépatite non A/non B, l'hépatite C est connue depuis une vingtaine d'années, mais le principal agent responsable, le virus de l'hépatite C (VHC), n'a été identifié que depuis 1989 (Choo *et al.*, 1989). Depuis, de nombreuses études ont permis de caractériser l'organisation génomique et l'expression du VHC.

II. Le virus de l'hépatite C

Le VHC est un virus enveloppé de petite taille (30-60 nm de diamètre) qui appartient à la famille des *Flaviviridae* (Rice, 1996). Son génome est constitué d'une molécule d'ARN monocaténaire, de polarité positive. Il contient environ 9600 nucléotides et code une polyprotéine de 3010 à 3033 acides aminés. Cette polyprotéine est clivée par des peptidases signal cellulaires et par deux protéases virales NS2 et NS3 pour générer un certain nombre de polypeptides représentés dans la figure 32 (pour revue voir Rice, 1996).

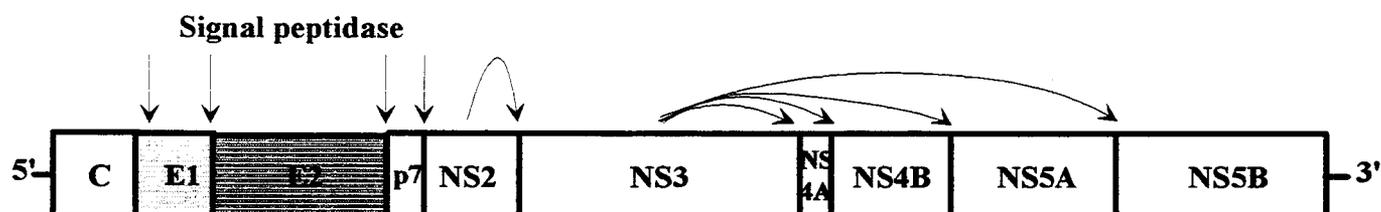


Figure 32 : Clivages de la polyprotéine codée par le génome du VHC.

Le clivage fait ainsi apparaître trois protéines structurales : une protéine de capsid, basique (C) de 21 kDa et deux N-glycosylprotéines de 31 kDa (E1) et 70 kDa (E2). Le reste de la polyprotéine contient les protéines non structurales NS2 (23 kDa), NS3 (70 kDa), NS4A (8 kDa), NS4B (27 kDa), NS5A (58 kDa) et NS5B (68 kDa). Entre les deux types de protéines, on retrouve une protéine de 7 kDa (p7) dont le rôle potentiel n'est pas encore défini.

A présent, le rôle de certaines protéines non structurales a été déterminé : ainsi, les protéines NS2 et NS3 présentent une activité protéasique directement impliquée dans le clivage de la polyprotéine (Grakoui *et al.*, 1993) et NS5B est une ARN polymérase ARN-dépendante (Behrens *et al.*, 1996).

On dispose, à ce jour, de peu d'informations concernant le cycle infectieux du virus et notamment sur la formation de l'enveloppe virale. Cependant, des études comparatives avec d'autres virus de la même famille supportent l'idée que les glycoprotéines E1 et E2 font partie de l'enveloppe du VHC (Rice, 1996). Du fait de l'absence de système cellulaire permettant d'assurer une réplication efficace du VHC, l'étude de l'assemblage de la particule virale est sensiblement limitée. Pour remédier à ce problème, des systèmes transitoires d'expression utilisant des vecteurs hétérologues tels que les virus de la Vaccine ou Sindbis permettent d'obtenir des taux d'expression élevés et facilitent l'étude de la protéine d'intérêt. Cette technique d'approche a largement contribué à l'étude de l'assemblage des glycoprotéines E1 et E2.

III. Assemblage des glycoprotéines E1 et E2

A. Les glycoprotéines du virus de l'hépatite C

Les glycoprotéines E1 et E2 sont des protéines membranaires de type I présentant un ectodomaine N-terminal et une séquence d'ancrage hydrophobe C-terminale. Elles sont très largement glycosylées puisqu'elles présentent respectivement 5/6 et 11 sites potentiels de N-glycosylation.

Grâce à l'obtention d'anticorps spécifiques de certains stades conformationnels (intermédiaires et natifs) de E1 et E2, des études préliminaires utilisant des systèmes transitoires d'expression ont permis de montrer que les glycoprotéines E1 et E2 interagissent entre elles pour former des hétérodimères (pour revue, Dubuisson, 1998). La formation des complexes E1E2 se présente

comme un phénomène lent et relativement inefficace et se traduit par deux voies d'assemblage bien distinctes au sein du RER (Figure 33) :

- une voie productive qui conduit à la formation des complexes E1E2 natifs.
- une voie non productive traduisant la formation d'agrégats E1E2 hétérogènes.

1. Voie d'assemblage des complexes E1E2 natifs

La cinétique de formation des complexes E1E2 natifs est lente ($T_{1/2}$ vie : 2h) : elle témoigne des caractéristiques propres de repliement de chacune des glycoprotéines.

En effet, des études de cinétique ont montré que la formation des ponts disulfures intramoléculaires de E1 est lente ($T_{1/2}$ vie : 1h) (Dubuisson et Rice, 1996) alors qu'elle est rapide pour E2 ($T_{1/2}$ vie : 15min). Cependant, le repliement de E2 se poursuit lentement ($T_{1/2}$ vie : 2h) pour amener progressivement la glycoprotéine vers sa forme native impliquée dans la formation de l'hétérodimère E1E2 (Michalak *et al.*, 1997). Pour E1, il semble que la formation des ponts disulfures soit un événement limitant dans le repliement de la glycoprotéine. De plus, Michalak *et al.* (1997) ont montré que l'apparition des formes oxydées de E1 n'a lieu que lorsque cette glycoprotéine est exprimée en présence de E2. Ces résultats suggèrent ainsi que E2 aurait un rôle chaperon vis-à-vis de E1 en interagissant directement avec celle-ci.

Au cours de l'étape de mise en conformation, les formes immatures de E1 et E2 se retrouvent très largement associées à la calnexine (Choukhi *et al.*, 1998), indiquant que la lectine serait directement impliquée dans le repliement progressif des deux glycoprotéines vers leur forme native.

De cette façon, les glycoprotéines E1 et E2 s'assemblent progressivement pour former les hétérodimères non covalents E1E2 natifs. Cependant, il est important de noter que cette voie d'assemblage productive ne concerne que 5 % des molécules nouvellement synthétisées. En effet, la grande majorité des molécules s'engagent dans la voie d'assemblage non productive.

2. Voie d'assemblage non productive

Celle-ci se traduit par l'association covalente des glycoprotéines E1 et E2 par la formation de ponts disulfures intermoléculaires et conduit à l'agrégation des glycoprotéines. Choukhi *et al.* (1998) ont montré que les protéines chaperons calréticuline et BiP se retrouvent largement

associées avec les complexes agrégés, témoignant d'un repliement incorrect des glycoprotéines et de leur rétention au sein du RER.

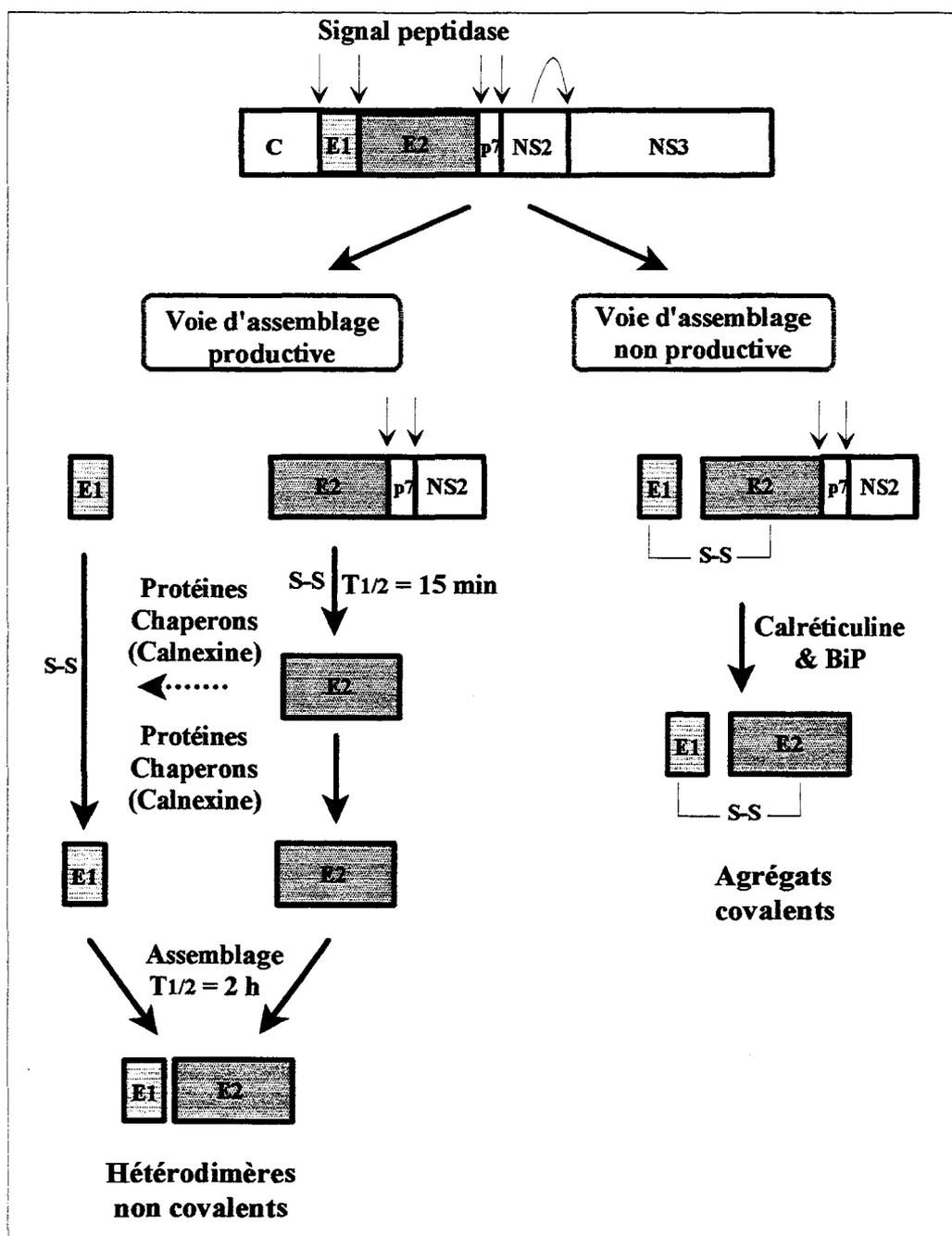


Figure 33 : Voies d'assemblage des complexes E1E2.

Ainsi, l'assemblage des complexes E1E2 natifs se présente comme un phénomène inefficace. Cependant, l'absence de glycanes de type complexe et l'absence d'expression des complexes à la surface cellulaire suggèrent que les hétérodimères non covalents E1E2 ne quittent pas le RER ou le compartiment proche *cis*-golgien. Récemment, des expériences de co-

immunolocalisation ont montré que les complexes E1E2 natifs présentaient une répartition subcellulaire identique à celle de la protéine PDI résidente du RER (Deleersnyder *et al.*, 1997), confirmant une rétention spécifique des hétérodimères glycoprotéiques au sein du RER.

B. Rétention des complexes E1E2 natifs dans le RER

D'une manière générale, il est montré que les particules virales des Flavivirus (qui appartiennent à la même famille que le VHC) apparaissent dans des vésicules intracellulaires et sont libérées de la cellule par la voie d'exocytose (Pettersson, 1991). De cette façon, la rétention des complexes E1E2 natifs dans le RER pourrait signifier que le bourgeonnement des particules virales du VHC s'effectuerait à partir des membranes du RER. Pour vérifier cette hypothèse, l'identification de signaux de rétention permettrait de comprendre les mécanismes de bourgeonnement de la particule virale mais également d'en déterminer l'origine subcellulaire.

Des études préliminaires ont porté sur la glycoprotéine E2 dont le repliement ne nécessite pas la présence de E1 et pour laquelle la rétention au sein du RER ne semble pas liée au contrôle de qualité mais impliquerait, *à priori*, une propriété intrinsèque de la glycoprotéine (Michalak *et al.* 1997). L'analyse de la séquence primaire d'acides aminés de E2 n'a pas permis de mettre en évidence de motifs peptidiques de rétention spécifique du RER, tels que le signal KDEL ou les motifs double-lysine et double-arginine. Par contre, Cocquerel *et al.* (1998) ont récemment montré que le domaine transmembranaire de E2 était directement impliqué dans la rétention de cette glycoprotéine dans le RER.

C. Le domaine transmembranaire de E2 : signal de rétention réticulaire

Selby *et al.* (1994) ont montré que la délétion des 31 acides aminés C-terminaux de E2 conduisait à la sécrétion de la glycoprotéine. Parce que ces acides aminés appartiennent au domaine d'ancrage membranaire de E2, ces résultats ont amené certains auteurs à étudier l'influence du domaine transmembranaire sur le trafic intracellulaire de la glycoprotéine E2.

Dans cet objectif, Cocquerel *et al.* (1998) ont montré que l'expression de protéines chimériques dans lesquelles le domaine transmembranaire de E2 est fusionné à l'ectodomaine de CD4, une protéine normalement exportée à la surface cellulaire, conduit à la rétention du complexe dans le RER. De la même façon, lorsque le domaine transmembranaire de E2 est

remplacé par le segment membranaire de la protéine CD4, la protéine chimérique est alors exportée à la surface de la cellule. Ces résultats semblent indiquer que le domaine transmembranaire de E2 est nécessaire et suffisant pour retenir spécifiquement la glycoprotéine dans le RER.

En considérant ces résultats et tenant compte du rôle chaperon de E2 dans le repliement de E1, il est possible d'envisager que le domaine transmembranaire de E2 corresponde, à lui seul, au signal de rétention des complexes E1E2 natifs dans le RER.

Ainsi, la mise en évidence d'un tel signal de rétention du compartiment réticulaire permettrait de confirmer le fait que le bourgeonnement de la particule virale du VHC s'effectuerait bien à partir des membranes du RER. Cependant, si la rétention semble désigner le RER comme le compartiment d'origine, il reste à déterminer la nature exacte de cette rétention : **s'agit-il d'une rétention par recyclage impliquant le trafic intracellulaire ou d'une rétention strictement réticulaire ?**

C'est précisément à cette question que nous avons tenté de répondre. Pour ce faire, nous avons considéré les structures glycaniques portées par les glycoprotéines E1 et E2 comme témoins du phénomène de rétention. En étudiant l'effet de certains agents perturbant le trafic intracellulaire sur la distribution subcellulaire des complexes E1E2 natifs, deux approches expérimentales ont été abordées : une approche biologique par des expériences de co-immunolocalisation et une approche biochimique par l'étude des glycannes portés par les glycoprotéines.

Ce travail a fait l'objet de l'article accepté dans *The Journal of Biological Chemistry* « **Hepatitis C virus glycoprotein complex localization in the endoplasmic *reticulum* involves a determinant for retention and not retrieval** » (1998)

Hepatitis C Virus Glycoprotein Complex Localization in the Endoplasmic Reticulum Involves a Determinant for Retention and Not Retrieval*

(Received for publication, April 6, 1998, and in revised form, July 15, 1998)

Sandrine Duvet^{‡§}, Laurence Cocquerel[‡], André Pillez[‡], René Cacan[§], André Verbert[§], Darius Moradpour^{||}, Czeslaw Wychowski[‡], and Jean Dubuisson^{‡**}

From the [‡]CNRS-UMR319, IBL/Institut Pasteur de Lille, 59021 Lille Cédex, France, [§]CNRS-UMR111, Université des Sciences et Technologies, 59655 Villeneuve d'Ascq Cédex, France and ^{||}Department of Medicine II, University Hospital, 79106 Freiburg, Germany

The hepatitis C virus (HCV) genome encodes two envelope glycoproteins (E1 and E2). These glycoproteins interact to form a noncovalent heterodimeric complex which in the cell accumulates in endoplasmic reticulum (ER)-like structures. The transmembrane domain of E2, at least, is involved in HCV glycoprotein complex localization in this compartment. In principle, ER localization of a protein can be the consequence of actual retention in this organelle or of retrieval from the Golgi. To determine which of these two mechanisms is responsible for HCV glycoprotein complex accumulation in the ER, the precise localization of these proteins was studied by immunofluorescence, and the processing of their glycans was analyzed. Immunolocalization of HCV glycoproteins after nocodazole treatment suggested an ER retention. In addition, HCV glycoprotein glycans were not modified by Golgi enzymes, indicating that the ER localization of these proteins is not because of their retrieval from the cis Golgi. Retention of HCV glycoprotein complexes in the ER without retrieval suggests that this compartment plays an important role for the acquisition of the envelope of HCV particles. A true retention in the ER was also observed for E2 expressed in the absence of E1 or for a chimeric protein containing the ectodomain of CD4 in fusion with the transmembrane domain of E2. These data indicate that, in HCV glycoprotein complex, the transmembrane domain of E2, at least, is responsible for true retention in the ER, without recycling through the Golgi.

Resident proteins in cellular organelles contain some information in their primary structure for determining their subcellular localization. Keeping these proteins in a particular compartment can be achieved either by a strict retention in this compartment or by retrieval. Although most integral membrane proteins of the Golgi seem to be genuinely retained (1, 2), endoplasmic reticulum (ER)¹ residence largely depends on re-

trieval mechanisms (3, 4). Many ER, luminal, and type I transmembrane proteins contain carboxyl-terminal sequences of the prototypes KDEL and KKXX, respectively (5, 6). These sequences act as retrieval signals, returning proteins that have left the compartment in which they reside (7).

Hepatitis C virus (HCV) is a positive-strand RNA virus that belongs to the *Flaviviridae* family (8). Its genome contains a long open reading frame of 9,030 to 9,099 nucleotides that is translated into a single polyprotein of 3,010 to 3,033 amino acids (9). Cleavages of this polyprotein are co- and post-translational and generate at least 10 polypeptides including 2 glycoproteins, E1 and E2 (10). These glycoproteins are heavily modified by *N*-linked glycosylation and are believed to be type I transmembrane glycoproteins with an amino-terminal ectodomain and a carboxyl-terminal hydrophobic anchor. For E2, carboxyl-terminal deletions removing its hydrophobic region result in secretion of the ectodomain. This is in accordance with other data proposing that the hydrophobic anchor domain begins at amino acid 718 (position on the polyprotein) (11, 12). The situation appears to be more confusing for E1, because a truncated form ending at amino acid 340 is secreted only if it contains an internal deletion between amino acids 262 and 290, suggesting that a second membrane anchor might exist (13). However, truncated forms ending at amino acid 311 or 334 and containing this internal sequence can also be secreted (11, 14). Because E1 and its truncated forms do not fold properly in the absence of E2 (11), the lack of secretion of some truncated forms of E1 can be because of retention in the ER by interaction with chaperones. E1, like E2, is probably anchored by its carboxyl-terminal hydrophobic sequence, and the amino-terminal limit of the potential transmembrane domain of E1 remains to be established. Studies using transient expression systems have shown that E2 interacts with E1 to form a noncovalent heterodimer (15). However, the efficiency of HCV glycoprotein assembly is low, and a large portion of them form heterogeneous disulfide-linked aggregates (16, 17).

Prolonged interactions of HCV glycoprotein complexes with ER chaperones has been observed (18). It has initially been suggested that association of HCV oligomers with calnexin could be responsible for their continued retention in an intracellular compartment (17). However, more recent data indicate that E1E2 complexes in their native form do not interact any longer with calnexin and are still retained in a pre-medial Golgi compartment (15). This suggests that HCV glycoprotein com-

* This work was supported by the CNRS, the Institut Pasteur de Lille, and Association pour la Recherche sur le cancer Grant 1039. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

|| Darius Moradpour was supported by DFG Grant Mo 799/1-1.

** To whom correspondence should be addressed: Equipe Hépatite C, CNRS-UMR 319, Institut de Biologie de Lille and Institut Pasteur de Lille, 1 rue Calmette, BP447, 59021 Lille cédex, France. Tel.: 33 3 20 87 11 60; Fax: 33 3 20 87 11 11; E-mail: jdbuis@infobiogen.fr.

¹ The abbreviations used are: ER, endoplasmic reticulum; HCV, hepatitis C virus; mAb, monoclonal antibody; BFA, brefeldin A; endo H and

D, endo β -D-N-acetylglucosaminidase H and D, respectively; PNGase F, peptide N-glycanase F; HPLC, high performance liquid chromatography; PDI, protein disulfide isomerase; ERGIC, ER-to-Golgi intermediate compartment.

ER Retention of Hepatitis C Virus Glycoprotein Complex

plexes contain a retention signal for localization in an intracellular compartment. In addition, we have shown that a signal for ER localization of E2 maps to its transmembrane domain (19). The purpose of this work was to identify more precisely the subcellular localization of HCV glycoprotein complex and to study the mechanism involved. Immunolocalization of HCV glycoproteins suggested an ER retention. In addition, HCV glycoprotein glycans were not modified by Golgi enzymes, indicating that the ER localization of these proteins is not because of their retrieval from the cis Golgi.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials—All culture reagents were supplied by Life Technologies, Inc. [$^2\text{-}^3\text{H}$]Mannose (429 GBq/mmol) was purchased from Amersham Pharmacia Biotech. ^{35}S -Protein labeling mix was obtained from NEN Life Science Products. Endo β -D-N-acetylglucosaminidase H (endo H) and peptide N-glycanase F (PNGase F) were from New England Biolabs. Endo β -D-N-acetylglucosaminidase D (endo D) was from Boehringer Mannheim. L-1-Tosylamido-2-phenylethyl chloromethyl ketone-treated trypsin, Jack bean α -mannosidase, brefeldin A (BFA), Triton X-100, Igepal CA-630, puromycin, and tetracycline were from Sigma. Protein A-Sepharose CL-4B and concanavalin A-Sepharose were from Amersham Pharmacia Biotech. Lysine-fixable and -nonfixable Texas red dextran, average molecular weight 10,000 and 70,000, and lucifer yellow were purchased from Molecular Probes. Rabbit anti-mouse IgG was purchased from DAKO (Copenhagen, Denmark). Rhodamine and Cy2-conjugated donkey anti-mouse and anti-rabbit IgG were from Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA). Monoclonal antibodies (mAbs) A4 (Anti-E1 (16)), H53 (Anti-E2 (19)), and OKT4 (anti-CD4 (20)) were produced *in vitro* by using a MiniPerm apparatus (Heraeus) as recommended by the manufacturer. Rabbit antibodies to PDI (SPA-890) and Rab1 were purchased from Stress Gen (Victoria, Canada) and Zymed Laboratories Inc. (San Francisco, CA), respectively. Rabbit polyclonal antibody to mannosidase II (21) and mouse mAb to ERGIC-53 (G1/93) (22) were kindly provided by K. Moremen (University of Georgia) and H.-P. Hauri (University of Basel), respectively.

Cell Culture—The HepG2 and CV-1 cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA. The UHCV-11.4 cell line derives from the U-2 OS human osteosarcoma cell line (ATCC HTB-96) and has been described (23). This cell line contains a tetracycline-regulated system that allows tightly controlled expression of the full-length HCV polyprotein. Cell monolayers were grown in Dulbecco's modified essential medium supplemented with 10% fetal bovine serum. The UHCV-11.4 cell line was also supplemented with 500 $\mu\text{g/ml}$ G418, 1 $\mu\text{g/ml}$ puromycin, and 1 $\mu\text{g/ml}$ tetracycline. To allow expression of HCV polyprotein, UHCV-11.4 cells were rinsed twice with Dulbecco's modified essential medium and incubated for an additional 24 h in the same medium deprived of tetracycline as described (23).

Growth of Viruses—Stocks of vaccinia virus recombinants expressing HCV proteins were grown and titrated on CV-1 monolayers. Vaccinia virus recombinants vTF7-3 (a vaccinia virus recombinant expressing the T7 DNA-dependent RNA polymerase) (24), vE1E2p7 (a vaccinia virus recombinant expressing HCV glycoproteins E1 and E2, and the p7 polypeptide), vE2p7 (a vaccinia virus recombinant expressing HCV glycoprotein E2 and the p7 polypeptide) (25), and vCD4-E2₇₁₈ (a vaccinia virus recombinant expressing the ectodomain of CD4 fused to the transmembrane domain of E2) (19) were used in this work.

Immunofluorescence Microscopy—Subconfluent HepG2 or UHCV-11.4 cells were grown on coverslips. For HCV glycoprotein expression in HepG2 cells, subconfluent monolayers were coinfecting by vTF7-3 and vaccinia virus recombinants expressing HCV glycoproteins. For HCV protein expression in UHCV-11.4 cells, subconfluent monolayers were rinsed twice with medium deprived of tetracycline and incubated in the same medium. At 6 h post-infection (HepG2 cells) or after 24 h without tetracycline (UHCV-11.4 cells), cells were fixed for 10 min with paraformaldehyde (4% in phosphate-buffered saline). Cells were permeabilized or not for 30 min at room temperature with TBS (50 mM Tris-Cl (pH 7.5), 150 mM NaCl) containing 0.1% Triton X-100. Immunofluorescence was carried out as described (15).

Metabolic Labeling and Immunoprecipitation—Cells expressing HCV proteins were metabolically labeled with ^{35}S -protein labeling mix (3.7×10^6 Bq/ml) as described previously (16). Cells were lysed with 0.5% Igepal CA-630 in TBS. Immunoprecipitations were carried out as described (17).

For *in vivo* labeling of glycan moieties, HepG2 cells were infected with the appropriate vaccinia virus recombinants and pulse-labeled for

30 min with 3.7×10^6 Bq/ml [$^2\text{-}^3\text{H}$]mannose in α -minimum essential medium containing 0.5 mM glucose and 10% dialyzed fetal bovine serum. After 4 h of chase, cells were lysed in TBS, 0.5% Igepal CA-630, and the lysates were used for immunoprecipitation.

Glycosidase Digestions—Treatment with endo H (19), endo D (26), and α -mannosidase (27) were performed as described.

Analysis of Oligosaccharide Material—Immunoprecipitated [$^2\text{-}^3\text{H}$]mannose-labeled proteins were digested overnight at room temperature with 0.2 mg of L-1-tosylamido-2-phenylethyl chloromethyl ketone-treated trypsin in 0.1 M ammonium bicarbonate (pH 7.9). Trypsin-treated proteins were boiled for 10 min to inactivate the trypsin, and the peptides were dried and dissolved in 20 mM sodium phosphate (pH 7.5) containing 50 mM EDTA and 0.2 mg/ml NaN_3 , in 50% glycerol. The peptides were incubated overnight at 37 °C in the presence of PNGase F (0.5 units). For some samples, endo H (10 millimoles) digestion was performed in 50 mM sodium citrate buffer (pH 5.5). Size analysis of the glycan moieties was achieved by HPLC on an amino-derivatized column ASAHIPAK $\text{NH}_2\text{P-50}$ (250×4.6 mm) (Asahi, Kawasaki-ku, Japan) with a solvent system of acetonitrile/water from 70:30 (v/v) to 50:50 (v/v) at a flow rate of 1 ml/min over 80 min. Oligomannosides were identified as described previously (28) by their retention time. Separation of labeled oligosaccharides was monitored by continuous flow detection of radioactivity with Flo-one β detector (Packard).

Affinity Chromatography of Labeled N-Glycans—The lectin column (concanavalin A-Sepharose, 5×0.5 cm) was equilibrated at room temperature in 5 mM sodium acetate buffer (pH 5.2) containing 0.1 M NaCl, 1 mM MnCl_2 , 1 mM CaCl_2 , and 1 mM MgCl_2 . Glycan fractions (resulting from PNGase F digestion) were applied to the column, which was then eluted with the equilibration buffer (buffer a). Weakly retained glycans were eluted with 10 mM methyl α -D-glucoside in the equilibration buffer (buffer b), and strongly retained glycans were eluted with 100 mM α -D-mannoside (buffer c).

RESULTS

Immunolocalization of HCV Glycoprotein Complex—Recent data from our group indicate that native HCV glycoprotein complexes are localized in ER-like structures and are not transported beyond the cis or medial Golgi (15). However these data do not show whether HCV glycoproteins are retained in the ER or transported beyond the ER and cycle between early compartments of the secretory pathway. As a first approach to answer this question, cells expressing HCV glycoproteins were analyzed by immunofluorescence studies. Because of the absence of an efficient system for cell culture replication of HCV, we used a cell line that can express the full-length HCV polyprotein in a tightly regulated manner (UHCV-11.4) (23). This also has the advantage of avoiding morphological modifications of some subcellular compartments because of a viral vector such as vaccinia virus. Before identifying the precise subcellular localization of HCV glycoproteins by immunofluorescence, we first analyzed the formation of native E1E2 complexes in this cell line. Using the vaccinia/T7 expression system, we have previously shown that the assembly of E1E2 heterodimers is slow and inefficient (15). When expressed in UHCV-11.4 cells, HCV glycoproteins showed the same tendency to aggregate (data not shown), suggesting that accumulation of misfolded HCV glycoproteins is not because of high levels of expression or to the vaccinia virus vector. This tendency to aggregate is therefore probably an intrinsic property of these glycoproteins. In addition, the formation of native E1E2 complexes in UHCV-11.4 cell line was equally slow, as shown by the kinetics of recognition of HCV glycoproteins with a conformation-sensitive E2-reactive mAb (H53), which specifically reacts with the noncovalent E1E2 heterodimer (Fig. 1) (15, 19). mAb H53 was used throughout this work to localize E2 or E1E2 complexes. The use of this mAb allowed us to study the subcellular localization of properly folded E2 or E1E2 complexes without the background because of the presence of a large portion of misfolded proteins that can be retained in the ER by interacting with chaperones.

To identify the HCV glycoprotein-containing organelle(s), we employed double-label immunofluorescence microscopy using

ER Retention of Hepatitis C Virus Glycoprotein Complex

antibodies to known ER, intermediate compartment, and Golgi antigens. As previously observed with the vaccinia/T7 expression system, no fluorescence was detected on the surface of permeabilized cells expressing HCV polyprotein when reacted with mAb H53 (data not shown). When the cells were permeabilized, HCV glycoproteins showed mainly an ER-like distribution of fluorescence (Fig. 2), and some spots with a higher intensity of fluorescence were also detected. Treatment with cycloheximide for 4 or 8 h did not induce any change in the distribution of fluorescence (data not shown). The pattern observed after labeling with mAb H53 was similar to that revealed by an antibody against PDI (an ER resident protein) and different from those shown by antibodies directed against mannosidase II (a marker of the Golgi apparatus) or Rab1 (a marker of the ER-to-Golgi intermediate compartment (ERGIC) (Fig. 2). Similar results were observed when HCV glycoproteins are expressed in HepG2 cells by using the vaccinia/T7 expres-

sion system (data not shown). It has to be noted that the brighter spots detected with mAb H53 colocalized with PDI and did not colocalize with markers of the endocytic pathway (data not shown). Because intracellular native HCV glycoproteins are rather stable (15), these spots likely correspond to accumulation of HCV glycoproteins in some areas of the ER. It is likely that expression of HCV polyprotein induces proliferation of ER membranes as observed in flavivirus infection (10).

Although no clear colocalization of HCV glycoproteins was observed with markers of the Golgi apparatus or the ERGIC, our data do not exclude transport to the cis Golgi followed by recycling to the ER as observed for luminal proteins containing a carboxyl-terminal sequence of the prototype KDEL (3, 29, 30). As a first approach to answer this question, cells expressing the HCV polyprotein (UHCV-11.4) were treated with nocodazole. This agent disrupts microtubules, leading to a desintegration of the Golgi and interruption of traffic between the Golgi, the ERGIC, and the ER (31, 32). The fate of HCV glycoproteins was compared with that of PDI, an ER resident protein that contains a KDEL signal for retrieval. After treatment for 5 h with 20 μ M nocodazole, much of PDI concentrated in large spots (Fig. 3). Such concentrated spots were not observed with mAb H53. However, there was a redistribution of the bright spots observed in the absence of treatment. An ERGIC marker, ERGIC-53 (22), showed the expected perinuclear staining without treatment, which changed to more punctuated staining after treatment with nocodazole. A similar desintegration of structure was observed for the Golgi (Fig. 3).

Analysis of the Processing of HCV Glycoprotein Glycans— Although some differences were observed by immunofluorescence between HCV glycoproteins and PDI after nocodazole treatment, these data did not allow to clearly conclude that HCV glycoproteins are strictly retained in the ER. Another

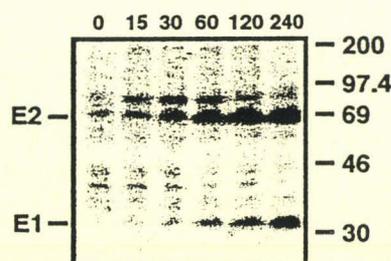


FIG. 1. Formation of E1E2 complexes in UHCV-11.4 cells. After 24-h cultivation in the absence of tetracycline, UHCV-11.4 cells were pulse-labeled for 10 min with [35 S]methionine and chased for the indicated times (in min). After immunoprecipitation, samples were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (10% acrylamide). HCV glycoproteins are indicated on the left. Sizes ($\times 10^3$ Da) of protein molecular mass markers are indicated on the right.

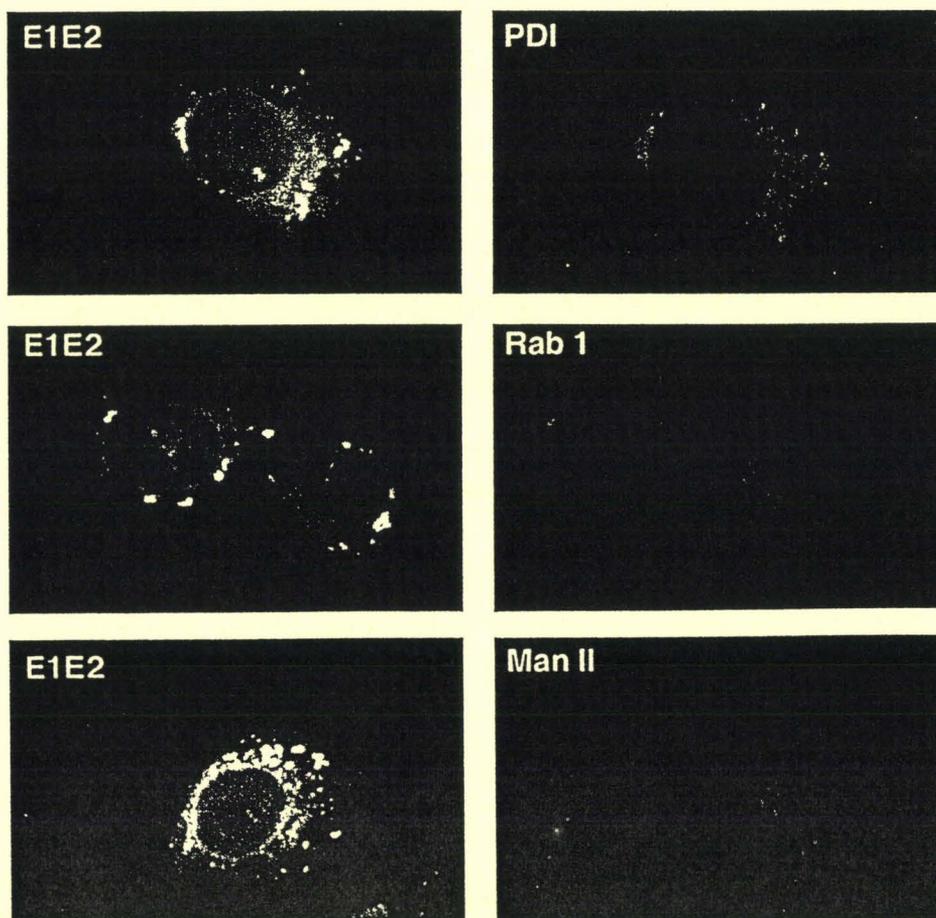


FIG. 2. Indirect double-label immunofluorescence characterization of the vacuole-containing HCV glycoprotein complexes. After a 24-h cultivation in the absence of tetracycline, UHCV-11.4 cells were fixed with paraformaldehyde, permeabilized with Triton X-100, and labeled with anti-E2 mAb H53 (secondary antibody anti-mouse IgG-Cy2) and antibodies to PDI, Rab1, or mannosidase II (Man II) (secondary donkey anti-rabbit IgG-iodamine). Magnification 625 \times .

ER Retention of Hepatitis C Virus Glycoprotein Complex

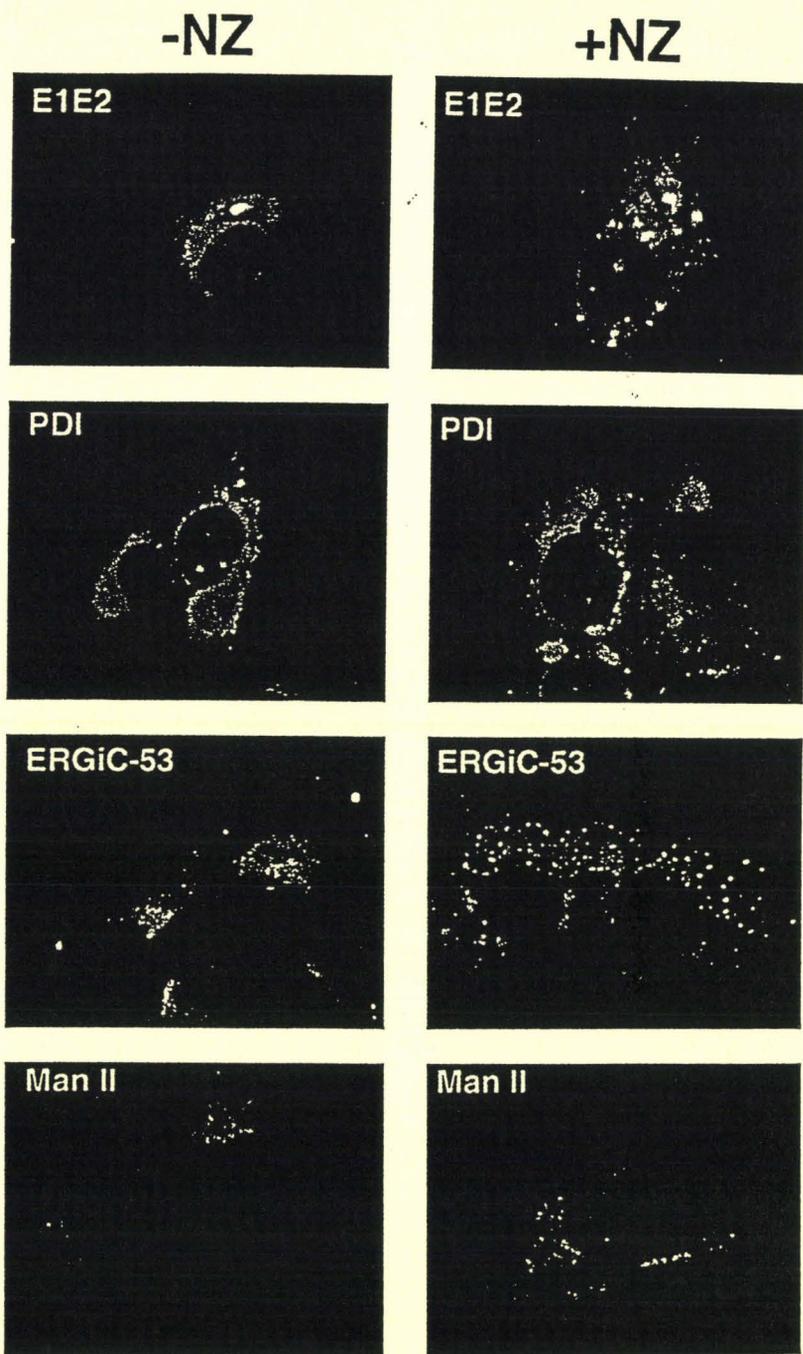


FIG. 3. Effect of nocodazole treatment on the intracellular accumulation of HCV glycoprotein complexes. After a 20-h cultivation in the absence of tetracycline, UHCV-11.4 cells were incubated for an additional 5 h in the presence or absence of 20 μ M Nocodazole (NZ). Cells were fixed with paraformaldehyde, permeabilized with Triton X-100, and labeled with anti-E2 mAb H53, anti-ERGiC-53 mAb G1/93 (secondary donkey anti-mouse IgG-Cy2) or antibodies to PDI, or mannosidase II (*Man II*) (secondary donkey anti-rabbit IgG-Cy2). Magnification 625 \times .

approach to tackle this problem was to analyze the modifications that their glycans have potentially acquired in the compartment into which they have transited. It has been previously shown that HCV glycoproteins are endo H-sensitive when analyzed in pulse-chase experiments with chase times of up to 8 h (15). Similar results were observed for HCV glycoproteins expressed in the UHCV-11.4 cell line (Fig. 4). The lack of complex-type glycosylation excludes transit through the medial- but not the cis Golgi. In the cis Golgi, HCV glycoproteins would be exposed to Golgi α -mannosidase I, which would process its sugar chains to $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ (33). Molecules containing $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ should accumulate after several cycles through the cis Golgi and back to the ER, and they should be sensitive to endo D (34). As shown in Fig. 4, HCV glycoproteins remained endo D-resistant after 4 h of chase, suggesting that these molecules do not cycle between the ER and the cis Golgi. However, one last intermediate in sugar chain processing in the Golgi that would be sensitive to endo H and resistant to

endo D could be $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_3$, formed by the action of GlcNAc-transferase I in the medial Golgi.

To better characterize their potential processing, HCV glycoprotein glycans were removed by PNGaseF treatment and analyzed by affinity chromatography and HPLC. For this approach, HCV glycoproteins were labeled with [2- ^3H]mannose and immunoprecipitated with mAb H53 before PNGaseF treatment and characterization of labeled glycans. However, because the level of HCV glycoprotein expression in UHCV-11.4 cells was too low for such analysis, we used the vaccinia/T7 system to obtain higher expression levels of HCV glycoproteins. As a preliminary analysis, we first compared the sensitivity of HCV glycoproteins to endo H, endo D, and jack bean α -mannosidase to confirm that the processing of their glycans is similar in both expression systems. HCV glycoproteins were sensitive to endo H treatment and resistant to endo D treatment in both systems (Fig. 4). In addition, HCV glycoproteins showed some sensitivity to jack bean α -mannosidase treatment in both ex-

ER Retention of Hepatitis C Virus Glycoprotein Complex

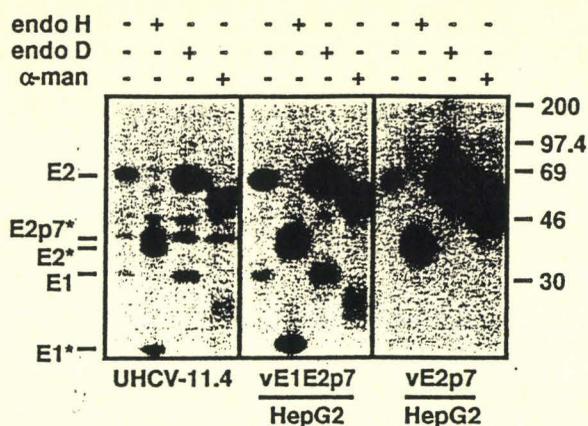


FIG. 4. Analysis of the sensitivity of HCV glycoprotein complexes to glycosidase treatments. UHCV-11.4 cells (cultured for 24 h in the absence of tetracycline), HepG2 cells coinfecting with vTF7-3 and vE1E2p7 (a vaccinia recombinant expressing HCV glycoproteins E1 and E2 and the p7 polypeptide), or vE2p7 (a vaccinia recombinant expressing HCV glycoprotein E2 and the p7 polypeptide) were pulse-labeled for 10 min with [35 S]methionine, chased for an additional 4 h, and lysed with Igepal CA-630. Cell lysates were immunoprecipitated with mAb H53 followed in the indicated cases by treatment with endo H, endo D, or jack bean α -mannosidase and analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (10% acrylamide). HCV glycoproteins are indicated on the left. Sizes ($\times 10^3$ Da) of protein molecular mass markers are indicated on the right. Deglycosylated proteins are indicated by asterisks.

pression systems, and their shift in electrophoretic mobility was similar using both expression systems. Affinity chromatography analysis of HCV glycoprotein glycans removed by PNGase F treatment showed that 100% of the radioactive glycans bound strongly to concanavalin A and eluted in a buffer containing 100 mM α -D-mannoside (buffer c) (Fig. 5A), indicating that HCV glycoprotein oligosaccharide moieties are of the oligomannoside type only. In addition, HPLC analysis of the glycans released by PNGase F treatment demonstrated the presence of three species: Man₉, Man₈, and Man₇GlcNAc₂, respectively (Fig. 5B). These results were confirmed by the fact that 100% of the radioactivity bound to E1E2 complexes could be released by endo H. As expected, HPLC analysis of the oligosaccharides released by endo H revealed the same species liberated as Man₉, Man₈, and Man₇GlcNAc₁ (Fig. 5C). That the oligosaccharide precursor, which is transferred onto nascent proteins, is the Glc₃Man₉GlcNAc₂ reveals the sequential actions of ER glucosylases I and II and at least the action of ER mannosidase-yielding Man₉ species. The presence of Man₇ is probably because of trimming of mannose residues, occurring after prolonged residence in the ER (27). Indeed, both Man₉ mannosidase (35) and soluble ER mannosidase (36) have been demonstrated to be able to trim mannosidic linkage down to Man₆GlcNAc₂ species. The nature of the glycans observed in this work suggested two possibilities: either HCV glycoproteins were retained in the ER and could not reach the Golgi vesicles where additional processing takes place or the *N*-glycosylation sites could not be modified even in the presence of mannosidases and glycosyltransferases. To test the second hypothesis, a redistribution of Golgi enzymes into the ER was induced by BFA treatment (37). Labeled HCV-glycoprotein oligosaccharides obtained from BFA-treated cells were analyzed by affinity chromatography on a concanavalin A column (Fig. 6A). Twenty-four percent of the radioactivity was eluted in the equilibration buffer (buffer a), demonstrating that some glycans have been processed into complex types. Seventy-six percent of the radioactive oligosaccharides remained of oligomannoside type and were eluted in a buffer containing 100 mM α -D-mannoside (buffer c). In addition, HPLC analysis of this fraction revealed

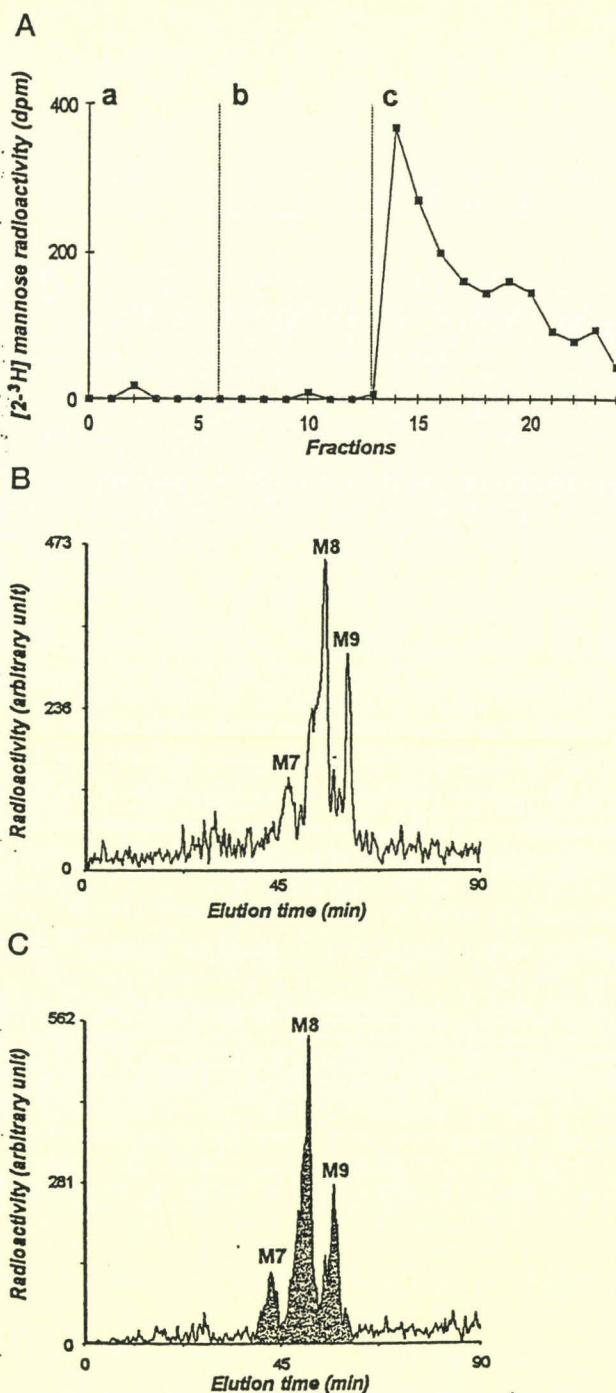


FIG. 5. Analysis of the oligosaccharides bound to HCV glycoprotein complexes. HepG2 cells were coinfecting with vTF7-3 and vE1E2p7. At 4.5 h post-infection, infected cells were pulse-labeled for 30 min with [2 - 3 H]mannose, chased for an additional 4 h, and lysed with Igepal CA-630. Cell lysates were used for immunoprecipitation with mAb H53, and labeled glycans were removed by PNGase F treatment as described under "Experimental Procedures." Panel A represents concanavalin A-Sepharose chromatography of glycan fractions obtained after PNGase F treatment using the equilibration buffer alone (a), with 10 mM methyl α -D-glucoside (b), or with 100 mM methyl α -D-mannoside (c). Panels B and C show HPLC analysis of glycans bound to immunoprecipitated glycoproteins after PNGase F or endo H treatment, respectively. M7, M8, and M9 indicate oligosaccharide species possessing two (open peaks) or one (shaded peaks) GlcNAc residues at their reducing end and 7, 8, or 9 mannose residues, respectively.

the presence of smaller species (Man₍₇₋₉₎GlcNAc₂) (Fig. 6B) when compared with the ones observed in the absence of BFA (Fig. 5B). Together these data indicate that the absence of processing of HCV glycoprotein glycans is not because of their

ER Retention of Hepatitis C Virus Glycoprotein Complex

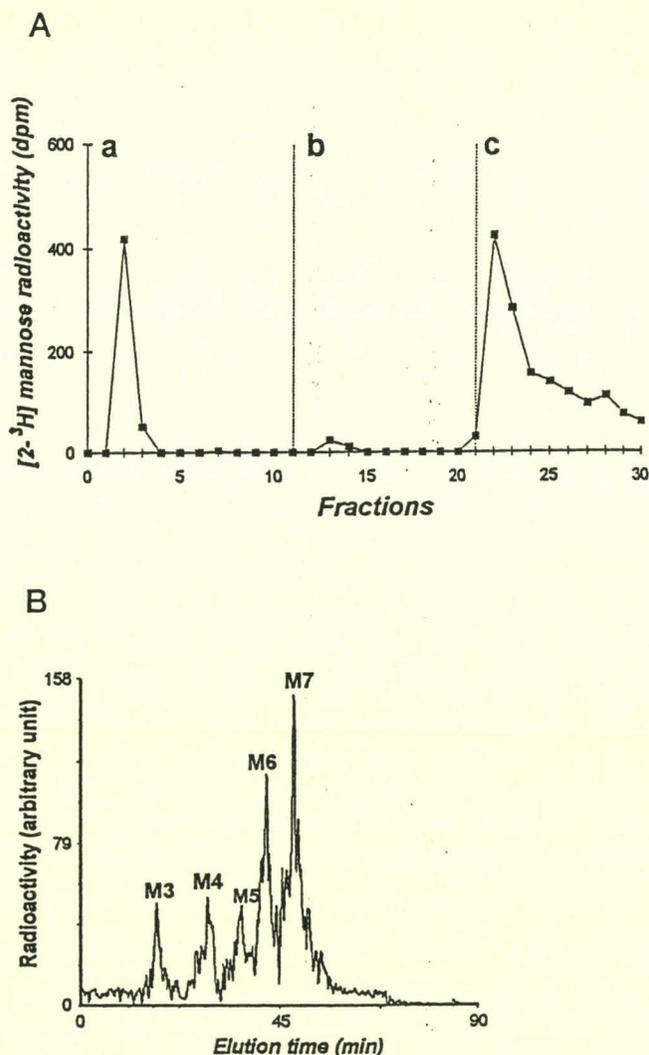


FIG. 6. Effect of BFA on the processing of the glycans bound to HCV glycoprotein complexes. HepG2 cells were coinfectd with vTF7-3 and vE1E2p7. At 4.5 h post-infection, infected cells were pulse-labeled for 30 min with [2-³H]mannose, chased for an additional 4 h in the presence of BFA (10 μ g/ml), and lysed with Igepal CA-630. Cell lysates were used for immunoprecipitation with mAb H53, and labeled glycans were removed by PNGase F treatment as described under "Experimental Procedures." The glycan fraction was submitted to concanavalin A-Sepharose affinity chromatography in the conditions described in Fig. 5 (panel A). Panel B shows an HPLC analysis of the fraction eluted with 100 mM methyl α -D-mannoside (c). M3, M4, M5, M6, and M7 indicate oligosaccharide species possessing two GlcNAc residues at their reducing end and 3, 4, 5, 6, or 7 mannose residues, respectively.

inaccessibility to Golgi mannosidases and glycosyltransferases.

The Transmembrane Domain of E2 Is a Determinant for ER Retention and Not Retrieval—Previous data from our group have shown that E2 glycoprotein expressed in the absence of E1 is retained in the ER or a pre-medial Golgi compartment and that the signal for E2 subcellular localization maps to its transmembrane domain (19). We were therefore interested to determine whether E2 expressed in the absence of E1 would be retained in the ER, like E1E2 complex, without any recycling from the cis Golgi. When analyzed by double immunofluorescence, expression of E2 alone showed a pattern similar to that revealed by an antibody against PDI and different from those shown by antibodies directed against mannosidase II or Rab1 (data not shown). As shown in Fig. 4, E2 expressed in the absence of E1 was endo H-sensitive and endo D-resistant. It also showed some sensitivity to jack bean α -mannosidase treatment, similar to what was observed when E1 and E2 were

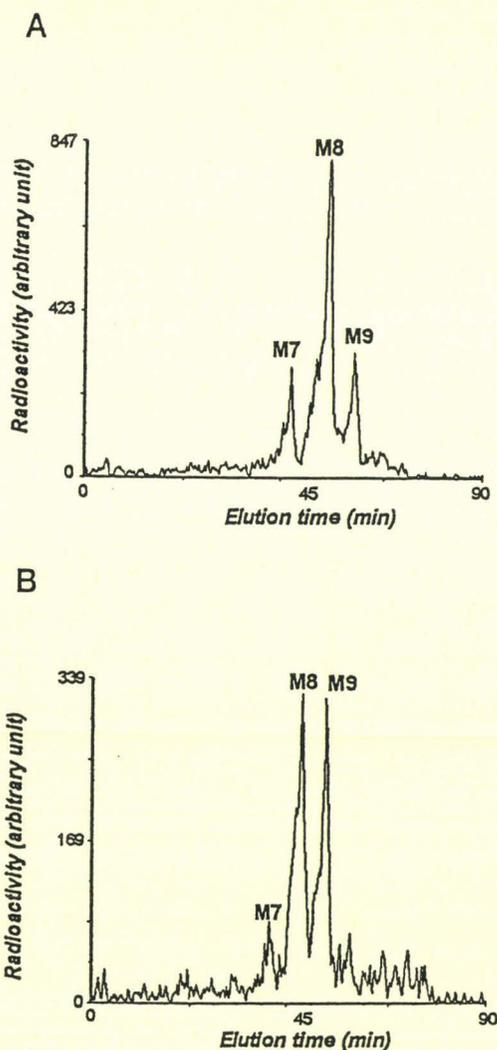


FIG. 7. The transmembrane domain of E2 is a determinant for ER retention. HepG2 cells were coinfectd with vTF7-3 and vaccinia virus recombinants expressing E2 alone (panel A) or a chimeric protein expressing the ectodomain of CD4 fused to the transmembrane domain of E2 (CD4-E2₇₁₉) (panel B). At 4.5 h post-infection, infected cells were pulse-labeled for 30 min with [2-³H]mannose, chased for an additional 4 h, and lysed with Igepal CA-630. Cell lysates were used for immunoprecipitation with mAb H53 (anti-E2) or OKT4 (anti-CD4), and labeled glycans were removed by PNGase F treatment as described under "Experimental Procedures." Glycan fractions were analyzed by HPLC. Identification of the peaks is as indicated in Fig. 5.

coexpressed. HPLC analysis of E2 glycans revealed the same species (Man₍₉₋₇₎GlcNAc₂) as observed for E1E2 complexes (Fig. 7A). In addition, the glycans of a chimeric protein containing the ectodomain of CD4 (a protein normally expressed to the cell surface) fused to the transmembrane domain of E2 showed a similar HPLC profile (Fig. 7B). Together these data indicate that the transmembrane domain of E2 is responsible for genuine retention in the ER, without recycling through the Golgi.

DISCUSSION

Immunolocalization of HCV glycoproteins and analysis of their glycans showed that these proteins are strictly retained in the ER. In addition, this retention could be mediated by at least the transmembrane domain of E2. A growing number of ER retention signals have been identified. The best characterized of these motifs are KDEL-COOH, KKXX-COOH and NH₂-RR, all of which seem to function by retrieval from post-ER compartments (38-40). For KDEL-bearing proteins, deletion of the retrieval motif leads to their secretion. However, these proteins are secreted at different rates and in general very slowly (41).

The KDEL motif, as originally proposed (5), acts then as a salvage mechanism to return proteins that have left the ER. Resident ER proteins would be largely excluded from vesicular export because their high local concentration favors intermolecular interactions or because of the presence of retention signals (42). Recently, it has been proposed that export from the ER may occur through a selective mechanism (43). Such a selective export may involve a di-acidic signal (DXE) on the cytoplasmic tail of transmembrane proteins. HCV glycoproteins do not contain a cytoplasmic tail and therefore do not possess a positive DXE-like export signal. However, in the absence of this type of signal, we would expect to detect some slow release of HCV glycoproteins out of the ER. Strict retention in the ER has recently been described for unassembled IgM intermediates and for the uncleaved precursor of the human asialoglycoprotein receptor H2a subunit (26, 44). Retention of these proteins is because of quality control, which contrary to what is usually observed (45, 46), does not involve retrieval in these cases. For HCV glycoproteins, it has been shown that ER retention is not because of quality control. Indeed, HCV glycoprotein complexes in their native form do not interact with ER chaperones (15, 18). In addition, replacement of the transmembrane domain of E2 by the transmembrane domain and cytosolic tail of CD4 leads to its export to the cell surface (19). ER localization of some cytosolic proteins can be mediated by a hydrophobic sequence at their carboxyl termini (47, 48). For these proteins, it has not been shown whether a mechanism for retrieval or strict retention is involved. Similarly, the transmembrane domain of Golgi proteins and part of their flanking regions contain sufficient information for Golgi retention (7). For these proteins, subcellular localization is not because of retrieval from other compartments but to strict retention. Although the mechanism by which Golgi retention occurs is still unclear, it has been suggested that membrane thickness could play a role (49). Such lipid-based mechanism has also been proposed for proteins that are localized in the ER by their transmembrane domain (47), and ER retention of HCV glycoprotein E2 could fit in this model.

A strict ER retention of HCV glycoprotein complexes suggests that budding of HCV particles occurs in the ER. Enveloped viruses acquire their envelope by budding through one of several host cellular membranes. In the case of viruses such as Semliki Forest virus, vesicular stomatitis virus or influenza virus, the viral membrane glycoproteins are synthesized and transported to the plasma membrane in a manner indistinguishable from cellular proteins. It is the accumulation of these proteins at the cell surface that is responsible for viral budding (50). Some other viruses, however, bud at internal membranes, such as those of the ER (e.g. rotaviruses), the ERGIC (coronaviruses), or the Golgi complex (*Bunyaviridae*) (50, 51). Virus particles are then released from the infected cells either after cell lysis (e.g. rotaviruses) or after transport of virus-containing vesicles to the cell surface and fusion of these vesicles with the plasma membrane (e.g. coronaviruses and bunyaviruses). For viruses that bud intracellularly, there needs to be an accumulation of the viral membrane glycoproteins, which form the spikes, in the appropriate compartment (51). A strategy that most of these viruses have developed is to endow the spike proteins with signals for compartment-specific targeting and retention, similarly to normal compartment-specific cellular proteins (52–57). For the flaviviruses, virions appear in intracellular vesicles (probably modified ER) and are released from cells via the exocytosis pathway (reviewed in Refs. 50 and 51). In the case of HCV, such studies have been hampered by the absence of an efficient cell culture system for its replication. In addition, efficient HCV particle formation has not been ob-

served in transient expression assays, suggesting that essential viral or host factors are missing or blocked. The process of viral envelope formation is not well understood. In most cases, the viral nucleocapsid plays an important role (58), and the icosahedral capsid probably acts as a scaffold responsible for the curvature of the envelope. In some cases, viral membrane proteins are secreted in the absence of the nucleocapsid. This is the case for most flaviviruses (10), which, like HCV, belong to the *Flaviviridae* family. However such virus-like particles are not observed for HCV.

In conclusion, we show that the transmembrane domain of E2 is responsible for genuine retention in the ER without recycling through the Golgi. This indicates that besides the classical retrieval mechanisms described for proteins with a KDEL or a KKXX signal, retention of native proteins without retrieval can also occur in the ER.

Acknowledgments—We thank K. Moremen and H.-P. Hauri for the generous gift of antibodies, Françoise Jacob-Dubuisson for critical reading of the manuscript, and Sophana Ung for excellent technical assistance.

REFERENCES

1. Nilsson, T., Hoe, H. M., Slusarewicz, P., Rabouille, C., Watson, R., Hunte, F., Watzel, G., Berger, E. G., and Warren, G. (1994) *EMBO J.* 13, 562–574
2. Munro, S. (1995) *EMBO J.* 17, 4695–4704
3. Lewis, M. J., and Pelham, H. R. B. (1992) *Cell* 68, 353–364
4. Letourneur, F., Gaynor, E. C., Hennecke, S., Démollières, C., Duden, R., Emr, S., Riezman, H., and Cosson, P. (1994) *Cell* 79, 1199–1207
5. Munro, S., and Pelham, H. R. B. (1987) *Cell* 48, 899–907
6. Nilsson, T., Jackson, M. R., and Peterson, P. A. (1989) *Cell* 58, 707–718
7. Nilsson, T., and Warren, G. (1994) *Curr. Opin. Cell Biol.* 6, 517–521
8. Francki, R. I. B., Fauquet, C. M., Knudson, D. L., and Brown, F. (1991) *Arch. Virol.* 2, (Suppl.) 223–233
9. Matsuura, Y., and Miyamura, T. (1993) *Semin. Virol.* 4, 297–304
10. Rice, C. M. (1996) in *Fields Virology* (Fields, B. N., Knipe, D. M., and Howley, P. M., eds) 3rd Ed., pp. 931–959, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia
11. Michalak, J.-P., Wychowski, C., Choukhi, A., Meunier, J.-C., Ung, S., Rice, C. M., and Dubuisson, J. (1997) *J. Gen. Virol.* 78, 2299–2306
12. Mizushima, H., Hijikata, M., Asabe, S.-I., Hirota, M., Kimura, K., and Shimotohno, K. (1994) *J. Virol.* 68, 6215–6222
13. Matsuura, Y., Suzuki, T., Suzuki, R., Sato, M., Aizaki, H., Saito, I., and Miyamura, T. (1994) *Virology* 205, 141–150
14. Hussy, P., Schmid, G., Mous, J., and Jacobsen, H. (1996) *Virus Res.* 45, 45–57
15. Deleersnyder, V., Pillez, A., Wychowski, C., Blight, K., Xu, J., Hahn, Y. S., Rice, C. M., and Dubuisson, J. (1997) *J. Virol.* 71, 697–704
16. Dubuisson, J., Hsu, H. H., Cheung, R. C., Greenberg, H. B., Russell, D. G., and Rice, C. M. (1994) *J. Virol.* 68, 6147–6160
17. Dubuisson, J., and Rice, C. M. (1996) *J. Virol.* 70, 778–786
18. Choukhi, A., Ung, S., Wychowski, C., and Dubuisson, J. (1998) *J. Virol.* 72, 3851–3858
19. Cocquerel, L., Meunier, J.-C., Pillez, A., Wychowski, C., and Dubuisson, J. (1998) *J. Virol.* 72, 2183–2191
20. Reinherz, E. L., Kung, P. C., Goldstein, G., and Schlossman, S. F. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 4061–4065
21. Moremen, K. W., Touster, O., and Robbins, P. W. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 16876–16885
22. Schweizer, A., Fransen, J. A. M., Bächli, T., Ginsel, L., and Hauri, H.-P. (1988) *J. Cell Biol.* 107, 1643–1653
23. Moradpour, D., Kary, P., Rice, C. M., and Blum, H. E. (1998) *Hepatology* 28, 192–201
24. Fuerst, T. R., Niles, E. G., Studier, F. W., and Moss, B. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 8122–8126
25. Fournillier-Jacob, A., Cahour, A., Escricou, N., Girard, M., and Wychowski, C. (1996) *J. Gen. Virol.* 77, 1055–1064
26. Shenkman, M., Ayalon, M., and Lederkremer, G. Z. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 11363–11368
27. Hebert, D. N., Foellmer, B., and Helenius, A. (1995) *Cell* 81, 425–433
28. Kmiećik, D., Herman, V., Stroop, C. J. M., Michalski, J. C., Mir, A. M., Labiau, O., Verbert, A., and Cacan, R. (1995) *Glycobiology* 5, 483–494
29. Martire, G., Mottola, G., Pascale, M. C., Malagolini, N., Turrini, L., Serafini-Cessi, F., Jackson, M. R., and Bonatti, S. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 3541–3547
30. Townsley, F. M., Wilson, D. W., and Pelham, H. R. B. (1993) *EMBO J.* 12, 2821–2829
31. Saraste, J., and Svensson, K. (1991) *J. Cell Sci.* 100, 415–430
32. Cole, N. B., Sciaky, N., Marotta, A., Song, J., and Lippincott-Schwartz, J. (1996) *Mol. Biol. Cell* 7, 631–650
33. Kornfeld, R., and Kornfeld, S. (1985) *Annu. Rev. Biochem.* 54, 631–664
34. Tai, T., Yamashita, K., Ogata-Arakawa, M., Koide, N., and Muramatsu, T. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 8569–8575
35. Bause, E., Breuer, W., Schweden, J., Roeser, R., and Geyer, R. (1992) *Eur. J. Biochem.* 208, 451–457
36. Bischoff, J., and Kornfeld, R. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 4758–4765
37. Lippincott-Schwartz, J., Yuan, L. C., Bonifacio, J. C., and Klausner, R. D. (1989) *Cell* 58, 801–813

ER Retention of Hepatitis C Virus Glycoprotein Complex

38. Pelham, H. R. B. (1988) *EMBO J.* 7, 913-918
39. Schutze, M.-P., Peterson, P. A., and Jackson, M. R. (1994) *EMBO J.* 13, 1696-1705
40. Jackson, M. R., Nilsson, T., and Peterson, P. A. (1993) *J. Cell Biol.* 121, 317-333
41. Mazzarella, R. A., Srinivasan, M., Haugejorden, S. M., and Green, M. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 1094-1101
42. Sonnichsen, B., Fullekrug, J., Van, P. H., Diekmann, W., Robinson, D. G., and Mieskes, G. (1994) *J. Cell Sci.* 107, 2705-2717
43. Nishimura, N., and Balch, W. E. (1997) *Science* 277, 556-558
44. Isidoro, C., Maggioni, C., Demoz, M., Pizzagalli, A., Fra, A. M., and Sitia, R. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 26138-26142
45. Hammond, C., and Helenius, A. (1994) *J. Cell Biol.* 126, 41-52
46. Hammond, C., and Helenius, A. (1995) *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 523-529
47. Yang, M., Ellenberg, J., Bonifacino, J. S., and Weissman, A. M. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 1970-1975
48. Ahn, K., Szczesna-Skorupa, E., and Kemper, B. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 18726-18733
49. Bretcher, M. S., and Munro, S. (1993) *Science* 261, 1280-1281
50. Griffiths, G., and Rottier, P. (1992) *Semin. Cell Biol.* 3, 367-381
51. Pettersson, R. F. (1991) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 170, 67-104
52. Andersson, A. M., Melin, L., Bean, A., and Pettersson, R. F. (1997) *J. Virol.* 71, 4717-4727
53. Armstrong, J., and Patel, S. (1991) *J. Cell Sci.* 98, 567-575
54. Hobman, T. C., Woodward, L., and Farquahr, M. G. (1995) *Mol. Biol. Cell* 6, 7-20
55. Locker, J. K., Klumperman, J., Oorschot, V., Horzinek, M. C., Geuze, H. J., and Rottier, P. J. M. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 28263-28269
56. Machamer, C. E., and Rose, J. K. (1987) *J. Cell Biol.* 105, 1205-1214
57. Weisz, O. A., Swift, A. M., and Machamer, C. E. (1993) *J. Cell Biol.* 122, 1185-1196
58. Harrison, S. C., Skehel, J. J., and Wiley, D. C. (1996) in *Fields Virology* (Fields, B. N., Knipe, D. M., and Howley, P. M., eds) 3rd Ed., pp. 59-99, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia

I. Discussion de l'article II

Comme nous l'avons précédemment décrit, deux mécanismes de rétention peuvent témoigner de la localisation spécifique d'une protéine dans un compartiment subcellulaire donnée : une rétention par recyclage qui implique le transport vésiculaire et une rétention stricte qui assure véritablement la rétention de la protéine dans son compartiment cible. De nombreuses études suggèrent que la rétention des glycoprotéines natives E1 et E2 du virus de l'hépatite C est spécifique du compartiment RER.

Pour étudier précisément la nature de cette rétention, il est indispensable de disposer d'un outil de reconnaissance spécifique qui permet de distinguer les hétérodimères E1E2 natifs des molécules qui s'engagent dans la voie non productive. Ainsi, au cours de cette étude, nous avons utilisé un anticorps monoclonal (anticorps H53) qui est spécifiquement dirigé contre la glycoprotéine E2 native. Son intérêt repose sur le fait qu'il permet à la fois de piéger E2 mais également les complexes E1E2 natifs.

Une bonne partie de ce travail a été effectuée sur une lignée cellulaire d'ostéosarcomes humains : la lignée UHCV-11.4 (Moradpour *et al.*, 1998). Cette lignée présente la particularité d'exprimer la polyprotéine totale codée par le génome du VHC dans un système d'expression régulé par la tétracycline. Ce système n'a pas recours à l'utilisation de vecteurs viraux : cependant, la levée de l'inhibition par la tétracycline permet d'obtenir des taux d'expression suffisamment importants pour étudier la biosynthèse des glycoprotéines E1 et E2 du VHC. L'intérêt de son utilisation repose sur les conditions plus physiologiques qui, en limitant l'expression des glycoprotéines, évitent les perturbations cellulaires qui peuvent être créés par l'infection virale.

A. Approche biologique du phénomène de rétention des complexes E1E2 natifs dans le RER

Pour discriminer les deux mécanismes de rétention, dans un premier temps, il est paru intéressant de regarder la distribution intracellulaire des complexes E1E2 et d'en estimer la sensibilité vis-à-vis d'agent perturbant le trafic du RER vers les compartiments golgiens.

1. Etude de la localisation subcellulaire des complexes E1E2 natifs

Les techniques d'immunofluorescence permettent d'avoir une idée générale de la distribution subcellulaire d'une protéine. En effet, les différents organites intracellulaires s'organisent de façon spécifique au sein de la cellule (figure 2 de l'article II) :

- le RER présente une distribution périphérique et très étendue du fait d'une réticulation importante : la répartition de la protéine PDI illustre parfaitement une distribution réticulaire.
- la mannosidase II présente une répartition de type périnucléaire caractéristique des structures golgiennes.
- la RabI présente une répartition intermédiaire à celle du RER et du Golgi : elle représente un marqueur de l'ERGIC.

La distribution des complexes E1E2 est similaire à celle de la PDI marqueur du RER. Cependant, si la PDI représente une protéine résidente du RER, elle présente le signal de rétention KDEL qui témoigne d'un recyclage permanent du compartiment pré-golgien vers le RER. Afin de préciser la nature de la rétention des complexes E1E2, l'utilisation du nocodazole s'est avérée intéressante.

2. Influence du nocodazole sur la répartition subcellulaire des complexes E1E2

Le nocodazole détruit spécifiquement la formation des microtubules impliqués dans le transport rétrograde du compartiment golgien vers le RER. En présence d'un tel agent, les molécules présentant un signal de rétention par recyclage et situées dans les compartiments post-réticulaires ne peuvent plus rejoindre le RER. De cette façon, nous avons montré que la distribution des complexes E1E2 ne semblait aucunement perturbée par le nocodazole, indiquant une rétention sans transit vers les compartiments pré-golgiens (figure 3 de l'article II). Par contre, la répartition de la PDI est sensiblement affligée par la présence du nocodazole confirmant l'implication du recyclage vers le RER.

Ainsi, la distribution des glycoprotéines E1 et E2 semble indiquer une localisation spécifiquement réticulaire. Afin d'avoir une idée plus précise du phénomène, nous avons considéré la nature des N-glycannes liés aux glycoprotéines natives E1 et E2. En effet, comme

nous l'avons montré, la maturation des glycanes portés par les glycoprotéines nouvellement synthétisées commence dans le RER et continue dans les différents saccules de l'appareil de Golgi. Ainsi, il est possible de suivre le trajet d'une glycoprotéine en prenant ses glycanes comme témoins de sa localisation subcellulaire.

B. Nature des glycanes liés aux glycoprotéines natives du VHC

L'étude de la sensibilité aux glycosidases permet d'avoir une idée de la nature des glycanes portés par les glycoprotéines E1 et E2. Cette étude s'est effectuée à la fois sur la lignée cellulaire UHCV-11.4 qui exprime la polyprotéine totale codée par le génome du VHC et sur des cellules HepG2 infectées par des recombinants du virus de la vaccine exprimant les complexes E1E2 et E2 seule. Ainsi, dans les trois cas, on observe une sensibilité à l'endo H et une résistance totale des glycoprotéines à l'endo D (figure 4 de l'article II). Ces résultats ne peuvent cependant témoigner d'une localisation strictement réticulaire compte tenu de la spécificité respective des deux enzymes (voir appendice technique). Par contre, le traitement à l' α -mannosidase de "jack bean" donne davantage de renseignements : les glycoprotéines E1 et E2 présentent une sensibilité partielle à l'enzyme qui peut s'expliquer selon l'accessibilité des résidus de Man externes. Ces résultats indiquent donc clairement que les glycoprotéines E1 et E2 natives présentent des glycanes de type oligomannosidique. Cependant, pour déterminer la nature exacte de la répartition des glycoprotéines, il est paru indispensable d'en déterminer les structures glycaniques.

C. Analyse structurale des oligomannosides portés par les hétérodimères E1E2 natifs

La structure des oligomannosides portés par les glycoprotéines E1 et E2 a été déterminée par HPLC. Trois espèces correspondant aux $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ et $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ sont retrouvées (figure 5 de l'article II).

La présence d'oligomannosides non-glucosylés indique que les glycoprotéines E1 et E2 ont subi l'action successive des glucosidases I et II du RER. Comme nous l'avons décrit dans les généralités, le précurseur oligosaccharidique $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ transféré sur la protéine est très vite hydrolysé par la glucosidase I pour donner le $\text{Glc}_2\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ puis en

$\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ par la glucosidase II. Par contre, la libération du $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ représente une étape importante dans le processus de la mise en conformation des glycoprotéines puisqu'il est spécifiquement reconnu par les lectines calnexine et calréticuline impliquées dans le contrôle de qualité des glycoprotéines. L'hydrolyse définitive du dernier résidu de Glc signifie que les glycoprotéines sont stables d'un point de vue conformationnel ou irréversiblement dénaturées. Choukhi *et al.* (1998) ont clairement montré que la calnexine interagissait spécifiquement avec les glycoprotéines E1 et E2 immatures : ainsi, l'absence d'oligosaccharides glucosylés est en parfait accord avec l'idée que les glycoprotéines E1 et E2 sont correctement conformées et que leur rétention dans le RER ne relève pas du contrôle de qualité.

La présence majoritaire du $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ indique l'action des mannosidases du RER : il peut provenir de l'action de la mannosidase I réticulaire, de la mannosidase II réticulaire ou de l'action partielle de la Man_9 -mannosidase. D'une manière générale, lorsqu'une glycoprotéine est destinée à la voie de sécrétion, le processing réticulaire se limite à l'action des mannosidases I ou II du RER pour libérer les deux isomères $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$: la glycoprotéine s'engage alors dans l'appareil de Golgi dans lequel la maturation des glycannes se termine. Pour les glycoprotéines E1 et E2, on observe la présence de $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ qui témoigne d'une rétention prolongée des complexes E1E2 dans le RER confirmée par le fait que la totalité des glycannes portés par E1 et E2 reste très fortement maintenue sur lectine de concanavaleine A. Ce $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ peut avoir pour origine l'action consécutive des mannosidases I et II du RER ou l'action de l'une ou l'autre de ces deux mannosidases associée à l'action partielle de la Man_9 -mannosidase.

Quoi qu'il en soit, les glycosidases du RER peuvent, à elles seules, générer les espèces $\text{Man}_{7-9}\text{GlcNAc}_2$ (figure 34).

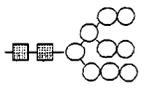
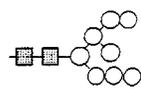
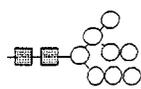
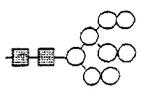
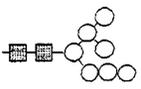
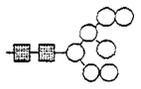
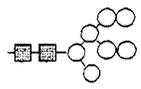
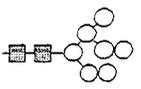
<p>Espèce $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$</p> <p>Origine :</p>	 <p>Glucosidases I & II du RER</p>			
<p>Espèces $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$</p> <p>Origines :</p>	 <p>Mannosidase I du RER (A)</p>	 <p>Mannosidase II du RER (B) ou Man_9mannosidase (C)</p>	 <p>Man_9mannosidase (C)</p>	
<p>Espèces $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$</p> <p>Origines :</p>	 <p>(A) + (B) ou (A) + (C)</p>	 <p>(A) + (C)</p>	 <p>(C)</p>	 <p>(C) ou (B) + (C)</p>

Figure 34 : Glycosidases impliquées dans la formation des différentes espèces oligomannosidiques portées par les glycoprotéines E1 et E2 du VHC.

Cependant, la présence de tels oligomannosides ne signifie pas que les glycoprotéines E1 et E2 soient strictement retenues au sein du RER, deux hypothèses peuvent être suggérées :

- soit les glycoprotéines sont effectivement retenues strictement dans le RER.
- soit les glycoprotéines sont engagées dans l'appareil de Golgi mais sont inaccessibles aux glycosyltransférases golgiennes : les glycannes demeurent de type oligomannosidique.

D. Influence de la brefeldine A sur la maturation des glycanes portés par les glycoprotéines E1 et E2

Comme nous l'avons précédemment décrit (page 40), la BFA provoque la fusion des compartiments RER et golgiens qui se traduit par la redistribution des diverses glycosyltransférases golgiennes vers le compartiment réticulaire : les glycoprotéines strictement localisées dans le RER se retrouvent alors en présence des glycosyltransférases golgiennes. En présence de BFA, les glycanes portés par les glycoprotéines E1 et E2 et fortement retenus sur concanavaleine A (76 %) sont représentés par des petites espèces oligomannosidiques $\text{Man}_{(3-7)}\text{GlcNAc}_2$ qui témoignent d'un processing avancé impliquant les glycosyltransférases golgiennes (figure 6 de l'article II). En l'absence de l'agent, la présence des espèces hautement mannosylées $\text{Man}_{(7-9)}\text{GlcNAc}_2$ confirme que les glycoprotéines E1 et E2 n'ont jamais quitté le compartiment réticulaire.

E. Implication du domaine transmembranaire de E2 dans la rétention des complexes E1E2 natifs

Pour déterminer si le domaine transmembranaire de E2 peut assurer, à lui seul, le rôle de signal de rétention de la glycoprotéine au sein du RER, nous avons étudié la structure des glycanes portés par la protéine chimérique contenant le domaine transmembranaire de E2 fusionné à l'ectodomaine de CD4, une glycoprotéine normalement exportée à la surface cellulaire. Nous avons montré que les mêmes oligomannosides $\text{Man}_{(7-9)}\text{GlcNAc}_2$ sont à nouveau retrouvés indiquant que le domaine transmembranaire de E2 maintient spécifiquement la glycoprotéine chimérique dans le RER (figure 7 de l'article II). Il est, à présent, clairement établi que les oligomannosides $\text{Man}_{(7-9)}\text{GlcNAc}_2$ représentent les espèces glycaniques « marqueurs » de la rétention stricte des complexes E1E2.

Ainsi, le domaine transmembranaire de E2 pourrait être suffisant pour retenir le complexe E1E2 compte tenu du rôle chaperon de E2 vis-à-vis de E1. Cependant, parce que les glycoprotéines E1 et E2 doivent impérativement se retrouver dans le même compartiment subcellulaire pour former l'hétérodimère, l'hypothèse que E1 présente également un signal de rétention n'est pas à exclure.

II. Le domaine transmembranaire de E1 : signal de rétention du RER ?

Il est montré que l'expression de E1 seule conduit à la rétention de la glycoprotéine dans le RER. Cependant, Michalak *et al.* (1997) ont montré que la glycoprotéine E2 était directement impliquée dans le repliement de E1 : cette rétention pourrait donc simplement correspondre à un problème de mise en conformation lié au contrôle de qualité. L'investigation de cette étude est, de surplus, limitée par le fait que nous ne possédons aucun anticorps spécifique des formes E1 natives. Ainsi, dans l'objectif de déterminer si E1 présentait un signal de rétention du RER, une stratégie différente a dû être adoptée.

Une étude préliminaire a consisté à coexprimer E1 avec la glycoprotéine E2 dont le domaine transmembranaire a été remplacé par celui d'une protéine normalement exportée à la surface cellulaire. Malheureusement, aucune conclusion significative n'a pu être émise du fait que le domaine transmembranaire de E2 est directement impliqué dans l'interaction entre E1 et E2.

Dans l'hypothèse que le signal de rétention de E1 soit précisément porté par son domaine transmembranaire, notre étude a porté sur la construction de protéines chimériques auxquelles a été fusionné le domaine transmembranaire de E1. De cette façon, l'étude de la distribution subcellulaire et l'analyse des glycanes portés par les protéines chimériques ont été effectuées en vue de déterminer, d'une part, si le domaine transmembranaire de E1 présente un signal de rétention et, d'autre part, la nature de la rétention.

Ce travail a fait l'objet de l'article accepté dans *Journal of Virology* « **The transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E1 is a signal for static retention in the endoplasmic reticulum** » (1998).

The Transmembrane Domain of Hepatitis C Virus Glycoprotein E1 Is a Signal for Static Retention in the Endoplasmic Reticulum

LAURENCE COCQUEREL,¹ SANDRINE DUVET,^{1,2} JEAN-CHRISTOPHE MEUNIER,¹ ANDRÉ PILLEZ,¹
RENÉ CACAN,² CZESLAW WYCHOWSKI,¹ AND JEAN DUBUISSON^{1*}

CNRS-UMR319, IBL/Institut Pasteur de Lille, 59021 Lille Cedex,¹ and CNRS-UMR111, Université des
Sciences et Technologies, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex,² France

Received 8 September 1998/Accepted 16 December 1998

Hepatitis C virus (HCV) glycoproteins E1 and E2 assemble to form a noncovalent heterodimer which, in the cell, accumulates in the endoplasmic reticulum (ER). Contrary to what is observed for proteins with a KDEEL or a KKXX ER-targeting signal, the ER localization of the HCV glycoprotein complex is due to a static retention in this compartment rather than to its retrieval from the cis-Golgi region. A static retention in the ER is also observed when E2 is expressed in the absence of E1 or for a chimeric protein containing the ectodomain of CD4 in fusion with the transmembrane domain (TMD) of E2. Although they do not exclude the presence of an intracellular localization signal in E1, these data do suggest that the TMD of E2 is an ER retention signal for HCV glycoprotein complex. In this study chimeric proteins containing the ectodomain of CD4 or CD8 fused to the C-terminal hydrophobic sequence of E1 were shown to be localized in the ER, indicating that the TMD of E1 is also a signal for ER localization. In addition, these chimeric proteins were not processed by Golgi enzymes, indicating that the TMD of E1 is responsible for true retention in the ER, without recycling through the Golgi apparatus. Together, these data suggest that at least two signals (TMDs of E1 and E2) are involved in ER retention of the HCV glycoprotein complex.

Hepatitis C virus (HCV) is a positive-strand RNA virus which belongs to the *Flaviviridae* family (18). Its genome contains a long open reading frame of 9,030 to 9,099 nucleotides that is translated into a single polyprotein of 3,010 to 3,033 amino acids (33). Cleavages of this polyprotein are co- and posttranslational and generate at least 10 polypeptides, including 2 glycoproteins, E1 and E2 (50). These glycoproteins are believed to be type I transmembrane proteins with an N-terminal glycosylated ectodomain and a C-terminal hydrophobic anchor. For E2, C-terminal deletions that remove its hydrophobic region result in secretion of the ectodomain (35, 53). This is in accordance with other data proposing that the hydrophobic anchor domain begins at amino acid 718 (position on the polyprotein) (36). For E1, it has been suggested that a second membrane anchor (between amino acids 262 and 290) might exist in addition to its C-terminal hydrophobic domain (34). However, truncated forms ending at amino acid 311 or 334 and containing this internal sequence can also be secreted (23, 35). E1, like E2, is therefore probably anchored by its C-terminal hydrophobic sequence, but the N-terminal limit of this transmembrane domain (TMD) has not been established.

HCV glycoproteins E1 and E2 interact together to form a noncovalent heterodimer (11, 48). The efficiency of HCV glycoprotein assembly is low, and a large portion of them form heterogeneous disulfide-linked aggregates (13, 14). The noncovalent heterodimeric complex is believed to be the prebudding form of HCV glycoprotein oligomer and accumulates in the endoplasmic reticulum (ER) (11). Recently, the mechanism responsible for HCV glycoprotein complex localization in the ER has been analyzed (15). The absence of modifications

of HCV glycoprotein glycans by Golgi enzymes indicates that the ER localization of these proteins is not due to their retrieval from the cis-Golgi body. Static retention of HCV glycoprotein complexes in the ER suggests that this compartment plays an important role in the acquisition of the envelope of HCV particles.

HCV glycoprotein E2 expressed in the absence of E1 can fold properly (35), and this has allowed us to analyze the intracellular localization of its properly folded form (9, 55). E2 expressed alone is retained in the ER, as shown by the lack of complex glycans, its intracellular distribution, and the absence of its expression on the cell surface. In addition, replacement of the TMD of E2 with the anchor sequence of CD4 has been shown to be sufficient for its export on the cell surface, and a chimeric protein containing the ectodomain of CD4 fused to the TMD of E2 is retained in the ER (9). This indicates that the TMD of E2 contains the information for its ER localization. This ER localization signal has also been shown to be responsible for true retention of E2 in the ER, without recycling through the Golgi body (15).

The ER retention signal present in E2 could be sufficient to retain E1-E2 complexes in the ER. However, the presence of an ER-targeting signal in E1 as well cannot be excluded. The aim of this study was to look for a potential ER localization signal in E1. By making chimeric proteins containing the ectodomain of CD4 or CD8 fused to the C-terminal hydrophobic sequence of E1, we showed that the TMD of E1 is able to retain these ectodomains in the ER. In addition, these chimeric proteins were not processed by Golgi enzymes. This indicates that the TMD of E1 is responsible for true retention in the ER, without recycling through the Golgi apparatus.

* Corresponding author. Mailing address: Equipe Hépatite C, CNRS-UMR 319, Institut de Biologie de Lille & Institut Pasteur de Lille, 1 rue Calmette, BP447, 59021 Lille Cedex, France. Phone: (33) 3-20-87-11-60. Fax: (33) 3-20-87-11-11. E-mail: jdbuis@infobiogen.fr.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture. The HepG2, HeLa, CV-1, and 143B (thymidine kinase-deficient) cell lines were obtained from the American Type Culture Collection, Rockville.

Md. Cell monolayers were grown in Dulbecco modified essential medium (Gibco-BRL) supplemented with 10% fetal bovine serum.

Plasmid constructs. Plasmids expressing chimeric proteins were constructed by using the standard methodology (52). Briefly, DNA sequences of protein domains were introduced into pTM1 plasmid (38) by PCR. Plasmids expressing chimeric proteins were constructed in two steps by introducing successively the sequences of domains from two different proteins. A unique restriction site was introduced between the sequences of the protein domains. HCV sequences were amplified from H-strain clones (17). Plasmids pTM1/CD4(1-371)-E1(347-383), pTM1/CD4(1-371)-E1(353-383), pTM1/CD8(1-159)-E1(347-383) and pTM1/CD8(1-159)-E1(353-383) contain the signal sequence of CD4 or CD8 followed by the sequence of their ectodomain in fusion with the C-terminal 37 or 31 amino acids of E1. Between these sequences, there is a junction sequence encoding two additional amino acids (Gly and Ser). Plasmid pTM1/CD8 contains the sequence of the entire CD8 glycoprotein (amino acids 1 to 214). Plasmids pTM1/E1(171-346)-CD4(374-435) and pTM1/E1(171-352)-CD4(374-435) contain the signal sequence and the ectodomain of E1 in fusion with the C-terminal 62 amino acids of CD4. Between these two sequences, there is a junction sequence encoding two additional amino acids (Leu and Gln). Plasmids containing sequences amplified by PCR were verified by sequencing.

Generation and growth of viruses. Vaccinia virus recombinants were generated by homologous recombination essentially as described earlier (25) and plaque purified twice on 143B cells under bromodeoxyuridine selection (50 μ g/ml). Stocks of vaccinia virus recombinants were grown and titrated on CV-1 monolayers. Vaccinia virus recombinants vTF7-3 (a vaccinia virus recombinant expressing the T7 DNA-dependent RNA polymerase) (19), vE1E2p7 (a vaccinia virus recombinant expressing HCV glycoproteins E1 and E2 and the p7 polypeptide) (17), vCE1 (a vaccinia virus recombinant expressing HCV proteins C and E1) (35), and vCD4 (a vaccinia virus recombinant expressing full-length CD4) (9) were used in this work.

Antibodies. Monoclonal antibodies (MAbs) A4 (anti-E1 [13]), H53 (anti-E2 [9]), OKT8 (anti-CD8), and OKT4 (anti-CD4) (49) were produced *in vitro* by using a MiniPerm apparatus (Heraeus) as recommended by the manufacturer. Rabbit antibodies to PDI (SPA-890) and Rab1 were obtained from StressGen (Victoria, British Columbia, Canada) and Zymed (San Francisco, Calif.), respectively. Rabbit polyclonal antibody to mannosidase II (37) was kindly provided by K. Moreman (University of Georgia). The anti-CD4 MAb 13B8.2 was purchased from Immunotech. Rhodamine and cyanogen 2 (Cy2)-conjugated donkey anti-rabbit and anti-mouse immunoglobulin G (IgG) were purchased from Jackson ImmunoResearch (West Grove, Pa.).

Metabolic labeling and immunoprecipitation. Cells expressing HCV proteins were metabolically labeled with 35 S-Protein Labeling Mix (100 μ Ci/ml; DuPont NEN) as previously described (13). Cells were lysed with 0.5% Triton X-100 in Tris-buffered saline (TBS; 50 mM Tris-Cl [pH 7.5], 150 mM NaCl). Immunoprecipitations were carried out as described previously (14). For *in vivo* labeling of glycan moieties, HepG2 cells were infected with the appropriate vaccinia virus recombinants and pulse-labeled for 30 min with 100 μ Ci of [3 H]mannose (Amersham) per ml in α minimal essential medium containing 0.5 mM glucose and 10% dialyzed fetal bovine serum. After 4 h of chase, cells were lysed in TBS-0.5% Triton X-100, and the lysates were used for immunoprecipitation.

Endo H digestions. Immunoprecipitated proteins were eluted from protein A-Sepharose in 30 μ l of dissociation buffer (0.5% sodium dodecyl sulfate [SDS] and 1% 2-mercaptoethanol) by boiling for 10 min. The protein samples were then divided into two equal portions for digestion with endo- β -N-acetylglucosaminidase H (endo H; New England Biolabs) or an undigested control. Digestions were carried out for 1 h at 37°C in the buffer provided by the manufacturer. Digested samples were mixed with an equal volume of 2 \times Laemmli sample buffer and analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE).

Analysis of oligosaccharide material. Immunoprecipitated [3 H]mannose-labeled proteins were digested overnight at room temperature with 0.2 mg of tosylsulfonyl phenylalanyl chloromethyl ketone (TPCK)-treated trypsin in 0.1 M ammonium bicarbonate (pH 7.9). Trypsin-treated proteins were boiled for 10 min to inactivate the trypsin, and the peptides were dried and dissolved in 20 mM sodium phosphate (pH 7.5) containing 50 mM EDTA and 0.2 mg of Na₂S₂O₅ per ml in 50% glycerol. The peptides were incubated overnight at 37°C in the presence of PNGase F (0.5 U; New England Biolabs). For some samples, endo H (10 mU) digestion was performed in 50 mM sodium citrate buffer (pH 5.5). Size analysis of the glycan moieties was achieved by high-pressure liquid chromatography (HPLC) on an amino-derivatized column ASAHIPAK NH2P-50 (250 by 4.6 mm) (Asahi, Kawasaki-ku, Japan) with a solvent system of acetonitrile-water of from 70:30 to 50:50 (vol/vol) at a flow rate of 1 ml/min over 80 min. Oligomannosides were identified as previously described (26) by their retention time. Separation of labeled oligosaccharides was monitored by continuous-flow detection of radioactivity with a Flo-One β detector (Packard). The abbreviations used for the sugars are as follows: GalNAc, N-acetylgalactosamine; Glc, glucose; GlcNAc, N-acetylglucosamine; and Man, mannose.

Affinity chromatography of labeled N glycans. The lectin column (concanavalin A-Sepharose; 5 by 0.5 cm) was equilibrated at room temperature in 5 mM sodium acetate buffer (pH 5.2) containing 0.1 M NaCl, 1 mM MnCl₂, 1 mM CaCl₂, and 1 mM MgCl₂. Glycan fractions (resulting from PNGase F digestion) were applied to the column which was then eluted with the equilibration buffer

(buffer a). Weakly retained glycans were eluted with 10 mM methyl- α -D-glucoside in the equilibration buffer (buffer b) and strongly retained glycans were eluted with 100 mM α -D-mannoside (buffer c).

Indirect immunofluorescence. Subconfluent HepG2 cells grown on coverslips were infected with the appropriate vaccinia virus recombinants at a multiplicity of infection of 3 PFU/cell. At 8 h postinfection, cells were fixed for 10 min with paraformaldehyde (4% in phosphate-buffered saline [PBS]). Cells were permeabilized or not for 30 min at room temperature with TBS containing 0.1% Triton X-100. Immunofluorescence was carried out as described earlier (11).

Flow-cytometric analysis. For detection of cell surface expression of chimeric proteins, HeLa cells grown in six-well plates were infected with the appropriate vaccinia virus recombinants at a multiplicity of infection of 10 PFU/cell. At 8 h postinfection, cells were washed twice with PBS at 4°C and resuspended by pipetting. Cells were stained with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-CD4 MAb 13B8.2 and fixed in PBS-1% paraformaldehyde for 30 min, resuspended in 1 ml of PBS, and subjected to flow-cytometric analysis with an Epics-Profile II (Coulter). For each sample, 10⁴ cells were analyzed.

RESULTS

Design of chimeric proteins to study the presence of a potential intracellular retention signal in E1. In order to identify the presence of a potential intracellular localization signal in E1, chimeras between proteins normally exported to the cell surface (CD4 or CD8) and E1 were constructed (Fig. 1B) and expressed in HepG2 cells with the vaccinia II virus/T7 expression system. However, before designing the constructs, we needed a more precise localization of the limits of the domains in E1. Based on experimental data (23, 35), E1 is believed to be anchored by its C-terminal hydrophobic sequence, but the N-terminal limit of this TMD has not been established. The putative N-terminal border of E1 TMD was therefore deduced from the prediction of transmembrane segments by using the TMAP program (45) based on a multiple sequence alignment carried out with the CLUSTAL W1.6 program (56). Based on these analyses, the N-terminal residue of the TMD of E1 was identified as a tryptophane at position 353 (position on the polyprotein) (Fig. 1A). This limit was therefore taken into account to design the chimeric proteins between E1 and CD4 or CD8 (Fig. 1B). For some constructs (CD4-E1₃₄₇ and CD8-E1₃₄₇), 6 amino acids of the C terminus of the E1 ectodomain were added to serve as a spacer between the ectodomain of CD4 or CD8 and the predicted TMD of E1.

The TMD of HCV glycoprotein E1 functions as an intracellular localization signal. Recently, we have shown that E1 expressed alone is retained in the ER (9). Replacement of the TMD of E1 by the anchor and cytoplasmic domains of CD4 (E1₃₅₂-CD4 and E1₃₄₆-CD4) led to ER localization of this protein (data not shown), suggesting that a determinant for ER localization maps in the ectodomain of E1. However, E1 expressed in the absence of E2 does not fold properly (35), and misfolded proteins are usually retained in the ER independently of the presence of a specific retention signal (20). We therefore analyzed the folding of E1₃₅₂-CD4 and E1₃₄₆-CD4 to see whether these chimeras would be misfolded like E1 expressed alone. Since we have no conformation-sensitive MAb directed against E1, we monitored disulfide bond formation by SDS-PAGE under nonreducing conditions as previously described (14). This method takes advantage of an increase in mobility as a protein acquires a compact conformation stabilized by the formation of intramolecular disulfide bonds. An oxidized form of E1, which appeared slowly, was clearly detected when E2 was coexpressed with E1 (Fig. 2) as previously observed (14). However, SDS-PAGE analysis of E1₃₄₆-CD4 (data not shown) and E1₃₅₂-CD4 (Fig. 2) under nonreducing conditions did not show any shift of their electrophoretic mobilities, indicating that these proteins are not properly folded. Therefore, when E1₃₄₆-CD4 and E1₃₅₂-CD4 are expressed

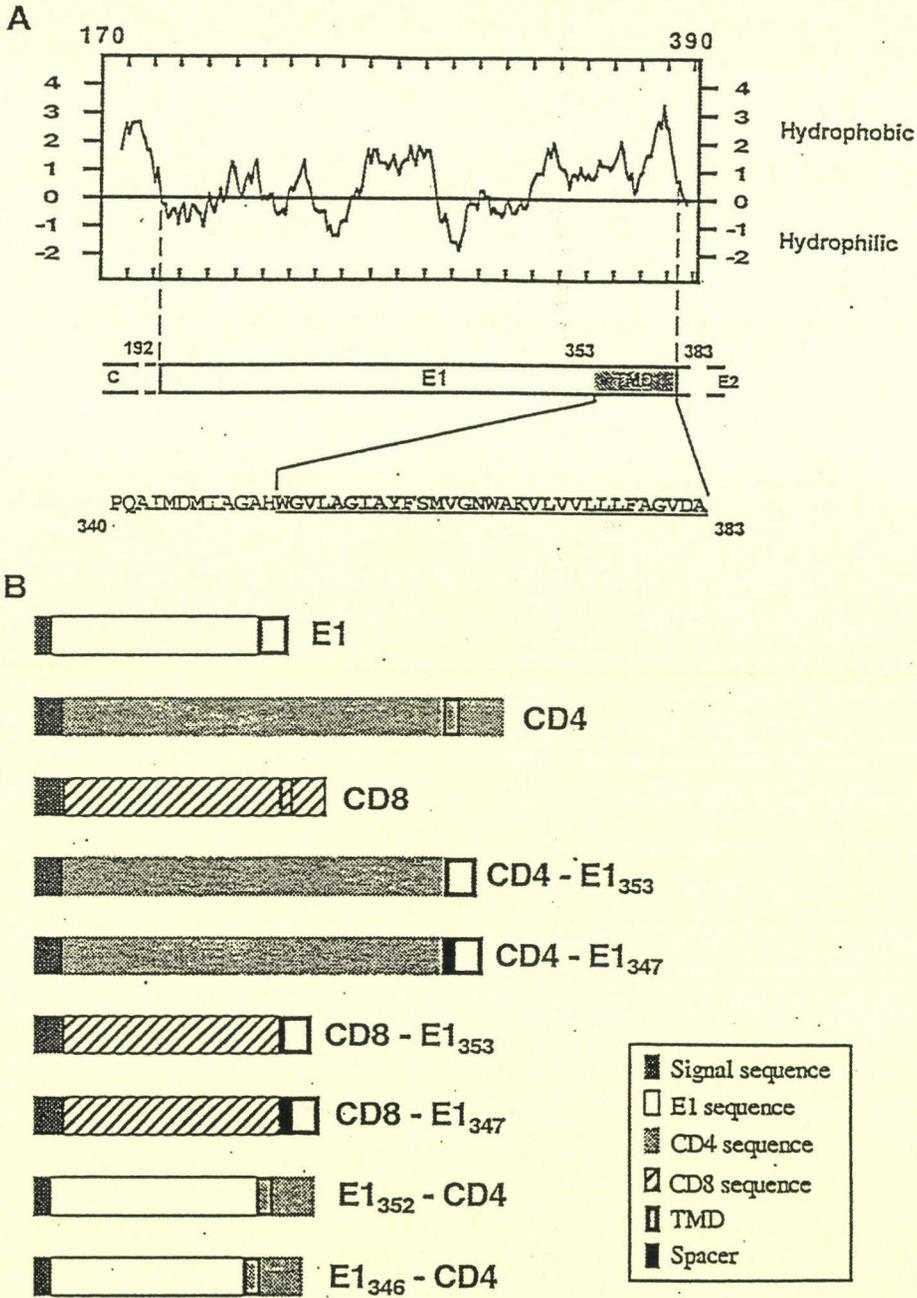


FIG. 1. Schematic representation of the proteins used in this study. (A) Hydropathy plot (28) of HCV glycoprotein E1. The putative ectodomain and TMD of E1 are from amino acids 192 to 352 and amino acids 353 to 383 (position on the polyprotein), respectively. The amino acid sequence of the C-terminal region of E1 is shown, indicated by the single-letter amino acid code. The TMD of E1 is underlined. (B) Schematic representation of the parental (E1, CD4, and CD8) and chimeric proteins. CD4-E1₃₅₃ and CD8-E1₃₅₃, ectodomains of CD4 and CD8 fused to the TMD of E1; CD4-E1₃₄₇ and CD8-E1₃₄₇, same as CD4-E1₃₅₃ and CD8-E1₃₅₃ with an additional 6-amino-acid spacer from the ectodomain of E1 at the N terminus of the TMD of E1; E1₃₅₂-CD4, ectodomain of E1 fused to the TMD and cytoplasmic domain of CD4; E1₃₄₆-CD4, same as E1₃₅₂-CD4 with a 6-amino-acid deletion at the C terminus of the ectodomain of E1. The ectodomain of CD4 is from amino acid 1 to 373, its TMD is from 374 to 395, and its cytosolic domain is from 396 to 435. The ectodomain of CD8 is from amino acid 1 to 160, its TMD is from 161 to 187, and its cytosolic domain is from 188 to 214. Details on the constructions are described in Materials and Methods.

alone, we cannot differentiate an ER localization due to a specific signal from a retention caused by misfolding.

Due to the difficulties in analyzing chimeric proteins containing the ectodomain of E1, we focused our work on the potential role of the TMD of E1 in ER retention. Since transmembrane sequences are supposed to fold autonomously as α -helix structures in the lipid environment of the ER membrane (47), chimeric proteins containing the ectodomain of

CD4 in fusion with the TMD of E1 (CD4-E1₃₄₇ and CD4-E1₃₅₃) were produced, and their subcellular localization was studied. Cell surface expression of these proteins was analyzed by immunofluorescence and flow cytometry. Cells infected by a vaccinia virus recombinant expressing full-length CD4 (vCD4) were used as a control of cell surface expression. Cells expressing CD4, CD4-E1₃₄₇, or CD4-E1₃₅₃ and fixed with paraformaldehyde were all positive after permeabilization with Triton

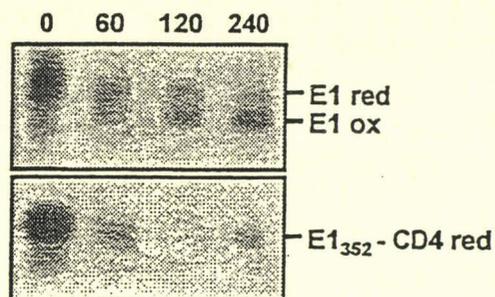


FIG. 2. Analysis of intramolecular disulfide bond formation in E1₃₅₂-CD4. HepG2 cells were coinfecting with vTF7-3 and a vaccinia virus recombinant expressing E1₃₅₂-CD4 at a multiplicity of infection of 5 PFU/cell. Cells coinfecting with vTF7-3 and a vaccinia virus recombinant expressing E1, E2, and p7 were used as a control. At 4.5 h postinfection, infected cells were pulse-labeled for 10 min and chased for the indicated times (in minutes). Cell lysates were immunoprecipitated with MAb A4. Immunoprecipitates were analyzed under nonreducing condition by SDS-PAGE (10% acrylamide). red, reduced; ox, oxidized.

X-100, as determined by immunofluorescence, whereas only CD4-expressing cells were detected in the absence of detergent (Fig. 3). The absence of detectable CD4-E1₃₄₇ and CD4-E1₃₅₃ on the surface of cells infected by vaccinia virus recombinants expressing these proteins was confirmed by flow cytometry

(Fig. 4). For this approach, HeLa cells were used instead of HepG2 cells because of their better dissociation capacity. Intracellular retention of CD4-E1₃₅₃ and CD4-E1₃₄₇ does not seem to be due to misfolding of these chimeric proteins because single mutations of some amino acid residues in the TMD of E1 lead to their cell surface expression (10). Since CD4-E1₃₅₃ and CD4-E1₃₄₇ showed similar intracellular retention profiles (Fig. 3 and 4 and data not shown), only results obtained with CD4-E1₃₅₃ are presented in the following paragraphs.

Together, these data indicate that the TMD of E1 functions as an intracellular localization signal.

The TMD of E1 is a signal for ER localization. Since CD4-E1₃₅₃ was retained in an intracellular compartment, we suspected that the TMD of E1 plays a role in ER localization. In a first approach to analyze the intracellular localization of CD4-E1₃₅₃, its sensitivity to digestion by endo H was analyzed in pulse-chase experiments (Fig. 5). Endo H removes the chitobiose core of high-mannose and some hybrid forms of N-linked sugars but not the complex forms (51). Resistance to digestion with endo H is indicative that glycoproteins have moved from the ER to at least the medial- or trans-Golgi region, where complex sugars are added. The CD4 protein contains two N-linked glycans, and only one of them becomes

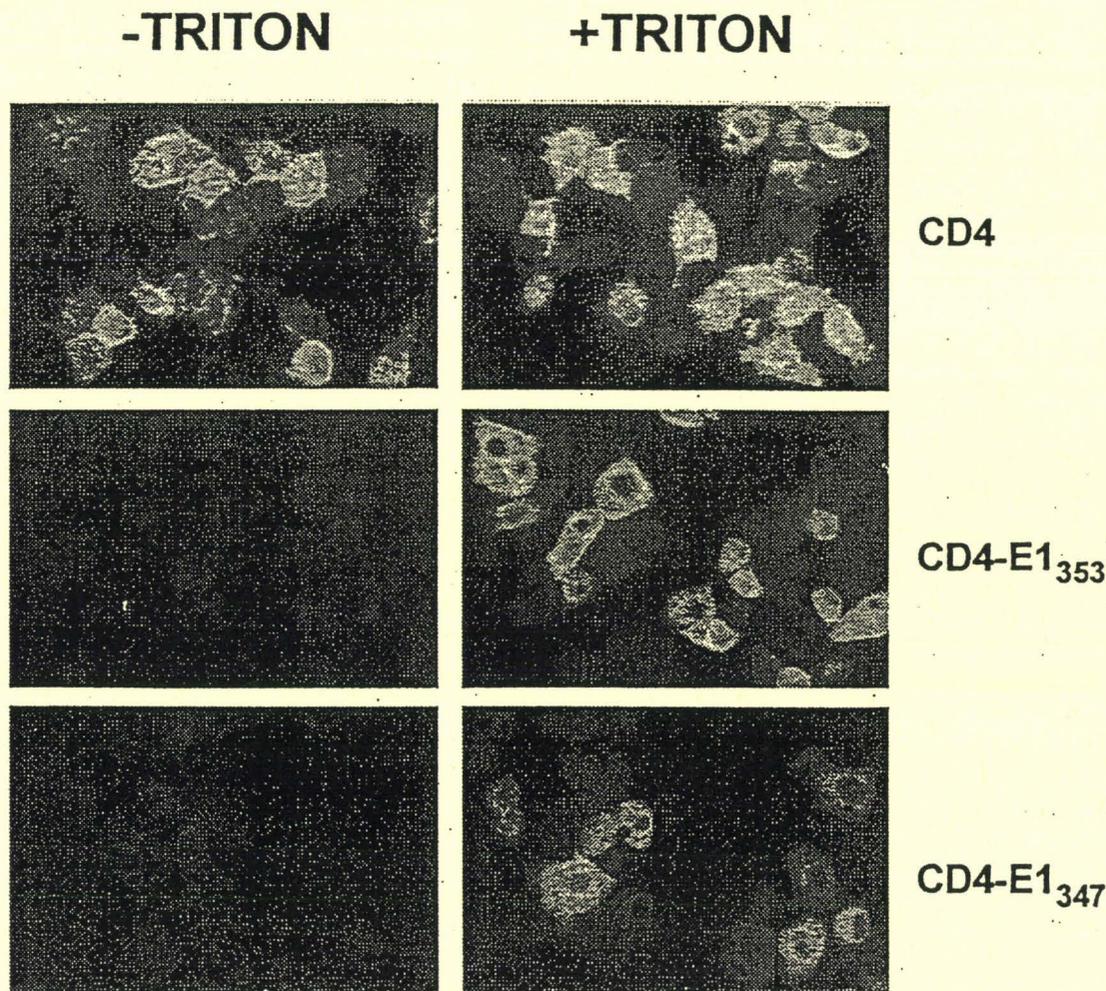


FIG. 3. Absence of cell surface expression of CD4-E1₃₅₃ and CD4-E1₃₄₇. HepG2 cells were coinfecting with vTF7-3 and the appropriate vaccinia virus recombinant at a multiplicity of infection of 3 PFU/cell. At 8 h postinfection, cells were treated for indirect immunofluorescence light microscopy. Cells were fixed with paraformaldehyde, permeabilized or not with Triton X-100, and immunostained with anti-CD4 MAb OKT4 (secondary donkey anti-mouse IgG-Cy2).

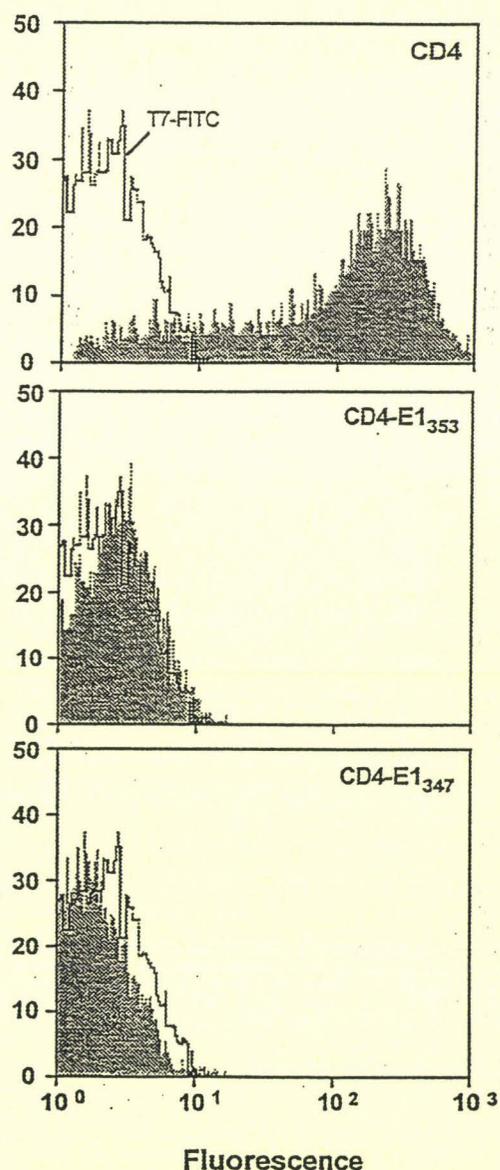


FIG. 4. Expression of chimeric proteins analyzed by flow cytometry. HeLa cells were coinfecting with vTF7-3 and the appropriate vaccinia virus recombinant at a multiplicity of infection of 10 PFU/cell. At 8 h postinfection, cells were immunostained with FITC-conjugated anti-CD4 MAb 13B8.2. Stained cells were fixed in PBS-1% paraformaldehyde before flow-cytometric analysis. The level of cell surface expression is indicated by the shift of the solid histogram to the right from the open control histogram (T7-FITC, MAb 13B8.2 on cells infected with vTF7-3 alone).

endo H resistant (54). During the pulse, CD4 was sensitive to endo H treatment, and its resistant form was detected after 1 h of chase or more, whereas the chimeric protein remained endo H sensitive even after 4 h of chase (Fig. 5). This suggests that CD4-E1₃₅₃ does not reach the trans-Golgi region.

To identify the organelle(s) containing CD4-E1₃₅₃, we employed double-label immunofluorescence microscopy with antibodies to known ER, intermediate-compartment, and Golgi antigens. The pattern observed after labeling with MAb OKT4 was similar to that revealed by an antibody against PDI (an ER-resident protein) and different from those shown by antibodies directed against mannosidase II (a marker of the Golgi apparatus) or Rab1 (a marker of the ER-to-Golgi intermediate

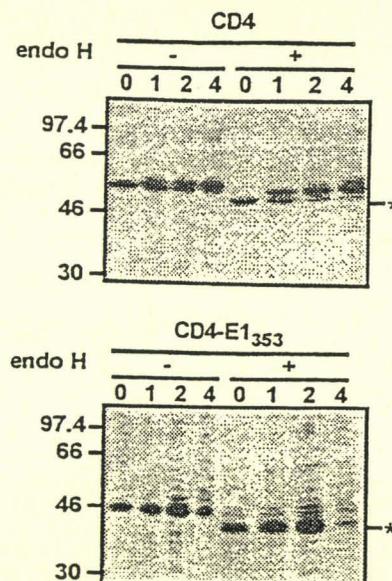


FIG. 5. Sensitivity of CD4-E1₃₅₃ to endo H treatment. HepG2 cells were coinfecting with vTF7-3 and the appropriate vaccinia virus recombinant at a multiplicity of infection of 5 PFU/cell. At 4.5 h postinfection, infected cells were pulse-labeled for 10 min and chased for the indicated times (in hours). Cell lysates were immunoprecipitated with MAb OKT4 and then treated or not with endo H. Samples were separated by SDS-PAGE (10% polyacrylamide). Deglycosylated proteins are indicated by asterisks. Sizes (in kilodaltons) of protein molecular-mass markers are indicated on the left.

compartment) (Fig. 6). These data indicate that CD4-E1₃₅₃ is localized in the ER at steady state.

The TMD of E1 is a determinant for ER retention and not retrieval. Keeping a protein in a subcellular compartment can be achieved either by a strict retention in this compartment or by retrieval. In the case of HCV glycoproteins, the E1-E2 heterodimer is genuinely retained in the ER without recycling through the Golgi apparatus, and the TMD of E2 has been shown to be responsible for static retention of E2 in the ER (15). Here, we wanted to know whether ER retention by the TMD of E1 would involve a similar mechanism.

As a first approach to answer this question, chimeric proteins between the ectodomain of CD8 and the TMD of E1 were constructed (CD8-E1₃₅₃ and CD8-E1₃₄₇; Fig. 1). The human CD8 protein is a uniquely *O*-glycosylated type I membrane protein (29, 43). Since the initial step of *O*-glycosylation occurs in an early Golgi compartment (44), chimeric proteins containing the ectodomain of CD8 (CD8-E1₃₅₃ and CD8-E1₃₄₇) should be useful tools for analyzing the mechanism of retention mediated by the TMD of E1. If it involves recycling through the Golgi apparatus, addition of *O*-linked GalNAc should occur in the CD8 portion of the chimeric proteins. Molecules containing *O*-glycans should therefore accumulate after several cycles through the cis-Golgi region and back to the ER, and this should be visualized by a shift of the electrophoretic mobility in SDS-PAGE (32, 44). CD8 is synthesized as a 27-kDa species (CD8u), which is converted to a transient and initially glycosylated 29-kDa form, before the full maturation to a completely glycosylated 32- to 34-kDa doublet (CD8m). The intermediate form is generated in an early Golgi compartment, and the mature form in the trans-Golgi/TGN region. When expressed in HepG2 cells with the vaccinia virus/T7 expression system, the intermediate 29-kDa form was barely detectable (Fig. 7). This is probably due to a faster processing of the glycans in HepG2 cells. Another characteristic of CD8

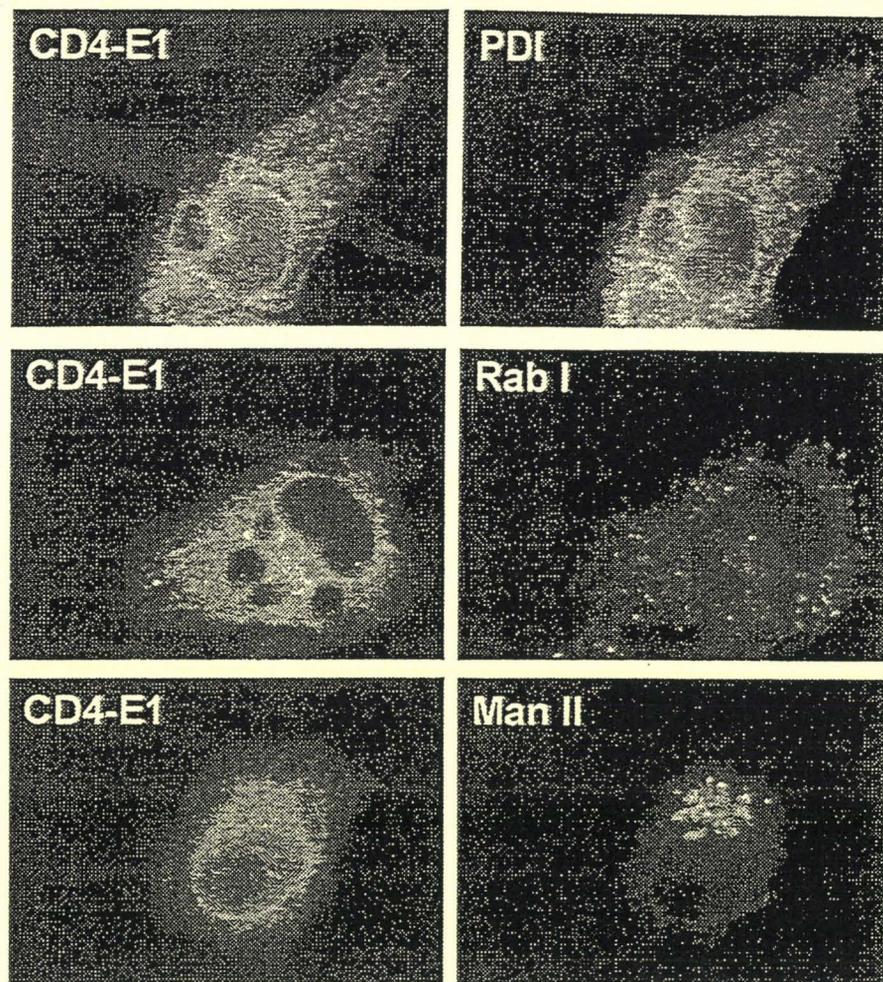


FIG. 6. Indirect double-label immunofluorescence characterization of the organelle containing CD4-E1₃₅₃. Subconfluent HepG2 cells grown on coverslips were infected with vTF7-3 and vCD4-E1₃₅₃ at a multiplicity of infection of 3 PFU/cell. At 8 h postinfection, cells were fixed with paraformaldehyde, permeabilized with Triton X-100, and labeled with anti-CD4 MAb OKT4 (secondary donkey anti-mouse IgG-Cy2) and antibodies to PDI, Rab I, or mannosidase II (Man II) (secondary donkey anti-rabbit IgG-rhodamine red-X).

expression in HepG2 cells is the longer half-life of the 27-kDa precursor (Fig. 7) compared to previously reported data (44). When the transmembrane and cytosolic domains of CD8 were replaced by the TMD of E1 (CD8-E1₃₅₃ and CD8-E1₃₄₇), no shift in the electrophoretic mobility of the molecules was observed in pulse-chase experiments (Fig. 7 and data not shown).

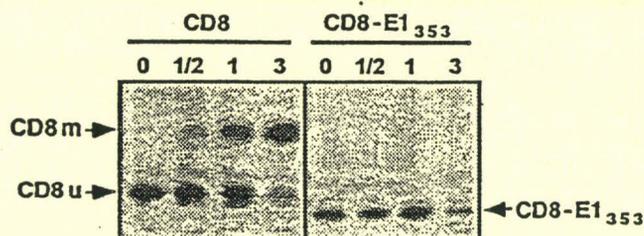


FIG. 7. Expression of CD8 and CD8-E1₃₅₃ analyzed in pulse-chase experiments. HepG2 cells were coinfecting with vTF7-3 and the appropriate vaccinia virus recombinant at a multiplicity of infection of 5 PFU/cell. At 4.5 h postinfection, infected cells were pulse-labeled for 10 min and chased for the indicated times (in hours). Cell lysates were immunoprecipitated with MAb OKT8 (anti-CD8). Samples were separated by SDS-PAGE (10% polyacrylamide). CD8u, unglycosylated precursor of CD8; CD8m, mature form of CD8.

The absence of accumulation of an immature *O*-glycosylated form suggests that neither CD8-E1₃₅₃ nor CD8-E1₃₄₇ cycle through the cis-Golgi apparatus. In addition, these data confirm that the TMD of E1 is a signal for ER localization.

As an additional approach to study the mechanism involved in ER localization, we analyzed the modifications that CD4-E1₃₅₃ glycans have potentially acquired in the compartment into which they have transited. As shown above, CD4-E1₃₅₃ is endo H sensitive when analyzed in pulse-chase experiments with chase times of up to 4 h (Fig. 5). The lack of complex-type glycosylation excludes transit through the trans- but not the cis- or medial-Golgi region. In the cis-Golgi region, these proteins would be exposed to Golgi α -mannosidase I, which would process their sugar chains to Man₅GlcNAc₂ (27). Molecules containing Man₅GlcNAc₂ should accumulate after several cycles through the cis-Golgi region and back to the ER. To better characterize their potential processing, CD4-E1₃₅₃ glycans were removed by PNGase F treatment and analyzed by affinity chromatography and HPLC. For this approach, CD4-E1₃₅₃ was labeled with [2-³H]mannose and immunoprecipitated with MAb OKT4 before PNGase F treatment and characterization of labeled glycans. Affinity chromatography analysis of these glycans showed that 100% of them bound strongly to con-

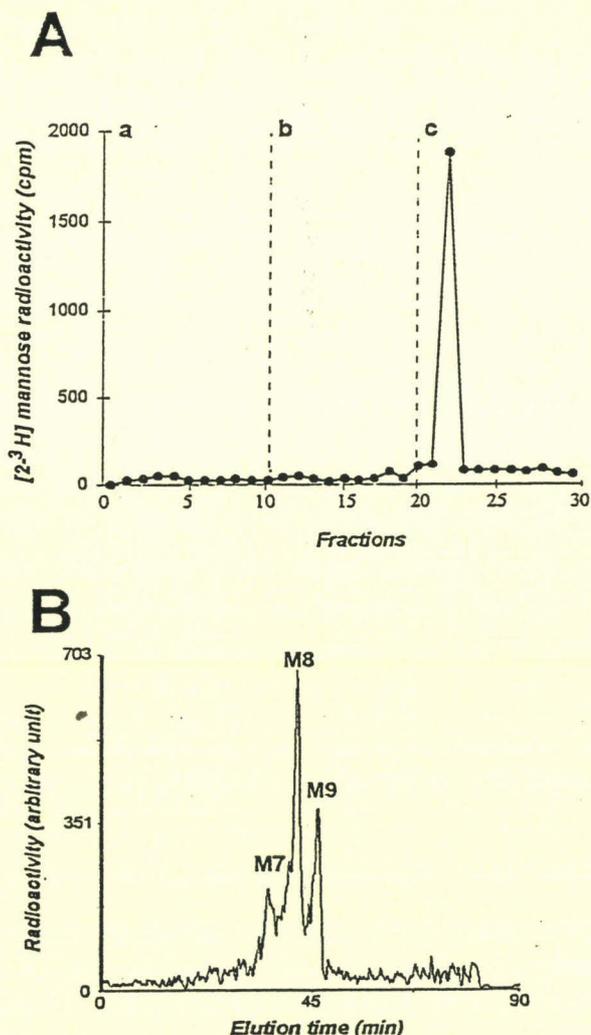


FIG. 8. Analysis of the oligosaccharides bound to CD4-E1₃₅₃. HepG2 cells were infected with vTF7-3 and vCD4-E1₃₅₃. At 4.5 h postinfection, infected cells were pulse-labeled for 30 min with [²⁻³H]mannose, chased for an additional 4 h, and lysed with Triton X-100. Cell lysates were used for immunoprecipitation with MAb OKT4, and labeled glycans were removed by PNGase F treatment as described in Materials and Methods. Panel A represents concanavalin A-Sepharose chromatography of glycan fractions obtained after PNGase F treatment with the equilibration buffer alone (a), with 10 mM methyl- α -D-glucoside (b), or with 100 mM methyl- α -D-mannoside (c). Panel B shows HPLC analysis of glycans bound to immunoprecipitated glycoproteins after PNGase F treatment. M7, M8, and M9 indicate the oligosaccharide species possessing two GlcNAc residues at their reducing end and 7, 8, or 9 mannose residues, respectively.

canavalin A and eluted in a buffer containing 100 mM α -D-mannoside (buffer c) (Fig. 8A and data not shown), indicating that CD4-E1₃₅₃ oligosaccharide moieties are of the oligomannoside type only. In addition, HPLC analysis of these glycans demonstrated the presence of three species: Man₉, Man₈, and Man₇GlcNAc₂, respectively (Fig. 8B and data not shown). Since the oligosaccharide precursor which is transferred onto nascent proteins is the Glc₃Man₉GlcNAc₂, this reveals the sequential actions of ER glucosidases I and II and at least the action of ER mannosidase yielding Man₈ species. The presence of Man₇ is probably due to the trimming of mannose residues occurring after prolonged residence in the ER (21). Indeed, both Man₉ mannosidase (5) and soluble ER mannosidase (6) have been demonstrated to be able to trim the mannosidic linkage down to Man₆GlcNAc₂ species. As ex-

pected, the affinity chromatography and HPLC profiles of the glycans associated with full-length CD4 revealed the presence of processed species characteristic of the Golgi compartment (data not shown). The nature of the glycans observed in this work confirms the data obtained with CD8-E1₃₅₃ and CD8-E1₃₄₇ and indicates that CD4-E1₃₅₃ is retained in the ER and cannot reach the Golgi vesicles where additional processing takes place.

DISCUSSION

Due to their limited genetic capacity, viruses exploit basic cellular mechanisms throughout their replicative cycle. For instance, the maturation of viral proteins in infected cells involves mostly host-cell metabolic pathways, including localization mechanisms, folding proteins, and enzymes that modify the primary translation product. For this reason, viral glycoproteins have often been used as tools for cell biology studies. Viral and cellular proteins in the secretory pathway contain some information in their primary structure for determining their subcellular localization. Keeping proteins in a particular compartment can be achieved either by a strict retention in this compartment or by retrieval. Many luminal and type I transmembrane proteins of the ER contain carboxy-terminal sequences of the prototypes KDEL and KKXX, respectively (39, 40). These sequences act as retrieval signals, returning proteins that have left the compartment in which they reside (41). HCV glycoproteins have been shown to localize in the ER at steady state (11), but they do not cycle between the ER and the Golgi apparatus (15). Recently, we have shown that the TMD of E2 is a signal for retention in the ER (9), and in this report we show that the TMD of E1 can play a similar function.

Immunolocalization of chimeric proteins containing the TMD of E1 and analysis of their glycans showed that this TMD is a signal for static retention in the ER. Proteins are transported from the ER to the Golgi complex by carrier vesicles that are formed from the membrane of the ER and that selectively fuse with the cis-Golgi membrane. These vesicles are coated with a set of proteins known as coatomer protein II (COPII) (4). Partitioning of membrane proteins into these vesicles is now believed to be based on a positive sorting signal in the cargo molecules which could interact with the membrane-proximal surfaces of the COPII coat proteins (24). A number of transmembrane proteins that are transported out of the ER contain the motif Asp-X-Glu (where X is any amino acid) in their cytosolic C-terminal domain. Mutational studies of this diacidic motif in the context of the cytoplasmic tail of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G (VSV-G) showed that mutation of either acidic residue to alanine reduced by fivefold the rate of transport of VSV-G from the ER (42). A different motif (paired phenylalanine residues near the C terminus) that also specifies exit from the ER has also been identified in proteins that recycle within the early part of the secretory pathway (12, 16). There is no experimental evidence that HCV glycoproteins contain a cytoplasmic tail or that they possess a positive sorting signal. This could explain some retention of HCV glycoproteins in the ER. However, in the absence of this type of signal, we would expect to detect some slow release of HCV glycoproteins out of the ER, as was observed for mutants of VSV-G deleted of their cytoplasmic tail (42). TMDs have been previously identified as ER localization signals of some proteins (1, 58). For these proteins, it has not been shown whether a mechanism for retrieval or strict retention is involved. Similarly, the transmembrane domain of Golgi proteins and part of their flanking regions contain sufficient information for Golgi retention (41). For these proteins,

subcellular localization is not due to retrieval from other compartments but to strict retention. Although the mechanism by which Golgi retention occurs is still unclear, it has been suggested that membrane thickness could play a role (7). Such a "lipid-based" mechanism could also be responsible for the ER retention mediated by the TMDs of E1 and E2.

HCV glycoprotein complex has at least two signals for ER retention. Recently, we have reported that the TMD of E2 is involved in ER localization (9), and here we show that the TMD of E1 plays a similar role. Enveloped viruses acquire their envelope by budding through one of several host cellular membranes. There needs therefore to be an accumulation of viral membrane glycoproteins, which form the spikes, in the appropriate compartment before budding can take place (46). A strategy that most of these viruses have developed is to endow the spike proteins with signals for compartment-specific localization (2, 3, 22, 30, 31, 57). The TMDs of E1 and/or E2 probably play such a role in retaining HCV glycoprotein complex in the ER where budding is supposed to occur (15). Why has the HCV glycoprotein complex evolved two signals for ER retention? One reason could be that it is necessary to maintain both proteins in the ER before they interact together to form a complex. However, these proteins also interact during their folding (8). In addition, only folded proteins are supposed to leave the ER (20). Alternatively, the fact that both TMDs act as retention signals could be due to the constraints imposed by the other functions played by these domains. Besides their role in ER retention, the TMDs of E1 and E2 also are responsible for the membrane anchor, serve as signal sequences, and are involved in E1-E2 interactions. Mutations in the TMD of one of these glycoproteins, which would suppress its ER localization function, would not probably allow this domain to retain the other functions.

In conclusion, the TMDs of E1 and E2 are both involved in static retention in the ER. As multifunctional domains, these TMDs seem to play a crucial role for HCV envelope formation, and further studies will be needed to decipher their different functions.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Françoise Jacob-Dubuisson for critical reading of the manuscript, F. Penin for help in the sequence analyses of E1, and Sophana Ung for excellent technical assistance. We are grateful to D. R. Littman, B. Moss, and K. Moremen for the gifts of plasmids containing the sequence of CD8, the vaccinia virus recombinant vTF7-3, and the anti-mannosidase II antibody, respectively.

This work was supported by the CNRS, the Institut Pasteur de Lille, and grant 9736 from the ARC.

REFERENCES

- Ahn, K., E. Szczesna-Skorupa, and B. Kemper. 1993. The amino-terminal 29 amino acids of cytochrome P450 2C1 are sufficient for retention in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 268:18726-18733.
- Andersson, A. M., L. Melin, A. Bean, and R. F. Pettersson. 1997. A retention signal necessary and sufficient for Golgi localization maps to the cytoplasmic tail of a *Bunyaviridae* (Uukuniemi virus) membrane glycoprotein. *J. Virol.* 71:4717-4727.
- Armstrong, J., and S. Patel. 1991. The Golgi sorting domain of coronavirus E1 protein. *J. Cell Sci.* 98:567-575.
- Barlowe, C., L. Orci, T. Yeung, M. Hosobuchi, S. Hamamoto, N. Salama, M. F. Rezac, M. Ravazzola, M. Amherdt, and R. Schekman. 1994. COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* 77:895-907.
- Bause, E., W. Breuer, J. Schweden, R. Roesser, and R. Geyer. 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.
- Bischoff, J., and R. Kornfeld. 1986. The use of 1-deoxymannojirimycin to evaluate the role of various α -mannosidases in oligosaccharide processing in intact cells. *J. Biol. Chem.* 261:4758-4765.
- Bretcher, M. S., and S. Munro. 1993. Cholesterol and Golgi apparatus. *Science* 261:1280-1281.
- Choukhi, A., S. Ung, C. Wychowski, and J. Dubuisson. 1998. Involvement of endoplasmic reticulum chaperones in folding of hepatitis C virus glycoproteins. *J. Virol.* 72:3851-3858.
- Cocquerel, L., J.-C. Meunier, A. Pillez, C. Wychowski, and J. Dubuisson. 1998. A retention signal necessary and sufficient for endoplasmic reticulum localization maps to the transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E2. *J. Virol.* 72:2183-2191.
- Cocquerel, L., C. Wychowski, F. Minner, F. Penin, and J. Dubuisson. Unpublished data.
- Deleersnyder, V., A. Pillez, C. Wychowski, K. Blight, J. Xu, Y. S. Hahn, C. M. Rice, and J. Dubuisson. 1997. Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes. *J. Virol.* 71:697-704.
- Dominguez, M., K. Dejgaard, J. Fullekrug, S. Dahan, A. Fazel, J. P. Paccoud, D. Y. Thomas, J. J. Bergeron, and T. Nilsson. 1998. gp25L/emp24/p24 protein family members of the cis-Golgi network bind both COP I and II coatomer. *J. Cell Biol.* 140:751-765.
- Dubuisson, J., H. H. Hsu, R. C. Cheung, H. B. Greenberg, D. G. Russell, and C. M. Rice. 1994. Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. *J. Virol.* 68:6147-6160.
- Dubuisson, J., and C. M. Rice. 1996. Hepatitis C virus glycoprotein folding: disulfide bond formation and association with calnexin. *J. Virol.* 70:778-786.
- Duvet, S., L. Cocquerel, A. Pillez, R. Cacan, A. Verbert, D. Moradpour, C. Wychowski, and J. Dubuisson. 1998. Hepatitis C virus glycoprotein complex localization in the endoplasmic reticulum involves a determinant for retention and not retrieval. *J. Biol. Chem.* 273:32088-32095.
- Fiedler, K., M. Veit, M. A. Stammes, and J. E. Rothman. 1996. Bimodal interaction of coatomer with the p24 family of putative cargo receptors. *Science* 273:1396-1399.
- Fournillier-Jacob, A., A. Cahour, N. Escriou, M. Girard, and C. Wychowski. 1996. Processing of the E1 glycoprotein of hepatitis C virus expressed in mammalian cells. *J. Gen. Virol.* 77:1055-1064.
- Francki, R. L. B., C. M. Fauquet, D. L. Knudson, and F. Brown. 1991. Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol.* 2(Suppl.):223.
- Fuerst, T. R., E. G. Niles, F. W. Studier, and B. Moss. 1986. Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:8122-8126.
- Hammond, C., and A. Helenius. 1995. Quality control in the secretory pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7:523-529.
- Hebert, D. N., B. Foellmer, and A. Helenius. 1995. Glucose trimming and reglycosylation determine glycoprotein association with calnexin in the endoplasmic reticulum. *Cell* 81:425-433.
- Hobman, T. C., L. Woodward, and M. G. Farquahr. 1995. Targeting of a heterodimeric membrane complex to the Golgi complex: rubella virus E2 glycoprotein contains a transmembrane Golgi retention signal. *Mol. Biol. Cell.* 6:7-20.
- Hussy, P., G. Schmid, J. Mous, and H. Jacobsen. 1996. Purification and in vitro-phospholabeling of secretory envelope proteins E1 and E2 of hepatitis C virus expressed in insect cells. *Virus Res.* 45:45-57.
- Kaiser, C., and S. Ferro-Novick. 1998. Transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10:477-482.
- Kieny, M.-P., R. Lathé, R. Drillien, D. Spehner, S. Skory, D. Schmitt, T. Wiktor, H. Koprowski, and J.-P. Lecocq. 1984. Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus. *Nature* 312:163-166.
- Kmićik, D., V. Herman, C. J. M. Stroop, J. C. Michalski, A. M. Mir, O. Labiau, A. Verbert, and R. Cacan. 1995. Catabolism of glycan moieties of lipid intermediates leads to a single Man₉GlcNAc oligosaccharide isomer: a study with permeabilized CHO cells. *Glycobiology* 5:483-494.
- Kornfeld, R., and S. Kornfeld. 1985. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* 54:631-664.
- Kyte, J., and R. F. Doolittle. 1982. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157:105-132.
- Littman, D. R., Y. Thomas, P. J. Maddon, L. Chess, and R. Axel. 1985. The isolation and sequence of the gene encoding T8: a molecule defining functional classes of T lymphocytes. *Cell* 40:237-246.
- Locker, J. K., J. Klumperman, V. Oorschot, M. C. Horzinek, H. J. Geuze, and P. J. M. Rottier. 1994. The cytoplasmic tail of mouse hepatitis virus M protein is essential but not sufficient for its retention in the Golgi complex. *J. Biol. Chem.* 269:28263-28269.
- Machamer, C. E., and J. K. Rose. 1987. A specific transmembrane domain of a coronavirus E1 glycoprotein is required for its retention in the Golgi region. *J. Cell Biol.* 105:1205-1214.
- Martire, G., G. Mottola, M. C. Pascale, N. Malagolini, L. Turrini, F. Serafini-Cessi, M. R. Jackson, and S. Bonatti. 1996. Different fate of a single reporter protein containing KDEL or KKXX targeting signals stably expressed in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 271:3541-3547.
- Matsuura, Y., and T. Miyamura. 1993. The molecular biology of hepatitis C virus. *Semin. Virol.* 4:297-304.

34. Matsuura, Y., T. Suzuki, R. Suzuki, M. Sato, H. Aizaki, I. Saito, and T. Miyamura. 1994. Processing of E1 and E2 glycoproteins of hepatitis C virus expressed in mammalian and insect cells. *Virology* 205:141-150.
35. Michalak, J.-P., C. Wychowski, A. Choukhi, J.-C. Meunier, S. Ung, C. M. Rice, and J. Dubuisson. 1997. Characterization of truncated forms of hepatitis C virus glycoproteins. *J. Gen. Virol.* 78:2299-2306.
36. Mizushima, H., M. Hijikata, S.-I. Asabe, M. Hirota, K. Kimura, and K. Shimotohno. 1994. Two hepatitis C virus glycoprotein E2 products with different C termini. *J. Virol.* 68:6215-6222.
37. Moremen, K. W., O. Touster, and P. W. Robbins. 1991. Novel purification of the catalytic domain of Golgi α -mannosidase II: characterization and comparison with the intact enzyme. *J. Biol. Chem.* 266:16876-16885.
38. Moss, B., O. Elroy-Stein, T. Mizukami, W. A. Alexander, and T. R. Fuerst. 1990. New mammalian expression vectors. *Nature* 348:91-92.
39. Munro, S., and H. R. B. Pelham. 1987. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* 48:899-907.
40. Nilsson, T., M. R. Jackson, and P. A. Peterson. 1989. Short cytoplasmic sequences serve as retention signals for transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* 58:707-718.
41. Nilsson, T., and G. Warren. 1994. Retention and retrieval in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6:517-521.
42. Nishimura, N., and W. E. Balch. 1997. A di-acidic signal required for selective export from the endoplasmic reticulum. *Science* 277:556-558.
43. Nitsch, L., D. Tramontano, F. S. Ambesi-Impiombato, N. Quarto, and S. Bonatti. 1985. Morphological and functional polarity of an epithelial thyroid cell line. *Eur. J. Cell Biol.* 38:57-66.
44. Pascale, M. C., M. C. Erra, N. Malagolini, F. Serafini-Cessi, A. Leone, and S. Bonatti. 1992. Post-translational processing of an *O*-glycosylated protein, the human CD8 glycoprotein, during the intracellular transport to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 267:25196-25201.
45. Persson, B., and P. Argos. 1994. Prediction of transmembrane segments in proteins utilizing multiple sequence alignments. *J. Mol. Biol.* 237:182-192.
46. Pettersson, R. F. 1991. Protein localization and virus assembly at intracellular membranes. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 170:67-104.
47. Popot, J.-L. 1993. Integral membrane protein structure: transmembrane α -helices as autonomous folding domains. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3:532-540.
48. Ralston, R., K. Thudium, K. Berger, C. Kuo, B. Gervase, J. Hall, M. Selby, G. Kuo, M. Houghton, and Q.-L. Choo. 1993. Characterization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia viruses. *J. Virol.* 67:6753-6761.
49. Reinherz, E. L., P. C. Kung, G. Goldstein, and S. F. Schlossman. 1979. Separation of functional subsets of human T cells by a monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4061-4065.
50. Rice, C. M. 1996. *Flaviviridae*: viruses and their replication, p. 931-959. In B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley (ed.), *Fields virology*, 3rd ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa.
51. Robbins, P. W., R. B. Timble, D. F. Wirth, C. Hering, F. Maley, G. F. Maley, R. Das, B. W. Gibson, N. Royal, and K. Biemann. 1984. Primary structure of the *Streptomyces* enzyme endo- β -*N*-acetylglucosaminidase H. *J. Biol. Chem.* 259:7577-7583.
52. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
53. Selby, M. J., E. Glazer, F. Masiarz, and M. Houghton. 1994. Complex processing and protein:protein interactions in the E2:NS2 region of HCV. *Virology* 204:114-122.
54. Shin, J., R. L. Dunbrack, S. Lee, and J. L. Strominger. 1991. Signals for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum studied with CD4 truncation mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1918-1922.
55. Spaete, R. R., D. Alexander, M. E. Rugroden, Q.-L. Choo, K. Berger, K. Crawford, C. Kuo, S. Leng, C. Lee, R. Ralston, K. Thudium, J. W. Tung, G. Kuo, and M. Houghton. 1992. Characterization of the hepatitis E2/NS1 gene product expressed in mammalian cells. *Virology* 188:319-330.
56. Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680.
57. Weisz, O. A., A. M. Swift, and C. E. Machamer. 1993. Oligomerization of a membrane protein correlates with its retention in the Golgi complex. *J. Cell Biol.* 122:1185-1196.
58. Yang, M., J. Ellenberg, J. S. Bonifacino, and A. M. Weissman. 1997. The transmembrane domain of a carboxy-terminal anchored protein determines localization to the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 272:1970-1975.

I. Discussion de l'article III

Les protéines CD4 et CD8 sont deux glycoprotéines membranaires exprimées à la surface cellulaire. CD4 représente une N-glycosylprotéine possédant deux sites de N-glycosylation. L'un d'entre eux présente des glycanes de type oligomannosidique indiquant une éventuelle inaccessibilité de l'oligosaccharide aux glycosyltransférases golgiennes. Par contre, CD8 est une O-glycosylprotéine membranaire de type I. A la différence de la N-glycosylation qui s'effectue de manière co-traductionnelle par le transfert « en bloc » d'un oligosaccharide sur la protéine dans le RER, la biosynthèse des O-glycanes s'effectue de façon post-traductionnelle : elle commence par le transfert d'un résidu de N-acétylgalactosamine sur les résidus Ser/Thr d'une protéine puis continue par l'addition successive de monosaccharides. Le processus de O-glycosylation reste assez mal défini, mais de nombreuses études suggèrent qu'il aurait pour origine le compartiment *cis*-golgien (pour revue Brockhausen, 1995).

Ainsi, l'étude de l'expression de protéines chimériques exprimant l'ectodomaine des glycoprotéines CD4 et CD8 fusionné au domaine transmembranaire de E1 (E1₃₅₃₋₃₈₃), est parue intéressante pour déterminer l'implication du domaine transmembranaire de E1 dans la rétention de la glycoprotéine dans le RER.

A. Etude de la localisation subcellulaire de CD4-E1₃₅₃

Une première approche biologique nous a permis de montrer que la protéine chimérique CD4-E1₃₅₃ n'est pas exprimée à la surface cellulaire contrairement à la glycoprotéine CD4 exprimée seule (voir figures 3 et 4 de l'article III). Ces résultats préliminaires indiquent que CD4-E1₃₅₃ est maintenue dans un compartiment intracellulaire. Les expériences de co-immunolocalisation nous révèlent que la distribution subcellulaire de CD4-E1₃₅₃ est similaire à celle de la PDI résidente du RER (figure 6 de l'article III). Elle est, par contre, bien différente de la répartition plus ponctuelle de Rab1 (marqueur de l'ERGIC) et de la répartition périnucléaire de la mannosidase II golgienne.

Ainsi, la répartition de CD4-E1₃₅₃ suggère fortement une localisation strictement réticulaire. Pour nous conforter dans cette hypothèse, nous avons étudié la nature des glycanes portés par la protéine chimérique. L'expérience de pulse-chase ([³⁵S] méthionine) nous indique que les glycanes portés par CD4-E1₃₅₃ restent sensibles à l'endo H : cette sensibilité nous indique que

les glycanes ne sont pas de type complexe, mais compte tenu de la spécificité de l'enzyme, une rétention par recyclage ne peut être exclue. Ainsi, nous avons considéré la structure des glycanes afin de préciser la localisation de CD4-E1₃₅₃. Comme nous l'avons précédemment décrit (page 107), la présence des trois espèces oligomannosidiques Man₍₇₋₉₎GlcNAc₂ assure une localisation spécifiquement réticulaire (figure 8 de l'article III). Cette analyse structurale nous permet également de vérifier que la protéine chimérique CD4-E1₃₅₃ est stable d'un point de vue conformationnel. En effet, l'absence d'oligomannosides monoglucosylés qui témoignent du caractère immature d'une glycoprotéine nouvellement synthétisée, nous indique que la rétention de CD4-E1₃₅₃ ne résulte pas d'un problème de mise en conformation lié au contrôle de qualité mais bien de la présence d'un signal de rétention spécifique du RER.

B. Etude de la localisation subcellulaire de CD8-E1₃₅₃

Dans le but de confirmer l'absence de recyclage de CD4-E1₃₅₃, nous avons étudié la O-glycosylation de la glycoprotéine chimérique CD8-E1₃₅₃. Pascale *et al.* (1992) ont montré que la glycoprotéine CD8 exprimée seule, acquiert ses O-glycanes dans le compartiment *cis*-golgien : la protéine est d'abord retrouvée sous une forme non glycosylée de 27 kDa qui donne naissance à un intermédiaire O-glycosylé immature de 29 kDa dont la maturation finale conduit à une forme de 32-34 kDa. De cette façon, un recyclage permanent de CD8-E1₃₅₃ à partir des compartiments pré-golgiens devrait se traduire par l'acquisition de O-glycanes qui peut être mise en évidence par un changement de migration électrophorétique de la molécule. Dans notre étude, aucune glycosylation n'est observée sur la protéine chimérique CD8-E1₃₅₃, confirmant ainsi l'absence de recyclage dans la rétention observée pour CD4-E1₃₅₃ (figure 7 de l'article III).

II. Comment expliquer l'implication d'un domaine transmembranaire comme signal de rétention stricte ?

On peut s'interroger sur les facteurs qui conduisent un domaine transmembranaire à retenir spécifiquement une protéine dans un compartiment subcellulaire donné. Il est, par exemple, clairement établi que le domaine transmembranaire des galactosyltransférases et sialyltransférases golgiennes contiennent les informations suffisantes pour assurer une rétention

stricte dans leur compartiment d'action (Nilsson et Warren, 1994). Le mécanisme mis en jeu reste à déterminer, mais il est suggéré que l'épaisseur de la membrane soit directement impliquée (Bretscher et Munro, 1993). En effet, la rigidité des membranes est déterminée par leur composition lipidique : à juste titre, il est montré que la proportion de cholestérol, connu pour augmenter l'épaisseur et la rigidité des membranes, augmente progressivement le long de la voie de sécrétion. Ainsi, sa présence accrue au sein des membranes golgiennes pourrait empêcher la déformation membranaire impliquée dans la formation des vésicules de sécrétion et expliquer la rétention spécifique des glycosyltransférases dans les membranes golgiennes. D'autre part, le domaine transmembranaire des protéines golgiennes est, d'une façon générale, plus court que celui des protéines membranaires retrouvées au niveau de la membrane plasmique (Munro, 1995). Ainsi, ces résultats suggèrent que la longueur du domaine transmembranaire présente également une importance dans le mécanisme de rétention des protéines dans le compartiment golgien.

A l'heure actuelle, plusieurs domaines transmembranaires ont été identifiés comme signaux de rétention de protéines dans le RER (Ahn *et al.*, 1993 ; Yang *et al.*, 1997) mais pour lesquels la nature de la rétention n'a pas été spécifiée. Cependant, à l'image des protéines golgiennes, la longueur du domaine transmembranaire semble représenter un facteur important dans la rétention de ces protéines. En effet, Yang *et al.* (1997) ont étudié l'influence de la longueur du segment membranaire de la protéine UBC6 de la levure sur la rétention de la protéine. C'est ainsi qu'ils ont montré que l'allongement (de 4 ou 9 acides aminés) du segment membranaire pouvait conduire à l'envoi de la protéine dans l'appareil de Golgi ou à l'export à la surface de la cellule. D'autre part, Bonifacino *et al.* (1991) ont montré que certains acides aminés chargés (Arg, Asp, Lys, Glu) ajoutés à l'intérieur du domaine transmembranaire de l'antigène Tac, pouvaient induire une rétention ou une dégradation de la protéine.

L'étude de l'influence de la longueur du domaine transmembranaire de la glycoprotéine E2 n'a pas permis de rendre compte de son importance sur la rétention de la molécule. Par contre, il semblerait que les domaines transmembranaires de E1 et E2 présentent des acides aminés chargés à l'interface des deux segments membranaires des glycoprotéines. En effet, des études de délétions partielles des deux glycoprotéines ont permis de dresser un modèle hypothétique de leur structure dans lequel la glycoprotéine E1 présenterait les résidus Asn et Lys et E2, les résidus Asp et Arg (Figure 35). Ainsi, la présence de ces résidus chargés pourrait expliquer la rétention spécifique des deux glycoprotéines au sein du RER.

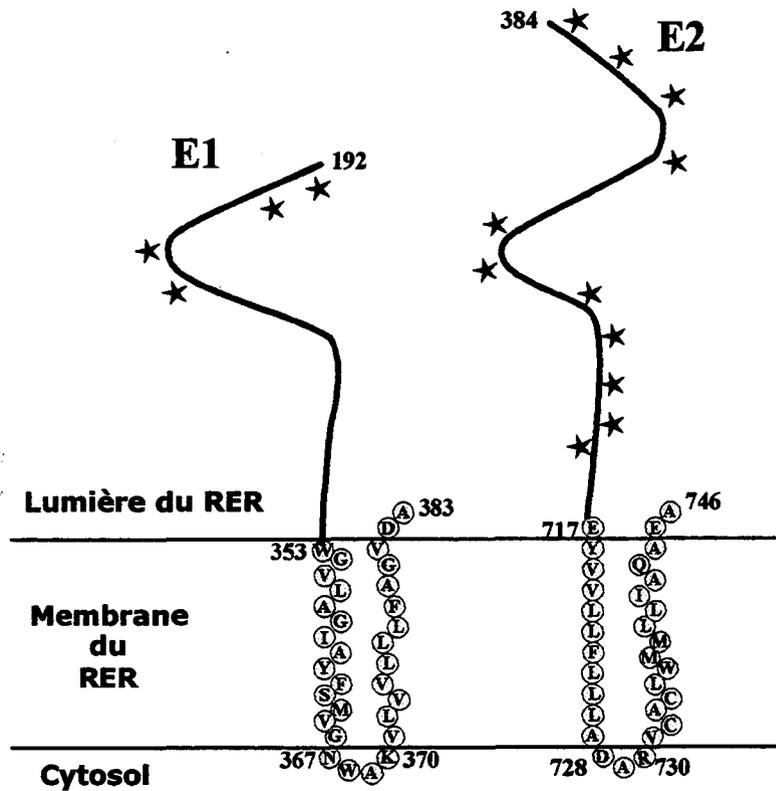


Figure 35 : Modèles hypothétiques de la structure des glycoprotéines E1 et E2.
(Symbole : ★ N-glycane)

III. Conclusion : Intérêt biologique

Les virus ont développé différents processus afin d'acquérir leur enveloppe. Certains, le virus de la stomatite vésiculaire ou le virus de l'influenza bourgeonnent au niveau de la membrane plasmique. D'autres, acquièrent leur enveloppe au niveau des compartiments intracellulaires : ainsi, les rotavirus, les coronavirus et les bunyavirus bourgeonnent dans le RER, l'ERGIC et l'appareil de Golgi respectivement. La plupart de ces virus ont développé une stratégie qui consiste à se doter de protéines d'enveloppe présentant un signal d'adressage et de rétention spécifique de compartiments subcellulaires.

Pour les Flavivirus, les connaissances actuelles suggèrent que les virions apparaissent dans les vésicules réticulaires pour être libérés par la voie d'exocytose (Pettersson, 1991) (figure 36). Ainsi, la mise en évidence d'une rétention stricte des glycoprotéines E1 et E2 du VHC dans le RER est un argument supplémentaire qui confirme que la formation des particules virales s'effectue à partir des membranes du RER (étape 7 de la figure 36).

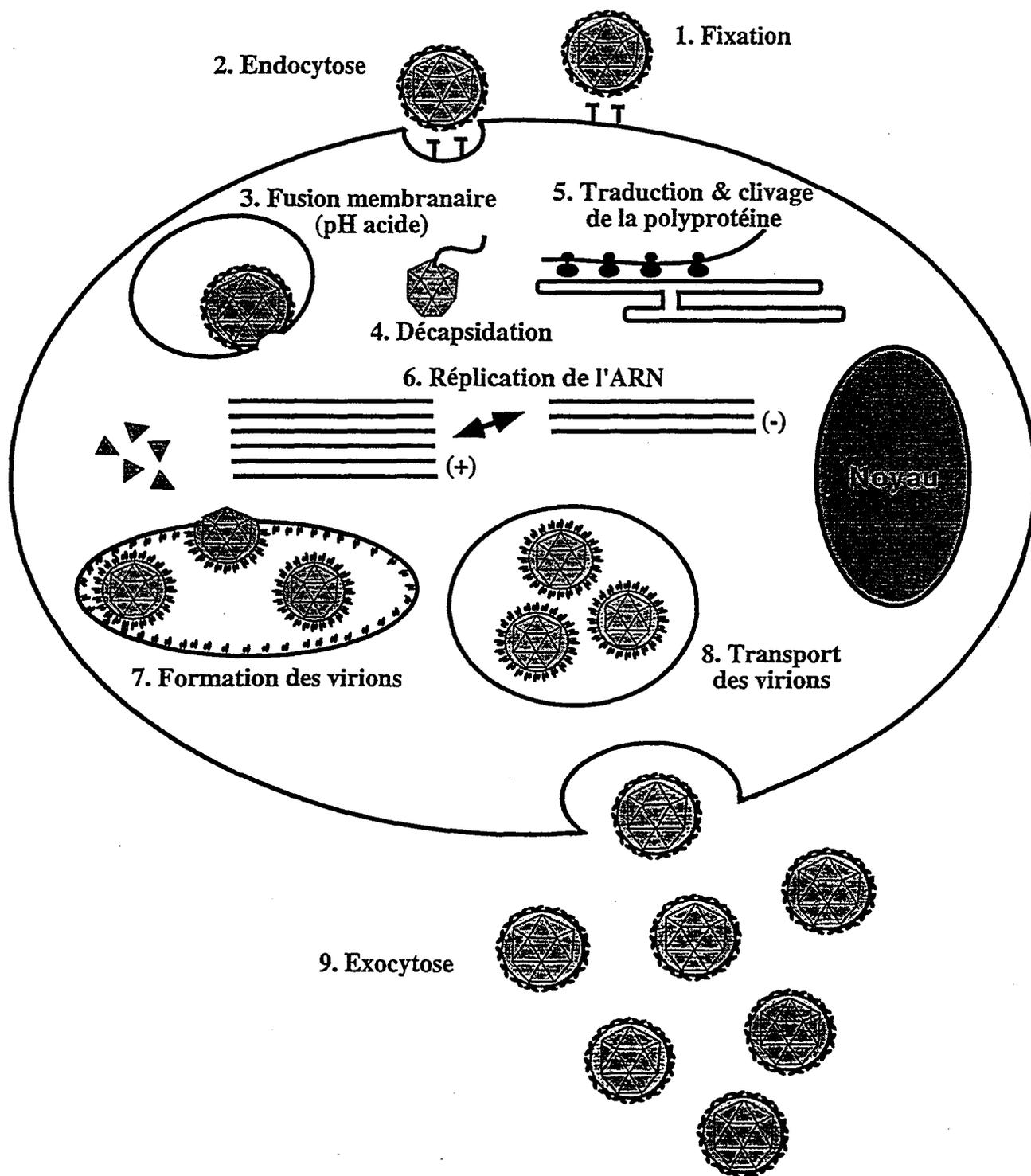


Figure 36 : Cycle infectieux des Flavivirus.

I. Conclusion générale

Différents compartiments intracellulaires sont impliqués dans la biosynthèse des N-glycosylprotéines. Le RER représente non seulement le compartiment de synthèse mais c'est également le compartiment dans lequel se détermine la destinée des glycoprotéines nouvellement synthétisées. En effet, le RER contient tous les facteurs nécessaires à l'étape de mise en conformation qui sont impliqués dans le contrôle de qualité des molécules.

Au cours de notre étude, nous nous sommes particulièrement intéressés aux glycoprotéines dont les glycannes demeurent de type oligomannosidique pour lesquels nous avons montré qu'ils représentent de véritables témoins de la destinée des glycoprotéines nouvellement synthétisées.

A. Les oligomannosides solubles : témoins de la dégradation des glycoprotéines

Depuis quelques années, il a été clairement établi que le processus de N-glycosylation s'accompagnait de la libération d'oligomannosides solubles dans la lumière du RER provenant de l'activité hydrolytique de l'oligosaccharyltransférase. Les oligosaccharides libérés sont destinés à être dégradés selon un mécanisme particulier qui fait intervenir trois compartiments subcellulaires : le RER, le cytosol et les lysosomes. Alors que l'origine et la destinée des OSGn₂ étaient bien définies, l'origine des OSGn₁ restait controversée. L'hypothèse était qu'une partie d'entre eux provenait de la dégradation des glycoprotéines nouvellement synthétisées.

C'est pour étudier la relation OSGn₁/glycoprotéines que nous nous sommes intéressés à un modèle d'étude particulier : les cellules B3F7 présentant une mutation dans les gènes impliqués dans la glycosylation. Ces cellules déficientes en Man-P-Dol synthétase transfèrent sur les protéines des glycannes tronqués de type Glc₃Man₅GlcNAc₂. L'originalité de ce modèle réside sur la libération importante d'oligomannosides solubles par rapport aux cellules CHO sauvages. L'étude de la nature de ces oligomannosides a montré la présence d'une quantité plus importante d'OSGn₁ que d'OSGn₂. Prenant en considération que les OSGn₂ libérés par l'hydrolyse des intermédiaires lipidiques sont à l'origine des OSGn₁ après transport dans le cytosol, il paraissait évident que les OSGn₁ excédentaires devaient avoir une autre origine.

Pour distinguer les OSG_{n1} issus du catabolisme des OSG_{n2} libérés par l'activité hydrolytique de l'oligosaccharyltransférase et ceux provenant de la dégradation des glycoprotéines, nous avons utilisé un inhibiteur de la synthèse protéique : l'anisomycine. Depuis longtemps, on savait que l'utilisation d'inhibiteurs de la synthèse protéique tels que la puromycine ou la cycloheximide conduisait à la disparition des OSG_{n1} suggérant que les glycoprotéines étaient à l'origine d'une partie de ces OSG_{n1}. Cependant, la raison pour laquelle la conversion des OSG_{n2} en OSG_{n1} n'était plus observée en présence de castanospermine, restait inexplicée.

Ainsi, cette étude nous a permis de préciser que :

- ❶ l'inhibition de la synthèse des protéines provoque des changements de populations des précurseurs lipidiques : dans le modèle B3F7, elle conduit à l'accumulation de l'espèce Glc₃Man₅GlcNAc₂-PP-Dol au dépens des espèces non glucosylées.
- ❷ l'absence d'accepteur protéique conduit à la libération exclusive des espèces Glc₃Man₅GlcNAc₂ sous forme soluble grâce à l'activité hydrolytique de l'oligosaccharyltransférase. En présence de castanospermine, ces espèces s'accumulent dans la lumière du RER puisqu'elles ne peuvent être transportées dans le cytosol pour donner les OSG_{n1}.
- ❸ les OSG_{n1} ont bien une double origine : d'une part, l'hydrolyse des intermédiaires lipidiques générant les OSG_{n2} et d'autre part, la dégradation des glycoprotéines.
- ❹ les OSG_{n1} provenant de la dégradation des glycoprotéines :
 - sont libérés dans le compartiment cytosolique.
 - rejoignent le catabolisme des oligomannosides provenant de l'hydrolyse des intermédiaires lipidiques.

Diverses études ont montré que la rétention prolongée des glycoprotéines immatures ou mal conformées dans la lumière du RER peut conduire les molécules à s'engager, de façon irréversible, dans un processus de dégradation. Etant donné l'importance des glycannes dans le contrôle de qualité des glycoprotéines, il est possible d'envisager que dans le modèle B3F7, la présence de glycannes tronqués sur les protéines perturbe la mise en conformation impliquant

une rétention de ces glycoprotéines. A plus long terme, cette rétention serait à l'origine de la dégradation.

Ces dernières années, de nombreux travaux ont porté sur l'étude du processus impliqué dans la dégradation des glycoprotéines nouvellement synthétisées. A l'heure actuelle, la voie cytosolique impliquant le protéasome est suggérée et même démontrée dans certains modèles. Durant ce processus, il est clairement démontré que l'étape de déglycosylation anticipe la protéolyse proprement dite. Dans le modèle B3F7, la libération d'OSGn₁ cytosoliques est en parfait accord avec une dégradation par le protéasome plutôt qu'une dégradation impliquant la voie autophagique. Il reste à préciser la nature de l'enzyme de déglycosylation pour laquelle deux hypothèses s'offrent à nous :

- soit l'action d'une endoglucosaminidase cytosolique libérant directement les OSGn₁ observés.
- soit l'action successive d'une PNGase et d'une chitobiase cytosoliques.

B. Les oligomannosides : témoins d'une rétention réticulaire stricte

La deuxième partie de notre travail a concerné l'étude de la rétention de glycoprotéines dans le RER lorsque celui-ci représente le compartiment d'adressage des molécules. Cette étude s'est effectuée sur le modèle particulier des glycoprotéines E1 et E2 du virus de l'hépatite C. L'étude de l'assemblage des complexes E1E2 natifs a rapidement montré qu'il se présente comme un phénomène lent et relativement inefficace. Cependant, l'absence de glycannes de type complexe et l'absence d'expression des complexes à la surface cellulaire suggéraient que les hétérodimères non covalents E1E2 ne quittaient pas le RER ou le compartiment proche *cis*-golgien. Afin de déterminer l'origine de cette rétention, des études de délétion partielle ont montré que le domaine transmembranaire de E2 était nécessaire et suffisant pour retenir spécifiquement la glycoprotéine dans le RER.

De manière à déterminer la nature et à confirmer l'origine potentielle de la rétention des complexes E1E2 natifs dans le RER, nous avons utilisé les glycannes comme témoins de cette rétention.

Ainsi, nous avons montré que :

- ① les oligomannosides $\text{Man}_{(7-9)}\text{GlcNAc}_2$ retrouvés sur les glycoprotéines E1 et E2 témoignent d'une localisation spécifiquement réticulaire. Ces oligomannosides peuvent être ainsi considérés comme de véritables « marqueurs » de la rétention des complexes E1E2 dans le compartiment RER.
- ② Nous avons précisé la nature de la rétention : c'est une **rétention stricte** qui n'implique aucun recyclage à partir des compartiments pré-golgiens.
- ③ nous avons vérifié que les domaines transmembranaires des deux glycoprotéines E1 et E2 sont directement impliqués dans la rétention. L'expression de protéines chimériques (CD4-E2₇₁₈ ; CD4-E1₃₅₃ et CD8-E1₃₅₃) a effectivement permis de montrer que les domaines transmembranaires de E1 et E2 pouvaient assurer, à eux seuls, la rétention spécifique au sein du compartiment RER.

Pour les Flavivirus, il est suggéré que les virions apparaissent dans les vésicules réticulaires pour être libérés par la voie d'exocytose. Ainsi, la mise en évidence d'une rétention stricte des glycoprotéines E1 et E2 dans le RER nous a permis de confirmer que la formation des particules virales s'effectue bien à partir des membranes du RER.

II. Perspectives

Ainsi, les oligomannosides sont non seulement des témoins de la destinée des glycoprotéines au sein du RER mais de nombreux travaux montrent qu'ils en représentent également les acteurs. Dans le but de préciser davantage l'origine de la dégradation des glycoprotéines synthétisées dans le modèle B3F7, il serait donc intéressant d'exprimer une glycoprotéine à un taux suffisamment élevé de manière à pouvoir étudier à la fois d'un point de vue protéique et glycannique la destinée de cette glycoprotéine. Dans cette perspective, le modèle des glycoprotéines du virus de l'hépatite C nous semble intéressant puisqu'elles présentent une séquence transmembranaire assurant une rétention stricte du compartiment RER : tous les phénomènes observés seront donc localisés dans le RER. Pour effectuer ce travail, nous

envisageons d'exprimer les glycoprotéines (E1 et/ou E2) dans le mutant de glycosylation B3F7 à l'aide de systèmes transitoires d'expression. Notre choix s'est porté sur l'utilisation du virus de type Sindbis puisqu'il permet d'infecter efficacement les cellules CHO contrairement au virus de la Vaccine. Ainsi, à l'aide de marquage protéique ($[^{35}\text{S}]$ méthionine) ou glycanique ($[2\text{-}^3\text{H}]$ mannose) suivi d'immunoprécipitation des molécules, il est envisageable d'étudier :

- l'influence de glycannes tronqués sur le repliement et l'assemblage des glycoprotéines E1 et E2.
- les potentialités d'interaction avec la calnexine qui est directement impliquée dans l'étape de mise en conformation et dans l'assemblage des complexes E1E2 natifs dans le modèle du virus de l'hépatite C
- dans le cas d'une dégradation des glycoprotéines, nous tâcherons de préciser davantage le mécanisme de déglycosylation puisque la nature exacte de l'enzyme reste à déterminer.

APPENDICE

TECHNIQUE

Cette partie représente un complément d'informations techniques des Matériels et Méthodes qui ne font pas l'objet d'un commentaire au sein des paragraphes « materials and methods » des articles :

« Cytosolic deglycosylation process of newly synthesized glycoproteins generates oligomannosides possessing one GlcNAc residue at the reducing end ».

« Hepatitis C virus glycoprotein complex localization in the endoplasmic *reticulum* involves a determinant for retention and not retrieval ».

« The transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E1 is a signal for static retention in the endoplasmic *reticulum* ».

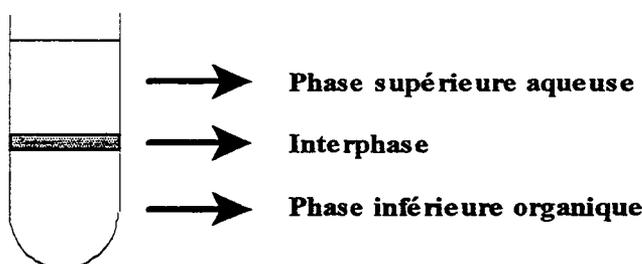
I. Etude de la glycosylation

A. Purification du matériel en vue d'extraction

Après marquage au [2-³H] mannose et lavages des cellules par du PBS froid, 0,3 ml de mélange d'arrêt (Ig G 10%, MgCl₂ 5mM, cacodylate de sodium 0,1M pH 7,4) et 0,8 ml de méthanol sont ajoutés directement dans la boîte de culture. Les cellules sont grattées et récupérées dans un tube d'extraction dans lequel 1,2 ml de chloroforme sont ajoutés.

B. Extraction séquentielle des intermédiaires lipidiques

Elle est fondée sur les différences de solubilité des produits générés par le cycle des dolichols. Le mélange chloroforme/méthanol/eau (3/2/1, v/v/v) dans lequel se trouvent les cellules est centrifugé à 3500 tours/min pour donner naissance à 3 phases majeures :



- la phase inférieure (phase CM) contient les éléments les moins polaires c'est-à-dire les intermédiaires lipidiques : Man-P-Dol, Glc-P-Dol, Glc-PP-Dol et GlcNAc₂-PP-Dol.

- la phase supérieure contient les molécules les plus polaires : les glycosyl-nucléotides, les monosaccharides libres ; les oligosaccharides neutres possédant un ou deux GlcNAc en position terminale réductrice (OSGn₁ et OSGn₂) et les oligosaccharides-phosphates.
- l'interphase contient les glycoprotéines nouvellement synthétisées et les oligosaccharides-PP-Dol amphipolaires. Des extractions supplémentaires par le mélange chloroforme/méthanol/eau (C/M/W, 10/10/3, v/v/v) sont réalisées pour séparer les intermédiaires lipidiques des glycoprotéines.

L'extraction séquentielle d'après Cacan et Verbert (1995) est illustrée dans la figure 37.

B. Analyse des glycannes

1. Purification des oligosaccharides solubles

La phase supérieure est directement déposée sur Biogel P2 pour éliminer les précurseurs radiomarqués. Le matériel oligosaccharidique, constitué du matériel neutre (OS) et phosphorylé (OSP), est séparé sur résine échangeuse d'anions QAE-Séphadex A25 (Pharmacia Biotech, France), équilibrée par du tampon Tris-base 10 mM. L'élution est réalisée par du tampon Tris-base 10 mM sur lequel on applique un gradient discontinu de NaCl : 20 mM, 70 mM et 100 mM. De cette façon, les OS, non chargés, sont élués par le tampon d'équilibre, les OSP chargés, sont élués par le tampon NaCl 70 mM.

2. Préparation des oligosaccharides à partir des glycoprotéines

2.1. Digestion trypsique des glycoprotéines

Le culot protéique issu de l'extraction séquentielle est d'abord digéré par 300 µg de trypsine bovine traitée au TPCK (Sigma, St Louis, MO, USA) dans 300 µl de tampon bicarbonate de sodium 100 mM pH 7,9 à température ambiante pendant une nuit. Le mélange est ensuite porté à ébullition 10 min pour inactiver la trypsine.

2.2. Hydrolyse des glycopeptides par la peptide N-glycanase F

Après évaporation, le trypsinat est dissout dans 100 µl de tampon phosphate de sodium 20 mM, pH 7,5, EDTA 50 mM dans lequel sont ajoutés 500 mU de PNGase F (Boehringer Mannheim, Mannheim, Allemagne). Après une nuit de traitement à 37°C, les glycannes sont purifiés sur une colonne Biogel P2.

PIT: Phase Inférieure Théorique
PST: Phase Supérieure Théorique

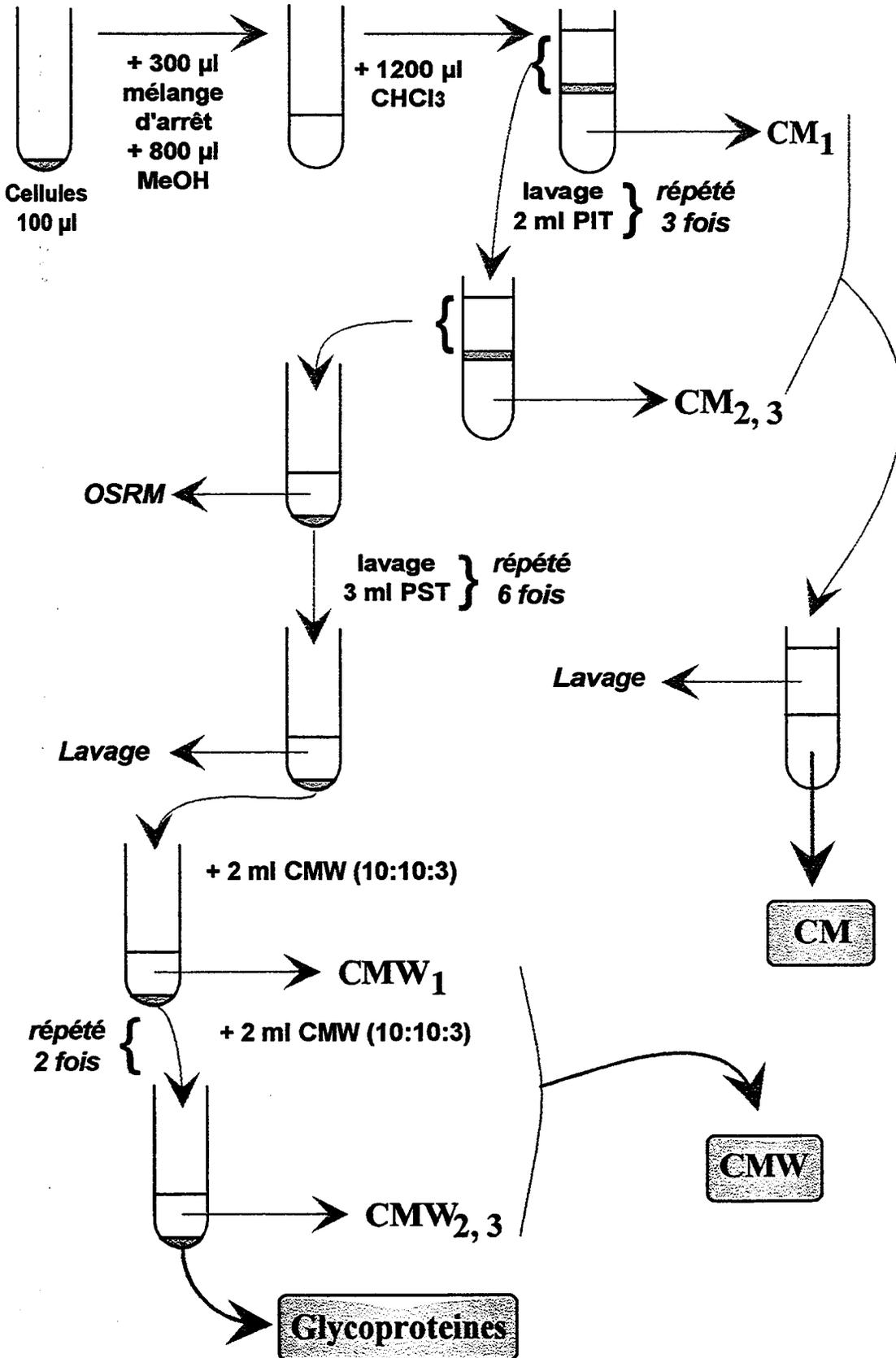


Figure 37 : Extraction séquentielle des intermédiaires lipidiques (d'après Cacan et Verbert, 1995).

C. Analyse par HPLC

La chromatographie liquide haute performance (HPLC) est réalisée sur une colonne amino de type Asahipak NH₂P50, de dimensions 250 x 4,6 mm (Asahi, Kawasaki-ku, Japon). L'élution se fait par un gradient continu acétonitrile/eau de 70/30 (v/v) à 50/50 (v/v) en 90 min au débit de 1 ml/min. Les espèces radioactives sont repérées en continu par un détecteur β Flo-one (Packard, France) en scintillation liquide Flow 302 (Quickszink flow, Allemagne). Avant l'injection, l'échantillon purifié sur colonne de filtration Biogel P2, est concentré à sec et repris par le mélange acétonitrile/eau (70/30, v/v), filtré sur filtre Millipore 0,45 μ m.

La colonne utilisée pour l'HPLC est capable de séparer nettement des oligosaccharides qui diffèrent d'un hexose. Les pics sont identifiés par comparaison avec des standards préparés au laboratoire à partir d'intermédiaires lipidiques obtenus par marquage métabolique de cellules CHO au [2-³H] mannose (Kmiécik *et al.*, 1995).

La figure 38 est une illustration des différentes étapes qui permettent d'obtenir les populations glycaniques en vue d'analyse HPLC.

II. Appendice technique relatif à l'étude des glycoprotéines E1 et E2 du virus de l'hépatite C

A. Matériel biologique

1. Cellules HepG2

La lignée cellulaire HepG2 provient de l'ATCC (Rockville, Md). Elles sont cultivées dans le milieu d'Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) supplémenté par 10 % de sérum de veau foetal (SVF, Gibco-BRL) et de 8 mg/ml de gentamycine (Gentalline).

2. Lignée UHCV-11.4

La lignée cellulaire UHCV-11.4 est dérivée d'ostéosarcomes humains. Elle exprime de manière constitutive la polyprotéine totale codée par le génome du VHC par un système d'expression régulé par la tétracycline (Moradpour *et al.*, 1998).

Les cellules sont cultivées dans du DMEM supplémenté par 10 % de SVF, 500 μ g/ml de généticine (G418 sulfate), 1 μ g/ml de puromycine et 1 μ g/ml de tétracycline. Pour permettre

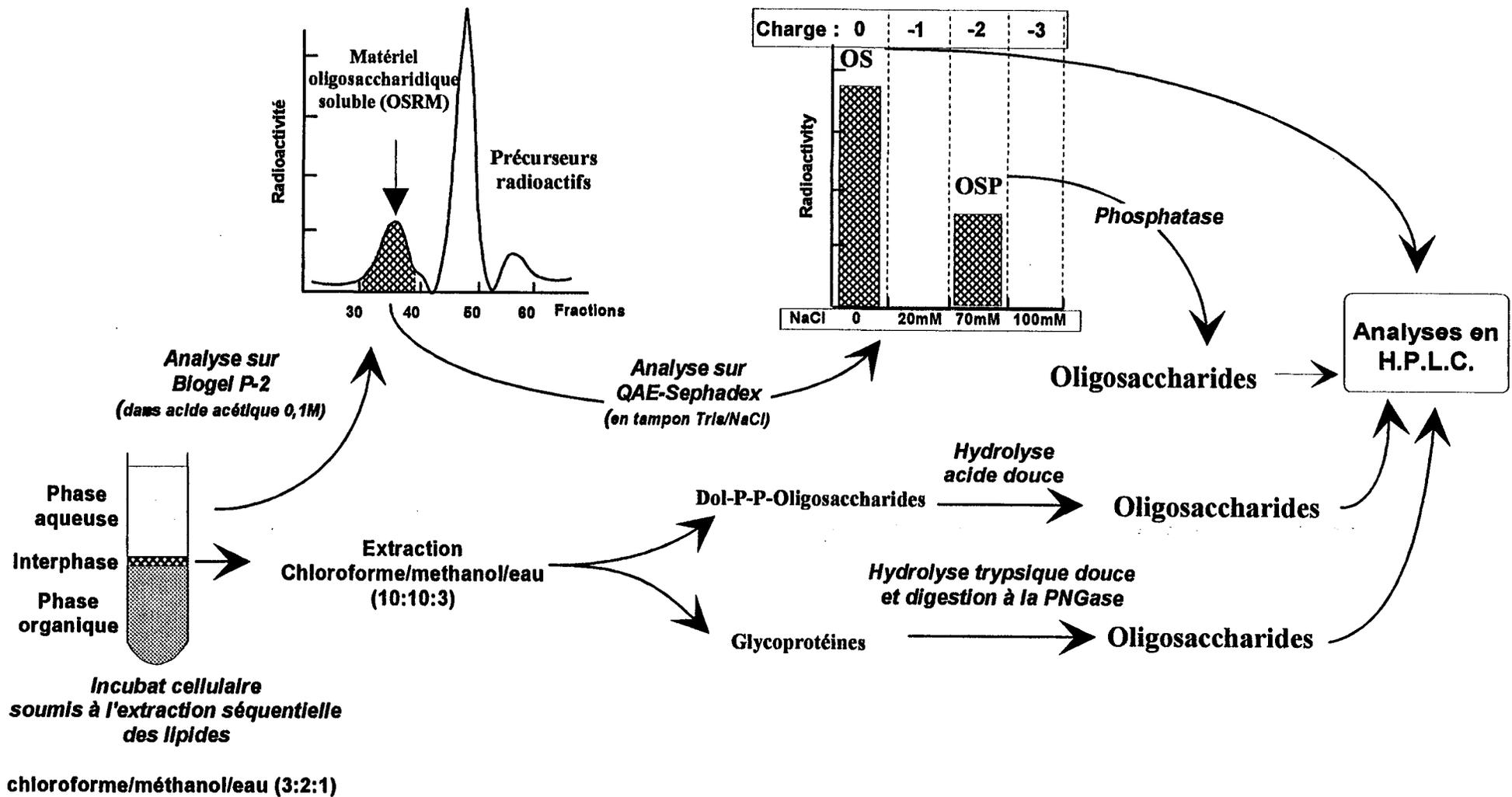


Figure 38 : Procédures d'isolement des fractions glycaniques.

l'expression de la polyprotéine du VHC, les cellules sont lavées deux fois par le milieu de culture dépourvu de tétracycline puis incubées 24 h dans ce même milieu avant d'être utilisées.

B. Production des stocks viraux

1. Clonage des séquences des recombinants viraux utilisés

Différents recombinants du virus de la vaccine exprimant les séquences d'intérêt ont été utilisés dans ce travail (figure 39) :

- les séquences de la polyprotéine du VHC : E1E2p7 et E2p7 (Fournillier-Jacob *et al.*, 1996).
- les séquences des protéines CD4 et CD8.
- les séquences des protéines chimériques CD4-E2₇₁₈ (Cocquerel *et al.*, 1998), CD4-E1₃₅₃, CD4-E1₃₄₇, CD8-E1₃₅₃, CD8-E1₃₄₇, E1₃₅₂-CD4 et E1₃₄₇-CD4 (Cocquerel *et al.*, article III).

Les différentes séquences ont été introduites dans le vecteur plasmidique pTM1 où elles sont immédiatement en aval du promoteur de l'ARN polymérase du bactériophage T7 et d'une séquence IRES "Internal ribosome entry site" du virus de l'encéphalomyocardite (Elroy-Stein *et al.*, 1989).

2. Expression virale

Le plasmide pTM-1 possède des séquences flanquantes du virus de la vaccine permettant la reconstitution de recombinants. Ce système permet d'atteindre des taux d'expression élevés lorsque les cellules sont coinfectedes avec le recombinant choisi et le vTF7-3, un virus recombinant de la vaccine qui exprime la T7 ARN polymérase ADN-dépendante. En effet, l'expression de la T7 polymérase permet une production élevée de transcrits qui servent de messagers : ces ARN sont reconnus spécifiquement au niveau des ribosomes grâce à l'IRES pour être ensuite traduits.

La production de stocks viraux s'est effectuée sur cellules CV-1 (ATCC, Rockville, Md). Chaque stock viral dérivant d'une plage isolée est amplifié sur cellules CV-1. Les cellules infectées sont ensuite soumises à trois cycles de congélation-décongélation afin de relarguer les particules virales intracellulaires.



————— vVHC E1E2 p7

————— vVHC E2 p7



■ Séquence signal

□ Séquence de E1

▨ Séquence de E2

▩ Séquence de CD4

▤ Séquence de CD8

Domaine transmembranaire :

□ E1 □ CD4

▨ E2 ▨ CD8

□ Séquence d'espace

Figure 39 : Présentation des différentes constructions exprimées par les différents recombinants utilisés.

3. Titrage des particules virales

Pour le titrage viral, des dilutions d'ordre 10 des préparations virales ont été inoculées sur des cellules CV-1. Les cellules sont incubées environ 36 h à 37 °C en présence de DMEM-5 % SVF. Les cellules sont ensuite fixées au formol et colorées au cristal violet afin de comptabiliser le nombre de plages de lyse. Le titre viral est exprimé en UFP/ml.

C. Infection virale et marquage métabolique

Les cellules HepG2 cultivées en plaques de 6 puits (6 x 9,6 cm²) sont infectées à l'aide des différents recombinants du virus de la vaccine à raison de 5 UFP /cellule. Après 1 heure d'adsorption à 37°C dans 200 µl de tampon PBS (Na₂HPO₄ 6,5 mM / KH₂PO₄ 1,5 mM pH 7,5 ; NaCl 140 mM ; KCl 3 mM) contenant 1 mM de MgCl₂ et 1% de SVF, l'incubation est poursuivie en ajoutant 1 ml/puits de milieu DMEM. Quatre heures après le début de l'infection, les cellules sont lavées puis incubées 15 min dans du DMEM dépourvu de méthionine et de cystéine. Les cellules sont ensuite marquées à l'aide d'un mélange de méthionine et de cystéine marquées ([³⁵S]-Protein Labeling Mix, NEN) pendant 15 min à raison de 100 µCi/ml dans le même milieu. Après un lavage, les cellules sont incubées dans un milieu DMEM supplémenté en Cys et Met non radioactives. Après 4 h de chasse, les cellules sont lavées 2 fois avec du TBS (Tris-HCl 20 mM pH 7,5 ; NaCl 137 mM ; EDTA 2 mM ; NaN₃ 5%) puis lysées avec du TBS contenant 0,5% Igepal CA-630 (Sigma, St Louis, MO).

D. Immunoprécipitation

Les immunoprécipitations sont réalisées de la façon suivante :

25 µl de billes de protéine A-Sépharose (Pharmacia) sont incubées 30 min à 4°C avec 6 µl d'anticorps anti-souris (DAKO) dans 1 ml de TBS-I (TBS supplémenté par 0,5% Igepal CA-630). Après un lavage dans du TBS-I, les billes sont incubées 1 h avec l'anticorps spécifique (H53 ou OKT4). Les anticorps, ainsi couplés aux billes, sont mis en contact avec l'antigène pendant 45 min. Après trois lavages dans du TBS-I et un lavage dans de l'eau distillée, 20 µl de tampon échantillon (Tris 62,5 mM pH 6,8 ; SDS 2% ; glycérol 10% ; bleu de bromophénol 0,05% ; β-mercaptoéthanol 5%) sont ajoutés en vue d'analyse électrophorétique sur gel d'acrylamide 10% (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970).

E. Microscopie par immunofluorescence

1. Préparation des cellules HepG2

Les cellules HepG2 sont cultivées sur lamelle de verre. Elles sont coinfectedées avec le virus de la vaccine exprimant la T7-polymérase et les recombinants vaccine exprimant les glycoprotéines de HCV. Six heures après le début de l'infection des HepG2, les cellules sont fixées 10 min à 4 °C par du paraformaldéhyde à 4 % dans du PBS pH 7,4 puis perméabilisées 30 min à température ambiante dans un tampon PBS contenant 0,1% de Triton X-100. Après perméabilisation, les cellules fixées sont lavées par du TBS et laissées une nuit à 4 °C dans ce même tampon.

2. Préparation des cellules UHCV-11.4

Les cellules UHCV-11.4 cultivées sur lamelle de verre sont lavées deux fois avec leur milieu de culture dépourvu de tétracycline puis incubées 24 h dans le même milieu. Les cellules sont alors fixées comme précédemment décrit.

3. Double -marquage des cellules

Les cellules fixées sont incubées 3 h à température ambiante dans un cocktail d'anticorps primaires contenant l'anticorps monoclonal H53 anti-E2 (dilution 1/1000) additionné de l'un des anticorps polyclonaux préparés chez le lapin à la dilution adéquate (anti-PDI (dilution 1/250), anti-Rab1 (dilution 1/1000), anti-mannosidase II (dilution 1/1000), anti-ERGIC-53 (dilution 1/1000)). Après deux lavages dans du tampon TBS, les cellules sont incubées 45 min à température ambiante dans un cocktail d'anticorps secondaires préparés chez l'âne, l'un dirigé contre les Ig de souris (marqué au fluoroisothiocyanate) et l'autre dirigé contre les Ig de lapin (marqué à la rhodamine).

F . Digestions des glycoprotéines par les glycosidases spécifiques

1. Traitement à l'endoglucosaminidase H

1.1. Spécificité et intérêt de l'enzyme

L'endo H permet de déglycosyler certaines glycoprotéines en libérant des oligosaccharides à un seul GlcNAc en position terminale réductrice (OSGn₁). D'une façon générale, le traitement

à l'endo H est utilisé pour déterminer si une glycoprotéine porte des glycanes de type oligomannosidique ou complexe. Cependant, l'activité de l'enzyme est assez large puisque sa spécificité repose uniquement sur la substitution du Man en $\alpha 1,6$ du pentasaccharide commun à toute N-glycosylprotéine comme indiqué dans la figure 40. De cette façon, il faut attendre que la mannosidase II située dans le *median*-Golgi ait agit pour qu'une glycoprotéine devienne résistante à l'action de l'endo H.

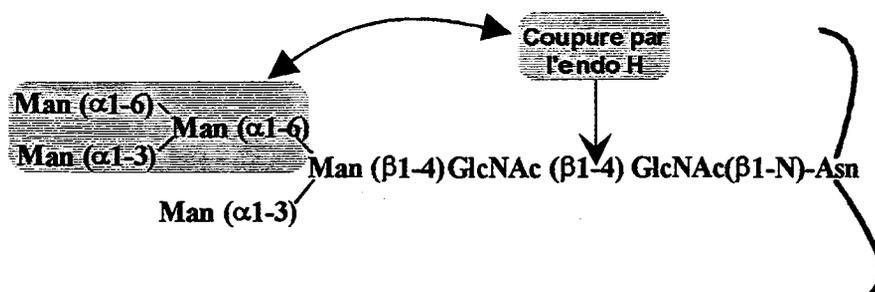


Figure 40 : Spécificité d'action de l'endo H.

1.2. Digestion à l'endo H

Les glycoprotéines immunoprécipitées sont dénaturées 10 min à 100°C dans 27 μ l de tampon de dénaturation (SDS 0,5 % ; β -mercaptoéthanol 1%). Le traitement enzymatique est effectué en ajoutant 3 μ l de tampon citrate de sodium 500 mM pH 7,5 et 10 mU d'endo H (New England Biolabs). L'échantillon est incubé 1 h à 37°C avant d'être analysé en SDS-PAGE.

2. Traitement à l'endoglucosaminidase D

2.1. Spécificité et intérêt de l'enzyme

L'activité de l'endo D présente une spécificité très étroite puisqu'elle repose sur la non-substitution du Man en $\alpha 1,3$ du pentasaccharide commun à toute N-glycosylprotéine. Ainsi, seules les glycoprotéines ayant subi l'action de la mannosidase I du *cis*-Golgi et présentant des glycanes de type « Man₅ branché » seront clivées par l'enzyme, libérant le Man₅GlcNAc₁ (voir figure 41).

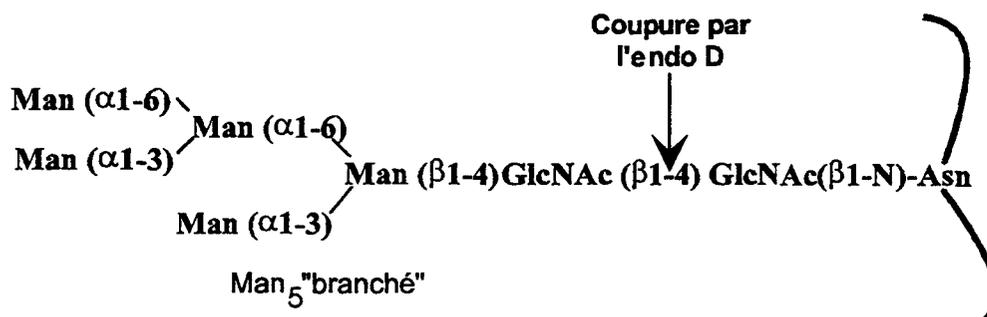


Figure 41 : Spécificité d'action de l'endo D

2.2. Digestion à l'endo D

Les immunoprécipités sont dénaturés 10 min à 100°C dans 10 µl de tampon citrate de sodium pH 6 contenant 0,5% de SDS. Le traitement enzymatique est effectué en ajoutant 10 µl de tampon d'incubation (citrate de sodium 50 mM pH 5,5 ; EDTA 40 mM ; Triton X-100 3%) et 0,4 mU d'endo D (Boehringer-Mannheim). L'échantillon est digéré une nuit à 37°C avant d'être analysé en SDS-PAGE.

3. Sensibilité à l'α-mannosidase de "jack bean"

3.1. Spécificité et intérêt de l'enzyme

L'α-mannosidase de "jack bean" est une exoglycosidase spécifique des glycoprotéines portant des glycanes de type oligomanosidique. Elle hydrolyse tous les résidus de Man liés en α accessibles à partir de l'extrémité non réductrice du glycanne comme indiqué dans la figure 42.

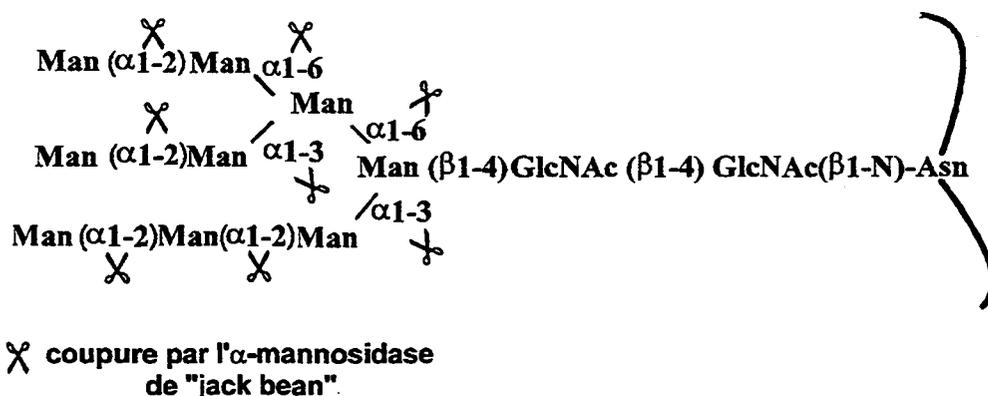


Figure 42 : spécificité d'action de l'α-mannosidase de "jack bean"

3.2. Digestion à l' α -mannosidase de "jack bean"

Les immunoprécipités sont repris dans 25 μ l de tampon citrate de sodium 50 mM pH 4,4. et traités par 0,28 U d' α -mannosidase. L'échantillon est incubé 2 h à 37°C avant d'être analysé en SDS-PAGE.

RÉFÉRENCES

A

- Abeijon, C. and Hirschberg, C.B. (1992) « Topography of glycosylation reactions in the ER » *Trends in Biochem. Sci.*, **17**, 32-36.
- Albright, C.F., Orlean, P. and Robbins, P.W. (1989) « A 13-amino acid peptide in three yeast glycosyltransferases may be involved in dolichol recognition » *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 7366-7369.
- Ahn, K., Szczesna-Skorupa, E. and Kemper, B. (1993) « The amino-terminal 29 amino acids of cytochrome P450 2C1 are sufficient for retention in the endoplasmic reticulum » *J. Biol. Chem.*, **268**, 18726-18733.
- Anumula, R.K. and Spiro, R.G. (1983) « Release of glucose containing polymannose oligosaccharides during glycoprotein biosynthesis » *J. Biol. Chem.*, **258**, 15274-15282.

B

- Bause, E. (1983) « Structural requirements of N-glycosylation of proteins, studies with proline peptides as conformational probes » *Biochem. J.*, **209**, 331-336.
- Behrens, S.E., Tomei, L. and De Francesco, R. (1996) « Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus » *EMBO J.*, **15**, 12-22.
- Berdoz, J., Gorski, J., Termijtelen, A.M., Dayer, J.M., Irle, D. and Mash, M. (1987) « Constitutive and induced expression of the individual HLA-DR β - and α -chain loci in different cell types » *J. Immunol.*, **139**, 1336-1341.
- Bischoff, J. and Kornfeld, R. (1983) « Evidence for an α -mannosidase in endoplasmic reticulum of rat liver » *J. Biol. Chem.*, **258**, 7907-7910.
- Bonay, P. and Hughes, R.C. (1991) « Purification and characterization of a novel broad-specificity (α 1 \rightarrow 2, α 1 \rightarrow 3, and α 1 \rightarrow 6) mannosidase from rat liver » *Eur. J. Biochem.*, **197**, 229-238.
- Bonifacino, J.S. and Lippincott-Schwartz, J. (1991) « Degradation of proteins within the ER » *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **3**, 592-600.
- Bonifacino, J.S., Cosson, P., Shah, N. and Klausner, R.D. (1991) « Role of potentially charged transmembrane residues in targeting proteins for retention and degradation within the endoplasmic reticulum » *EMBO J.*, **10**, 2783-2793.
- Bonifacino, J.S. (1996) « Reversal of fortune for nascent proteins » *Nature*, **384**, 405-406.
- Braakman, I., Helenius, J. and Helenius, A. (1992) « Manipulating disulfide bond formation and protein folding in the endoplasmic reticulum » *EMBO J.*, **11**, 1717-1722.
- Bretcher, M.S. and Munro, S. (1993) « Cholesterol and Golgi apparatus » *Science*, **261**, 1280-1281.

- Breuer, W. and Bause, E. (1995) « Oligosaccharyl transferase is a constitutive component of an oligomeric protein complex from pig liver endoplasmic *reticulum* » *Eur. J. Biochem.*, **228**, 689-696.
- Brockhausen, I. (1995) « Biosynthesis of O-glycans of the N-acetylgalactosamine- α -Ser/Thr linkage type » In Montreuil, J., Vliegthart, J.F.G. and Schachter, H. (Eds.), *Glycoproteins*, Elsevier Science B.V., pp. 201-259.

C

- Cacan, R., Hoflack, B. and Verbert, A. (1980) « Fate of oligosaccharide-lipid intermediates synthesized by resting rat-spleen lymphocytes » *Eur. J. Biochem.*, **106**, 473-479.
- Cacan, R., Cecchelli, R. and Verbert, A. (1987) « Catabolic pathway of oligosaccharide-diphosphodolichol : study of the fate of the oligosaccharidic moiety in mouse splenocytes » *Eur. J. Biochem.*, **166**, 469-474.
- Cacan, R. and Verbert, A. (1995) « Glycosyltransferases of the phosphodolichol pathways. In Verbert, A. (ed) *Methods on glycoconjugates*, a laboratory manual. Harwood Academy Publishers, Switzerland. pp. 191-199.
- Cacan, R., Dengremont, C., Labiau, O., Kmićik, D., Mir, A.M. and 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. and Verbert, A. (1997) « Free oligomannosides produced during the N-glycosylation process : origin, intracellular trafficking and putative roles » *TIGS*, **9**, 365-377.
- Chapman, A., Trowbridge, I.S., Hyman, R. and Kornfeld, S. (1979) « Structure of the lipid-linked oligosaccharides that accumulate in class E Thy-1-negative mutant lymphomas » *Cell*, **17**, 509-515.
- Choo, Q.L., Kuo, G., Weiner, A.J., Overby, L.R., Bradley, D.W. and Houghton, M. (1989) « Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome » *Science*, **244**, 359-362.
- Choukhi, A., Ung, S., Wychowski, C. and Dubuisson, J. (1998) « Involvement of endoplasmic *reticulum* chaperones in the folding of hepatitis C virus glycoproteins » *J. Virol.*, **72**, 3851-3858.
- Ciccarelli, E., Alonso, M.A., Cresteil, D., Bollen, A., Jacobs, P. and Alvarez, F. (1993) « Intracellular retention and degradation of human mutant variant of a α 1-antitrypsin in stably transfected chinese hamster ovary cell lines » *Eur. J. Biochem.*, **213**, 271-276.
- Ciechanover, A. (1994) « The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway » *Cell*, **79**, 13-21.
- Cocquerel, L., Meunier, J.C., Pillez, A., Wychowski, C. and Dubuisson, J. (1998) « A retention signal necessary and sufficient for endoplasmic *reticulum* localization maps to the transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E2 » *J. Virol.*, **72**, 2183-2191.

- Cole, N.B., Sciaky, N., Marotta, A., Song, J. and Lippincott-Schwartz, J. (1996) « Golgi dispersal during microtubule disruption : regeneration of Golgi stacks at peripheral endoplasmic *reticulum* exit sites » *Mol. Biol. Cell.*, **7**, 631-650.
- Cotner, T.H., Charbonneau, H., Mellins, E. and Pious, D. (1989) « mRNA abundance rather than differences in subunit determine differential expression of HLA-DR β 1 and DR β 3 molecules » *J. Biol. Chem.*, **264**, 11107-11111.
- Crowley, K.S., Liao, S., Worrell, V.E., Reinhart, G.D. and Johnson, A.E. (1994) « Secretory proteins move through the endoplasmic *reticulum* membrane via an aqueous, gated pore » *Cell*, **78**, 461-471.

D

- de Virgilio, M., Weninger, H. and Ivessa, N.E. (1998) « Ubiquitination is required for the retro-translocation of a short-lived luminal endoplasmic *reticulum* glycoprotein to the cytosol for degradation by the proteasome » *J. Biol. Chem.*, **273**, 9734-9743.
- Daniel, P.F., Winchester, B. and Warren, C.D. (1994) « Mammalian α -mannosidases- multiple forms but a common purpose ? » *Glycobiology*, **4**, 551-566.
- Deleersnyder, V., Pillez, A., Wychowski, C., Blight, K., Xu, J., Hahn, Y.S., Rice, C.M. and Dubuisson, J. (1997) « Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes » *J. Virol.*, **71**, 697-704.
- Dubiel, W., Ferrell, K., Pratt, G. and Rechsteiner, M. (1992) « Subunit 4 of the 26 S protease is a member of a novel eukaryotic ATPase family » *J. Biol. Chem.*, **267**, 22699-22702.
- Dubuisson, J. and Rice, C.M. (1996) « Hepatitis C virus glycoprotein folding : disulfide bond formation and association with calnexin » *J. Virol.*, **70**, 778-786.
- Dubuisson, J. (1998) « Folding, assembly and subcellular localization of HCV glycoproteins » *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, sous presse.
- Dunn, W.A., (1994) « Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation » *Trends in Cell Biol.*, **4**, 139-143.

E

- Edman, J.C., Ellis, L., Blacher, R.W., Roth, R.A. and Rutter, W.J. (1985) « Sequence of protein disulphide isomerase and implications of its relationship to thioredoxin » *Nature*, **317**, 267-270.
- Elbein, A.D. (1984) « Inhibitors of the biosynthesis and processing of N-linked oligosaccharides » *Critical Reviews in Biochemistry*, **16**, 21-49.
- Elliott, J.G., Oliver, J.D. and High, S. (1997) « The thiol-dependent reductase ERp57 interacts specifically with N-glycosylated integral membrane proteins » *J. Biol. Chem.*, **272**, 13849-13855.

- Elroy-Stein, O., Fuerst, T.R. and Moss, B. (1989) « Cap-independent translation of mRNA conferred by encephalomyocarditis virus 5' sequence improves the performance of the vaccinia virus/bacteriophage T7 hybrid expression system » *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 6126-6130.
- Elting, J.J., Chen, W.W. and Lennarz, W.J. (1980) « Characterization of a glucosidase involved in an initial step in the processing of oligosaccharide chains » *J. Biol. Chem.*, **255**, 2325-2331.
- Ermonval, M., Cacan, R., Gorgas, K., Haas, I.G., Verbert, A. and Buttin, G. (1997) « Differential fate of glycoproteins carrying a monoglucosylated form of truncated N-glycan in a new CHO line, MadIA214, selected for a thermosensitive secretory defect » *J. Cell. Sci.*, **110**, 323-336.
- Ermonval, M., Duvet, S., Zonneveld, D., Cacan, R., Buttin, G. and Braakman, I. « Truncated N-glycans affect protein folding in the ER of CHO-derived mutant lines without preventing calnexin binding » soumis à *Mol. Biol. Cell.* (1998).
- Evans, E.A., Gilmore, R. and Blobel, G. (1986) « Purification of microsomal signal peptidase as a complex » *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 581-585.

F

- Fenteany, G., Standaert, R.F., Lane, W.S., Choi, S., Corey, E.J. and Schreiber, S.L. (1995) « Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin » *Science*, **268**, 726-731.
- Fisher, E.A., Zhou, M., Mitchell, D.M., Wu, X., Omura, S., Wang, H., Goldberg, A.L. and Ginsberg, H.N. (1997) « The degradation of apolipoprotein B100 is mediated by the ubiquitin-proteasome pathway and involves heat shock protein 70 » *J. Biol. Chem.*, **272**, 20427-20434.
- Fournillier-Jacob, A., Cahour, A., Escriou, N., Girard, M. and Wychowski, C. (1995) « Processing of the E1 glycoprotein of hepatitis C virus expressed in mammalian cells » *J. Gen. Virol.*, **77**, 1055-1064.
- Freedman, R.B., Hirst, T.R. and Tuite, M.F. (1994) « Protein disulfide isomerase : building bridges in protein folding » *Trends Biochem. Sci.*, **19**, 331-336.
- Fu, J., Ren, M. and Kreibich, G. (1997) « Interactions among subunits of the oligosaccharyltransferase complex » *J. Biol. Chem.*, **272**, 29687-29692.

G

- Gavel, Y. and 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. and 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.

- Görlich, D., Prehn, S., Hartmann, E., Kalies, K-U. and Rapoport, T.A. (1992) « A mammalian homolog of Sec61p and SecYp is associated with ribosomes and nascent polypeptides during translocation » *Cell*, **71**, 489-503.
- Grakoui, A., McCourt, D.W., Wychowski, C., Feinstone, S.M. and Rice, C.M. (1993) « A second hepatitis C virus-encoded proteinase » *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 10583-10587.
- Grard, T., Herman, V., Saint-Pol, A., Kmiécik, D., Labiau, O., Mir, A.M., Alonso, C., Verbert, A., Cacan, R. and Michalski, J.C. (1996) « Oligomannosides or oligosaccharide-lipids as potential substrates for rat liver cytosolic α -D-mannosidase » *Biochem. J.*, **316**, 787-792.
- Grinna, L.S. and Robbins, P.W. (1980) « Substrate specificities of rat liver microsomal glucosidases which process glycoproteins » *J. Biol. Chem.*, **255**, 2255-2258.

H

- Haas, I. and Wabl, M. (1983) « Immunoglobulin heavy chain binding protein » *Nature*, **306**, 387-389.
- Haeuw, J.F., Strecker, G., Wieruszski, J.M., Montreuil, J. and Michalski, J.C. (1991a) « Substrate specificity of rat liver cytosolic α -D-mannosidase. Novel degradative pathway for oligomannosidic type glycans » *Eur. J. Biochem.*, **202**, 1257-1268.
- Haeuw, J.F., Michalski, J.C., Strecker, G., Spik, G. and Montreuil, J. (1991b) « Cytosolic glycosidases. Do they exist ? » *Glycobiology*, **1**, 487-492.
- Hamman, B.D., Chen, J.C., Johnson, E.E. and Johnson, A.E. (1997) « The aqueous pore through the translocon has a diameter of 40-60 Å during cotranslational protein translocation at the ER membrane » *Cell*, **89**, 535-544.
- Hammond, C. and Helenius, A. (1993) « A chaperone with a sweet tooth » *Curr. Biol.*, **3**, 884-885
- Hammond, C. and Helenius, A. (1994) « Quality control in the secretory pathway : retention of a misfolded viral membrane glycoprotein involves cycling between the ER, intermediate compartment, and Golgi apparatus » *J. Cell. Biol.*, **126**, 41-52.
- Hammond, C., Braakman, I. and Helenius, A. (1994) « Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming and, calnexin in glycoprotein folding and quality control » *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 913-917.
- Hammond, C. and Helenius, A. (1995) « Quality control in the secretory pathway » *Curr. Opin. Cell Biol.*, **7**, 523-529.
- Hanein, D., Matlack, K.E.S., Jungnickel, B., Plath, K., Kalies, K-U., Miller, K.R., Rapoport, T.A. and Akey, C.W. (1996) « Oligomeric rings of the Sec61p complex induced by ligands required for protein translocation » *Cell*, **87**, 721-732.

- Hart, G.W., Brew, K., Grant, G.A., Bradshaw, R.A. and Lennarz, W.J. (1979) « Primary structural requirements for the enzymatic formation of the N-glycosyl bond in glycoproteins » *J. Biol. Chem.*, **254**, 9747-9753.
- Haselbeck, A. and Tanner, W. (1982) « Dolichyl phosphate-mediated mannosyl transfer through liposomal membranes » *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 1520-1524.
- Hedge, R.S., Voigt, S., Rapoport, T.A. and Lingappa, V.R. (1998) « TRAM regulates the exposure of nascent secretory proteins to the cytosol during translocation into the endoplasmic reticulum » *Cell*, **92**, 621-631.
- Helenius, A., Trombetta, E.S., Hebert, D.N. and Simons, J.F. (1997) « Calnexin, calreticulin and the folding of glycoproteins » *Trends in Cell Biology*, **7**, 193-200.
- Hendrick, J.P. and Hartl, F.U., (1995) « The role of molecular chaperones in protein folding » *FASEB J.*, **9**, 1559-1569.
- Hiller, M.M., Finger, A., Schweiger, M. and Wolf, D.H. (1996) « ER degradation of a misfolded luminal protein by the cytosolic ubiquitin-proteasome pathway » *Science*, **273**, 1725-1728.
- Hirano, N., Shibasaki, F., Sakai, R., Tanaka, T., Nishida, J., Yazaki, Y., Takenawa, T. and Hirai, H. (1995) « Molecular cloning of the human glucose-regulated protein ERp57 /GRP58, a thiol-dependent reductase. Identification of its secretory form and inducible expression by the oncogenic transformation » *Eur. J. Biochem.*, **234**, 336-342.
- Holst, B., Bruun, A.W., Kielland-Brandt, M.C. and Winther, J.R. (1996) « Competition between folding and glycosylation in the endoplasmic reticulum » *EMBO J.*, **15**, 3538-3546.
- Houri, J-J., Ogier-Denis, E., de Stefanis, D., Bauvy, C., Baccino, F.M., Isidoro, C. and Codogno, P. (1995) « Differentiation-dependent autophagy controls the fate of newly synthesized N-linked glycoproteins in the colon adenocarcinoma HT-29 cell line » *Biochem. J.*, **309**, 521-527.
- Hoyvik, H., Gordon, 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.
- Hughes, E.A., Hammond, C. and Cresswell, P. (1997) « Misfolded major histocompatibility complex class I heavy chains are translocated into the cytoplasm and degraded by the proteasome » *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 1896-1901.

I

- Imperiali, B. and Rickert, K.W. (1995) « Conformational implications of asparagine-linked glycosylation » *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **92**, 97-101.

J

- Jackson, M.R., Nilsson, T. and Peterson, P.A. (1990) « Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic *reticulum* » *EMBO J.*, **9**, 3153-3162.
- Jackson, M.R., Nilsson, T. and Peterson, P.A. (1993) « Retrieval of transmembrane proteins to the endoplasmic *reticulum* » *J. Cell. Biol.*, **121**, 317-333.
- Jakob, C.A., Burda, P., Roth, J. and Aebi, M. (1998) « Degradation of misfolded endoplasmic *reticulum* glycoproteins in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by a specific oligosaccharide structure » *J. Cell. Biol.*, **142**, 1223-1233.
- Jensen, T.J., Loo, M.A., Pind, S., Williams, D.B, Goldberg, A.L. and Riordan, J.R. (1995) « Multiple proteolytic systems, including the proteasome, contribute to CFTR processing » *Cell*, **83**, 129-135.

K

- Kaiser, C. and Ferro-Novick, S. (1998) « Transport from the endoplasmic *reticulum* to the Golgi » *Curr. Opin. Cell Biol.*, **10**, 477-482.
- Kalies, K.U., Rapoport, T.A. and Hartmann, E. (1998) « The β subunit of the Sec61 complex facilitates cotranslational protein transport and interacts with the signal peptidase during translocation » *J. Cell. Biol.*, **141**, 887-894.
- Kang, M.S, Bowlin, T.L., Vijay, I.K. and Sunkara, S.P. (1993) « Accumulation of pentamannose oligosaccharides in human mononuclear leukocytes by action of swainsonine, an inhibitor of glycoprotein processing » *Carbohydrate Research*, **248**, 327-337.
- Karaivanova, V.K., Luan, P. and Spiro, R.G. (1998) « Processing of viral envelope glycoprotein by the endomannosidase pathway : evaluation of host cell specificity » *Glycobiology*, **8**, 725-730.
- Kelleher, D.J., Kreibich, G. and 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.
- Kelleher, D.J. and Gilmore, R. (1997) « DAD1, the defender against apoptotic cell death, is a subunit of the mammalian oligosaccharyltransferase » *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 4994-4999.
- Kelly, R.B. (1990) « Tracking an elusive receptor » *Nature*, **345**, 480-481.
- Klausner, R.D. and Sitia, R. (1990) « Protein degradation in the endoplasmic *reticulum* » *Cell*, **62**, 610-614.
- Kmićik, 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 permeabilized CHO cells » *Glycobiology*, **5**, 483-494.

L

- Laemmli, U.K. (1970) « Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-4 » *Nature*, **227**, 680-685.
- Lewis, M.J. and Pelham, H.R. (1996) « SNARE-mediated retrograde traffic from the Golgi complex to the endoplasmic *reticulum* » *Cell*, **85**, 205-215.
- Lippincott-Schwartz, J., Donaldson, J.G., Schweizer, A., Berger, E.G., Hauri, H.P., Yuan, L.C. and Klausner, R.D. (1990) « Microtubule-dependent retrograde transport of proteins into the ER in the presence of brefeldin A suggests an ER recycling pathway » *Cell*, **60**, 821-836.
- Löwe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickl, P., Baumeister, W. and Huber, R. (1995) « Crystal structure of the 20 S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution » *Science*, **268**, 533-539.
- Lütcke, H. (1995) « Signal recognition particle (SRP), a ubiquitous initiator of protein translocation » *Eur. J. Biochem.*, **228**, 531-550.

M

- Mc Cracken, A.A. and Brodsky, J.L. (1996) « Assembly of ER-associated protein degradation in vitro : dependence on cytosol, calnexin, and ATP » *J. Cell. Biol.*, **132**, 291-298.
- Mayer, T.U., Braun, T. and Jentsch, S. (1998) « Role of the proteasome in membrane extraction of a short-lived ER-transmembrane protein » *EMBO J.*, **17**, 3251-3257.
- Michalak, J.P., Wychowski, C., Choukhi, A., Meunier, J.C., Ung, S., Rice, C.M. and Dubuisson, J. (1997) « Characterization of truncated forms of hepatitis C virus glycoproteins » *J. Gen. Virol.*, **78**, 2299-2306.
- Montreuil, J. (1984) « Spatial conformation of glycans and glycoproteins » *Biol. Cell.*, **51**, 115-132.
- 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., Bauvy, C. and Codogno, P. (1995) « Endoplasmic *reticulum*-to-cytosol transport of free polymannose oligosaccharides in permeabilized HepG2 cells » *EMBO J.*, **14**, 6034-6042.
- Moore, S.E.H. (1998) « Transport of free polymannose-type oligosaccharides from the endoplasmic *reticulum* into the cytosol is inhibited by mannosidases and requires a thapsigargin-sensitive calcium store » *Glycobiology*, **8**, 373-381.
- Moradpour, D., Kary, P., Rice, C.M. and Blum, H.E. (1998) « Continuous human cell lines inducibly expressing hepatitis C virus structural and nonstructural proteins » *Hepatology*, sous presse.

- Mothes, W., Prehn, S. and Rapoport, T.A. (1994) « Systematic probing of the environment of a translocating secretory protein during translocation through the ER membrane » *EMBO J.*, **13**, 3973-3982.
- Mothes, W., Heinrich, S.U., Graf, R., Nilsson, I.M., von Heijne, G., Brunner, J. and Rapoport, T.A. (1997) « Molecular mechanism of membrane protein integration into the endoplasmic *reticulum* » *Cell*, **89**, 523-533.
- Munro, S. (1995) « An investigation of the role of transmembrane domains in Golgi protein retention » *EMBO J.*, **14**, 4695-4704.

N

- Nilsson, T. and Warren, G. (1994) « Retention and retrieval in the endoplasmic *reticulum* and the Golgi apparatus » *Curr. Opin. Cell Biol.*, **6**, 517-521.

O

- 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. (Tokyo)*, **110**, 982-989.
- Olden, K., Parent, J.B. and White, S.L. (1982) « Carbohydrate moieties of glycoproteins : a re-evaluation of their function » *Biochim. Biophys. Acta*, **650**, 209-232.
- Oliver, J.D., Van der Wal, F.J., Bulleid, N.J. and High, S. (1997) « Interaction of the thiol-dependent reductase ERp57 with nascent glycoproteins » *Science*, **275**, 86-88.
- Otsu, M., Urade, R., Kito, M., Omura, F. and Kikuchi, M. (1995) « A possible role of ER-60 protease in the degradation of misfolded proteins in the endoplasmic *reticulum* » *J. Biol. Chem.*, **270**, 14958-14961.
- Ou, W.J., Cameron, P.H., Thomas, D.Y. and Bergeron, J.J.M. (1993) « Association of folding intermediates of glycoproteins with calnexin during protein maturation » *Nature*, **364**, 771-776.

P

- Pascale, M.C., Erra, M.C., Malagolini, N., Serafini-Cessi, F., Leone, A. and Bonatti, S. (1992) « Post-translational processing of an O-glycosylated protein, the human CD8 glycoprotein, during the intracellular transport to the plasma membrane » *J. Biol. Chem.*, **267**, 25196-25201.
- Pelham, H.R.B. (1988) « Evidence that luminal ER proteins are sorted from secreted proteins in a post-ER compartment » *EMBO J.*, **7**, 913-918.

- Pelham, H.R.B. (1991) « Recycling of proteins between ER and Golgi complex » *Curr. Opin. Cell Biol.*, **3**, 585-591.
- Pettersson, R.F. (1991) « Protein localization and virus assembly at intracellular membranes » *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **170**, 67-104.
- Pierce, R.J., Spik, G. and 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. and Montreuil, J. (1980) « Demonstration and cytosolic location of an endo-N-acetyl- β -D-glucosaminidase activity towards an asialo-N-acetyllactosamine type substrate in rat liver » *Biochem. J.*, **185**, 261-264.
- Pillon, M., Schekman, R. and Römisch, K. (1997) « Sec61p mediates export of a misfolded secretory protein from the endoplasmic *reticulum* to the cytosol for degradation » *EMBO J.*, **16**, 4540-4548.
- Pless, D.D. and Lennarz, W.J. (1977) « Enzymatic conversion of proteins to glycoproteins » *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 134-138.
- Pollard, M.G., Travers, K.J. and Weissman, J.S. (1998) « Ero1p : a novel and ubiquitous protein with an essential role in oxidative protein folding in the endoplasmic *reticulum* » *Mol. Cell.*, **1**, 171-182.

Q

- Qu, D., Teckman, J.H., Omura, S. and Perlmutter, D.H. (1996) « Degradation of a mutant secretory protein, α 1-antitrypsin Z, in the endoplasmic *reticulum* requires proteasome activity » *J. Biol. Chem.*, **271**, 22791-22795.

R

- Rajagolapan, S., Xu, Y. and Brenner, M.B. (1994) « Retention of unassembled components of integral membrane proteins by calnexin » *Science*, **263**, 387-390.
- Rice, C.M. (1996) « Flaviviridae : the viruses and their replication » p, 931-959. In B. N. Fields, D.M. Knipe and P.M. Howley (ed.), *Fields virology*, 3rd ed. Raven Press New York, N.Y.
- Rickert, K.W. and Imperiali, B. (1995) « Analysis of the conserved glycosylation site in the nicotinic acetylcholine receptor : potential roles in complex assembly » *Chemistry and Biology*, **2**, 751-759.
- Rock, K.L., Gramm, C., Rothstein, L., Clark, K., Stein, R., Dick, L., Hwang, D. and Goldberg, A.L. (1994) « Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules » *Cell*, **78**, 761-771.
- Rodan, A.R., Simons, J.F., Trombetta, E.S. and Helenius, A. (1996) « N-linked oligosaccharides are necessary and sufficient for association of glycosylated forms of bovine RNase with calnexin and calreticulin » *EMBO J.*, **15**, 6921-6930.

- Rothman, J.E. (1994) « Mechanisms of intracellular protein transport » *Nature*, **372**, 55-63.

S

- Saint-Pol, A., Bauvy, C., Codogno, P. and Moore, S.E.H. (1997) « Transfer of free polymannose-type oligosaccharides from the cytosol to lysosomes in cultured human hepatocellular carcinoma HepG2 cells » *J. Cell. Biol.*, **136**, 45-59.
- Savitz, A. and Mayer, D.I. (1993) « 180 kD ribosome receptor is essential for both ribosome binding and protein translocation » *J. Cell. Biol.*, **120**, 853-863.
- Scheffner, M., Nuber, U. and Huibregtse, J.M. (1995) « Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade » *Nature*, **373**, 81-83.
- Schutze, M.P., Peterson, P.A. and Jackson, M.R. (1994) « An N-terminal double-arginine motif maintains type II membrane proteins in the endoplasmic reticulum » *EMBO J.*, **13**, 1696-1705.
- Schweden, J. and 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.
- Seglen, P.O. and Gordon, P.B. (1982) « 3-Methyladenine : specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes » *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 1889-1892.
- Selby, M.J., Glazer, E., Masiarz, F., and Houghton, M. (1994) « Complex processing and protein:protein interactions in the E2 :NS2 region of HCV » » *Virology*, **204**, 114-122.
- Shenkman, M., Ayalon, M. and Lederkremer, G.Z. (1997) « Endoplasmic reticulum quality control of asialoglycoprotein receptor H2a involves a determinant for retention and not retrieval » *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 11363-11368.
- Snider, M.D. and Rogers, O.C. (1984) « Transmembrane movement of oligosaccharide-lipids during glycoprotein synthesis » *Cell*, **36**, 753-761.
- Sousa, M.C., Ferrero-Garcia, M.A. and Parodi, A.J. (1992) « Recognition of the oligosaccharide and protein moieties of glycoproteins by the UDP-glucose : glycoprotein glucosyltransferase » *Biochemistry*, **31**, 97-105.
- Sousa, M.C. and Parodi, A.J. (1995) « The molecular basis for the recognition of misfolded glycoproteins by the UDP-glucose : glycoprotein glucosyltransferase » *EMBO J.*, **14**, 4196-4203.
- Spiro, M. J., Spiro, R.G. and Bhoyroo, V.D. (1979) « 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. and 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., Zhu, Q., Bhoyroo, V. and Söling, H.D. (1996) « Definition of the lectin-like properties of the molecular chaperone, calreticulin, and demonstration of its copurification with endomannosidase from rat liver golgi » *J. Biol. Chem.*, **271**, 11588-11594.
- Stafford, F.J. and Bonifacino, J.S. (1991) « A permeabilized cell system identifies the endoplasmic reticulum as a site of protein degradation » *J. Cell. Biol.*, **115**, 1225-1236.
- Stoll, J. (1986) PhD. Thesis School of Hygiene and Public Health. The Johns Hopkins University
- Suzuki, T., Seko, A., Kitajima, K., Inoue, Y. and Inoue, S. (1994) « Purification and enzymatic properties of peptide : N-glycanase from C3H mouse-derived L-929 fibroblast cells » *J. Biol. Chem.*, **269**, 17611-17618.
- Suzuki, T., Park, H. Kitajima, K. and Lennarz, W.J. (1998) « Peptides glycosylated in the endoplasmic reticulum of yeast are subsequently deglycosylated by a soluble peptide : N-glycanase activity » *J. Biol. Chem.*, **273**, 21526-21530.

T

- Tang, B.L., Wong, S.H., Qi, X.L., Low, S.H. and Hong, W. (1993) « Molecular cloning, characterization, subcellular localization and dynamics of p23, the mammalian KDEL receptor » *J. Cell. Biol.*, **120**, 325-328.
- Trombetta, S.E. and Parodi, A.J. (1992) « Purification to apparent homogeneity and partial characterization of rat liver UDP-glucose : glycoprotein glucosyltransferase » *J. Biol. Chem.*, **267**, 9236-9240.
- Trugnan, G., Ogier-Denis, E., Sapin, C., Darmoul, D., Bauvy, C., Aubery, M. and Codogno, P. (1991) « The N-glycan processing in HT-29 cells is a function of their state of enterocytic differentiation » *J. Biol. Chem.*, **266**, 20849-20855.
- Tsubuki, S., Saito, Y., Tomioka, M., Ito, H. and Kawashima, S. (1996) « Differential inhibition of calpain and proteasome activities by peptidyl aldehydes of di-leucine and tri-leucine » *J. Biochem.*, **119**, 572-576.
- Turco, S.J. and 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.

V

- van der Wal, F.J., Oliver, J.D. and High S. (1998) « The transient association of ERp57 with N-glycosylated proteins is regulated by glucose trimming » *Eur. J. Biochem.*, **256**, 51-59.
- Vassilakos, A., Michalak, M., Lehrman, M.A. and Williams, D.B. (1998) « Oligosaccharide binding characteristics of the molecular chaperones calnexin and calreticulin » *Biochemistry*, **37**, 3480-3490.
- Villers, C., Cacan, R., Mir, A.M., Labiau, O. and Verbert, A. (1994) « Release of oligomannoside-type glycans as a marker of the degradation of newly synthesized glycoprotein » *Biochem. J.*, **298**, 135-142.
- Voigt, S., Jungnickel, B., Hartmann, E. and Rapoport, T.A. (1996) « Signal sequence-dependent function of the TRAM protein during early phases of protein transport across the endoplasmic reticulum membrane » *J. Cell. Biol.*, **134**, 25-35.
- von Figura, K. and Hasilik, A. (1986) « Lysosomal enzymes and their receptors » *Ann. Rev. Biochem.*, **55**, 167-193.

W

- Ward, C.L., Omura, S. and Kopito, R.R. (1995) « Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway » *Cell*, **83**, 121-127.
- Ware, F.E., Vassilakos, A., Peterson, P.A., Jackson, M.R., Lehrman, M.A. and Williams, D.B. (1995) « The molecular chaperone calnexin bind Glc1Man9GlcNAc2 oligosaccharide as an initial step in recognizing unfolded glycoproteins » *J. Biol. Chem.*, **270**, 4697-4704.
- Weng, S. and Spiro, R.G. (1993) « Demonstration that a kifunensine-resistant α -mannosidase with a unique processing action of N-linked oligosaccharides occurs in rat liver endoplasmic reticulum and various cultured cells » *J. Biol. Chem.*, **268**, 25656-25663.
- 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.
- Weng, S. and Spiro, R.G. (1997) « Demonstration of a peptide : N-glycosidase in the endoplasmic reticulum of rat liver » *Biochem. J.*, **322**, 655-661.
- Werner, E.D., Brodsky, J.L. and Mc Cracken, A.A. (1996) « Proteasome-dependent endoplasmic reticulum-associated protein degradation : an unconventional route to a familiar fate » *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 13797-13801.

- Wiertz, E.J.H.J., Jones, T.R., Sun, L., Bogyo, M., Geuze, H.J. and Ploegh, H.L. (1996a) « The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol » *Cell*, **84**, 769-779.
- Wiertz, E.J.H.J., Tortorella, D., Bogyo, M., Yu, J., Mothes, W., Jones, T.R., Rapoport, T.A. and Ploegh, H.L. (1996b) « Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction » *Nature*, **384**, 432-438.
- Wikström, L. and Lodish, H.L. (1993) « Unfolded H2b asialoglycoprotein receptor subunit polypeptides are selectively degraded within the ER » *J. Biol. Chem.*, **268**, 14412-14416.
- Wilson, D.W., Lewis, M.J. and Pelham, H.R.B. « 1993 » « pH-dependent binding of KDEL to its receptor *in vitro* » *J. Biol. Chem.*, **268**, 7465-7468.
- Wu, Y., Whitman, I., Molmenti, E., Moore, K., Hippenmeyer, P. and Perlmutter, D.H. (1994) « A lag in intracellular degradation of mutant α 1-antitrypsin correlates with the liver disease phenotype in homozygous PiZZ α 1-antitrypsin deficiency » *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 9014-9018.

Y

- Yang, M., Ellenberg, J., Bonifacino, J.S. and Weissman, A.M. (1997) « The transmembrane domain of a carboxy-terminal anchored protein determines localization to the endoplasmic reticulum » *J. Biol. Chem.*, **272**, 1970-1975.
- Yu, H., Kaung, G., Kobayashi, S. and Kopito, R.R. (1997) « Cytosolic degradation of T-cell receptor α chains by the proteasome » *J. Biol. Chem.*, **272**, 20800-20804.

Z

- Zapun, A., Darby, N.J., Tessier, D.C., Michalak, M., Bergeron, J.J.M. and Thomas, D.Y. (1998) « Enhanced catalysis of ribonuclease B folding by the interaction of calnexin or calreticulin with ERp57 » *J. Biol. Chem.*, **273**, 6009-6012.

ANNEXE

Sommaire des figures et tableaux

Figure 1 : « core » ou noyau commun à toute N-glycosylprotéine	2
Figure 2 : Les trois principaux types de structures N-glycanniques	2
Figure 3 : Topographie du cycle des dolichols (d'après Abeijon et Hirschberg, 1992)	4
Figure 4 : Structure du tétradécasaccharide élaboré au cours du cycle des dolichols	5
Figure 5 : Adressage des protéines en voie de synthèse au sein de la machinerie du translocon (d'après Gilmore, 1993)	7
Figure 6 : La double activité de l'oligosaccharyltransférase : transfert « en bloc » du précurseur oligosaccharidique sur une protéine en voie de synthèse et sur une molécule d'H ₂ O	12
Figure 7 : Structures oligomannosidiques obtenues par les différentes mannosidases du RER	14
Figure 8 : Maturation réticulaire des N-glycannes	16
Figure 9 : Maturation golgienne des N-glycosylprotéines	17
Figure 10 : Le trafic intracellulaire des oligomannosides libérés par l'activité hydrolytique de l'oligosaccharyltransférase	20
Figure 11 : Structures oligomannosidiques portées par les glycoprotéines marqueurs d'une localisation réticulaire, golgienne ou lysosomique	22
Figure 12 : Structures oligomannosidiques solubles marqueurs d'une localisation réticulaire, cytosolique ou lysosomique	23
Figure 13 : Mode d'interaction général des protéines chaperons	28
Figure 14 : Impact dynamique de la N-glycosylation sur le repliement d'oligopeptides issus de l'hémagglutinine (d'après Imperiali et Rickert, 1995)	30
Figure 15 : Spécificité de reconnaissance de la calnexine et de la calréticuline (d'après Ware <i>et al.</i> , 1995)	32
Figure 16 : Cycle de déglucosylation-reglucosylation (d'après Hammond et Helenius, (1995) et modifié d'après Spiro <i>et al.</i> , 1996)	34
Figure 17 : Rôle potentiel de ERp57 dans le repliement des N-glycosylprotéines au cours du cycle de déglucosylation-reglucosylation (d'après Zapun <i>et al.</i> , 1998)	37
Figure 18 : Destinées des N-glycosylprotéines nouvellement synthétisées	38
Figure 19 : Action de la BFA (d'après Lippincott-Schwartz <i>et al.</i> , 1990) et point d'impact du nocodazole sur le trafic intracellulaire	41
Figure 20 : Mécanisme de rétention par recyclage des protéines solubles dans le RER par le signal KDEL (d'après Kelly, 1990)	42
Figure 21 : Assemblage du protéasome 26S (sur le modèle d' <i>Archebacterium thermoplasma</i>)	48
Figure 22 : Processus général de la dégradation cytosolique des glycoprotéines mal conformées (d'après Bonifacino, 1996)	53
Figure 23 : Mécanismes potentiels de réassociation des glycoprotéines au complexe Sec61	57
Figure 24 : Nature des glycannes libérés par une activité PNGase	59
Figure 25 : Nature des glycannes libérés par une activité endoglucosaminidase	59
Figure 26 : Ubiquitination des protéines destinées à la dégradation protéasomale	61

Figure 27 : Modèle hypothétique du rétro-transport des glycoprotéines destinées à la dégradation cytosolique	64
Figure 28 : Trafic des oligomannosides libérés par l'activité hydrolytique de l'oligosaccharyltransférase dans le modèle B3F7	70
Figure 29 : Les trois voies de déglycosylation des glycoprotéines destinées à la dégradation (adapté au modèle B3F7)	82
Figure 30 : La rétention des glycoprotéines nouvellement synthétisées dans le modèle B3F7 : origine potentielle de la dégradation	85
Figure 31 : Mécanismes potentiels du processus de déglycosylation des glycoprotéines nouvellement synthétisées et destinée des oligomannosides libérés (sur le modèle B3F7)	87
Figure 32 : Clivages de la polyprotéine codée par le génome du virus de l'hépatite C	88
Figure 33 : Voies d'assemblage des complexes E1E2	91
Figure 34 : Glycosidases impliquées dans la formation des différentes espèces oligomannosidiques portées par les glycoprotéines E1 et E2 du VHC	106
Figure 35 : Modèles hypothétiques de la structure des glycoprotéines E1 et E2	121
Figure 36 : Cycle infectieux des Flavivirus	122
Figure 37 : Extraction séquentielle des intermédiaires lipidiques (d'après Cacan et Verbert, 1995)	130
Figure 38 : Procédures d'isolement des fractions glycaniques	132
Figure 39 : Présentation des différentes constructions exprimées par les différents recombinants utilisés	134
Figure 40 : Spécificité d'action de l'endo H	137
Figure 41 : Spécificité d'action de l'endo D	138
Figure 42 : Spécificité d'action de l' α -mannosidase de « jack bean »	138
Tableau 1 : Principaux facteurs qui favorisent ou perturbent l'étape de mise en conformation des protéines	25
Tableau 2 : Temps de demi-vie de divers modèles de glycoprotéines dégradées par la voie cytosolique	52

