

Université des Sciences et Technologies de Lille

THESE de DOCTORAT

Présentée par

François FOULQUIER

Pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de Lille I
Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

**INFLUENCE DES GLYCANNES SUR LA DESTINEE
DES N-GLYCOPROTEINES**



Directeur de thèse : Professeur René CACAN
Unité Mixte de Recherche N°8576 du CNRS et de l'USTL

Soutenu le 10 décembre 2003

Devant le jury composé de :

Monsieur le Docteur Jean-Claude MICHALSKI	<i>Président</i>
Monsieur le Docteur Patrice CODOGNO	<i>Rapporteur</i>
Monsieur le Professeur Raymond JULIEN	<i>Rapporteur</i>
Monsieur le Professeur Philippe DELANNOY	<i>Examineur</i>
Monsieur le Professeur René CACAN	<i>Directeur de thèse</i>

A ma sœur,

A mes parents.

Je tiens à remercier les membres de ce jury :

Docteur Jean-Claude Michalski,

Jean-claude, c'est pour moi un très grand honneur que tu aies accepté de présider mon jury de thèse. Je t'en remercie.

Professeur Raymond Julien,

Mon séjour dans votre laboratoire reste un excellent souvenir, vous m'avez accueilli chaleureusement et permis d'entrevoir le monde des puces à ADN. C'est pour moi, un honneur que vous soyez rapporteur de cette thèse.

Docteur Patrice Codogno,

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

Professeur Philippe Delannoy,

L'intérêt constant que tu as porté à mon travail, les précieux conseils lors des discussions scientifiques du lundi ainsi que ta grande disponibilité m'ont beaucoup apporté. Avec ton dynamisme et ta compétence, la Recherche ne peut qu'avancer. Je te remercie d'avoir accepté d'examiner ma thèse.

Professeur René Cacan,

René, il est très difficile pour moi, de résumer en ces quelques lignes tout ce que je ressens. Vous avez été un directeur extrêmement attentif et patient. La très grande liberté que vous m'avez laissée, ainsi que vos encouragements constants m'ont été d'une aide très précieuse, aussi bien sur le plan professionnel que personnel. Outre nos passionnantes discussions scientifiques, je garde un excellent souvenir, des leçons d'équitation, d'alpinisme, de natation. Je ne vous cacherai pas que je suis en train d'écrire ces quelques lignes avec un peu d'amertume, mais soyez certain que je ne manquerai pas de mettre en pratique tout ce que j'ai appris au sein de votre groupe. René, MERCI.

Je ne saurais terminer sans remercier toute l'équipe du **020**.

Lorsque je suis arrivé au laboratoire, j'ai trouvé des collègues de travail qui sont devenus après quatre années, de véritables ami(e)s. Je voulais vous dire que travailler avec vous est un réel plaisir. J'ai trouvé en votre compagnie beaucoup de complicité. Un grand MERCI à vous tous.

Sandrine, tu as dû partager avec moi ta paillasse et tes étagères. Je t'en remercie (non, je plaisante !). Je te remercie pour la complicité qui s'est installée entre nous et pour ta grande disponibilité.

Anne-Marie, la confiance que tu m'as témoignée chaque jour, ton écoute, ainsi que ta bonne humeur constante, ont contribué pour beaucoup dans la réalisation de ce travail.

Fred, tu as guidé mes premiers pas au laboratoire, tu m'as fait découvrir et aimer la glycobiologie. Je t'en remercie.

André, je garde d'excellents souvenirs du congrès en Sicile et tout particulièrement du débarquement à Catane en pleine nuit. Je te rassure, on ne faisait pas touristes du tout.....

Je tiens à remercier, les membres du **017** pour leur soutien et la gentillesse qu'ils m'ont témoignés, Sylvain, Bénédicte, Marie-Ange, sans oublier **Anne** pour son aide très précieuse dans mes premiers pas en Biologie Moléculaire.

Merci encore à Guy et Christelle pour les soirées honnêtes et sympathiques.

Merci au Dr Dominique Legrand, au Dr Annick Pierce et Momo pour m'avoir si gentiment aidé dans la réalisation d'un vecteur d'expression de la Lactoferrine humaine.

Enfin, je tiens à remercier toutes les personnes du C9 qui ont, de part leur gentillesse et leur bonne humeur, contribué à rendre ce travail agréable. Merci à Jacqueline, Michelle, Brigitte, Nadège, Fred D, pour les cafés partagés.

A Limoges,

Un grand merci à François Gallet et Lionel Forestier pour m'avoir si bien accueilli et accordé un peu de leur temps.

Et finalement,

Merci à Benoît, Joël, Pascal, Vianney, Virginie, Hélène, Françoise, Stéphanie et Laurence.

Merci à ma famille et en particulier à **ma sœur**,

Et évidemment, un grand merci à **mes parents**. Ce travail est en quelque sorte le vôtre.

Ce travail a été réalisé sous la direction du Professeur René CACAN dans le laboratoire de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle de l'Université des Sciences et Technologies de Lille (Unité Mixte de Recherche n°8576 du CNRS, Directeur : Docteur Jean-Claude MICHALSKI).

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

Les travaux présentés ont fait l'objet des publications et communications suivantes:

Publications :

Foulquier, F., Harduin-Lepers, A., Duvet, S., Marchal, I., Mir, A. M., Delannoy, P., Chirat, F., and Cacan, R. (2002) The unfolded protein response in a dolichyl phosphate mannose deficient Chinese hamster ovary cell line points out the key role of a demannosylation step in the quality-control mechanism of N-glycoproteins. *Biochem J.* **362** (Pt 2):491-8.

Foulquier, F., Duvet, S., Chirat, F., and Cacan, R. (2002) Rôle des glycanes dans le contrôle qualité des N-glycoprotéines. *Soumis à Médecine Sciences.*

Foulquier, F., Duvet, S., Klein, A., Mir, A. M., Chirat, F., and Cacan, R. (2003) Endoplasmic reticulum associated degradation of glycoproteins bearing Man₅GlcNAc₂ and Man₉GlcNAc₂ species in the MI8-5 CHO cell line. *Accepté pour publication dans European Journal of Biochemistry.*

Communications Orales :

Foulquier, F., Mir, A. M., Chirat, F., et Cacan, R. Etude de l'influence de la structure des N-glycanes sur la destinée des N-glycoprotéines dans la lignée B3F7. *1^{er} Glycojeunes, Lille, 31 mars 1999.*

Foulquier, F., Delannoy, P., Chirat, F., et Cacan, R. L'UPR dans la lignée B3F7 mets en lumière le rôle clé de l'étape de démannosylation dans le mécanisme contrôle qualité des N-glycoprotéines. *Colloque GT-Rec, Saint christol lez ales, 25-26 octobre 2001.*

Foulquier, F., Duvet, S., Mir, A. M., Chirat, F., et Cacan, R. N-glycosylation et induction transcriptionnelle : effet de la structure des N-glycanes sur l'UPR. *XXVIII^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs en Biochimie et Biologie Moleculaire, 1-5 Juillet 2002, Dijon.*

Foulquier, F., Duvet, S., Mir, A. M., Chirat, F., et Cacan, R. Mise en évidence d'une relation entre N-glycosylation et UPR (Unfolded Protein Response). *2^{ème} Journée André Verbert, 19 Septembre 2002, Lille.*

Foulquier, F., Duvet, S., Mir, A. M., Chirat, F., et Cacan, R. Relationship between UPR (Unfolded Protein Response) and N-glycosylation process in mammalian cell lines. *13th Joint Meeting of the Studiengruppe Glykobiologie der Gesellschaft für Biochemie und Molekular biologie the Nederlandse Vereniging voor Glycobiologie and the Groupe Lillois de Glycobiologie, 21-23 Novembre 2002, Münster (Allemagne).*

Communications par affiches :

Foulquier, F., Chirat, F., Mir, A. M., Cacan, R. Study of the influence of *N*-glycans structure on the fate of newly synthesized *N*-glycoproteins.

12th Joint Meeting of the Studiengruppe Glykobiologie der Gesellschaft für Biologische Chemie, the Netherlands Society for Glycobiology, and the Groupe Lillois de Glycobiologie, Villeneuve d'Ascq, 05-07 November 2000.

Foulquier, F., Marchal, I., Mir, A. M., Duvet, S., Chirat, F., et Cacan, R. CHO cell lysate display a strong glucosidase activity on glucosylated oligomannoside species.

27th Meeting of the Federation of European Biochemical Societies, 30 juin-5 juillet 2001, Lisbonne, Portugal.

ABREVIATIONS

ADN	Acide DéoxyriboNucléique
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	ARN messenger
ATP	Adénosine Triphosphate
BiP	Binding Immunoglobulin Protein
CDG	Congenital Disorders of Glycosylation
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CHO	Chinese Hamster Ovary
CMH-I	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
CMH-II	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
CNX	Calnexine
CRT	Calréticuline
DTT	Dithiothréitol
EDEM	Endoplasmic Reticulum Degradation Enhancing Mannosidase like Protein
ERAD	Endoplasmic Reticulum Associated Degradation
ERGIC	Endoplasmic Reticulum Golgi Intermediate Compartment
ERSD	Endoplasmic Reticulum Storage Diseases
ERSE	Endoplasmic Reticulum Stress Element
GalNAC	N-Acétylgalactosamine
GK	Glucokinase
GlcNAC	N-Acétylglucosamine
Glc-P-Dol	Glucosyl Phosphodolichol
GPT	UDP-GlcNAC : dolichol-P GlcNAC-1-p transférase
GRP	Glucose Regulated Protein
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion oxydé
GTP	Guanosine Triphosphate
HECT	Homologous with the E6-AP C-Terminus
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HK	Hexokinase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSP	Heat Shock Proteins
Ig	Immunoglobuline
JNK	Jun N-Terminal Protein Kinases
kDa	Kilo Dalton
LDL	Low Density Lipoprotein
LLO	Lipid Linked Oligosaccharrides
Man-P Dol	Mannosyl Phosphodolichol
OSGn1	Oligosaccharrides neutres possédant un seul résidu d'N-acétylglucosamine
OSGN2	Oligosaccharrides neutres possédant deux résidus d'N-acétylglucosamine

OST	Oligosaccharyltransférase
PDI	Protéine Disulfure Isomérase
P-Dol	Phosphodolichol
PGI	Phosphoglucoisomérase
PIR	Processing Inhibitor Resistance
PM	Phosphomannose Isomérase
PMM	Phosphomannomutase
PNGase	Peptide N-Glycosidase F
RI, RII	Ribophorine I et Ribophorine II
RAMP4	Ribosome Associated Membrane Protein 4
RE	Reticulum Endoplasmique
RER	Reticulum Endoplasmique Rugueux
RNC	Ribosome Nascent Chain
SCF	Skp1/cullin/F-box
SPC	Signal Peptide Clivage
SR	SRP Receptor
SREBP	Sterol Responsive Element Binding Protein
SRP	Signal Recognition Particle
TAP	Transporters Associated Antigen Processing
TRAM	Translocated Chain Associated Membrane Protein
TRAP	Translocon Associated Membrane Protein
tRNA	ARN de Transfert
UGGT	UDP-Glc : glycoprotéine glucosyltransférase
UPR	Unfolded Protein Response
UPRE	UPR element

Les résidus glucidiques

NOMS	SYMBOLES	NOMS	SYMBOLES
N-Acétylgalactosamine	GalNAc	Galactose	Gal
N-Acétylglucosamine	GlcNAc	Glucose	Glc
Acide N-Acétyleuraminique	NeuAc	Mannose	Man
Fucose	Fuc		

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

I.	La Biosynthèse des N-glycoprotéines	1
	Biosynthèse des N-glycoprotéines	2
	1. Introduction	2
	2. Translocation des protéines	3
	2.1 Adressage des protéines vers le RE	3
	2.1.1 Le peptide signal	3
	2.1.2 La particule de reconnaissance du signal (SRP)	4
	2.1.3 Le récepteur de la SRP	4
	2.2 Le translocon	5
	2.2.1 Structure du translocon	5
	2.2.1.1 Le complexe Sec61	5
	2.2.1.2 La protéine TRAM	5
	2.2.2 Les protéines associées au translocon	6
	2.2.3 Dynamique de la translocation : implication de la protéine chaperonne BiP	6
	3. Processus de N-glycosylation	6
	3.1 Synthèse du précurseur glycanique	7
	3.1.1 Topographie du cycle des dolichols	7
	3.1.1.1 L'initiation	7
	3.1.1.2 Les précurseurs	7
	3.1.1.3 La translocation	8
	3.1.1.4 L'allongement	9
	3.1.1.5 Le recyclage	9
	3.2 Transfert du précurseur glycanique	9
	3.2.1 L'oligosaccharyltransférase	9
	3.2.1.1 Le Transfert en bloc	9
	3.2.1.2 Composition du complexe de l'OST	10
	3.2.1.3 Spécificité de l'oligosaccharyltransférase	10
	3.3 Régulation du processus de N-glycosylation	11
	3.3.1 Régulation du cycle de dolichols	11
	3.3.1.1 Régulation par le taux de précurseur : notion de pool de Dol-P	11
	3.3.1.2 Régulation par les enzymes	11
	3.3.1.3 Régulation par le taux d'accepteur protéique	12
	3.3.1.4 Régulation par le transfert sur l'eau du donneur oligosaccharidique Glc ₃ Man ₉ GlcNAc ₂	12
	3.4. Pathologies liées à un déficit dans la synthèse du Glc ₃ Man ₉ GlcNAc ₂ -PP-Dol	13
II.	Le Contrôle qualité des N-glycoprotéines	14
	Contrôle qualité des N-glycoprotéines	15
	1. Introduction	15
	2. Mise en conformation des N-glycoprotéines	15

2.1. Le RE : un compartiment impliqué dans le processus de mise en conformation	15
2.1.1 <i>Un environnement oxydant</i>	15
2.1.2 <i>Les protéines chaperonnes</i>	16
2.1.2.1 <i>BiP</i>	16
2.2 Rôle des glycanes dans la mise en conformation des N-glycoprotéines	17
2.2.1 <i>Relation entre N-glycosylation et mise en conformation</i>	17
2.2.2 <i>Maturation des glycanes dans la lumière du RE</i>	17
2.2.2.1 <i>Glucosidase I et glucosidase II</i>	17
2.2.2.2 <i>ER α1,2-mannosidases</i>	18
A. <i>Mannosidases de classe I</i>	18
A.1 <i>ER α1,2-mannosidase I</i>	18
A.2 <i>La Man₉-mannosidase</i>	19
B. <i>Mannosidase de classe II</i>	19
B.1 <i>ER α1,2-mannosidase II</i>	19
2.2.3 <i>Le cycle calnexine-calréticuline</i>	19
2.2.3.1 <i>L'entrée dans le cycle</i>	19
2.2.3.2 <i>La calnexine et la calréticuline</i>	20
A. <i>La CNX et la CRT lient spécifiquement les glycoprotéines monoglucosylées</i>	20
B. <i>Interactions de type protéine-protéine</i>	21
C. <i>Coopération avec l'ERp57</i>	21
2.2.3.3 <i>Dynamique du cycle calnexine-calréticuline</i>	21
3. Dégradation des N-glycoprotéines néosynthétisées	23
3.1 <i>La voie autophagique</i>	23
3.2 <i>La voie ERAD</i>	23
3.2.1 <i>Voie de dégradation dépendante de la formation d'une structure glycanique et du protéasome</i>	23
3.2.2 <i>Voie de dégradation indépendante de la formation d'une structure glycanique et dépendante du protéasome</i>	24
3.2.3 <i>Voie de dégradation dépendante de la formation d'une structure glycanique et indépendante du protéasome</i>	24
3.3. EDEM : un intermédiaire dans la voie de dégradation des glycoprotéines mal conformées	26
3.4 <i>Retrotranslocation</i>	27
3.4.1 <i>Les protéines facilitant le rétrotransport des glycoprotéines</i>	27
3.4.1.1 <i>Les protéines luminales</i>	27
3.4.1.2 <i>Les protéines cytoplasmiques</i>	28
3.5. Ubiquitination des N-glycoprotéines	29
3.5.1 <i>Les acteurs</i>	29
3.5.2. <i>Complexe SCF et dégradation des glycoprotéines mal conformées</i>	30
3.6. Déglycosylation cytosolique des N-glycoprotéines	31
3.6.1. <i>L'activité PNGase</i>	31
3.6.1.1 <i>Interaction entre protéasome et PNGase</i>	31
3.6.1.2 <i>Catabolisme des OSGn2</i>	32
3.7 Le protéasome	32
3.7.1 <i>La particule 20S</i>	32
3.7.2 <i>Le complexe 19S</i>	32
3.7.3 <i>Fonction du protéasome</i>	33
3.8 ERAD et système immunitaire	33

4. Sécrétion des glycoprotéines.	35
4.1 L'ERGIC 53	35
4.2 VIP 36	35
5. Pathologies et contrôle qualité	35
5.1 Corps de Russel	36
5.2 Les agrésomes	37
III. Unfolded Protein Response	39
L'UPR : chef d'orchestre de la voie de sécrétion	40
1. Introduction	40
2. L'UPR chez la levure	40
2.1 La voie de signalisation	41
2.1.1 La protéine <i>Ire1p</i>	41
2.1.2 Un épissage non conventionnel	41
3. L'UPR chez les mammifères	42
3.1 Induction transcriptionnelle	42
3.1.1 Voie de signalisation partiellement homologue à celle de la levure	43
3.1.2 Activation de ATF6 par le stress du RE	43
3.2 Inhibition de la traduction	44
3.3 UPR et mort cellulaire programmée	45
3.4 BiP : lien manquant entre les protéines mal conformées du RE et l'activation de l'UPR	45
4. Rôle de l'UPR dans la physiologie cellulaire	46
4.1 Lien entre L'UPR et l'ERAD	47
4.2 Lien entre l'UPR et la N-glycosylation	47
5. UPR et pathologies	49
TRAVAUX PERSONNELS	
Introduction	51
Article 1 : Endoplasmic reticulum associated degradation of glycoproteins bearing Man₅GlcNAc₂ and Man₉GlcNAc₂ species in the MI8-5 CHO cell line.	53
Discussion	73
1. Contrôle qualité des glycoprotéines portant des glycanes de type Man ₅ GlcNAc ₂	74
1.1 La regluco-sylation	74
1.2 La dégluco-sylation	74
1.3 L'association à la calnexine	77

Article 2 : The unfolded protein response in a dolichyl phosphate mannose-deficient Chinese hamster ovary cell line point out the key role of a demannosylation step in the quality control mechanism of N-glycoproteins.	78
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

Discussion	79
-------------------	-----------

CONCLUSION

Conclusion générale	81
----------------------------	-----------

1. Influence des glycannes tronqués de type $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ sur la mise en conformation des glycoprotéines.	82
2. Influence des glycannes tronqués de type $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ sur la sécrétion des glycoprotéines	83
3. Influence des glycannes tronqués de type $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ sur la dégradation des glycoprotéines.	83

REFERENCES

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

LA BIOSYNTHESE DES N-GLYCOPROTEINES

Biosynthèse des N-glycoprotéines.

1. Introduction

Les cellules eucaryotes sont constituées de différents organites dont les fonctions spécialisées sont indispensables au maintien de la vie cellulaire et de l'organisme. Chaque organite est pourvu d'un jeu de protéines spécifiques qui définit, non seulement sa structure, mais aussi sa fonction. L'homéostasie cellulaire qui dépend du maintien de la fonctionnalité de ces organites requiert d'une part, que les protéines nouvellement synthétisées soient fonctionnelles, d'autre part, qu'elles soient également adressées avec précision vers leur destination finale.

Au cours de leur biosynthèse, la majorité des protéines destinées à être sécrétées ou intégrées au

niveau de la membrane des différents organites subiront, au sein de la lumière du Reticulum Endoplasmique Rugueux (RER), plusieurs modifications co- ou post-traductionnelles. Parmi celles-ci, la N-glycosylation, qui consiste dans l'addition covalente de chaînes oligosaccharidiques sur un résidu d'asparagine, est la plus répandue. En effet, on estime que 70% des protéines cellulaires sont N-glycosylées (Mononen et Karjalainen, 1999).

Une des particularités majeures des N-glycoprotéines matures, est l'extrême diversité structurale de leurs chaînes glycaniques. Cette complexité résulte de la conjonction de plusieurs facteurs, la variété de liaisons chimiques possibles entre deux monosaccharides, mais aussi le type d'organisme et le type cellulaire. D'une façon très schématique, il est possible de subdiviser la structure des glycannes sur une glycoprotéine mature en trois

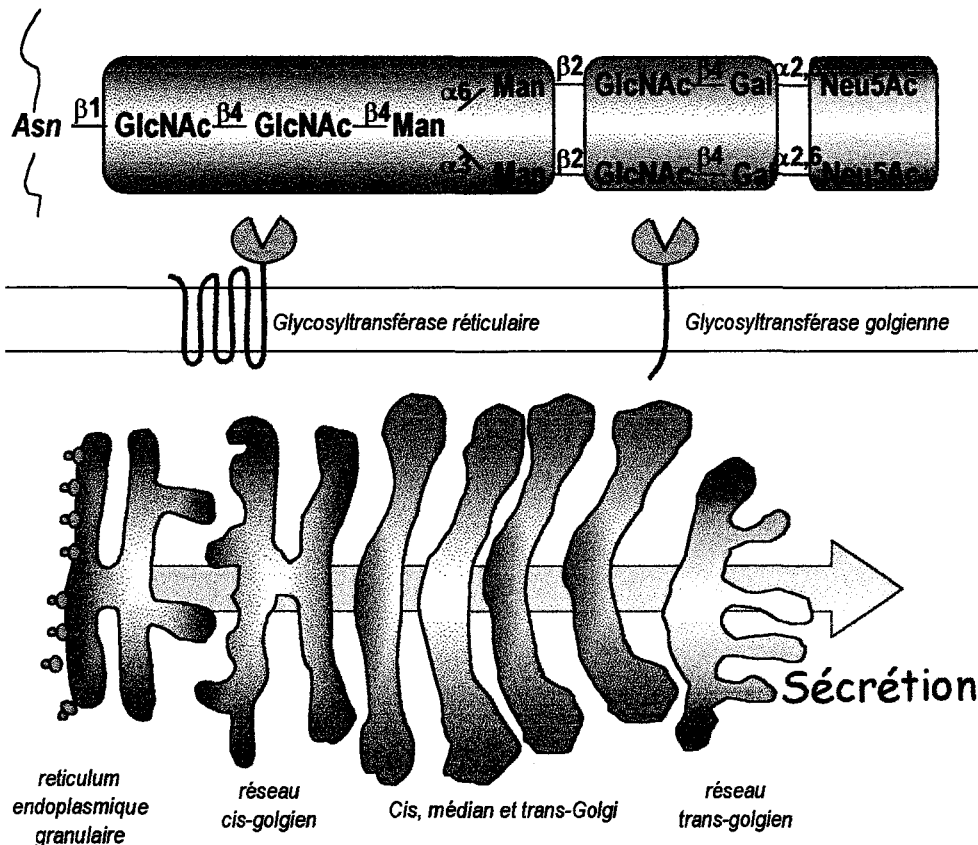


Figure 1 : Synthèse d'une N-glycoprotéine mature. Lieux de synthèse, types d'enzymes impliquées, et structure générale des glycannes.

régions (Figure 1) : une région souvent appelée noyau ou *core*, constituée de deux résidus d'*N*-acétylglucosamine et de trois résidus de mannose ; une région *centrale*, correspondant aux antennes et composée d'un nombre variable d'unités disaccharidiques galactose-*N*-acétylglucosamine ; le tout terminé par une région *périphérique* qui comprend notamment des résidus d'acide sialique ou de fucose. La synthèse d'une telle structure va s'effectuer en deux étapes successives, dans deux compartiments cellulaires : le RE et l'appareil de Golgi. La première étape, réticulaire, comprend notamment la formation, le transfert, ainsi que la maturation par des glycosidases spécifiques d'une structure oligosaccharidique hautement conservée au cours de l'évolution. La seconde étape, golgienne, correspond à l'addition de sucres terminaux. Les enzymes responsables de ce transfert de sucres, aussi bien au niveau du RE pour la formation du donneur oligosaccharidique, qu'au niveau de l'appareil de Golgi pour la synthèse d'une structure glycanne de type complexe, sont appelées : glycosyltransférases. Selon leur localisation cellulaire, ces enzymes sont très différentes. En effet, alors qu'elles sont composées de plusieurs domaines transmembranaires au niveau de la lumière du RE, ces dernières ne vont posséder qu'un seul domaine transmembranaire au niveau de l'appareil de Golgi.

Alors que la glycosylation dans le RE est homogène, l'appareil de Golgi va générer des glycannes structurellement très variés. Ce contraste de glycosylation, d'un point de vue évolutif, marque l'apparition de structures glycaniques impliquées dans des rôles biologiques précis. Dans la lumière du RE, où le nombre de structures glycaniques rencontrées est limité, le rôle biologique de ces structures fut beaucoup moins évident à percevoir. Aujourd'hui, on peut néanmoins considérer que la structure du glycanne au

niveau du RE joue un rôle fondamental dans la destinée des glycoprotéines. En effet, nous verrons au cours de ces généralités, comment la structure même de l'oligosaccharide génère des informations pouvant influencer la destinée des *N*-glycoprotéines nouvellement synthétisées. Nous mettrons en évidence la présence de signaux glycaniques qui interviennent à la fois dans la mise en conformation, la dégradation, la sécrétion des *N*-glycoprotéines nouvellement synthétisées, et également dans l'apparition d'une réponse cellulaire que l'on appelle UPR pour Unfolded Protein Response.

2. Translocation des protéines

Dans les cellules eucaryotes, la synthèse de la plupart des protéines débute dans le cytoplasme. Leur destination vers les différents organites cellulaires va donc dépendre de la présence d'une séquence d'adressage qui leur permettra d'être dirigées vers le bon compartiment.

2.1 Adressage des protéines vers le RE

Le transport des protéines du cytoplasme vers le RE, qui n'est rendu possible que si ces dernières contiennent une séquence spécifique dite séquence signal, concerne, non seulement les protéines membranaires et les protéines sécrétées, mais également toutes les protéines destinées aux organites impliqués dans la voie de sécrétion.

2.1.1 Le peptide signal

La séquence signal, également appelée peptide signal, est nécessaire à l'adressage et à la translocation de la protéine vers la membrane du RE.

Cette séquence, considérée comme une extension N-terminale de la protéine par (Blobel et Doberstein, 1975), est localisée à l'intérieur ou encore du côté C terminal de la protéine (von Heijne, 1990). Celle-ci est composée de trois régions :

- ◆ une région N-terminale de 1 à 5 résidus d'acides aminés chargée positivement,
- ◆ une région centrale hydrophobe de 6 à 50 résidus d'acides aminés,
- ◆ une région polaire de 3 à 7 résidus d'acides aminés.

La région hydrophobe est considérée selon von Heijne (1985) comme essentielle pour l'adressage des protéines vers le RE. La région polaire, quant à elle, contient le site de reconnaissance pour le clivage par la signal peptidase (von Heijne, 1998).

2.1.2 La particule de reconnaissance du signal (SRP)

Une des voies majeures d'adressage des protéines en voie de synthèse vers la membrane du RE fait intervenir un complexe protéique cytoplasmique nommé SRP pour (Signal Recognition Particle). Cette particule, complexe ribonucléoprotéique composé d'une molécule d'ARN et de 6 polypeptides (72, 68, 54, 19, 14, 9 Kda), est capable de lier et d'hydrolyser le GTP.

Dès que la zone hydrophobe du peptide signal émerge du ribosome dans le cytoplasme, celle-ci est reconnue par la protéine de 54 kDa (SRP54) de la SRP (Johnson et van Waes, 1999). Cette interaction de la SRP avec le complexe ribosome-chaîne protéique naissante (RNC) conduit, d'une part, à l'arrêt de la traduction et d'autre part, à l'adressage de ce complexe vers la membrane du RE au sein de laquelle se trouve un récepteur spécifique de la particule SRP (SR).

2.1.3 Le récepteur de la SRP

Le complexe RNC-SRP se fixe à la membrane du RE grâce au récepteur de la SRP (SR). Ce dernier, ancré dans la membrane du RE, est un hétérodimère de deux sous-unités à activités GTPasiques : une cytosolique (α) et une transmembranaire (β). Le processus d'adressage, dépendant de la liaison et de l'hydrolyse du GTP, nécessite la coopération de trois protéines : SRP54, SR α et SR β (Figure 2).

Grâce à l'interaction de SRP54 avec SR α , ces deux protéines lient le GTP avec une haute affinité. Deux effets sont ainsi engendrés : une stabilisation du complexe SRP-SR (Rapiejko et Gilmore, 1997), et une dissociation de la SRP de la chaîne protéique naissante. De façon concomitante, l'interaction de SR β

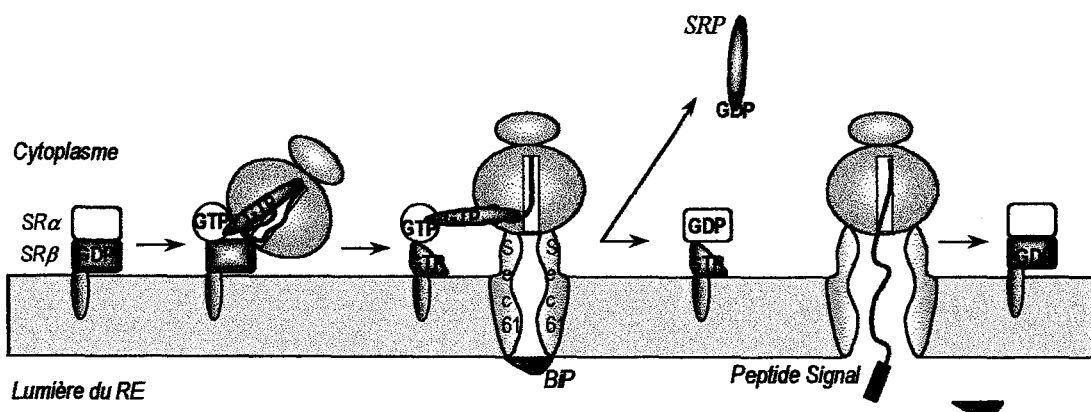


Figure 2 : Représentation schématique du processus d'adressage et du mécanisme de translocation des protéines à travers la membrane du RE (d'après Fulga et al., 2001).

avec une protéine ribosomale de 21 kDa conduit à la libération du GDP. La liaison du ribosome avec le complexe Sec61 altère ensuite l'interaction de SR β avec cette protéine de 21 kDa, conduisant ainsi SR β à lier du GTP. Dans une réaction finale, l'hydrolyse du GTP libère la SRP de son récepteur, la préparant ainsi à un nouveau cycle d'adressage (Connolly *et al.*, 1991). A ce stade, la traduction reprend.

2.2 Le translocon

Les sites de translocation qui vont permettre d'une part, le passage du cytoplasme vers la lumière du RE des protéines sécrétées et d'autre part, l'intégration des protéines membranaires dans la membrane du RE sont constitués par des complexes membranaires. L'environnement hydrophile formé par ces complexes, facilite la translocation de la chaîne polypeptidique. De tels complexes portent le nom de translocon (Walter et Lingappa, 1986).

2.2.1 Structure du translocon

L'utilisation de protéoliposomes, rendus compétents pour l'étude de la translocation des protéines, a démontré que trois constituants de la membrane du RE étaient suffisants pour accomplir *in vitro* une translocation co-translationnelle : le complexe Sec61, la protéine TRAM (TRanslocated chain Associated Membrane protein) et le récepteur de la SRP (Görlich et Rapoport, 1993).

2.2.1.1 Le complexe Sec61

Le complexe Sec61 est un hétérotrimère constitué de trois sous-unités transmembranaires : Sec61 α ,

Sec61 β , et Sec61 γ . L'agencement dans la membrane du RE de plusieurs complexes Sec61 forme le pore aqueux du translocon. Des travaux de microscopie électronique ont montré, que les hélices α de la protéine Sec61 α formaient la cavité centrale du translocon (Breyton *et al.*, 2002). Selon l'interaction du ribosome avec le complexe Sec61, celui-ci peut se trouver dans deux états différents. En absence d'interaction, le complexe Sec61 se trouve dans un état dit fermé et le diamètre du pore a été estimé à 9-25 Å. Par contre, lors de la translocation d'une protéine, le complexe est dans un état ouvert dit actif, et le diamètre du pore serait de 40-60 Å. Concernant la sous-unité Sec61 β , deux fonctions lui sont attribuées : faciliter l'interaction avec le complexe de la peptidase signal et la translocation des protéines. En effet, des travaux de Gruss *et al.*, (1999) ont montré que la phosphorylation de Sec61 β modulait le phénomène de translocation protéique.

2.2.1.2 La protéine TRAM

La fonction de la protéine TRAM reste ambiguë, alors que des études menées *in vitro* ont montré que sa présence était indispensable dans la translocation de certaines protéines. D'autres expériences de cross-linking ont montré l'interaction de TRAM avec la région N-terminale du peptide signal (High *et al.*, 1993), suggérant que cette protéine était impliquée dès les premières étapes de la translocation. Selon Hegde *et al.*, (1998), au cours du processus de translocation, la protéine TRAM régulerait l'exposition de domaines protéiques à certains facteurs cytosoliques durant les phénomènes de pause traductionnelle.

2.2.2 Les protéines associées au translocon

Deux complexes protéiques majeurs sont associés au translocon : celui de la signal peptidase (SPC) et celui de l'oligosaccharyltransférase (OST). Le complexe de la signal peptidase constitué de 5 sous-unités va permettre le clivage du peptide signal. Cette réaction serait d'ailleurs importante pour l'efficacité de la N-glycosylation. En effet, le caractère hydrophobe de la séquence signal, dirigerait la séquence N-terminale de la protéine dans la membrane du RE, ce qui permettrait l'interaction avec le complexe de l'OST, favorisant de ce fait, le processus de N-glycosylation (Chen *et al.*, 2001).

D'autres protéines intégrées dans la machinerie du translocon semblent impliquées dans l'arrimage du complexe RNC sur la membrane plasmique. Parmi celles-ci, on trouve plusieurs protéines membranaires :

- ◆ les ribophorines RI et RII,
- ◆ la protéine RAMP 4 (Ribosome Associated Membrane Protein 4) qui régulerait le processus de N-glycosylation (Schröder *et al.*, 1999),
- ◆ le complexe TRAP (Translocon Associated Membrane Protein).

Ce dernier constitué de deux protéines membranaires de 180 kDa (p180) et 34 kDa (p34), est localisé à proximité de la chaîne protéique naissante et des ribosomes associés à la membrane du RE. Selon Johnson et van Waes (1999), ces récepteurs ribosomiques putatifs seraient également impliqués dans la stabilisation du complexe ribosomique au niveau du pore aqueux.

2.2.3 Dynamique de la translocation : implication de la protéine chaperonne BiP

Le mécanisme de translocation protéique vers la lumière du RE est un processus dynamique impliquant la protéine chaperonne BiP. Celle-ci, soluble dans la lumière du RE, appartient à la famille des chaperonnes hsp70. En absence de ribosomes associés au translocon, BiP s'associe avec la face interne du translocon, empêchant ainsi les mouvements d'ions à travers la membrane du RE. Dès que le peptide signal apparaît, la SRP se fixe et une interaction avec son récepteur (SR) permet la liaison du ribosome au translocon. Cette interaction est faible et devient plus forte lorsque la longueur de la protéine synthétisée atteint une certaine taille. A ce stade, la chaîne naissante se trouve alors dans un compartiment aqueux, complètement distinct du cytoplasme et de la lumière du RE. Lorsque la préprotéine contient environ 70 acides aminés, BiP se détache du translocon, permettant ainsi au pore aqueux de s'ouvrir totalement (Crowley *et al.*, 1994) (Voir Figure 2). Une fois la traduction de la protéine achevée, celle-ci est libérée dans la lumière du RE après clivage du peptide signal par la signal peptidase. Après la translocation complète de la protéine, le ribosome se dissocie du translocon, celui-ci se referme et BiP reprend sa place initiale en scellant le pore aqueux.

3. Processus de N-glycosylation

Chez les eucaryotes, le processus de N-glycosylation implique deux étapes successives :

- ◆ l'assemblage d'un oligosaccharide de type $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ sur un lipide de type polyisoprénique nommé le dolichol,

◆ le transfert en bloc de cet oligosaccharide sur la protéine naissante en cours de translocation.

La synthèse de cet oligosaccharide lié à un lipide se fait par l'intermédiaire du cycle des dolichols. Son transfert sur la protéine requiert une protéine que nous avons déjà mentionnée: l'oligosaccharyltransférase.

3.1 Synthèse du précurseur glycannique

Contrairement à la synthèse des acides nucléiques et des protéines, le précurseur glycannique n'est pas synthétisé selon un modèle, mais résulte de l'action séquentielle de plusieurs enzymes au cours du cycle métabolique des dolichols. Ces enzymes, nommées glycosyltransférases, transfèrent successivement des monosaccharides sur le précurseur oligosaccharidique en formation qui est préalablement attaché sur un dolichol, via une liaison pyrophosphate. Cette série de réactions s'effectue à l'interface de deux compartiments subcellulaires, le cytoplasme et la lumière du RE. Pour revue sur les réactions du cycle des dolichols voir (Kornfeld et Kornfeld, 1985).

3.1.1 Topographie du cycle des dolichols

3.1.1.1 L'initiation

Les premières étapes du cycle des dolichols s'effectuent du côté cytosolique de la membrane du RE par le transfert de GlcNAc-1-P à partir d'UDP-GlcNAc sur le Dolichol-phosphate (Dol-P). Cette réaction catalysée par l'UDP-GlcNAc: dolichol-P GlcNAc-1-P transférase (GPT) forme un résidu d'*N*-acétylglucosamine lié au dolichol par une liaison pyrophosphate (GlcNAc-PP-Dol). Cette réaction est inhibée par un inhibiteur sélectif de la GPT: la

tunicamycine. Sur ce premier monosaccharide, seront ensuite transférés séquentiellement, un autre résidu d'*N*-acétylglucosamine et cinq résidus de mannose, pour générer un intermédiaire heptasaccharidique : le $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$. Les glycosyltransférases catalysant l'assemblage de cet intermédiaire lipidique sont des enzymes résidentes du RE. Leur site actif, orienté du côté cytosolique, utilise comme donneurs des sucres activés tels que l'UDP-GlcNAc et le GDP-Man. Parmi les sept glycosyltransférases impliquées, quatre sont actuellement identifiées.

3.1.1.2 Les précurseurs

La découverte des sucres activés et leurs implications dans la biosynthèse des glycoconjugués ont permis à Luis Leloir d'obtenir le Prix Nobel de Chimie en 1970. Très étudiées, on sait aujourd'hui que les voies de synthèse des différents sucres activés sont complexes et interconnectées. Impliquées dans la biosynthèse du précurseur glycannique $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$, celles-ci sont résumées dans la figure 3.

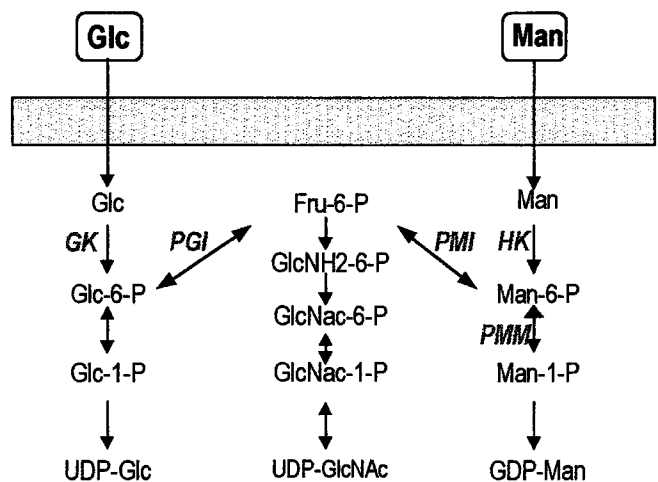


Figure 3 : Voies de synthèse des sucres activés impliquées dans la biosynthèse du précurseur glycannique. GK : Glucokinase, HK : Hexokinase, PGI: Phosphoglucoisomérase, PMI : Phosphomannosidomérase, PMM : Phosphomannosidomutase.

Une fois captés par la cellule grâce à des transporteurs spécifiques de la membrane plasmique, le glucose (Glc) et le mannose (Man) subiront une phosphorylation en position 6 par l'hexokinase, conduisant respectivement aux Glc-6-P et Man-6-P. La concentration intracellulaire de Man-6-P, est contrôlée par deux voies différentes, l'une provenant du Man, et l'autre de l'isomérisation du Fru-6-P en Man-6-P par la phosphomannose isomérase (PMI). Sous cette forme, ces sucres seront ensuite isomérisés en Glc-1-P, Man-1-P, par des mutases spécifiques. La phosphomannomutase (PMM) est responsable de la formation du Man-1-P. Codée par deux gènes homologues (PMM1 et PMM2), une déficience en PMM2 causera une diminution du flux métabolique dans la synthèse du GDP-Man, perturbant ainsi le processus de N-glycosylation. Les sucres activés, sous

forme d'UDP-Glc, de GDP-Man et d'UDP-GlcNAc, seront ensuite utilisés dans la biosynthèse des différents glycoconjugués.

3.1.1.3 La translocation

Les travaux de Snider et Rogers (1984) ont montré que l'allongement du $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ en $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$, ainsi que son utilisation, étaient réalisés du côté luminal du RER. Ces résultats ne pouvaient s'expliquer qu'en admettant, que le $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ synthétisé du côté cytosolique effectuait, à un moment donné, un mouvement de translocation à travers la membrane du RER. Ce mouvement, nommé "flip-flop", est d'une importance fondamentale dans le processus de biosynthèse du précurseur oligosaccharidique, puisque son absence

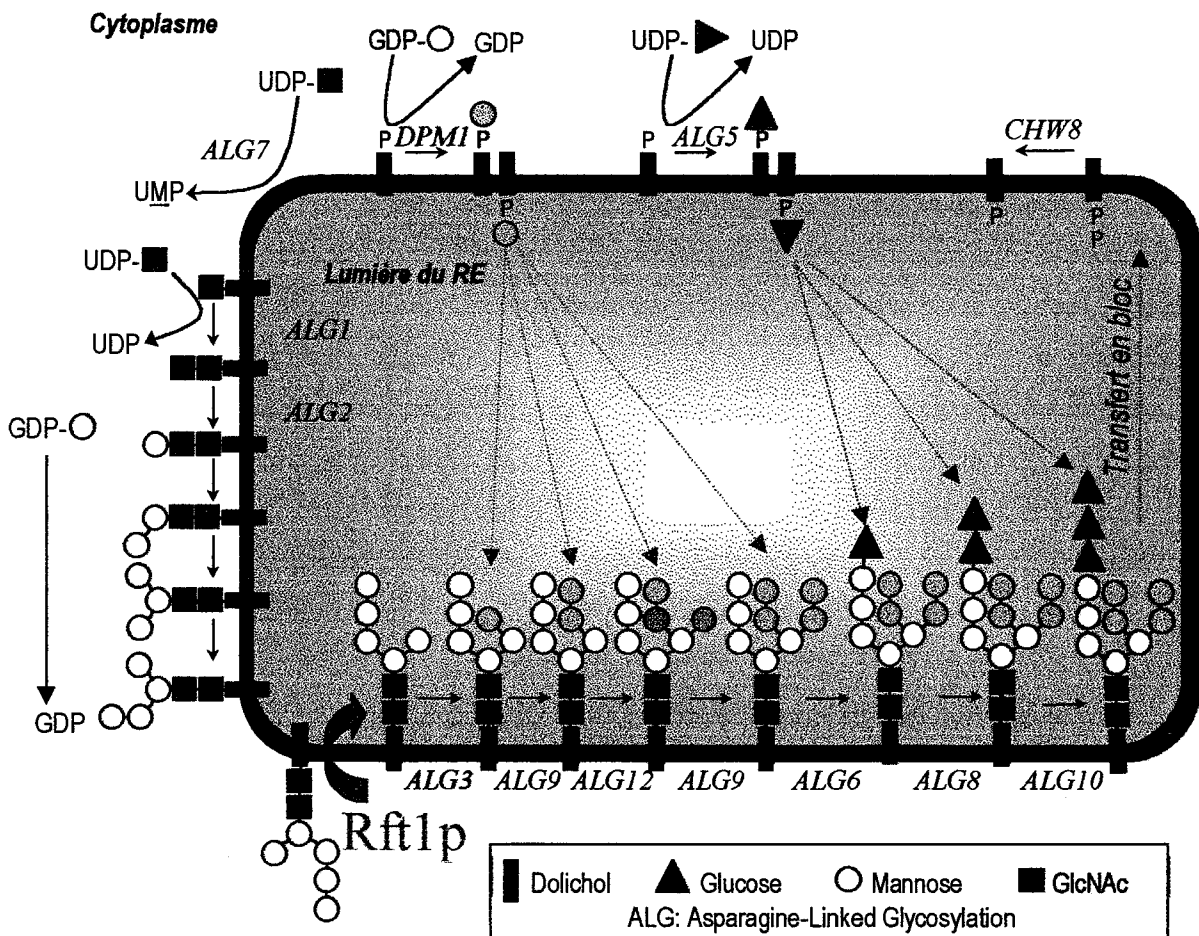


Figure 4: Topographie du cycle des dolichols (selon Hennet et Aebi, 1998).

engendrerait une perte complète de la N-glycosylation. Jusque très récemment, alors que ce mécanisme de translocation demeurait non élucidé, le groupe de M. Aebi (2002) a montré, que ce processus, ATP indépendant, était catalysé par une protéine transmembranaire de la membrane du RE : Rft1 (Helenius *et al.*, 2002). En effet, une inhibition de l'expression de Rft1 conduit à l'accumulation de Man₅GlcNAc₂-PP-Dol du côté cytosolique.

3.1.1.4 L'allongement

Une fois transféré du côté luminal, le Man₅GlcNAc₂-PP-Dol est allongé par l'addition de quatre résidus de mannose et trois résidus de glucose, pour former le précurseur oligosaccharidique mature : Glc₃Man₉GlcNAc₂-PP-Dol. Ce processus d'élongation est sous le contrôle de six glycosyltransférases différentes dont le site catalytique est dirigé vers la lumière du RE. Ces enzymes composées de plusieurs domaines transmembranaires Oriol *et al.*, (2002), n'utilisent pas comme substrat un nucléotide sucre (contrairement aux glycosyltransférases golgiennes et cytoplasmiques), mais un monosaccharide lié au dolichol : le mannosyl phosphodolichol (Man-P-Dol) ou le glucosyl phosphodolichol (Glc-P-Dol). Ces précurseurs sont synthétisés du côté cytoplasmique, par une Man-P-Dol synthase et une Glc-P-Dol synthase à partir de GDP-mannose et d'UDP-glucose. Chez la levure, la Man-P-Dol synthase est constituée d'une seule sous-unité liée à la membrane : Dpm1p, alors que chez les mammifères, elle est composée de trois sous-unités (Colussi *et al.*, 1997). Concernant la Glc-P-Dol synthase, Heesen *et al.*, (1994) ont isolé chez la levure une protéine similaire en séquence à Dpm1p : la protéine Alg5p qui permet la synthèse du Glc-P-Dol à partir d'UDP-Glc et de Dol-P.

Ces enzymes, constituent d'un point de vue topographique, une exception, puisque leur domaine catalytique se situe du côté cytoplasmique alors que l'utilisation de leur produit est luminale. Cette double compartimentation, au même titre que le Man₅GlcNAc₂-PP-Dol, nécessite un phénomène de flip-flop à travers la membrane du RE. La protéine responsable de ce mouvement reste encore à identifier.

3.1.1.5 Le recyclage

Après l'allongement du Man₅GlcNAc₂-PP-Dol en Glc₃Man₉GlcNAc₂-PP-Dol, celui-ci est transféré sur la chaîne protéique naissante par l'oligosaccharyltransférase. Suite au transfert, le Dol-PP résultant est alors converti en Dol-P par la pyrophosphatase codée par le gène CWH8 (Fernandez *et al.*, 2001). Cette réaction permet la régénération d'une nouvelle molécule de Dol-P, indispensable à la réinitialisation d'un nouveau cycle des dolichols.

3.2 Transfert du précurseur glycanique

3.2.1 L'oligosaccharyltransférase

3.2.1.1 Le transfert en bloc

L'oligosaccharyltransférase va transférer *en bloc* le tétradécasaccharide Glc₃Man₉GlcNAc₂ à partir du donneur, préalablement synthétisé par le cycle des dolichols sous forme dolichol pyrophosphate sur un résidu d'asparagine, intégré dans une séquence tripeptidique consensus (Figure 5).

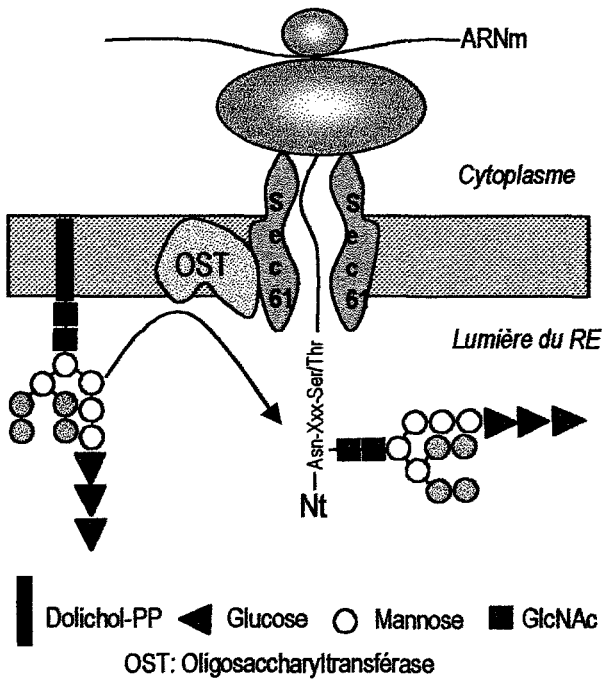


Figure 5: Transfert en bloc du précurseur oligosaccharidique sur une protéine en cours de synthèse.

Ce tripeptide accepteur, appelé sequon, est constitué du motif Nt---Asn-X-Ser/Thr---Ct (X étant n'importe quel acide aminé exceptée la proline). La présence d'une telle séquence est nécessaire mais pas suffisante. Néanmoins, on estime que parmi tous les sequons synthétisés, 90% sont glycosylés (Gavel *et al.*, 1990). Une certaine conformation protéique peut entraîner une mauvaise accessibilité du sequon à l'OST et expliquerait les 10% non glycosylés. Les travaux de Bause (1983) ont d'ailleurs montré, que l'accessibilité de l'OST pour le sequon était maximale quand celui-ci s'organisait en coude β .

Ce processus de transfert, dit co-translationnel, s'opère durant la translocation de la protéine en cours de synthèse. Lorsque la séquence consensus émerge dans la lumière du RE et qu'elle se trouve entre 30-40 Å de la membrane du RE, l'OST peut alors la glycosyler (Nilsson *et al.*, 1993). Dans certains cas, il a également été montré que l'OST pouvait transférer un glycanne de façon post-translationnelle (Duvet *et al.*, 2001).

3.2.1.2 Composition du complexe de l'OST

L'oligosaccharyltransférase est un complexe protéique multimérique ancré dans la membrane du RE. Chez la levure, ce complexe est composé de 9 sous-unités transmembranaires, alors que chez les mammifères, seulement 5 sous-unités ont été décrites : OST48, les ribophorines I et II (RI et RII), la protéine Dad1 et Stt3p. Si on fait l'analogie avec les fonctions connues des différentes sous-unités chez la levure, OST48 reconnaîtrait le précurseur glycanne et catalyserait son transfert sur le tripeptide accepteur. Selon Makishima *et al.*, (1997), Dad1 serait à la fois impliquée dans l'apoptose et requise pour le processus de N-glycosylation. Quant à Stt3p, cette protéine serait elle aussi responsable de la réaction de transfert catalysée par l'OST.

3.2.1.3 Spécificité de l'oligosaccharyltransférase

Le transfert du précurseur oligosaccharidique par l'OST sur la protéine naissante en cours de synthèse, représente l'étape cruciale dans le processus de N-glycosylation et révèle un rôle clé, pour la séquence triglycosylée présente sur l'oligosaccharide précurseur. En effet, plusieurs études ont montré que la réaction de transfert par l'OST est beaucoup plus efficace quand le donneur oligosaccharidique est triglycosylé (Turco *et al.*, 1979 ; Karaoglu *et al.*, 2001). Cette spécificité est également vérifiée dans des pathologies touchant le processus de N-glycosylation. En effet, des patients déficients en Glc-P-Dol transférase vont synthétiser des glycoprotéines hypoglycosylées, suite au transfert inefficace du donneur oligosaccharidique tronqué du type Man₉GlcNAc₂-PP-Dol (Grunewald *et al.*, 1999).

3.3 Régulation du processus de N-glycosylation

Suite à la découverte des mécanismes intimes qui permettent la synthèse du précurseur glycanique et son transfert sur une protéine en cours de synthèse, le défi fut de comprendre, comment ces deux processus majeurs arrivaient à s'harmoniser.

3.3.1 Régulation du cycle de dolichols

3.3.1.1 Régulation par le taux de précurseur : notion de pool de Dol-P

Une des réactions clé dans la biosynthèse du précurseur glycanique mature est l'initiation du cycle des dolichols par le transfert de GlcNAc-1-P sur le Dol-P par la GlcNAc-1-P transférase (GPT). Plusieurs travaux ont montré, que la synthèse d'oligosaccharides, liés à un lipide (LLO), dépendait fortement du taux de Dol-P. En effet, la disponibilité du Dol-P aux enzymes du cycle des dolichols, telles que la Man-P-Dol

synthase, la Glc-P-Dol synthase et la GPT, dépend non seulement de sa synthèse, mais également de sa régénération par action d'une pyrophosphatase sur le pyrophosphodolichol lors de la dernière étape du cycle des dolichols. Récemment, la notion de régulation du cycle des dolichols par la concentration en Dol-P a été fortement suggérée par le groupe de Lehrman (Figure 6).

A l'état stationnaire, la majorité du pool de Dol-P disponible pour la synthèse de LLO est sous la forme $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$. En effet, Gao et Lehrman, (2002), ont estimé que la concentration en Dol-P libre était 20 fois inférieure à celle de $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$. Cela signifie donc, qu'en absence de synthèse protéique, l'initiation du cycle par la GPT est inhibée par manque de Dol-P disponible.

3.3.1.2 Régulation par les enzymes

Un autre moyen pour la cellule de contrôler la synthèse du précurseur glycanique est de réguler les enzymes impliquées dans sa synthèse (Figure 7).

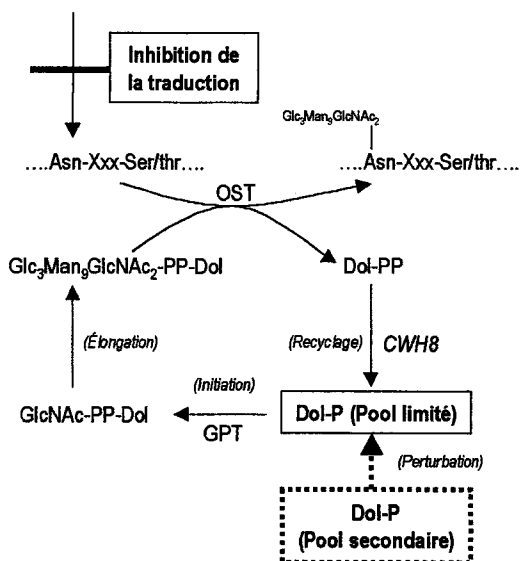


Figure 6 : Notion de pool de Dol-P: couplage entre l'initiation de la synthèse du $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ et l'arrêt de la traduction protéique (selon Gao et Lehrman, 2002).

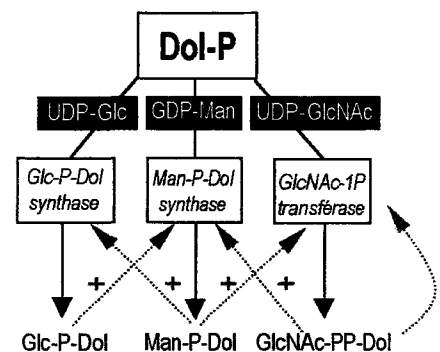


Figure 7 : Régulation des enzymes ayant accès au pool de Dol-P.

Trois enzymes sont soumises à régulation : la GPT, la Man-P-Dol synthase et la Glc-P-Dol synthase. Récemment, Kean *et al.*, (1999) ont montré *in vitro*, que la Man-P-Dol synthase et la Glc-P-Dol synthase étaient

chacune régulées positivement par le produit de l'autre. Ils ont également montré, que le produit de la GPT (GlcNAc-P-P-Dol) activait la Man-P-Dol synthase. Par contre, le GlcNAc-PP-Dol ainsi que le GlcNAc₂-PP-Dol, sont des inhibiteurs de la GPT.

3.3.1.3 Régulation par le taux d'accepteur protéique

Cela fait environ une dizaine d'années que les chercheurs essaient de répondre à la question : Y a-t-il une adaptation du cycle des dolichols aux besoins de la synthèse protéique ? La première constatation d'un tel couplage a débuté en observant que les inhibiteurs de synthèse protéique diminuaient fortement la synthèse de Glc₃Man₉GlcNAc₂-PP-Dol. Trois hypothèses ont été proposées pour tenter d'expliquer ce phénomène :

- ◆ l'hypothèse de Hubbard et Robbins (1980) : lorsque le Glc₃Man₉GlcNAc₂-PP-Dol n'est pas transféré, la régénération du Dol-P n'est plus possible ce qui entraîne un arrêt dans l'initiation du cycle des dolichols,

- ◆ l'hypothèse de Grant et Lennarz (1983) : un arrêt de la traduction provoquerait une augmentation cytoplasmique de GTP qui agirait comme inhibiteur de mannosyltransférases en particulier la Man-P-Dol synthase,

- ◆ l'hypothèse de Elbein (1990) : ce groupe suggère une rétroinhibition directe de la GPT par le donneur oligosaccharidique non utilisé.

Etant donné que les résultats de Lehrman ont montré que le pool de Dol-P était limitant, l'hypothèse la plus probable pour expliquer un couplage entre le cycle des dolichols et la synthèse protéique est celle de Hubbard et Robbins.

3.3.1.4 Régulation par le transfert sur l'eau du donneur oligosaccharidique Glc₃Man₉GlcNAc₂

Dès 1980, le groupe de R. Cacan ainsi que celui de G. Spiro ont montré que le processus de *N*-glycosylation s'accompagnait de la libération d'oligosaccharides solubles de type oligomannosidique dans la lumière du RE. Des études *in vitro* ont permis d'établir que cette libération d'oligosaccharides solubles était fortement diminuée en présence d'un large excès d'accepteur peptidique exogène, suggérant ainsi que l'OST était capable à la fois de catalyser le transfert en bloc de l'oligosaccharide sur un accepteur protéique mais également sur une molécule d'H₂O (Spiro et Spiro, 1991). Depuis, différentes études ont montré que cette libération d'oligosaccharides solubles était inversement proportionnelle au taux d'accepteur protéique (Kmiécik *et al.*, 1995). La fonction de cette double activité n'est toujours pas déterminée, mais la relation existante entre cette activité et le taux d'accepteur protéique, suggère un contrôle de l'ajustement du taux d'intermédiaires lipidiques par rapport à la disponibilité des protéines destinées à être glycosylées.

Au vu de ces résultats, la notion de pool de Dol-P limitant est beaucoup plus difficile à comprendre, étant donné, que ce transfert permettrait justement de régénérer un pool de Dol-P, même en absence de synthèse protéique.

D'après l'ensemble de ces données, on s'aperçoit que deux écoles s'affrontent concernant la régulation du cycle des dolichols. La première considère celui-ci comme statique et uniquement fonctionnel en présence de synthèse protéique, alors que la seconde suggère que ce cycle est dynamique, même en absence de synthèse protéique.

3.4. Pathologies liées à un déficit dans la synthèse du Glc₃Man₉GlcNAc₂-PP-Dol

Le rôle essentiel de la N-glycosylation dans la viabilité cellulaire a été démontré par des études sur des souris "knock out" pour certaines glycosyltransférases. Les travaux de Marek *et al.*, (1999) ont ainsi montré, qu'une délétion récessive dans le gène codant pour la GPT, donne un phénotype léthal. Des mutations dans les gènes impliqués dans le processus de N-glycosylation existent également chez l'être humain et causent des pathologies nommées CDG pour Congenital Disorders of N-glycosylation (Pour revue : Grunewald *et al.*, 2001 ; Freeze, 2002). Cette pathologie est divisée en deux groupes : le groupe I, incluant les gènes utilisés pour la biosynthèse et le transfert du Glc₃Man₉GlcNAc₂-PP-Dol, et le groupe II incluant tous les autres gènes impliqués dans la glycosylation une fois que le glycanne se trouve sur la protéine. Nous allons nous intéresser ici uniquement aux CDG de type I.

A l'heure actuelle, 10 cas de CDG de type 1 ont été identifiés (voir tableau 1). Quelle que soit la fonction du gène atteint, un changement structural du donneur oligosaccharidique est observé, se traduisant au niveau du phénotype, par l'apparition de transferrines hypoglycosylées dans la lumière du RE (Stibler et Hultcrantz, 1987). Actuellement, parmi tous les patients atteints de CDG, le CDG-Ib, déficient dans le gène de la phosphomannoisomérase (PMI), est le seul auquel on puisse remédier par un traitement consistant à lui administrer du mannose par voie orale.

Tableau 1: Les CDG de type I

Type	Enzyme	Fonction de l'enzyme	Gène muté
Ia	Phosphomannomutase	Man6P → Man1P	PMM2
Ib	Phosphomannose isomérase	Fru6P → Man6P	PMI
Ic	α1,3 Glucosyl transférase	M ₅ GN ₂ Dol → G ₁ M ₉ GN ₂ Dol	ALG6
Id	α1,3 Mannosyl transférase	M ₅ GN ₂ Dol → M ₆ GN ₂ Dol	ALG3
Ie	Man-P-Dol synthase	Dol-P → M-P-Dol	DPM1
If	Présentation du M-P-Dol et du G-P-Dol	Fonction inconnue	MPDU1
Ig	α1,2 Mannosyl transférase	M ₇ GN ₂ Dol → M ₈ GN ₂ Dol	ALG12
Ih	M ₁ GN ₂ -PP-Dol mannosyltransférase	M ₁ GN ₂ Dol → M ₂ GN ₂ Dol	ALG2
Ii	α1,3 Glucosyltransférase	G ₁ M ₉ GN ₂ Dol → G ₂ M ₉ GN ₂	ALG8
Ij	UDP-GlcNAc : dolichol phosphate N-acétylglucosamine -1 phosphate transférase	Dol-P → Dol-PP-GlcNAc	DPGAT 1

LE CONTROLE QUALITE DES N-GLYCOPROTEINES

Contrôle qualité des N-glycoprotéines

1. Introduction

Pour une cellule, la synthèse de protéines fonctionnelles requiert, à la fois l'intervention de la machinerie de transcription, de traduction, ainsi que celle de mise en conformation.

Afin de surveiller la fidélité de ces mécanismes et d'empêcher ainsi la dispersion de protéines mal conformées non fonctionnelles à travers la cellule, celle-ci a développé un système de contrôle qualité qui vérifie l'intégrité des protéines nouvellement synthétisées. Bien que le RE soit spécialisé dans la mise en conformation des glycoprotéines et des protéines de la voie de sécrétion, toutes n'adopteront pas forcément une conformation compatible avec la fonctionnalité de la molécule. Ces dernières, subiront alors un processus de rétro-translocation de la lumière du RE vers le cytoplasme afin d'être dégradées par la machinerie cytosolique du protéasome 26S. Ce processus de dégradation spécifique est nommé ERAD

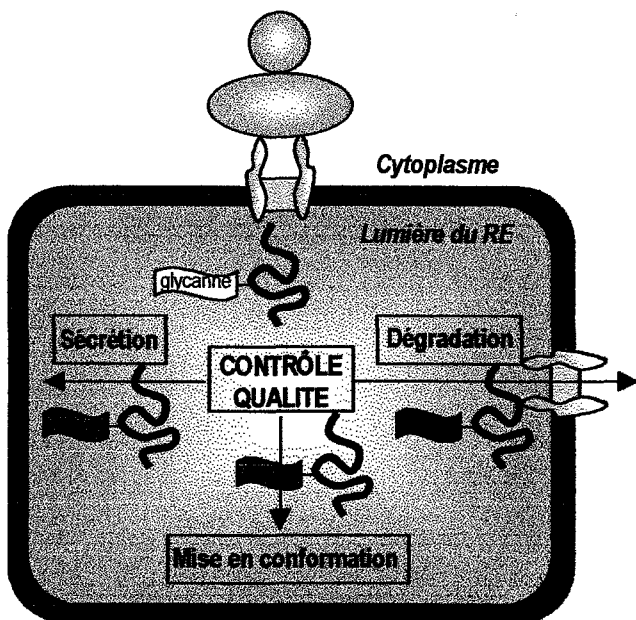


Figure 8: Destinée d'une N-glycoprotéine nouvellement synthétisée.

pour Endoplasmic Reticulum Associated Degradation. Nous verrons, au cours de ce chapitre, comment ce système de contrôle qualité utilisera astucieusement les glycanes des glycoprotéines afin de les diriger vers un système de mise en conformation, vers l'ERAD, ou, si ces dernières sont correctement conformées, vers la sécrétion (Figure 8).

2. Mise en conformation des N-glycoprotéines

2.1 Le RE : un compartiment impliqué dans le processus de mise en conformation

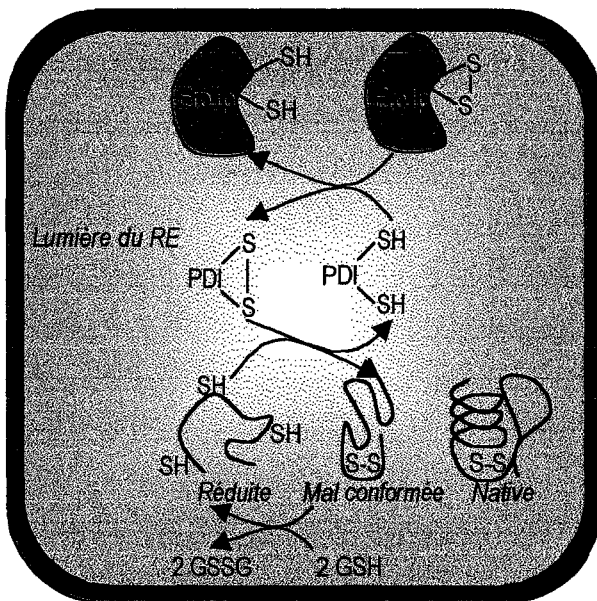
Le RE, à la différence du cytoplasme, procure aux protéines et aux glycoprotéines nouvellement synthétisées, un environnement cellulaire protégé. Les conditions oxydantes, ainsi que la forte concentration en Ca^{2+} , facilitent à la fois, la mise en conformation, l'oxydation, ainsi que l'oligomérisation des protéines synthétisées dans ce compartiment. Outre ces conditions spécifiques, le RE possède également de nombreuses protéines chaperonnes et enzymes, dont la fonction principale est d'assister le processus de repliement afin de réduire les risques d'agrégation.

2.1.1 Un environnement oxydant

La formation des ponts disulfures, requise pour la stabilité et la fonctionnalité de nombreuses protéines, requiert, d'une part un environnement oxydant, et d'autre part, l'intervention de protéines de repliement encore appelées foldases.

Comparée au cytoplasme, la lumière du RE possède un potentiel rédox suffisamment oxydant (potentiel rédox de $-150mV$ pour la lumière du RE contre $-230mV$ pour le cytoplasme) permet la formation spontanée de ponts disulfures. Cette différence de

potentiel rédox est générée par un rapport constant glutathion réduit/glutathion oxydé qui est de 60/1 dans le cytoplasme et de 3/1 dans le RE. Malgré ces conditions favorables, la formation de ponts disulfures aberrants n'est pas à exclure. Intervient alors une protéine nommée PDI (Protéine Disulfure Isomérase) qui permet, selon les conditions d'oxydo-réduction, de catalyser la réduction, l'isomérisation ou l'oxydation des ponts-disulfures (Freedman, Hirst et Tuite, 1994). En 1998, un autre acteur impliqué dans ce mécanisme d'oxydation apparaît avec l'identification chez la levure, de la protéine Ero1p (ER oxydoreductin 1). En effet, Pollard *et al.*, (1998) ont démontré, que l'environnement du RE devient particulièrement sensible au DTT lorsque cette protéine n'est plus fonctionnelle. Chez les mammifères, deux homologues de Ero1p ont été caractérisés : Ero1-L α et Ero1-L β . Concernant le rôle de Ero1p, celle-ci serait incapable d'oxyder directement les protéines mais permettrait via des interactions avec PDI, un contrôle "chirurgical" dans la formation des ponts disulfures (Fassio and Sitia, (2002) (Figure 9).



PDI: Protéine Disulfure Isomérase, GSH: Glutathion réduit
GSSG: Glutathion oxydé

Figure 9: Intervention de Ero1p et PDI dans la formation des ponts disulfures.

2.1.2 Les protéines chaperonnes

Outre la participation de ces enzymes dans le repliement correct des protéines nouvellement synthétisées, une autre classe de protéines, nommée protéines chaperonnes, assiste ce phénomène. Ces protéines, par un jeu d'interactions transitoires, stabilisent les structures protéiques partiellement repliées ou non, afin d'empêcher les interactions intra ou intermoléculaires, inappropriées durant la mise en conformation des protéines ou l'assemblage en oligomères. Pour ce faire, ces protéines chaperonnes interagissent avec les surfaces ou les séquences hydrophobes des protéines naissantes afin de les masquer.

2.1.2.1 BiP

BiP est la protéine chaperonne la plus abondante et la mieux caractérisée du RE. Cette protéine soluble appartient à la famille des Hsp 70 (Heat shock proteins) et représente environ 7% des protéines du RE. Identifiée comme liant de façon non covalente les chaînes lourdes des immunoglobulines (Haas et Wabl, 1983), elle est constituée de deux domaines : un domaine N-terminal qui possède un site de liaison à l'ATP, et un domaine C-terminal qui lui, possède un domaine de liaison au peptide. Comme les autres membres de la famille des HSPs, BiP possède à la fois une haute affinité pour l'ATP ainsi qu'une activité ATPasique basale stimulée lors de la liaison aux protéines (Munro et Pelham, 1986). D'une manière générale, la liaison et l'hydrolyse de l'ATP sont couplées respectivement avec la liaison et la libération de la protéine reconnue par BiP. L'hydrolyse de l'ATP permettrait une association plus étroite entre le complexe protéine chaperon-substrat, favorisant de ce

fait le repliement de la protéine immature (Hendrick et Hartl, 1995). Ce changement conformationnel permettrait ensuite la dissociation de ce complexe.

Outre le rôle majeur de BiP dans le contrôle de la mise en conformation des protéines nouvellement synthétisées, cette protéine chaperonne intervient également dans la rétention des protéines immatures au niveau du RE. Cette rétention aura plusieurs conséquences : d'une part, éviter que des protéines immatures ne s'engagent dans la voie de sécrétion, et d'autre part, augmenter le temps de mise en conformation. Nous verrons, dans la suite de ces généralités, que BiP intervient également dans la dégradation des glycoprotéines mal conformées ainsi que dans l'apparition d'une réponse cellulaire aux protéines mal conformées.

2.2 Rôle des glycannes dans la mise en conformation des N-glycoprotéines

2.2.1 Relation entre N-glycosylation et mise en conformation

Le transfert en bloc d'un glycanne sur une protéine en cours de synthèse est fondamental chez les eucaryotes, et l'une des fonctions majeures attribuée à ce processus, est d'intervenir dans la mise en conformation des protéines nouvellement synthétisées. En effet, l'emploi d'inhibiteurs de N-glycosylation comme la tunicamycine, provoque l'agrégation de nombreux modèles glycoprotéiques dans la lumière du RE (König *et al.*, 1988). Cependant, il faut noter que l'importance du glycanne dans la mise en conformation des glycoprotéines n'est pas un phénomène général et que pour une même glycoprotéine, certains glycannes auront plus d'importance que d'autres. En effet, des mutations dans certains sites spécifiques de

N-glycosylation peuvent altérer totalement la mise en conformation de la protéine (Branza-Nichita *et al.*, 2000). Ceci suggère donc, un rôle individuel des glycannes impliquant un effet local sur la mise en conformation de la protéine.

Il est clairement établi, que l'acquisition de glycannes augmente le caractère hydrophile de la protéine durant le processus de mise en conformation, réduisant ainsi la formation d'agrégats (Wang *et al.*, 1996). Cependant, cet effet ne permet pas d'expliquer en quoi le transfert de glycannes tronqués peut affecter la mise en conformation de certaines glycoprotéines (Ermonval *et al.*, 2000). Nous verrons, dans la suite de ces généralités, que les glycannes des glycoprotéines nouvellement synthétisées subissent dans la lumière du RE une maturation par des glycosidases réticulaires. Les structures oligosaccharidiques ainsi générées, permettront aux glycoprotéines d'interagir avec les acteurs du contrôle qualité impliqués dans la rétention, la mise en conformation, la dégradation, et la sécrétion des N-glycoprotéines.

2.2.2 Maturation des glycannes dans la lumière du RE

2.2.2.1 Glucosidase I et glucosidase II

Immédiatement après son transfert sur la protéine naissante, le $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (durée de vie de 2 min) est soumis à l'action d'une α -glucosidase I (protéine membranaire de type II résidente de la lumière du RE) qui retire de façon co-translationnelle le premier résidu de glucose lié en $\alpha 1,2$. Séquentiellement, après son action, la glucosidase II retire les deux autres résidus de glucose liés en $\alpha 1,3$ (Figure 10). Cette enzyme soluble résidente de la lumière du RE, est un hétérodimère composé de deux sous-unités : une sous-unité catalytique α , et une sous-unité β dont le rôle

reste à élucider. Alors que la présence de la sous-unité β est indispensable *in vivo* à l'activité de la glucosidase II, *in vitro*, la sous-unité α , seule, est parfaitement active (Trombetta *et al.*, 2001 ; Treml *et al.*, 2000). De tels résultats, suggèrent pour la sous-unité β , un rôle dans la régulation de l'activité de la sous-unité α . Concernant la spécificité de la glucosidase II, celle-ci dépend fortement de la structure de l'oligosaccharide monoglucosylé, et les travaux de Grinna et Robbins (1980) ont montré que, *in vitro*, l'activité relative sur des oligosaccharides libres était : $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc} > \text{Glc}_1\text{Man}_8\text{GlcNAc} > \text{Glc}_1\text{Man}_7\text{GlcNAc}$. Sur un oligosaccharide du type $\text{Glc}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}$, il a été montré que la glucosidase II n'était pas active. Ainsi, il semble, que les quatre résidus de Man liés sur la branche en $\alpha 1,6$, soient directement impliqués dans l'interaction avec l'enzyme : l'absence d'un seul résidu de Man réduit en effet son activité de 80%.

L'activité de ces deux glucosidases est inhibée par la 1-déoxynojirimycine et ses dérivés, ainsi que la castanospermine.

2.2.2.2 ER $\alpha 1,2$ -mannosidases

Dans la lumière du RE, différentes $\alpha 1,2$ -mannosidases vont intervenir au cours de la maturation des N-glycannes. Ces $\alpha 1,2$ -mannosidases, agissant de façon concomitante ou immédiatement après la libération des résidus de glucose, peuvent être classées en deux catégories, selon leur sensibilité différente aux inhibiteurs. Les mannosidases de classe I, sont des glycosidases de type "inverting" inhibées par des analogues de monosaccharides sous forme pyranose, alors que les mannosidases de classe II, sont des glycosidases dites "retaining" inhibées par des analogues des monosaccharides sous forme furanose (Pour revue : Daniel *et al.*, 1994 ; Herscovics, 2001).

A. Mannosidases de classe I

A.1 ER $\alpha 1,2$ -mannosidase I

Mise en évidence dans le foie de rat par Bischoff et Kornfeld (1983), cette mannosidase transmembranaire de type II, hydrolyse un résidu de

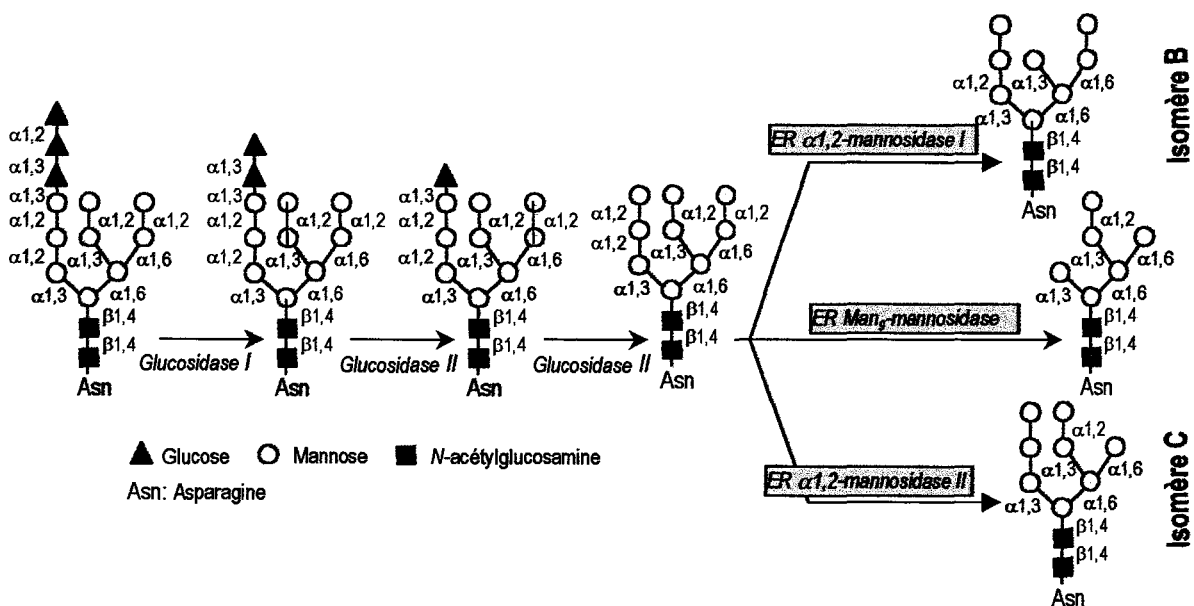


Figure 10: Représentation schématique de la maturation des glycannes dans la lumière du RE.

mannose lié en α 1,2, formant à partir du $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ l'isomère B de $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ (Figure 10). Son activité est inhibée par la déoxymannojirimycine et la kifunensine.

A.2 La Man_9 -mannosidase

Cette α 1,2-mannosidase, enzyme membranaire de type II, hydrolyse trois résidus de mannose liés en α 1,2 parmi les quatre que contient le précurseur glycanne $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, pour générer une structure oligomannosidique de type $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$.

B. Mannosidase de classe II

B.1 ER α 1,2-mannosidase II

Identifiée dans le foie de rat (Weng et Spiro, 1993), cette enzyme génère à partir du $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ un isomère particulier de $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ (isomère C), différent de celui produit par la ER mannosidase I. Cette mannosidase de classe II est inhibée par la swainsonine.

2.2.3 Le cycle calnexine-calréticuline

Lorsque les N-glycoprotéines sont mal conformées, il existe au sein du RE un système nommé cycle calnexine-calréticuline, faisant intervenir différentes chaperonnes et enzymes, visant à ramener les glycoprotéines mal conformées dans une conformation correcte. Nous allons voir, dans ce chapitre, par quel moyen, les glycannes des glycoprotéines mal conformées vont servir de signal pour entrer dans ce cycle de mise en conformation.

2.2.3.1 L'entrée dans le cycle

Pour une glycoprotéine mal conformée, l'entrée dans un cycle de mise en conformation, nécessite la présence, à sa surface, d'oligosaccharides monoglucosylés. Ces structures, peuvent être générées comme nous l'avons déjà vu, par l'action de la glucosidase II, mais également par l'action d'une glucosyltransférase nommée UGGT pour UDP-Glc : glycoprotéine glucosyltransférase. Cette enzyme soluble de la lumière du RE, requiert la présence indispensable de Ca^{2+} et utilise comme donneur l'UDP-Glc pour reglucosyler les glycannes des glycoprotéines totalement déglucosylées.

Des études *in vivo* et *in vitro*, ont montré que cette enzyme avait comme unique substrat les glycannes des glycoprotéines mal conformées (Trombetta *et al.*, 1989). De plus, seuls ceux situés dans des domaines partiellement conformés de la glycoprotéine sont reglucosylés (Trombetta et Helenius, 2000). Cette sélection, démontre en fait que l'UGGT est capable de discriminer les glycoprotéines mal conformées des glycoprotéines bien conformées. Une telle capacité lui vaut d'ailleurs la dénomination de "folding sensor".

Concernant la spécificité de reconnaissance de l'UGGT, des études *in vitro* ont montré que cette enzyme reconnaissait deux éléments dans le substrat accepteur : le résidu d'*N*-acétylglucosamine du point d'attache de l'oligosaccharide, et un domaine dénaturé composé d'acides aminés hydrophobes (Sousa et Parodi, 1995), ces deux éléments devant obligatoirement être attachés de façon covalente. Un tel pré-requis, évite ainsi que la mauvaise conformation de la glycoprotéine n'influence la glucosylation des autres glycoprotéines. L'UGGT n'est pas seulement spécifique du premier résidu de GlcNAc, mais également de la structure de l'oligosaccharide branché sur la



glycoprotéine. Les travaux de Sousa *et al.*, (1992) ont montré que les taux relatifs de reglucosylation du $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$, et $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ étaient respectivement de 100, 50 et 15. Ces structures monoglucosylées, ainsi générées, seront ensuite capturées par deux lectines de la lumière du RE : la calnexine (CNX) et la calréticuline (CRT).

2.2.3.2 La calnexine et la calréticuline

La calnexine et la calréticuline sont des lectines résidentes de la lumière du RE. La première est transmembranaire, la seconde soluble. Au niveau structural, ces deux lectines sont fortement identiques et composées de deux domaines : un domaine globulaire lectinique et un domaine P riche en proline. Le domaine lectinique permet de lier les structures oligosaccharidiques monoglucosylées de façon dépendante du Ca^{2+} ; alors que le domaine P interviendrait dans des interactions protéine-protéine, soit avec des substrats glycoprotéiques ou alors avec des membres de la famille des protéines disulfures isomérases tel que Erp57.

A. La CNX et la CRT lient spécifiquement les glycoprotéines monoglucosylées

La spécificité de reconnaissance de ces lectines a pu être mise en évidence grâce à l'emploi d'inhibiteurs de la maturation ou de la synthèse du glycanne. Ainsi, un traitement à la castanospermine ou à la tunicamycine inhibe fortement l'interaction CNX/CRT-glycoprotéine (Hammond *et al.*, 1995). D'autres études *in vitro*, à partir de CNX et CRT purifiées et immobilisées, ont montré, qu'en présence d'un mélange de glycannes tri, di, mono voire non glucosylés, ces lectines interagissaient uniquement

avec les oligosaccharides monoglucosylés. Concernant l'affinité vis à vis de différentes espèces oligosaccharidiques monoglucosylées, Vassilakos et collaborateurs ont mis en évidence, par délétions successives des résidus de mannose du core oligosaccharidique, l'importance du résidu de mannose branché en $\alpha 1,6$ dans cette reconnaissance. En effet, si celui-ci est retiré, plus aucune affinité n'est observée. L'affinité de ces deux lectines est donc maximale pour le $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ et diminue de façon graduelle lorsqu'on enlève séquentiellement des résidus de mannose (Ware *et al.*, 1995). Ainsi, la plus petite structure qui pourrait s'associer à la CNX et à la CRT devrait être le $\text{Glc}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ (Figure 11).

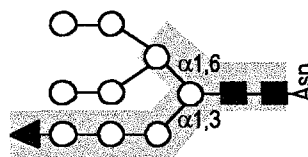


Figure 11: Spécificité de reconnaissance de la calnexine et de la calréticuline d'après (Ware *et al.*, 1995). La structure entourée en vert est indispensable à la spécificité d'interaction.

Alors que ces lectines reconnaissent le même déterminant oligosaccharidique, elles interagissent néanmoins avec des glycoprotéines différentes. Les travaux de Van Leeuwen et Kearsse (1996) ont en effet montré, que la CNX et la CRT interagissaient chacune avec des sous-unités différentes de CD3. Cette sélectivité, résulte essentiellement dans la localisation différente de ces lectines. Si on ajoute une séquence d'adressage à la CRT, celle-ci sélectionnera alors les mêmes substrats que la CNX (Danilczyk *et al.*, 2000).

B. Interactions de type protéine-protéine

Outre l'interaction glycanne-lectine, de nombreuses études tendent actuellement à prouver que des interactions protéine-protéine, indépendantes de la structure glycanne monoglucosylée, peuvent également exister entre la CNX/CRT et les glycoprotéines mal conformées. Ainsi, les travaux de Ware *et al.*, (1995) révélaient déjà la présence d'interactions protéine-protéine indépendantes du glycanne, puisque sous forme déglycosylée, l'association de l' α 1-antitrypsine avec la CNX est maintenue. De façon séquentielle, les glycoprotéines mal conformées interagiraient avec la CNX/CRT par l'intermédiaire des glycannes monoglucosylés au niveau de leur domaine lectinique, mais également, par des interactions protéine-protéine au niveau d'un domaine particulier, appelé site de liaison du polypeptide. Dans ce modèle, ce domaine aurait la fonction de molécule chaperonne et permettrait d'empêcher l'agrégation de substrats mal conformés. Cette nouvelle fonction, attribuée à la CNX et à la CRT, est supportée par des études *in vitro*, démontrant que ces lectines peuvent, non seulement discriminer des protéines dans des états de conformation différents, mais également supprimer l'agrégation de protéines mal conformées (Ihara *et al.*, 1999, Stronge *et al.*, 2001).

C. Coopération avec l'ERp57

L'ERp57 est une protéine soluble de la lumière du RE appartenant à la famille des protéines disulfures isomérasases (PDI). Concernant sa localisation, des expériences de "cross-linking" ont montré, que cette enzyme est retrouvée associée à la CNX et à la CRT. Récemment, Frickel *et al.*, (2002) ont d'ailleurs

démonstré que ERp57 interagissait avec l'extrémité du domaine P de la CNX et de la CRT. Cette interaction, fournit ainsi comme substrat à l'ERp57, les glycoprotéines monoglucosylées associées à la CNX ou à la CRT. Contrairement à PDI, ERp57 aurait donc pour unique substrat des N-glycoprotéines (Olivier *et al.*, 1997).

Dans le chapitre suivant, nous verrons comment les différents acteurs décrits ci-dessus, vont agir de concert, afin de permettre la remise en conformation des N-glycoprotéines néosynthétisées mal conformées.

2.2.3.3 Dynamique du cycle calnexine-calréticuline

Ce modèle, proposé initialement par Hammond et Helenius, (1995) pour expliquer le processus de mise en conformation des N-glycoprotéines mal conformées, apparaît essentiel *in vivo*. En effet, l'expérience de Mesaeli *et al.*, (1999) sur des souris transgéniques dépourvues de calréticuline, montre que celles-ci meurent au bout de 18 jours. De même, le fait d'empêcher l'interaction des glycoprotéines avec la CNX/CRT, conduit rapidement à une augmentation de glycoprotéines mal conformées au niveau de la lumière du RE. Les étapes de ce cycle sont résumées dans la figure 12.

Les glycoprotéines néosynthétisées ou en cours de synthèse, subissent séquentiellement l'action de la glucosidase I et l'action partielle de la glucosidase II. La glycoprotéine immature, exposant alors des glycannes monoglucosylés est reconnue spécifiquement par la calnexine ou la calréticuline. Cette interaction peut se faire de façon co-translationnelle (Molinari et Helenius, 2000). Une fois associée, la glycoprotéine mal conformée devient le substrat de l'ERp57 qui catalyse

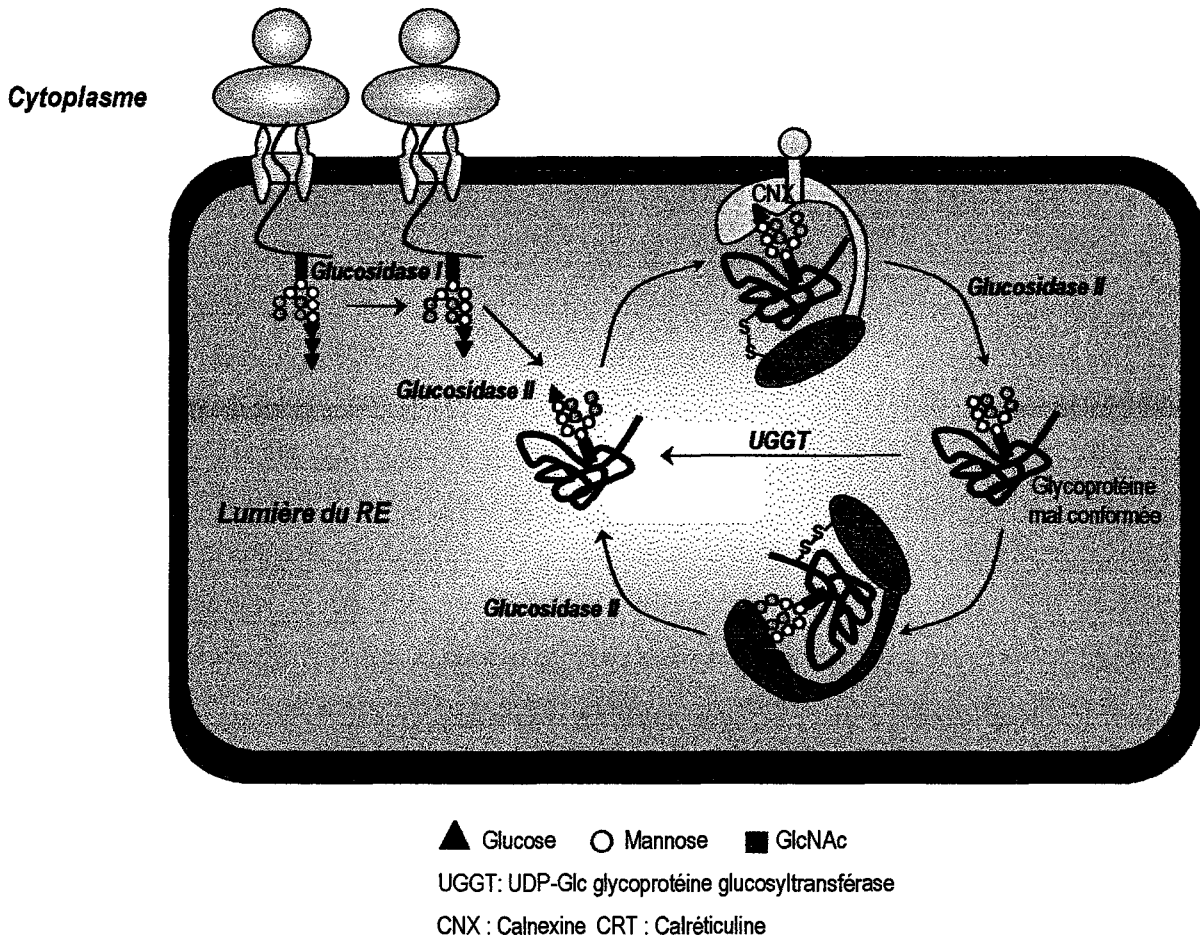


Figure 12: Cycle calnexine-calréticuline (d'après Hammond et Helenius (1995)).

alors la formation de ponts disulfures. La dissociation des complexes calnexine/calréticuline-glycoprotéine est ensuite induite par la glucosidase II qui retire le résidu de Glc du glycanne monoglucosylé. Cependant, cette étape ne peut se faire que si le glycanne monoglucosylé est dissocié de la calnexine ou de la calréticuline. Les travaux de Patil *et al.*, (2000) ont montré que la calnexine ainsi que la calréticuline avaient une faible affinité, mais une forte spécificité pour les glycannes monoglucosylés, favorisant de ce fait, une dissociation spontanée. A ce stade, suivant l'état conformationnel que la glycoprotéine aura atteint, deux possibilités sont envisageables :

- ◆ la glycoprotéine libérée possède sa conformation définitive et celle-ci pourra s'engager dans la voie de la sécrétion,

- ◆ la glycoprotéine, malgré ce cycle de mise en conformation reste mal conformée, les zones hydrophobes de cette dernière seront reconnues par l'UGGT, et la formation d'un nouveau signal permettra à la glycoprotéine de s'engager à nouveau dans le cycle.

Ainsi, une glycoprotéine mal conformée pourra subir plusieurs cycles de mise en conformation. Cependant, il est évident que le nombre de cycles qu'une glycoprotéine puisse subir est limité. Le mécanisme par lequel le recyclage prend fin est hypothétique et basé sur la différence d'affinité de l'UGGT pour des structures glycaniques démannosylées. En effet, au cours de plusieurs cycles, les glycannes des glycoprotéines mal conformées subissent l'action des mannosidases pour former des

structures partiellement démannosylées de type $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ et $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$. Etant donné, que l'affinité de l'UGGT pour ces structures est faible, les glycoprotéines mal conformées portant ces structures n'ont plus la possibilité d'entrer dans un nouveau cycle de mise en conformation.

3. Dégradation des N-glycoprotéines néosynthétisées

Afin d'éviter que des glycoprotéines mal conformées n'engorgent la lumière du RE, la cellule a développé deux voies principales de dégradation: la voie lysosomique *via* l'autophagie et la voie cytosolique associée au RE nommée ERAD (ERAD: ER-Associated Protein Degradation). Cette dernière implique trois étapes fondamentales: (1) la reconnaissance des glycoprotéines mal conformées à dégrader, (2) l'exportation vers une machinerie de dégradation, et pour finir, (3) la dégradation de ces glycoprotéines par le protéasome.

3.1 La voie autophagique

L'autophagie, se traduit par la formation progressive d'une vacuole intracellulaire en véritable organe de digestion (Ogier-Denis et Codogno, 2003). La formation des vacuoles digestives s'effectue en deux étapes:

- ◆ elle commence par la séquestration d'une région cytoplasmique par invagination des membranes d'un compartiment qui pourrait être le RER. 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. De ce fait, la vacuole s'acidifie progressivement.

Cette voie de dégradation non sélective s'effectue également pour les glycoprotéines néosynthétisées mais, uniquement, lorsque celles-ci sont non glucosylées. En effet, Ogier-denis *et al.*, (2000) ont montré, que la persistance des résidus de glucose sur des glycannes de glycoprotéines inhibaient sélectivement la séquestration des glycoprotéines par la voie autophagique. Les différentes étapes de la formation de la vacuole digestive peuvent être inhibées par la 3-méthyladénine, qui empêche l'étape de séquestration (Seglen et Gordon, 1982). Concernant la fusion de la vacuole avec les lysosomes, celle-ci peut être inhibée par 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.

3.2 La voie ERAD

Dans la lumière du RE, chaque glycoprotéine néosynthétisée adoptera une conformation différente. Comment, parmi tant de diversité conformationnelle, la cellule arrive-t-elle à orienter vers la voie de dégradation, uniquement les glycoprotéines mal conformées ?

3.2.1 Voie de dégradation dépendante de la formation d'une structure glycanique et du protéasome

De nombreuses données font apparaître l'implication d'une structure glycanique dans ce mécanisme de sélection. En effet, aussi bien chez la levure que chez les mammifères, l'emploi d'inhibiteurs de ER-mannosidase I tels que la kifunensine ou la 1-déoxymannojirimycine, bloque la dégradation

dépendante du protéasome de plusieurs modèles glycoprotéiques comme la chaîne lourde du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (Wislon *et al.*, 2000), une forme tronquée de la ribophorine I (De Virgilio *et al.*, 1999), et la sous-unité CD3L du récepteur des cellules T (Yang *et al.*, 1998). Ces résultats suggèrent donc fortement que la dégradation de ces modèles, est non seulement glycanne dépendant, mais implique également une étape de démannosylation (Figure 13, modèle 1).

Dans cette voie de dégradation, il semble que la calnexine joue un rôle important. Cependant, selon les modèles étudiés, nous verrons que son rôle reste sujet à controverses. Ainsi, dans certains cas, la calnexine joue un rôle protecteur vis à vis de la dégradation (cas des glycoprotéines citées ci-dessus), alors que pour d'autres, elle y participe activement en les séquestrant sous la forme $\text{Glc}_1\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$. Les travaux de Liu *et al.*, (1999) montrent ainsi que sous cette forme, la dégradation de l' α 1-antitrypsine liée à la calnexine est accélérée. En effet, comme le nombre de résidus de mannose sur la chaîne oligosaccharidique affecte l'efficacité de la glucosidase II, la dissociation du complexe CNX-glycoprotéine sous la forme $\text{Glc}_1\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ est retardée, l'interaction avec la CNX est alors prolongée et finit par se traduire par une dégradation. Cependant, dans ce cas, il semblerait que ce soit l'ensemble CNX-glycoprotéine mal conformée qui soit dégradé. Les travaux de Qu *et al.*, (1996) ont conforté ce modèle, en montrant qu'une forme mal conformée de l' α 1-antitrypsine interagissait avec la calnexine, ce qui aurait pour conséquence d'induire la polyubiquitination de la partie cytoplasmique de cette lectine (Figure 13 modèle 2). Il faut cependant signaler que pour certaines glycoprotéines, la dégradation mannosidase dépendante n'implique pas la CNX (Wang et White, 2000 ; Tokunaga *et al.*, 2000).

Quant à la structure glycanne précise impliquée dans la dégradation de ces différents modèles glycoprotéiques, il semblerait que ce soit la structure $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ isomère B générée par la ER-mannosidase I. Cette structure spécifique, identifiée respectivement chez la levure et chez les mammifères, est nécessaire pour la dégradation protéasome dépendante de la carboxypeptidase Y et de la ribophorine I tronquée (Jakob *et al.*, 1998, Kitzmüller *et al.*, 2003). Cependant, certains modèles glycoprotéiques impliquent également une étape de démannosylation sans pour autant nécessiter l'apparition de cette structure : récemment, le groupe de Lederkremer a démontré que pour être dégradée, la sous-unité H2a du récepteur des asialoglycoprotéines devait subir une étape de démannosylation, conduisant à l'apparition de structures glycanne de type $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ et $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ (Frenkel *et al.*, 2003) (Figure 13, modèle 3). C'est également le cas de la ribophorine I tronquée, exprimée dans une lignée CHO mutante de glycosylation qui ne transfère sur les glycoprotéines en cours de synthèse, uniquement une structure glycanne de type $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$. Lorsque l'étape de démannosylation, qui conduit à la structure glycanne de type $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$ est inhibée par la kifunensine, la ribophorine I tronquée n'est alors plus dégradée (Figure 13, modèle 4). Il est intéressant de noter que dans ces deux systèmes, le résidu de mannose accepteur du glucose transféré par l'UGGT est absent dans les structures générées. Ce mécanisme, servirait ainsi à extirper, après plusieurs cycles de mise en conformation, les glycoprotéines qui demeurent toujours mal conformées. L'étape de démannosylation jouerait alors, dans ce cas bien précis, le rôle de "timer" dans la dégradation des glycoprotéines mal conformées (Helenius *et al.*, 1994).

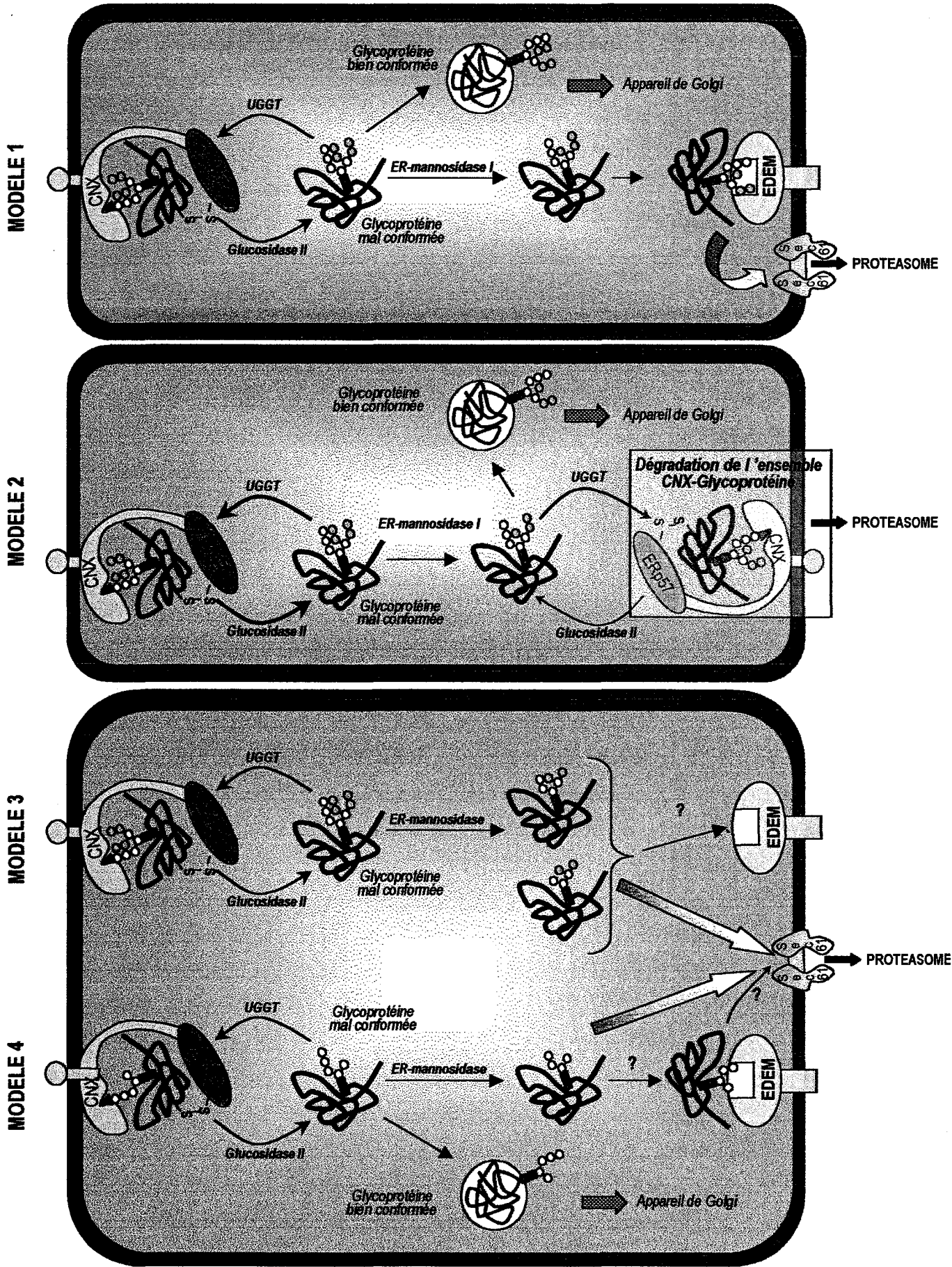


Figure 13: Modèles proposés permettant d'expliquer l'implication des glycanes dans l'adressage des glycoprotéines mal conformées vers le protéasome.

3.2.2 Voie de dégradation indépendante de la formation d'une structure glycanne et dépendante du protéasome

La dégradation de certains modèles glycoprotéiques ne semble pas affectée par l'utilisation des inhibiteurs de ER mannosidase-I, suggérant une dégradation indépendante de la structure du glycanne (Fagioli et Sitia, 2001 ; Cabral *et al.*, 2000). Confortant ces résultats, les travaux de Cacan et collaborateurs ont montré que la structure des oligosaccharides solubles libérés lors du processus de dégradation était strictement fidèle à celle retrouvée sur les glycoprotéines (Villers *et al.*, 1994, Duvet *et al.*, 1998). Cette voie de dégradation des glycoprotéines nouvellement synthétisées, indépendante de l'apparition d'un signal de dégradation glycanne, a été montrée dépendante de l'activité du protéasome. En effet, l'emploi d'inhibiteurs du protéasome diminue le taux d'oligosaccharides cytoplasmiques (Karaivanova et Spiro, 2000).

3.2.3 Voie de dégradation dépendante de la formation d'une structure glycanne et indépendante du protéasome

Alors que la majorité des glycoprotéines mal conformées sont dégradées par le protéasome, certains modèles glycoprotéiques le sont par une voie indépendante du protéasome. Cette voie, considérée comme alternative à l'ERAD classique a été proposée par plusieurs équipes. Récemment, le groupe de M. Aebi a mis en évidence que la dégradation de la carboxypeptidase Y dans les cellules CHO, était indépendante du protéasome et du lysosome, mais affectée par l'emploi d'inhibiteurs de la ER-mannosidase I (Mancini *et al.*, 2003). Siffers et

collaborateurs ont également démontré que selon l'allèle, la forme mal conformée de l' α 1-antitrypsine pouvait être dégradée selon deux voies différentes : le mutant nul Hong Kong est dégradé par le protéasome, alors que le mutant α 1-PIZ est dégradé par une voie indépendante du protéasome, inhibée par des inhibiteurs de tyrosine phosphatase. Là également, la structure de glycanne semble importante, puisque pour entrer dans cette voie, le mutant α 1-PIZ doit subir une étape de démannosylation par la ER-mannosidase II conduisant à la structure glycanne $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ (Cabral *et al.*, 2000).

La thyroperoxidase humaine est un autre exemple qui vient conforter l'existence d'une nouvelle voie de dégradation, puisque celle-ci est dégradée selon deux voies : une sensible aux inhibiteurs du protéasome, et l'autre aux inhibiteurs de cystéine/sérine protéases (Fayadat *et al.*, 2000).

Etant donné l'ensemble de ces résultats, le processus impliqué dans la dégradation des glycoprotéines mal conformées semble difficile à généraliser, tant ce mécanisme apparaît complexe et multiparamétrique. Cependant, dans la plupart des modèles étudiés, il apparaît que l'étape de démannosylation est un pré-requis indispensable pour l'ERAD.

3.3 EDEM : un intermédiaire dans la voie de dégradation des glycoprotéines mal conformées

Etant donné que la structure $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ isomère B semble impliquée activement dans l'ERAD des glycoprotéines mal conformées, la présence d'une lectine liant cette structure spécifique et qui adresserait les glycoprotéines mal conformées vers la dégradation est fortement pressentie (Jakob *et al.*, 1998).

Cependant, ce n'est que très récemment, qu'une telle lectine candidate, spécifique du Man₈GlcNAc₂ isomère B a été découverte. Celle-ci, nommée Mnl1p ou Htm1p chez la levure (Hosokawa *et al.*, 2001 ; Jakob *et al.*, 2001), et EDEM (ER Degradation Enhancing α -Mannosidase like protein) chez les mammifères (Nakatsukasa *et al.*, 2001), est homologue à la ER-mannosidase I, mais dépourvue de son activité enzymatique. Une telle implication de cette lectine dans l'ERAD des glycoprotéines a été démontrée chez la levure, par l'utilisation de souches déficientes en Mnl1p ou Htm1p, où la dégradation de la carboxypeptidase Y est fortement diminuée. Chez les mammifères, il a été montré que la surexpression de EDEM accélère l'ERAD du mutant nul Hong Kong de l' α 1-antitrypsine. L'hypothèse avancée est que cette lectine membranaire, interagissant avec la calnexine, favoriserait la libération des glycoprotéines destinées à la dégradation de la calnexine (Molinari *et al.*, 2003).

3.4 Retrotranslocation

Depuis longtemps, on sait que l'emploi d'inhibiteurs du protéasome empêche la dégradation de certaines glycoprotéines mal conformées localisées dans la lumière du RE (Jensen *et al.*, 1995 ; Ward *et al.*, 1995). Ces observations fournissent la preuve de l'implication du protéasome dans la dégradation des glycoprotéines retenues dans la lumière du RE, mais d'un point de vue topographique, pose un problème, puisque les protéines de la machinerie ubiquitine-protéasome sont cytosoliques. Ce sont les travaux de Wiertz *et al.*, 1996 qui ont montré que le passage de la glycoprotéine mal conformée de la lumière du RE vers son lieu de dégradation était réalisé par le complexe du translocon. En effet, ces auteurs ont montré que sous l'influence du gène US2 du cytomégalo virus, la chaîne

lourde du CMH I se retrouve transitoirement associée à la protéine Sec61 β , avant d'être dégradée dans le cytosol par le protéasome. Une deuxième étude, chez la levure, portant sur l'identification de mutations dans le complexe Sec61, confirma le rôle potentiel de ce complexe dans l'exportation des protéines luminales vers le cytoplasme (Pilon *et al.*, 1997). Dans ces mutants, la dégradation de plusieurs substrats réticulaires est retardée ou empêchée.

3.4.1 Les protéines facilitant le rétrotransport des glycoprotéines

Afin d'assurer une translocation unidirectionnelle, la rétrotranslocation des glycoprotéines de la lumière du RE vers le cytoplasme requiert l'action synergique de protéines à la fois cytosoliques et luminales (Figure 14).

3.4.1.1 Les protéines luminales

De toute évidence, la découverte de EDEM, située à proximité de la calnexine, semble représenter un candidat idéal pour amener les glycoprotéines mal conformées vers le complexe Sec61. En plus de cette lectine, d'autres protéines chaperonnes vont également participer activement à l'adressage des glycoprotéines mal conformées vers le complexe Sec61. Chez la levure, l'implication de Kar2p (BiP) dans ce processus est fortement suggérée (Brodski *et al.*, 1999 ; Knittler *et al.*, 1995), mais son rôle précis n'est pas encore élucidé. Elle aurait pour fonction potentielle de maintenir solubles les glycoprotéines mal conformées dans une conformation compétente pour l'exportation, mais également, d'agir comme un récepteur impliqué dans le trafic des glycoprotéines à travers le translocon. Impliquée dans ce phénomène, une autre protéine, la

PDI, a été montrée par Gillece *et al.*, (1999), comme étant nécessaire à la dégradation du prepro facteur α dont les sites de glycosylation ont été mutés. En effet, cette dernière permettrait de maintenir les protéines sous une forme réduite compétente pour la translocation.

3.4.1.2 Les protéines cytoplasmiques

Les travaux de Fisher *et al.*, 1997 ont montré l'implication d'une protéine chaperonne cytosolique Hsp70 dans la dégradation de l'apoplipoprotéine B100 (Apo B100). Fortement associée à l'Apo B100, la surexpression de Hsp70 accélère la dégradation de cette glycoprotéine. De façon récente, l'intervention de la polyubiquitination dans le phénomène de

rétrotranslocation est de plus en plus suggérée (Shamu *et al.*, 2001). Ainsi, les découvertes de Cdc48 chez la levure et p97 chez les mammifères, membres de la famille des AAA-ATPases, impliquées dans l'extraction de protéines de la membrane du RE, confortent cette hypothèse (Rabinovitch *et al.*, 2001). Chez la levure, ces AAA-ATPases forment un complexe au niveau de la membrane du RE avec deux autres protéines (Ufd1 et Npl4), ce qui permet de libérer les protéines mal conformées et polyubiquitinées de la membrane du RE. Ce complexe, en liant également l'ubiquitine et le protéasome, permettrait de faire la jonction entre la rétrotranslocation de la protéine et la machinerie de dégradation.

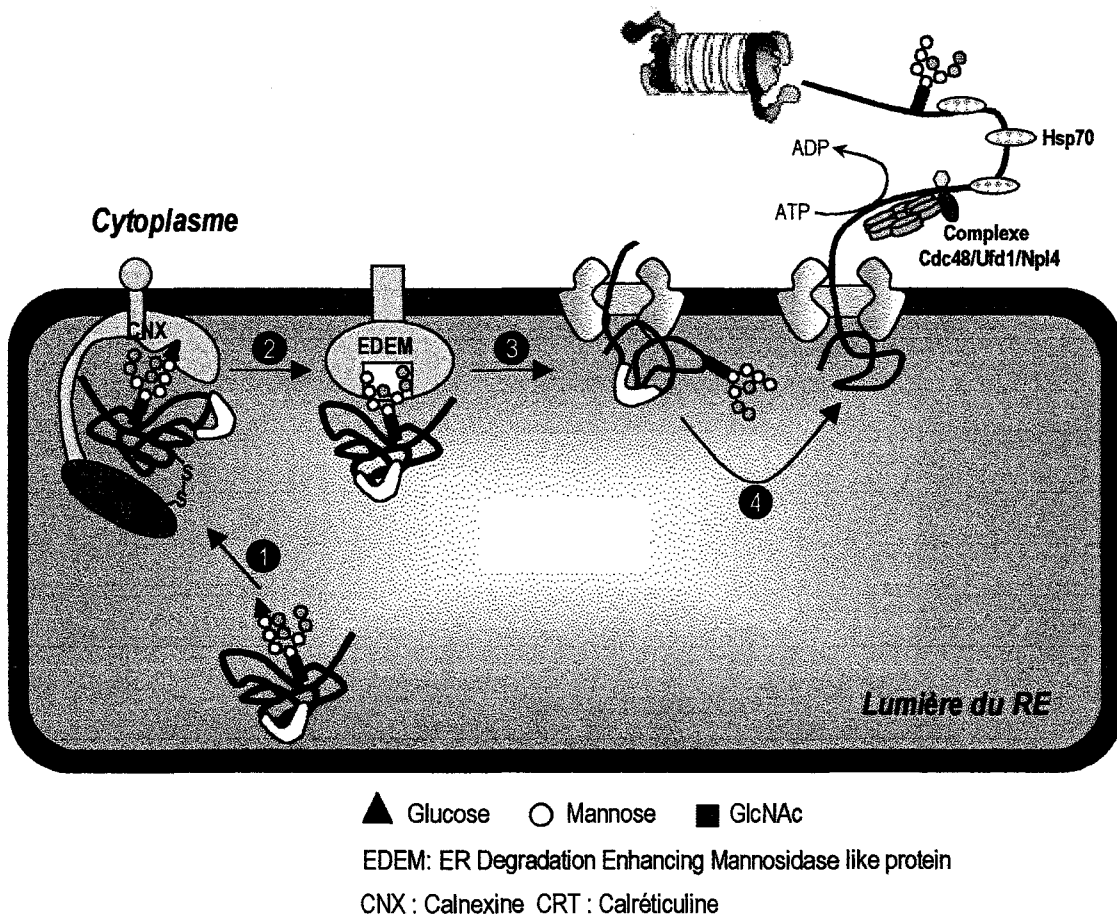


Figure 14: Modèle de rétrotranslocation des glycoprotéines destinées à l'ERAD à travers le complexe du translocon.

3.5 Ubiquitination des N-glycoprotéines

Chez les eucaryotes, la capacité à dégrader les protéines est une fonction essentielle. Au delà de ses rôles biologiques connus depuis longtemps, comme la dégradation de protéines surnuméraires et la formation de peptides antigéniques, ce processus est également impliqué dans la prolifération cellulaire, la régulation du cycle cellulaire et l'apoptose. Cette protéolyse intracellulaire dépend d'un système multi-enzymatique, nommé le système ubiquitine-protéasome. De façon extrêmement simplifiée, la modification covalente des protéines destinées à être dégradées par l'ubiquitine constitue un signal conduisant à l'adressage, la reconnaissance et la destruction de ces protéines par le protéasome. Ce système intervient dans la dégradation de nombreux substrats protéiques, mais également dans la dégradation de glycoprotéines modèles

(Plempner et Wolf, 1999).

3.5.1 Les acteurs

L'ubiquitine est une petite protéine très conservée de 76 acides aminés, exprimée dans toutes les cellules eucaryotes. L'ubiquitination des protéines requiert une cascade multi-enzymatique qui implique au moins trois types distincts d'enzymes : une enzyme d'activation E1 (ubiquitin-activating enzyme), une enzyme de conjugaison E2 (ubiquitin-conjugating enzymes ou Ubc), et une ligase E3 (ubiquitin-protein ligase). E1 a pour fonction majeure d'activer l'ubiquitine de façon dépendante de l'ATP, en catalysant la formation d'une liaison thioester entre E1 et une molécule d'ubiquitine. De façon séquentielle, l'ubiquitine est ensuite transférée de E1 à E2 puis de E2 à E3. Pour terminer, E3 catalyse l'étape finale en formant une liaison

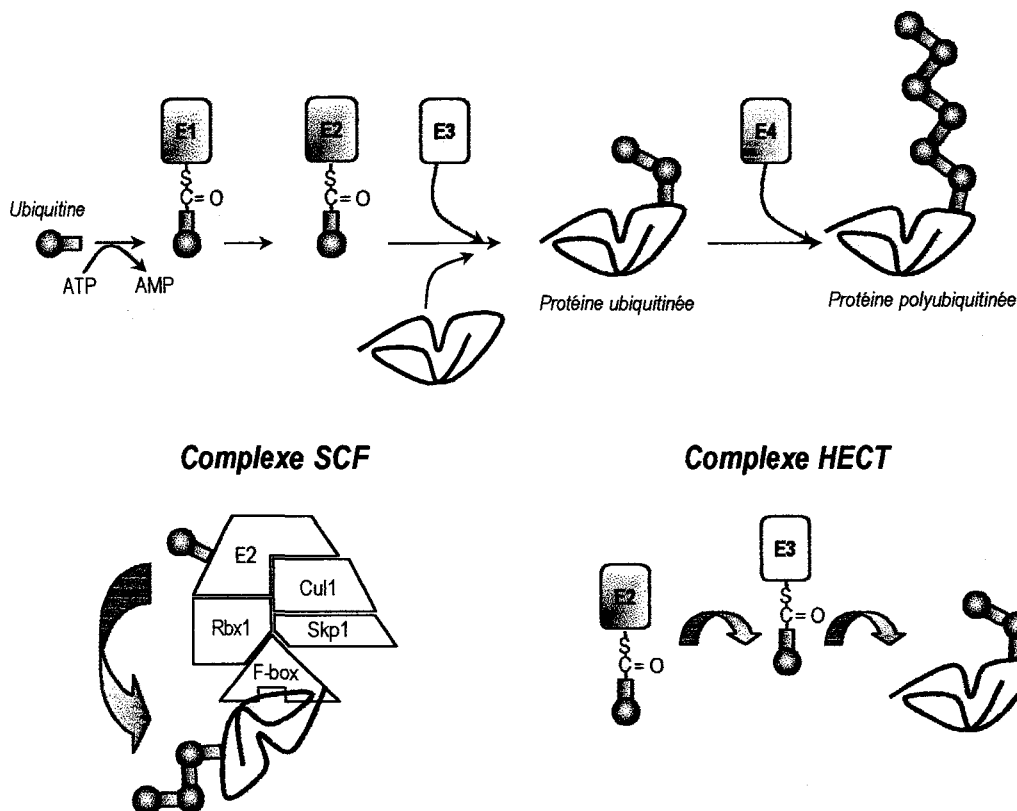


Figure 15 : Ubiquitination des protéines et les complexes ligases E3.

covalente entre le COOH terminal d'un résidu de glycine de l'ubiquitine et un groupement ϵ -aminé d'une lysine d'une protéine cible préalablement reconnue par E3 (Figure 15). Dans certains cas, une protéine n'est dégradée que si plusieurs molécules d'ubiquitine sont liées les unes aux autres. L'allongement des chaînes d'ubiquitine, également appelé polyubiquitination, serait réalisé par un dernier type de protéine nommée Udf2 chez la levure. Ce nouveau type d'enzyme d'ubiquitination désignée E4 est requis avec E1, E2 et E3 pour la polyubiquitination de la β -galactosidase (Koeg *et al.*, 1999). Si l'on considère la multitude de protéines sujettes à l'ubiquitination, on comprend rapidement les effets sévères que pourrait entraîner une reconnaissance aberrante de substrats. Pour s'affranchir d'un tel risque, on observe une spécificité de reconnaissance des substrats par E3, qui constitue en fait une famille de complexes protéiques permettant la reconnaissance de substrats spécifiques. Les protéines E3 sont classées en deux grandes catégories : celles qui forment une liaison thioester avec l'ubiquitine avant d'assurer le transfert de cette dernière sur le substrat (famille HECT), et celles qui facilitent le transfert de l'ubiquitine sur le substrat à partir de E2 (famille dite à Ring finger). Cette dernière catégorie de E3, qui permet de rapprocher l'enzyme E2 du substrat, comprend trois types de complexes (SCF, CBC et APC/C). Nous nous limiterons ici aux complexes SCF (Figure 15). Ces complexes sont composés de quatre protéines, Skp1, la culline/cdc53, Rbx1/Roc1/Hrt1, et une protéine adaptatrice faisant partie de la famille des F-box protéines. Ces protéines reconnaissent d'un côté les substrats à dégrader, et de l'autre, grâce aux boîtes F qui se lient à Skp1, le complexe composé des trois autres protéines. Le nombre de ces protéines est en constante évolution et la majorité de leurs fonctions reste inconnue. Ceci

suggère l'extraordinaire diversité des complexes SCF, certainement responsables de la dégradation d'un grand nombre de protéines.

3.5.2 Complexe SCF et dégradation des glycoprotéines mal conformées

Récemment, le groupe de Tanaka vient de trouver le lien manquant entre la glycosylation et l'ubiquitination. En effet, l'ubiquitination des glycoprotéines mal conformées par un complexe SCF liant spécifiquement les glycanes de type oligomannosidique a été identifiée. Deux protéines sont responsables de cette reconnaissance : Fbx2 (Fbs1), exprimée uniquement dans le cerveau et les testicules

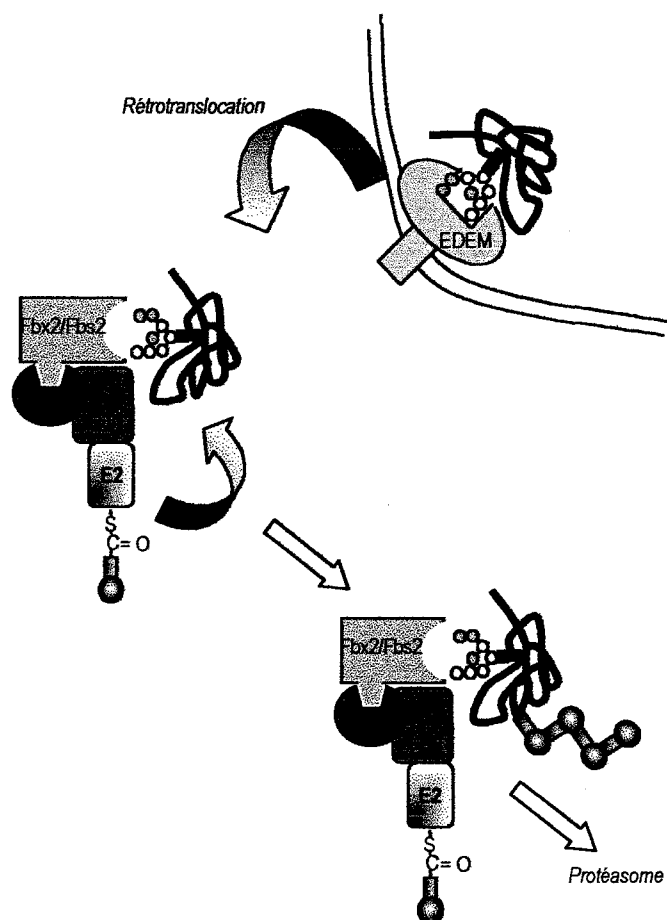


Figure 16: Modèle d'interaction entre le complexe ubiquitine ligase E3 ($SCF^{Fbx2/Fbs2}$) et les glycoprotéines mal conformées rétrotransloquées (d'après Lord et Frigerio, 2002).

et Fbs2 exprimée dans tous les tissus. Ces protéines faisant partie de la famille des F-box protéines, forment un complexe avec Skp1, Cul1 et Roc1 pour former respectivement le complexe SCF^{Fbx2} et SCF^{Fbs2} (Figure 16). L'affinité de ces complexes pour les glycoprotéines est strictement dépendante de la structure des glycanes associés à ces dernières, étant donné, que ces complexes reconnaissent uniquement des glycanes oligomannosidiques de type Man₃₋₉GlcNAc₂ (Yoshida *et al.*, 2003). En effet, des substitutions des résidus de mannose par d'autres sucres réduisent fortement l'affinité de ces complexes pour les glycoprotéines.

Ces résultats suggèrent donc fortement que, suite au phénomène de rétrotranslocation, ces complexes sont spécifiquement impliqués dans l'ubiquitination des glycoprotéines mal conformées.

3.6 Déglycosylation cytosolique des N-glycoprotéines

Suite à l'étape d'ubiquitination, les glycoprotéines destinées à la dégradation protéasomale subiront une étape de déglycosylation cytosolique. En 1996, les travaux de Wiertz et collaborateurs ont démontré, que lors de la dégradation du CMH I, l'emploi d'inhibiteurs du protéasome provoquait l'accumulation dans le cytoplasme d'un intermédiaire déglycosylé. Cette observation suggérait alors l'implication d'une activité peptide N-glycanase (PNGase) cytoplasmique dans l'ERAD.

3.6.1 L'activité PNGase

La peptide N-glycanase (PNGase) hydrolyse la liaison β -aspartylglycosamine entre le résidu de GlcNAc proximal d'un glycanne et le résidu

d'asparagine d'une protéine. Cette réaction a pour conséquence la libération des glycanes possédant deux résidus de GlcNAc en position terminale réductrice (OSGn₂) et la conversion du résidu d'Asn du point d'attache en résidu d'Asp (Figure 17).

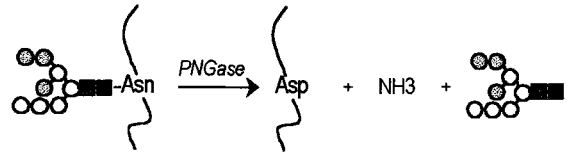


Figure 17: Activité PNGase.

Chez les mammifères, deux activités PNGase fortement dépendantes du pH ont été retrouvées : une lysosomique fonctionnant à pH acide, et une cytosolique dont l'activité optimale requiert un pH neutre. Cette dernière, impliquée dans l'ERAD, présente une spécificité assez large, puisqu'elle permet la libération de divers N-glycanes, qu'ils soient de type oligomannosidique, complexe ou hybride. Une troisième activité PNGase a également été décrite dans le foie de rat (Weng et Spiro, 1997). Celle-ci se distingue des deux précédentes puisqu'elle a été localisée dans la lumière du RE. Son rôle reste cependant encore à déterminer.

3.6.1.1 Interaction entre protéasome et PNGase

Récemment, le groupe de Lennarz a identifié chez la levure ainsi que chez les mammifères, une protéine capable de lier la PNGase (Suzuki *et al.*, 2001). Cette protéine cytosolique, nommée Rad23, se lie au protéasome par l'intermédiaire d'un domaine N-terminal ubiquitin-like mais également aux chaînes d'ubiquitine grâce à deux domaines UBA (ubiquitin associated). Ces différentes observations laissent à penser que Rad23 sert de connexion entre le protéasome, la

PNGase et les glycoprotéines ubiquitinées destinées à être dégradées.

3.6.1.2 Catabolisme des OSGn2

Au cours du processus de déglycosylation, immédiatement après leur libération, les OSGn₂ sont convertis en OSGn₁ par une activité chitobiase cytosolique (Cacan *et al.*, 1996). Ces OSGn₁ seront ensuite progressivement démannosylés par une mannosidase cytosolique (Haeuw *et al.*, 1991 ; Weng et Spiro, 1996), parfois considérée comme précurseur de la ER-mannosidase II, pour aboutir à une structure du type Man₅GlcNAc₁ encore appelée Man₅ linéaire (Grard *et al.*, 1996). Cette mannosidase cytosolique, incapable d'agir sur des OSGn₂, suggère l'action consécutive de la PNGase suivie de la chitobiase.

L'isomère Man₅GlcNAc₁ est ensuite transporté à l'intérieur du lysosome pour être dégradé en résidus de mannose et d'*N*-acétylglucosamine (Saint-Pol *et al.*, 1997).

3.7 Le protéasome

L'utilisation d'inhibiteurs de l'activité protéolytique du protéasome a largement contribué à la mise en évidence de son implication dans la dégradation des glycoprotéines mal conformées. Dans la plupart des modèles étudiés, l'emploi de tels inhibiteurs provoque une accumulation des glycoprotéines dans la lumière du RE (Ref) ou au niveau du cytoplasme sous forme déglycosylées (Yu *et al.*, 1997 ; de Virgilio *et al.*, 1998).

Le protéasome de masse moléculaire 2000 kDa est très complexe et composé approximativement de 35 sous-unités différentes. Son coefficient de sédimentation est de 26S et correspond à l'association de deux sous-complexes : un cœur protéolytique, le

protéasome 20S, et un complexe régulateur appelé complexe 19S.

3.7.1 La particule 20S

La particule 20S représente la partie centrale du protéasome et forme un cylindre creux composé de quatre anneaux heptamériques superposés. Les deux anneaux centraux sont identiques, composés chacun par des sous-unités différentes (dites de type β), pour définir une cavité interne où siègent les différentes activités catalytiques. Les deux anneaux extérieurs sont eux aussi composés de sous-unités différentes (dites de type α) et permettent l'association du protéasome 20S à des complexes régulateurs.

Des études de cristallographie (Löwe *et al.*, 1995) sur le modèle d'*Archebacterium thermoplasma* ont montré que la cavité était plus étroite au niveau des anneaux α que celle des anneaux internes β . Cette structuration particulière suggère que les substrats doivent être déstructurés (linéarisés) afin de pouvoir passer à travers les orifices formés par les anneaux α . Chez les eucaryotes, ces orifices peuvent être obstrués, et un système permettant de maintenir ouvert l'accès à la chambre catalytique est donc nécessaire. Aussi, le protéasome 20S ne fonctionne pas seul et interagit avec deux complexes régulateurs : les complexes 19S et 11S. Nous nous limiterons par la suite au complexe 19S.

3.7.2 Le complexe 19S

Ce complexe, constitué d'environ 18 sous-unités différentes se fixe de façon ATP-dépendante aux deux extrémités de la particule 20S, afin de former le complexe 26S. En se liant ainsi, ce complexe aurait

pour fonction principale d'activer l'ouverture des anneaux α et de permettre la reconnaissance des chaînes d'ubiquitine des substrats à dégrader. En effet, le protéasome 20S est capable d'hydrolyser des petits peptides, des protéines mal conformées mais en aucun cas des protéines ubiquitinées.

Concernant la structure, ce complexe est constitué de deux sous-ensembles : un couvercle vraisemblablement requis pour la dégradation des substrats ubiquitinés, et une base qui permet l'association de ce complexe au complexe 20S. Cette base est constituée de six ATPases qui en hydrolysant l'ATP fournissent l'énergie nécessaire à la linéarisation des substrats et à l'injection de ces derniers dans la chambre catalytique. Une activité isopeptidasique a également été découverte, associée au complexe 19S, ce qui permet l'hydrolyse et donc le recyclage de l'ubiquitine.

3.7.3 Fonction du protéasome

Dans la majorité des cas, le protéasome clive des substrats protéiques en petits peptides ayant entre 3 et 23 acides-aminés. Les peptides ainsi générés sont ensuite rapidement hydrolysés en acides-aminés par des protéases et des aminopeptidases telles que THIMET (Silva *et al.*, 1999), Tricorn (Tamura *et al.*, 1998), et TPPII (Yao *et al.*, 1999). Dans certains cas, les peptides générés ne seront pas dégradés en acides-aminés, mais présentés au système immunitaire associés aux molécules de CMH I.

3.8 ERAD et système immunitaire

Les antigènes intracellulaires (endogènes) et les antigènes extracellulaires (exogènes) représentent des substrats qui peuvent déclencher une réponse

immunitaire. Les antigènes extracellulaires sont éliminés par les anticorps sécrétés, alors que les antigènes intracellulaires sont plus efficacement éliminés par les lymphocytes T cytotoxiques. Le système immunitaire va utiliser deux voies différentes de présentation de l'antigène : les antigènes endogènes sont apprêtés par la voie cytosolique, puis présentés sur la membrane avec des molécules du CMH-I ; les antigènes exogènes sont apprêtés par la voie endocytaire, puis présentés sur la membrane avec des molécules du CMH-II.

Les peptides antigéniques intracellulaires peuvent être formés par plusieurs voies différentes, mais la majorité provient de la dégradation associée au RE (Figure 18). En effet, les glycoprotéines des enveloppes virales qui représentent d'excellents candidats pour générer des peptides antigéniques sont dégradées via l'ERAD. Ceci est notamment le cas de la gp160 du HIV-1, de la glycoprotéine E1 du virus de l'hépatite C, ainsi que de la glycoprotéine B du cytomégalovirus (Ferris *et al.*, 1999 ; Selby *et al.*, 1999). Les peptides antigéniques ainsi générés par l'activité du protéasome sont transportés ensuite à l'intérieur du RE grâce à un transporteur spécifique nommé TAP pour Transporters associated Antigen Processing (Harding et Geuze, 1993). Les peptides associés ensuite aux molécules de CMH-I migreront à la surface cellulaire pour être reconnus par les lymphocytes T cytotoxiques. Deux cas de figure peuvent alors se produire :

- ◆ le peptide associé au CMH-I est reconnu comme molécule du soi et le lymphocyte T se dissocie de la cellule,
- ◆ il n'est pas reconnu comme molécule du soi et la cellule est alors immédiatement détruite.

En conclusion, pour reprendre le titre d'un article paru dans *Nature*, on peut conclure que "The perfection use of imperfection".

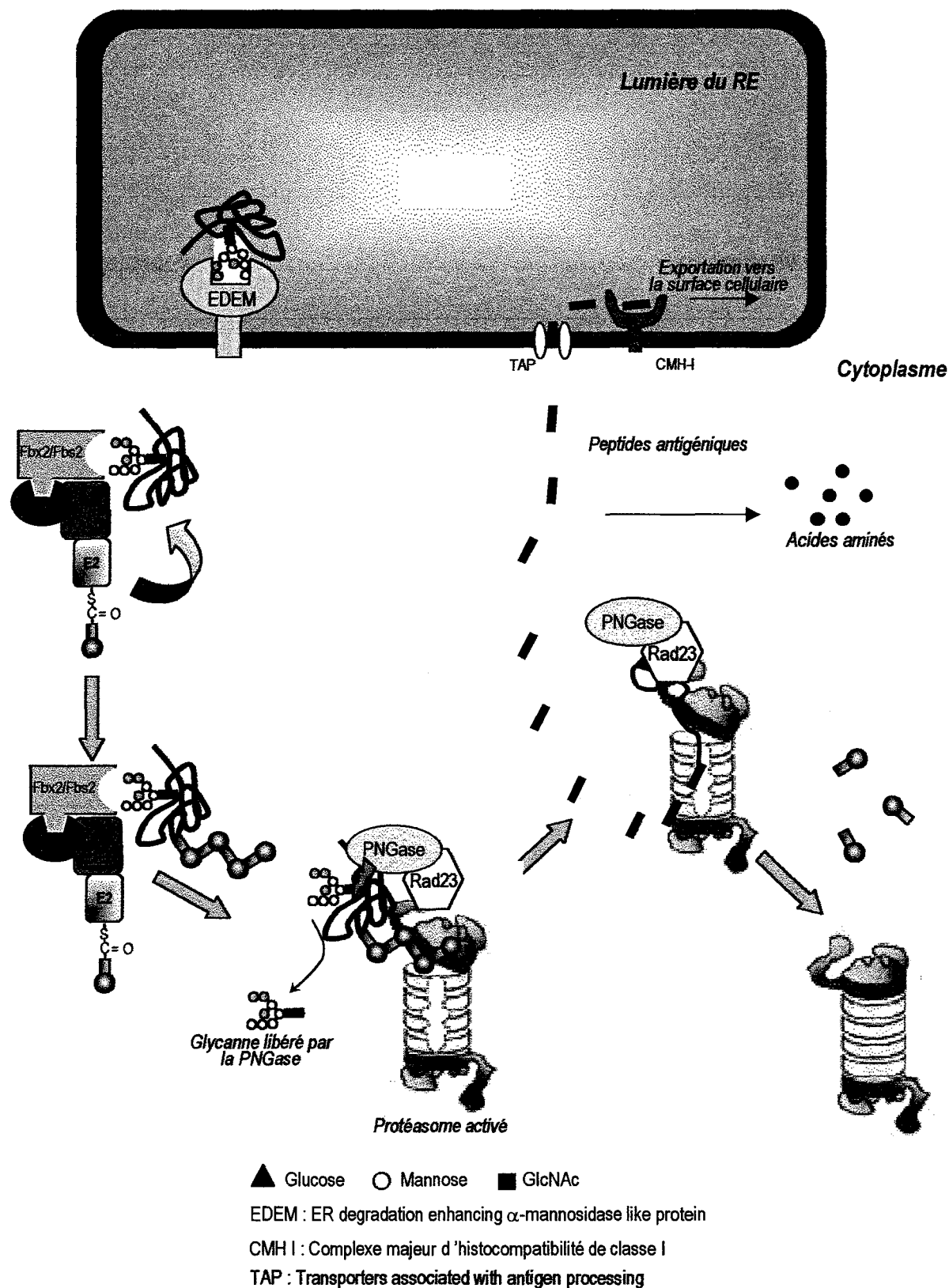


Figure 18: Relation entre dégradation des glycoprotéines nouvellement synthétisées et système immunitaire.

Ainsi, ce couplage intime entre dégradation des glycoprotéines mal conformées (virales ou endogènes) et le système immunitaire, permet à la cellule de contrôler de façon permanente son intégrité.

4. Sécrétion des glycoprotéines.

Nous venons de voir que les glycannes sont impliqués dans la mise en conformation et la dégradation des glycoprotéines. La découverte de deux lectines au niveau de l'appareil de Golgi prouve également que ces derniers sont impliqués dans le trafic des glycoprotéines le long de la voie de sécrétion.

4.1 L'ERGIC 53

L'ERGIC 53 est une lectine membranaire de type I de 53 kDa localisée au niveau du compartiment ERGIC. Cette protéine, dont la séquence est très proche de la lectine MR60 est capable de lier le mannose de façon Ca^{2+} dépendante (Arar *et al.*, 1995). Des ligands physiologiques n'ont pas encore été clairement identifiés, cependant, des études ont montré qu'une mauvaise localisation de cette lectine dans les cellules HeLa affaiblissait considérablement le transport intracellulaire de la cathepsine C (Vollenweider *et al.*, 1998). De plus, des mutations dans L'ERGIC 53 causent l'accumulation des facteurs V et VIII de coagulation dans la lumière du RE (Moussalli *et al.*, 1999). Ces résultats tendent donc à prouver l'implication de cette lectine dans le transport vésiculaire de certaines glycoprotéines entre le RE et l'ERGIC.

Continuellement recyclée entre l'ERGIC et le RE, cette lectine reconnaît des glycoprotéines portant des glycannes de type oligomannosidique. L'emploi d'inhibiteurs de mannosidases montre d'ailleurs que la

démannosylation n'est pas un élément requis pour la liaison à l'ERGIC 53. De récents travaux ont montré que le domaine de reconnaissance des sucres (CRD) de l'ERGIC53 était similaire à celui de la CNX/CRT, suggérant ainsi que les structures oligomannosidiques reconnues par l'ERGIC 53 seraient similaires à celles reconnues par la CNX/CRT (Velloso *et al.*, 2002).

4.2 VIP 36

VIP 36 est une lectine membranaire de type I homologue à ERGIC 53. Localisée principalement dans le *cis*-Golgi, elle est également retrouvée au niveau du *trans*-Golgi network et à la surface de la cellule. VIP 36, au même titre que l'ERGIC 53, reconnaît des glycoprotéines de type oligomannosidique ($\text{Man}_6\text{-}_9\text{GlcNAc}_2$) et participerait au transport intracellulaire de ces dernières (Hara-Kuge *et al.*, 2002). Hormis cette fonction, il a été suggéré que VIP36 fournirait un mécanisme de contrôle qualité dans l'appareil de Golgi. Reconnaisant les glycoprotéines de type oligomannosidique, cette lectine permettrait de piéger au niveau du *trans*-Golgi network celles qui ont échappé à l'action de la mannosidase I golgienne. Ces dernières, par un transport rétrograde, seraient ensuite recyclées dans le *cis*-Golgi pour subir de nouveau l'action de cette enzyme. Ce système empêcherait ainsi que certaines glycoprotéines de type oligomannosidique ne quittent l'appareil de Golgi.

5. Pathologies et contrôle qualité

Le contrôle qualité stringent qui s'exerce au sein du RE empêche les protéines ainsi que les glycoprotéines endommagées, mal conformées ou incorrectement assemblées, de quitter ce compartiment. Ces dernières seront ensuite dégradées

par une voie protéasome dépendante nommée ERAD. Cependant, lorsque le taux de synthèse d'une glycoprotéine défectueuse excède les capacités cellulaires de mise en conformation et de dégradation, celle-ci aura alors tendance à s'accumuler dans la lumière du RE. Cet engorgement du RE, qui interfère avec le processus de contrôle qualité des protéines fait partie d'un groupe de pathologies nommé ERSDs pour Endoplasmic Reticulum Storage Diseases (tableau 2) (Pour revue : Rutishauser et Spiess, 2002).

Tableau 2 : Les maladies d'accumulation du RE

Maladies d'accumulation du RE (ERSDs)
Manque de la protéine due à une rétention dans le RE
Mucoviscidose
Déficience en α 1-antitrypsine
Hypothyroïdisme congénital
Déficience en thyroglobuline
Déficience en thyroperoxidase
Défaut dans le récepteur des LDL
Déficience en lipoprotéine lipase
Déficience dans le récepteur de l'hormone de croissance
Agrégats protéiques
Diabète insipide
Mucoviscidose
Déficience en α 1-antitrypsine
Maladie de Creutzfeld-Jakob
Défaut dans la machinerie de transport
Déficience en facteur de coagulation V et VIII (mutations dans l'ERGIC 53)

Dans la majorité des cas, cette accumulation est causée soit, par la présence d'une protéine ou d'une glycoprotéine défectueuse de la voie de sécrétion, soit par un défaut de la machinerie de transport entre le RE et l'appareil de Golgi. Les troubles occasionnés par la rétention peuvent s'expliquer de deux façons : la non

fonctionnalité de la protéine mutée, ou l'agrégation de ces protéines dans le RE ou le cytoplasme. Ces agrégats toxiques, selon leur localisation, sont appelés corps de Russel ou agrésomes (Figure 19).

5.1 Corps de Russel

Les corps de Russel, caractérisés pour la première fois par Russel en 1890 comme des structures intracellulaires particulières, sont en fait des saccules du RE dilatées contenant des Ig condensées. Structuralement, ces corps de Russel se distinguent du RE et correspondent plutôt à des vésicules dérivées de celui-ci et dans lesquelles les protéines BiP, PDI et Erp72 sont absentes. De nombreuses protéines aberrantes, telles que l' α 1-antitrypsine, peuvent s'accumuler dans la lumière du RE et former alors des corps de Russel (Figure 19).

L' α 1-antitrypsine est synthétisée par le foie et correspond à l'inhibiteur le plus abondant de sérine protéase du plasma. Les patients qui présentent une déficience dans cette glycoprotéine vont, dans certains cas, développer une maladie chronique du foie pouvant entraîner l'apparition d'un carcinome hépatocellulaire. Plusieurs variants ont été identifiés et l'une des formes les plus sévères correspond au variant α 1-PIZ dont l'acide glutamique en position 342 a été remplacé par une lysine. Cette forme de l' α 1-antitrypsine est anormalement conformée et retenue à plus de 85% au niveau de la lumière du RE. De par sa conformation, l' α 1-PIZ formera des agrégats semblables au corps de Russel.

5.2 Les agrésomes

Au cours de la dégradation, nous avons vu que les protéines ainsi que les glycoprotéines mal conformées destinées à être dégradées, subissaient un processus de rétrotranslocation de la lumière du RE vers le cytoplasme. Ce phénomène, couplé à une rapide protéolyse cytoplasmique présente cependant de sérieux risques d'agrégation cytoplasmique quand ces protéines, extrêmement hydrophobes, sont exposées aux conditions réductrices du cytoplasme.

Dans de telles conditions, il arrive que des protéines polyubiquitinées, déglycosylées, s'accumulent dans le cytoplasme. Ces agrégats, formés à la périphérie cellulaire sont ensuite séquestrés en agrésomes près du noyau par un transport rétrograde microtubule-dépendant facilité par des complexes dynéine-dynactine (Figure 19). Ces complexes d'agrégats se forment quand la synthèse d'une protéine uniquement destinée à la dégradation, excède les capacités du système. Ces conditions sont, par exemple, retrouvées lors d'une infection virale ou dans la mucoviscidose.

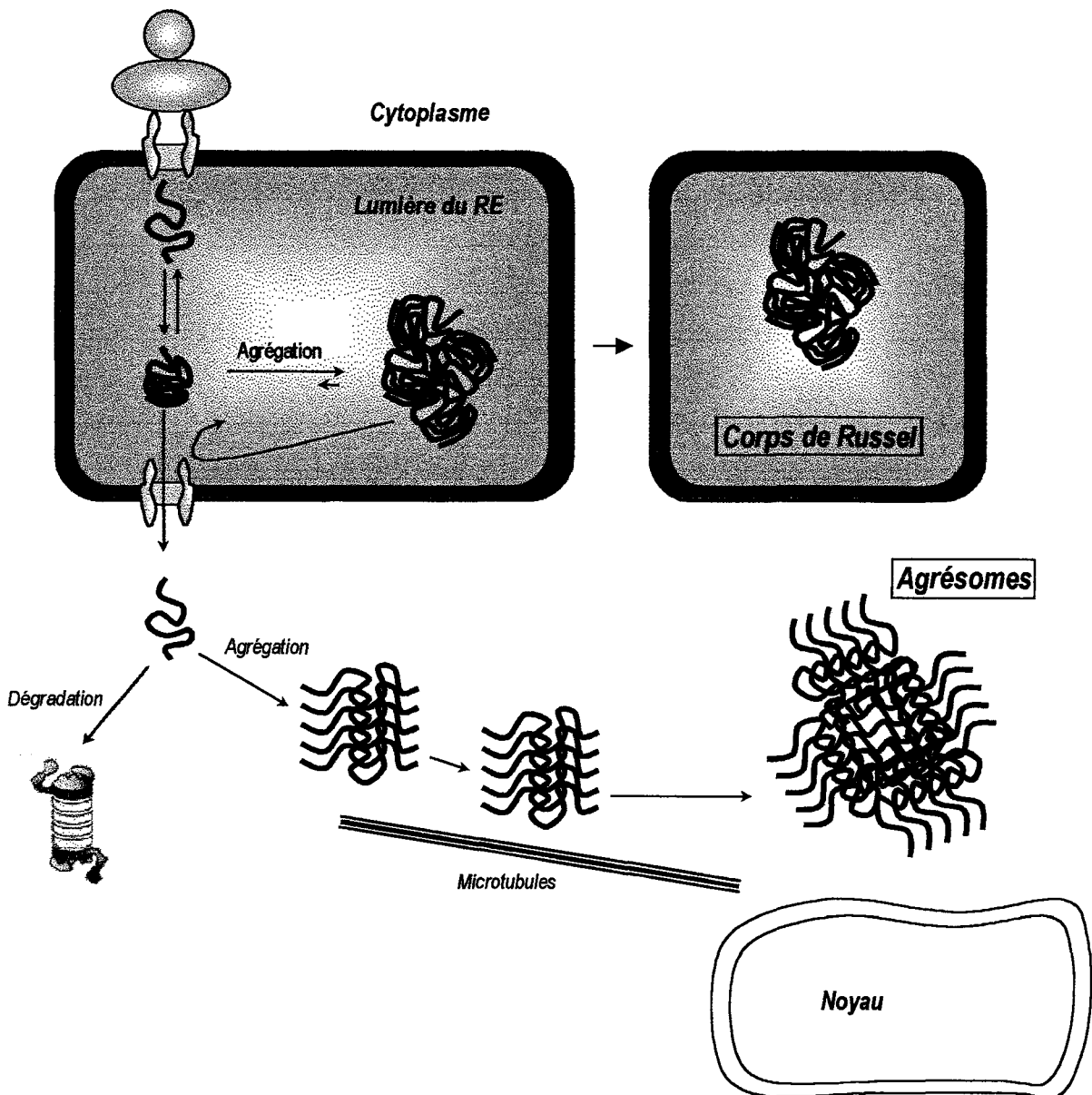


Figure 19: Représentation schématique de la formation des corps de Russel et des agrésomes.

La mucoviscidose est une maladie autosomale récessive, mettant en cause l'absence fonctionnelle d'une glycoprotéine membranaire qui facilite le transport d'ions chlorures à travers la membrane plasmique des cellules épithéliales. Ce canal est nommé CFTR pour « Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator ». Parmi les 800 mutations identifiées, la plus fréquente correspond à la délétion d'un seul résidu de Phe en position 508 ($\Delta F508$). Chez les sujets sains, une partie des molécules de CFTR s'engage dans la voie de sécrétion afin d'être exprimée à la surface de la membrane plasmique. Par contre, avant d'être dégradé par le système ubiquitine-protéasome (Jensen *et al.*, 1995), le $\Delta F508$ CFTR est retenu au niveau du RE (Pind *et al.*, 1994). Dans le cytoplasme, la présence de formes mal conformées de molécules de CFTR conduisent à la formation d'agrégomes (Garcia-Mata *et al.*, 1999).

Ainsi, la présence d'agrégats protéiques intracellulaires dans de nombreuses pathologies telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, et la maladie de Huntington, souligne l'importance physiologique du contrôle qualité et montre qu'une faille dans ce système peut avoir des conséquences catastrophiques pour l'organisme.

UNFOLDED PROTEIN RESPONSE

L'UPR: chef d'orchestre de la voie de sécrétion

1. Introduction

La lumière du RE est le site principal de la maturation et de la mise en conformation des protéines et des glycoprotéines de la voie de sécrétion. Devant le nombre considérable de protéines résidentes et synthétisées, la concentration protéique dans la lumière de cet organelle peut avoisiner les 100 mg/mL. Pour assurer le repliement correct de ces protéines, le RE est doté d'un système efficace de protéines chaperonnes qui empêche l'accumulation de protéines mal conformées. Cependant, malgré cet environnement, lorsqu'un déséquilibre entre le taux de synthèse protéique et les capacités de mise en conformation se produit, des protéines mal conformées vont apparaître. Celles-ci s'accumulent dans la lumière du RE, et constituent pour les cellules, une menace fondamentale. Dans cette situation de stress du RE, les cellules eucaryotes, afin de contrer cette accumulation

de protéines ou de glycoprotéines mal conformées, ont développé une voie de signalisation intracellulaire nommée UPR pour Unfolded Protein Response. Cette réponse, qui permet d'informer le cytoplasme et le noyau de l'état conformationnel des protéines au niveau de la lumière du RE, va engendrer trois mécanismes: le premier, consistant à augmenter les capacités de mise en conformation du RE, active la transcription de gènes caractéristiques; le second, par inhibition de la synthèse protéique réduit l'apport de protéines au RE et le troisième, activé lorsque les deux précédents n'ont pas réussi à contrer cette accumulation de protéines mal conformées conduit à la mort cellulaire programmée (Figure 20). Nous verrons, au cours de ce chapitre que les voies de signalisation intracellulaire de la réponse UPR sont très originales et mettent en jeu l'épissage d'un ARNm spécifique ainsi que plusieurs protéines transmembranaires du RE.

2. L'UPR chez la levure

Caractérisée pour la première fois par des approches génétiques chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, la voie de signalisation déclenchée, suite à l'accumulation de protéines mal conformées dans la lumière du RE, va induire la transcription de nombreux gènes codant pour des protéines impliquées, aussi bien dans la mise en conformation des protéines que dans la dégradation de ces dernières. Cette transduction du signal entre la lumière du RE et le noyau requiert chez la levure trois protéines essentielles: Ire1p, Hac1p et Rlg1p.

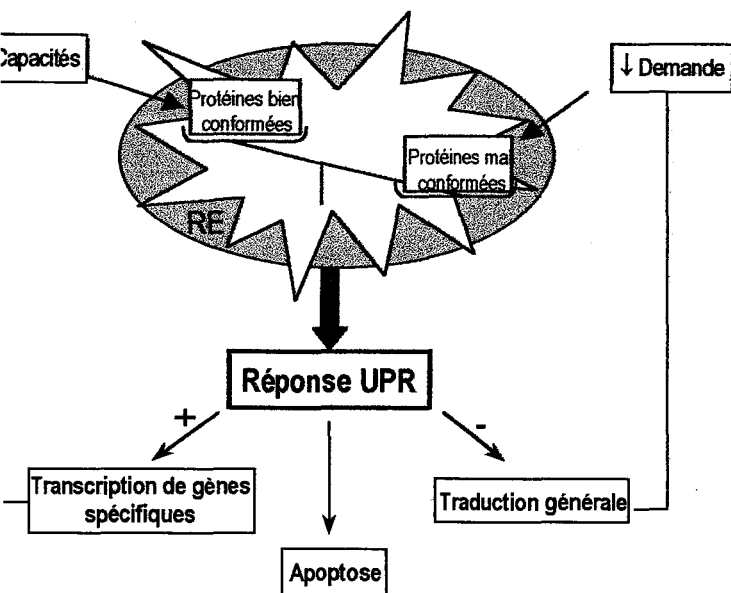


Figure 20: Réponses cellulaires engendrées suite à une accumulation de protéines mal conformées dans la lumière du RE.

2.1 La voie de signalisation

2.1.1 La protéine Ire1p

Cette protéine transmembranaire de type I du RE contient deux domaines : un domaine N-terminal impliqué dans la détection du stress du RE (en fonction du taux de protéines mal conformées) ; et un domaine C-terminal qui possède à la fois, une activité sérine/thréonine kinase et une activité endoribonucléase (Rnase).

Découverte depuis une dizaine d'années, Ire1p est considérée comme la protéine par laquelle l'information du niveau de stress du RE est communiquée au cytoplasme, puis au noyau. Dans des "conditions normales", c'est à dire, en absence de protéines mal conformées, les protéines Ire1p sont sous forme monomérique, par contre, dès que le taux de protéines mal conformées devient anormalement élevé à

l'intérieur de la lumière du RE, une dimérisation de ces protéines est observée. Ce phénomène, accompagné d'une autophosphorylation en *trans* conduit à l'activation de l'activité endoribonucléase des domaines C-terminaux (Shamu et Walter, 1996) (Figure 21).

2.1.2 Un épissage non conventionnel

Ire1p activée aura ensuite pour substrat l'ARNm HAC1 codant pour un facteur de transcription de la famille de b-ZIP protéines. Cet ARNm, exprimé de façon constitutive, est traduit dans la cellule uniquement lorsque celle-ci est en condition de stress (Cox et Walter, 1996). En effet, la présence d'un intron de 252 nucléotides rend impossible la traduction de l'ARNm HAC1. Par contre, sous l'activation de l'UPR, l'activité endoribonucléase de Ire1p va permettre l'épissage de cet intron. Les extrémités 5' et 3', ainsi formées, sont ensuite soudées par l'activité d'une tRNA

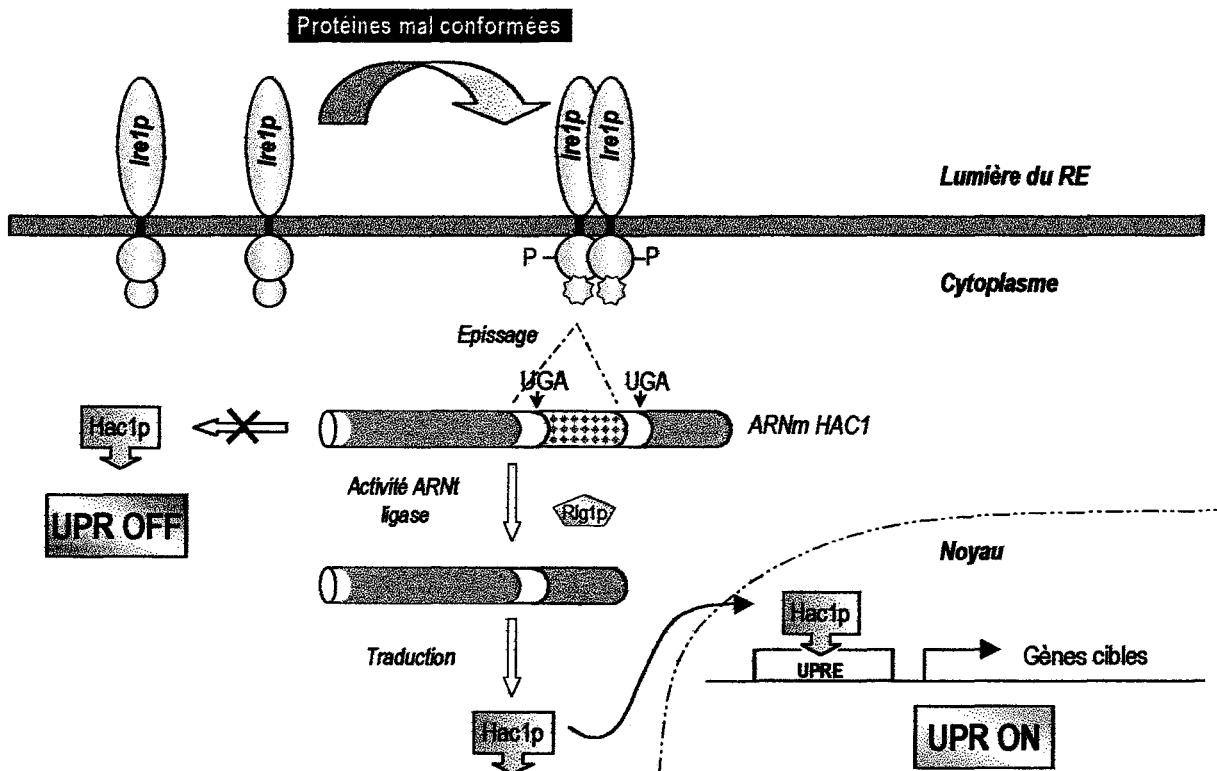


Figure 21: La réponse UPR chez la levure.

ligase nommée Rlg1p indépendante du spliceosome (Sidrauski *et al.*, 1996) (Figure 21).

Ce système d'épissage, qui représente un nouveau type d'épissage chez les eucaryotes, produit un ARNm nouveau HAC1, efficacement traduit en facteur de transcription Hac1p. Celui-ci, ainsi formé, sera acheminé dans le noyau où il activera la transcription de gènes inductibles par l'UPR en se liant aux motifs UPR (UPR elements) (Figure 21).

3. L'UPR chez les mammifères

Alors que chez la levure, l'UPR apparaît "linéaire" avec une seule voie de transduction, chez les mammifères, cette réponse est complexe et fait intervenir plusieurs voies de signalisation. Celles-ci vont générer des réponses diverses, coordonnées, qui permettront soit l'adaptation au stress, soit la mort cellulaire.

3.1 Induction transcriptionnelle

3.1.1 Voie de signalisation partiellement homologue à celle de la levure

Contrairement à la levure, deux homologues de IRE1 sont retrouvés dans le génome des mammifères : IRE1 α et IRE1 β . Alors que la protéine Ire1 α est exprimée universellement, Ire1 β est exprimée uniquement dans les cellules épithéliales intestinales. La surexpression de ces deux protéines est suffisante pour déclencher l'UPR, alors que la surexpression de formes mutantes de Ire1 dénuées de domaines cytoplasmiques, diminue l'UPR, supportant ainsi le concept que l'activité kinasique et endoribonucléasique contenue dans le domaine est essentielle pour l'activation de l'UPR. Etant donné que la région cytoplasmique de ces deux protéines est capable de cliver l'ARNm précurseur de HAC1 des levures, il a été postulé que les cellules de mammifères utilisaient un système d'épissage comparable à celui des levures.

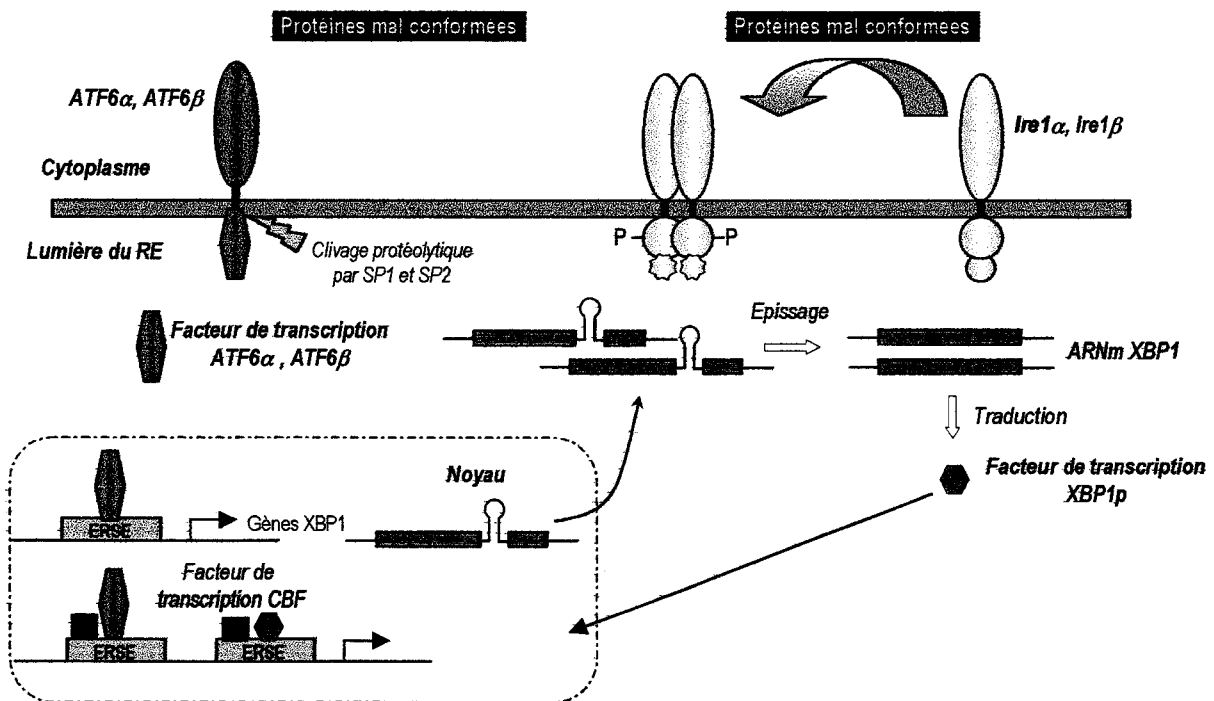


Figure 22: La réponse UPR transcriptionnelle chez les mammifères.

Pendant longtemps, le(s) ARNm cible(s) des protéines Ire1 est(sont) resté(s) inconnu(s) chez les mammifères. Récemment, le groupe de K. Mori a identifié une séquence de 19 nucléotides (CCAAT-(N)₉-CCACG) dans la région promotrice de BiP/GRP78 nécessaire et suffisante pour activer la transcription d'au moins trois chaperonnes majoritaires du RE : BiP/GRP78, GRP94 et la calréticuline. Cette séquence, nommée ERSE (Endoplasmic Reticulum Stress Element), a été utilisée pour isoler la protéine Xbp1p, facteur de transcription de la famille de b-ZIP protéines (Yoshida *et al.*, 1998). Par la suite, plusieurs autres groupes ont démontré que l'ARNm de XBP1 était substrat de Ire1 α et Ire1 β (Figure 22). Lorsque l'UPR est activée, le fragment excisé chez *C. elegans* est de 23 nucléotides, et de 26 nucléotides chez les mammifères. Dans les deux cas, cet épissage induit un changement du cadre de lecture dans la partie C-terminale de la protéine. La protéine Xbp1p se lie ensuite sur les séquences ERSD des promoteurs cibles des gènes de l'UPR et induit leur expression. Aussi bien chez les eucaryotes supérieurs que chez la levure, la synthèse de facteurs de transcription par une voie dépendante des protéines Ire1p requiert, dans les deux cas, l'épissage d'un intron (252 nt pour HAC1 et 26 nt pour XBP1). Cependant, on peut noter trois différences : il n'y a pas de séquence inhibitrice de la traduction dans l'ARNm XBP1, l'excision de l'intron change le cadre de lecture de cet ARNm, et l'expression du gène XBP1 est induite par le stress du RE contrairement au gène HAC1 dont l'expression est constitutive.

Le rôle joué par les protéines Ire1 dans la réponse UPR des mammifères n'est pas clair. Alors que l'inactivation du gène IRE1 α murin est létale au stade embryonnaire (E10.5), les travaux d'Urano *et al.*, (2000) ont montré que des souris "knock out" pour le gène IRE1 α , étaient capables de déclencher une induction

transcriptionnelle suite à un stress. Des résultats similaires ont été obtenus avec des fibroblastes IRE1 $\alpha^{-/-}$ et IRE1 $\beta^{-/-}$, suggérant donc qu'une accumulation de protéines mal conformées à l'intérieur du RE pouvait activer la transcription de gènes indépendamment des protéines Ire1 α et Ire1 β . Ces résultats suggèrent donc, que plusieurs voies de signalisation étaient impliquées dans l'induction transcriptionnelle, et que l'absence d'une des voies pouvait être compensée par une autre. L'hypothèse avancée jusqu'à présent était la présence d'une troisième isoforme de Ire1. Cependant, dans les cellules IRE1 $\alpha^{-/-}$ et IRE1 $\beta^{-/-}$, le facteur de transcription XBP1p n'est pas synthétisé (Calton *et al.*, 2002).

3.1.2 Activation de ATF6 par le stress du RE

En 1998, le groupe de K. Mori a identifié un facteur de transcription nommé ATF6, candidat pour l'UPR chez les mammifères. En effet, au même titre que le facteur de transcription XBP1p, ATF6 peut lier la séquence ERSE dans les régions promotrices des gènes de l'UPR (Yoshida *et al.*, 1998). ATF6 est une protéine transmembranaire de type II, résidente du RE, qui existe sous deux formes : ATF6 α et ATF6 β . Ces deux formes requièrent la présence du facteur de transcription CBF (NF-Y) pour lier la séquence ERSE (Yoshida *et al.*, 2001). Le mécanisme d'activation du facteur ATF6 est différent de celui du facteur Hac1p de la levure. En effet, l'activation se fait au niveau de la protéine et non de l'ARNm. Ainsi, à l'état basal, les protéines ATF6 α et ATF6 β sont exprimées de manière constitutive. Suite à un stress du RE, ces précurseurs inactifs sont clivés par une protéase pour générer deux domaines cytoplasmiques de 50 et 60 kDa respectivement, capables de migrer vers le noyau et

d'induire la transcription de gènes cibles. Les protéases impliquées dans le clivage de ATF6 sont celles capables de cliver le facteur SREBP (Sterol Responsive Element Binding Protein), impliqué dans la régulation du métabolisme du cholestérol. Ces protéases nommées protéases de site 1 et de site 2 (S1P et S2P) clivent SREBP lors d'une déprivation en cholestérol. Ainsi, le fragment généré migre vers le noyau et active la transcription des gènes requis pour la synthèse du cholestérol.

Ce facteur de transcription ATF6 se lie au promoteur du gène XBP1 pour activer sa transcription (Yoshida et al., 2001)(Figure 22). L'augmentation de la transcription de XBP1 produit alors plus de substrats pour les protéines Ire1 et génère donc plus de facteurs de transcription XBP1p.

3.2 Inhibition de la traduction

Contrairement à la levure, espèce chez laquelle aucune régulation de la traduction n'est observée, chez les mammifères, lors d'une accumulation de protéines mal conformées dans la lumière du RE, la traduction est inhibée rapidement et de façon transitoire. Ce blocage a pour but d'empêcher un apport de protéines supplémentaires alors que la lumière du RE est déjà surchargée. Ce phénomène d'inhibition de la traduction est corrélé avec l'augmentation de phosphorylation de la sous-unité α du facteur d'initiation de la traduction eIF2 (Figure 23). Cette phosphorylation de eIF2 empêche la formation du complexe de pré-initiation de la traduction et donc de l'interaction de l'ARNm avec la sous-unité 40S du ribosome. La protéine kinase PERK a été montrée impliquée dans ce phénomène. De la même façon que les protéines Ire1p, en réponse à un stress du RE, PERK se dimérise, ce qui induit une trans-autophosphorylation. De part son mécanisme,

l'inhibition de la traduction devrait toucher l'ensemble des protéines cellulaires, mais certaines semblent échapper à cette régulation. En effet, la traduction des ARNm qui requiert une faible exigence en facteur eIF2 et en complexe d'initiation est augmentée. C'est en particulier le cas pour un ARNm particulier codant pour le facteur de transcription ATF4 et qui n'est traduit uniquement que lorsque eIF2 est phosphorylé (Harding et al., 2000). La transcription de GADD34 est ainsi induite par l'UPR grâce à ATF4. Le produit protéique recrute ensuite la protéine phosphatase 1 (PP1) qui déphosphoryle eIF2 α -P, reversant ainsi l'inhibition de la traduction (Novoa et al., 2001) (Figure 23).

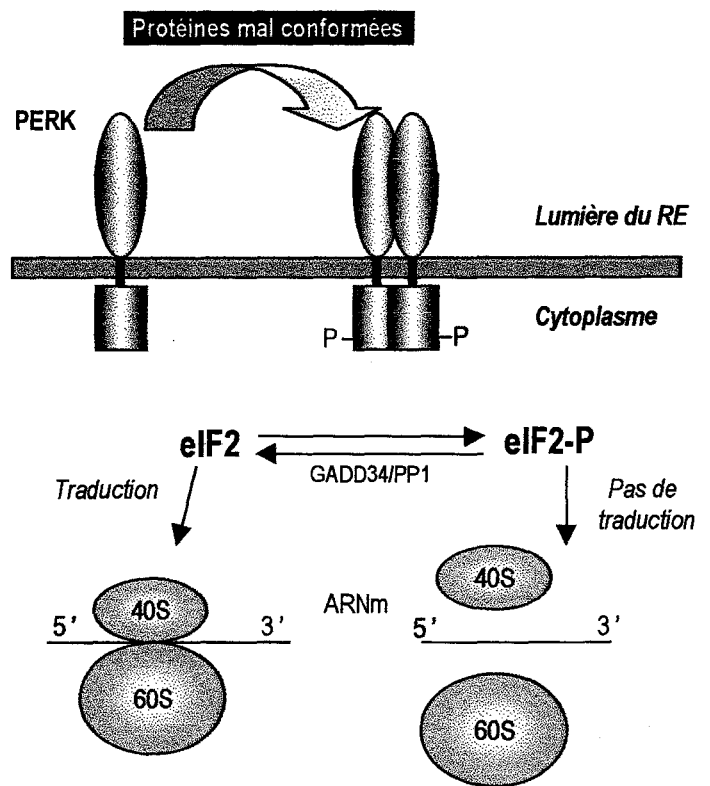


Figure 23: Inhibition de la traduction induite par l'UPR.

3.3 UPR et mort cellulaire programmée

Lorsque l'activation de l'UPR est prolongée, celle-ci conduit à la mort de la cellule par apoptose. Lors de l'accumulation prolongée de protéines mal conformées, les protéines Ire1 α et Ire1 β activées stimulent la voie des JNK (Jun N-terminal protein kinases) en recrutant une protéine adaptatrice TRAF2. En se fixant sur les protéines Ire1p, TRAF2 se libère de la procaspase 12, conduisant ainsi à la séquestration et à l'activation de la caspase 12. La cascade de caspases est ainsi activée, conduisant à la mort cellulaire par apoptose.

Une seconde voie conduisant à la mort cellulaire peut également être activée suite à un stress du RE. En effet, l'activation des protéines Ire1p, ATF6 et PERK conduit à l'activation transcriptionnelle de CHOP, gène codant pour un facteur de transcription fortement impliqué dans l'apoptose. En effet, dans des conditions de stress, l'inactivation du gène CHOP protège les cellules de l'apoptose (Zinszner *et al.*, 1998).

3.4 BiP : lien manquant entre les protéines mal conformées du RE et l'activation de l'UPR

La question que l'on peut se poser, étant donné les voies différentes de signalisation empruntées par l'UPR est : comment trois protéines indépendantes (Ire1p α et β , ATF6 et PERK) sont-elles activées par l'accumulation de protéines mal conformées dans la lumière du RE ? La protéine chaperonne BiP va jouer un rôle capital dans l'activation de l'UPR puisque cette dernière, dans des conditions normales de stress, interagit avec les domaines luminaux des trois protéines : Ire1, ATF6 et PERK. Par contre, suite à l'accumulation de protéines mal conformées au niveau de la lumière du RE, BiP va se détacher de Ire1p, ATF6 et PERK pour se fixer sur les zones hydrophobes des protéines qui s'accumulent (Figure 24). Cette dissociation permet ainsi à Ire1p et PERK de se dimériser et d'activer les voies de signalisation que nous venons de voir. Quant à l'interaction de BiP avec ATF6, celle-ci permet de retenir ATF6 au niveau du RE

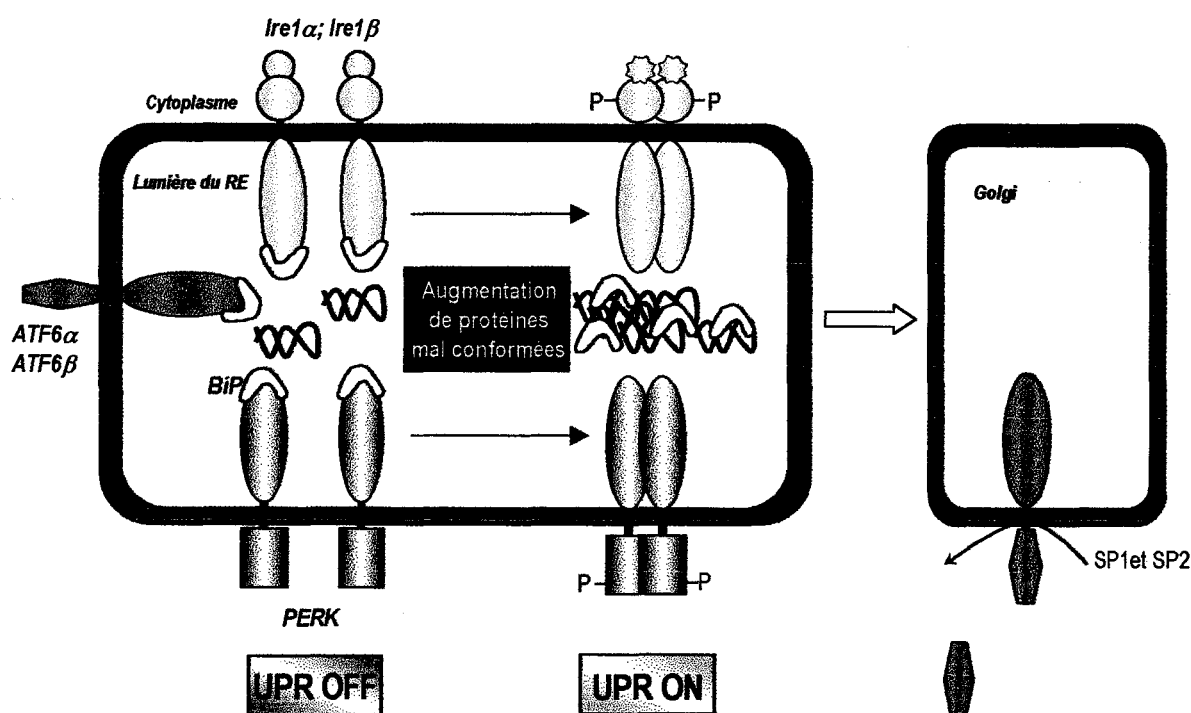


Figure 24: Activation de l'UPR par la protéine chaperonne BiP.

et d'empêcher ainsi son trafic vers l'appareil de Golgi. Lorsque BiP se dissocie, ATF6 est transporté vers l'appareil de Golgi où il subira l'action des protéases S1P et S2P. Ainsi, le taux intraréticulaire de BiP non associée (libre), fournit un mécanisme direct par lequel, un même stimulus permet d'activer trois protéines différentes. De plus, il est fortement suggéré que l'augmentation du taux de cette protéine chaperonne lors de l'activation de l'UPR provoquerait un contrôle négatif pour éteindre l'UPR. Ainsi, l'activation et l'arrêt de la réponse UPR seraient contrôlés par la protéine chaperonne BiP. C'est pour cette raison que BiP est considérée comme la protéine témoin de l'activation de l'UPR.

4. Rôle de l'UPR dans la physiologie cellulaire

Alors que le mécanisme, par lequel, le signal engendré, suite à un taux anormalement élevé de protéines mal conformées dans la lumière du RE est bien caractérisé, celui par lequel cette réponse diminue le taux de protéines mal conformées est moins clair. Récemment, deux travaux remarquables, l'un réalisé sur la base de criblages génétiques et l'autre réalisé par la technique de DNA microarray sur le génome entier de la levure, révélèrent que le nombre, ainsi que la variété de gènes régulés par l'UPR, étaient beaucoup plus importants que prévu. En effet, Travers *et al.*, (2000) ont montré que 5% du génome de la levure, soit 350 gènes parmi les 6300 étaient régulés par l'UPR. Le résultat de cette analyse génomique est accessible par Internet à l'adresse suivante : <http://www.cell.com/cgi/content/full/101/3/249/DC1>.

Parmi ces gènes, la moitié d'entre eux sont connus, et codent pour des protéines dont les fonctions sont très diverses. Le tableau 3, adapté des résultats

de Travers *et al.*, montre que ces protéines sont aussi bien impliquées dans le phénomène de translocation protéique, que dans la mise en conformation des protéines, le métabolisme des lipides, la glycosylation, l'ERAD et le trafic entre le RE et le Golgi.

Tableau 3 : Classe des gènes régulés par l'UPR

Fonction	Nombre de gènes
Impliqués dans la voie de sécrétion	103 au total
Translocation protéique	7
Métabolisme des lipides	19
Glycosylation réticulaire	17
Mise en conformation	10
Dégradation des protéines	6
Transport ER-Golgi	11
Transport Golgi-ER	5
Glycosylation golgienne	6
Envoi vers les vacuoles	4
Sécrétion vers la membrane plasmique	7
Biosynthèse de la membrane plasmique	11
Non impliqués dans la voie de sécrétion	105 au total
Fonction inconnue	173 au total

Cette régulation de gènes, impliqués dans des fonctions aussi diverses, suggère que l'UPR peut remodeler entièrement la voie de sécrétion suite à un stress du RE. Les gènes transcrits lors de l'activation de l'UPR vont ainsi coder pour des protéines qui vont agir en synergie, pour diminuer la concentration de protéines mal conformées dans la lumière du RE. De ce fait, l'UPR régule l'homéostasie du RE en augmentant les capacités de mise en conformation du RE par surexpression de chaperonnes et en permettant la dégradation des protéines qui s'accumulent en surexprimant les protéines impliquées dans l'ERAD.

4.1 Lien entre l'UPR et l'ERAD

Durant l'ERAD, nous avons vu que les protéines ainsi que les glycoprotéines mal conformées sont tout d'abord rétrotransloquées de la lumière du RE vers le cytoplasme, ubiquitinées et dégradées ensuite par le protéasome cytosolique 26S. En plus des nombreuses données qui montrent que l'UPR et l'ERAD sont deux processus indissociables, il est également très facile d'imaginer que les cellules déficientes dans l'ERAD accumulent des protéines mal conformées au sein de la lumière du RE et activent par conséquent l'UPR.

Les analyses génomiques et génétiques ont révélé que plusieurs gènes codant pour des protéines impliquées dans l'ERAD, étaient sous le contrôle transcriptionnel de l'UPR, permettant ainsi, en cas de stress, d'augmenter directement la clairance des protéines mal conformées dans la lumière du RE (Tableau 3). Alors que dans ces conditions, les capacités de dégradation du système ERAD sont facilement saturables, l'induction de l'UPR va permettre d'augmenter les capacités de cette voie afin d'éviter une saturation du RE. Ainsi, dans des cellules mutantes incapables d'activer l'UPR, le processus de dégradation de substrats spécifiques est fortement compromis. Les cellules déficientes en IRE1, sont par exemple, incapables de dégrader la carboxypeptidase Y (Cassagrande *et al.*, 2000). Cette notion de saturabilité du processus de dégradation, *via* la voie de l'ERAD, est également confortée par le fait que l'utilisation de la tunicamycine ou du DTT qui génère un taux élevé de protéines mal conformées à l'intérieur du RE, diminue fortement la dégradation de la carboxypeptidase Y. De façon surprenante, lorsque l'UPR est induite par l'expression de Hac1p, qui ne cause pas d'accumulation de protéines mal conformées, le taux de dégradation par l'ERAD est fortement augmenté,

démontrant ainsi que l'UPR joue un rôle direct en augmentant les capacités de dégradation de l'ERAD.

L'UPR intervient également dans la dégradation des glycoprotéines mal conformées. En effet, alors que la formation d'un signal de dégradation de type Man₈GlcNAc₂ isomère B constitue l'étape limitante dans la dégradation des glycoprotéines, les travaux de Travers *et al.*, 2000 ont montré que l'enzyme qui génère cette structure (la ER-mannosidase I) était sous le contrôle transcriptionnel de l'UPR. Ainsi, en cas de stress du RE, l'UPR serait capable d'accélérer la dégradation des glycoprotéines en réduisant le temps disponible pour leur mise en conformation.

4.2 Lien entre l'UPR et la N-glycosylation

Depuis que l'on sait que la structure des glycanes sur les glycoprotéines affecte le processus de contrôle qualité et plus particulièrement la mise en conformation des glycoprotéines, la relation entre l'UPR et la N-glycosylation est fortement suggérée. En effet, il faut savoir que tous les aspects de cette réponse décrits auparavant, peuvent être déclenchés par l'emploi d'inhibiteurs qui modifient la structure du glycanne ou qui interfèrent avec la synthèse de l'oligosaccharide lié au dolichol. Par exemple, la tunicamycine qui bloque le processus de N-glycosylation en inhibant une enzyme clé dans le cycle des dolichols, est un puissant inducteur de l'UPR. Celui-ci conduit à l'augmentation transcriptionnelle de BiP, à l'arrêt de la traduction protéique et, si le traitement se poursuit, à la mort cellulaire par apoptose. La castanospermine, un inhibiteur des étapes de déglucosylation réticulaire, active également cette réponse en empêchant les N-glycoprotéines mal conformées de subir un cycle gluco-dégluco essentiel pour leur remise en conformation. Il faut cependant

noter, que contrairement à la tunicamycine, la castanospermine ne cause pas d'arrêt de la traduction ou n'induit pas d'apoptose. Ces résultats indirects révèlent bien l'importance de la structure $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ dans la mise en conformation des glycoprotéines.

Néanmoins, malgré de fortes présomptions, aucun lien direct entre l'UPR et la *N*-glycosylation n'avait été démontré. Ce n'est que récemment, suite aux travaux de Travers *et al.*, (2000) et Ng *et al.*, (2000) que ce lien a pu être établi. En effet, chez la levure, ces auteurs ont montré que la transcription de gènes impliqués dans le processus de glycosylation, aussi bien réticulaire que golgien, était induite lors de l'activation de l'UPR et que certains mutants de levure déficients dans des gènes de *N*-glycosylation présentaient une activation constitutive de l'UPR. C'est d'ailleurs de cette manière, que la protéine Rft1 qui permet la translocation du $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ du côté cytoplasmique vers la face luminale a pu être identifiée.

Chez les mammifères, ce lien est plus difficile à établir du fait de la complexité de cette réponse, et du

modèle où la génétique est plus délicate à mettre en œuvre. Une première preuve de cette relation a cependant pu être mise en évidence en 1999 par le groupe de Lehrman montrant que l'activation de l'UPR dans une culture primaire de fibroblastes humains, augmentait la concentration en $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ (Doerrler et Lehrman, 1999). D'autres résultats sont venus depuis conforter cette hypothèse. En effet, il semblerait que l'UPR contrôle les trois aspects du métabolisme des oligosaccharides liés au dolichol : la synthèse, l'allongement et le transfert de ce donneur sur la protéine. Ce mécanisme, suggéré comme une des priorités de l'UPR, a pour fonction d'augmenter la qualité du donneur oligosaccharidique, assurant ainsi à la cellule un contrôle qualité adéquat des *N*-glycoprotéines mal conformées.

Cependant, le mécanisme par lequel l'UPR est activée n'est pas encore élucidé. En effet, cette activation ne résulterait pas d'une accumulation de protéines mal conformées au niveau de la lumière du RE, mais d'une accumulation d'intermédiaires tronqués du type $\text{Man}_{(2-5)}\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$. Le modèle proposé pour expliquer l'allongement des LLO tronqués est

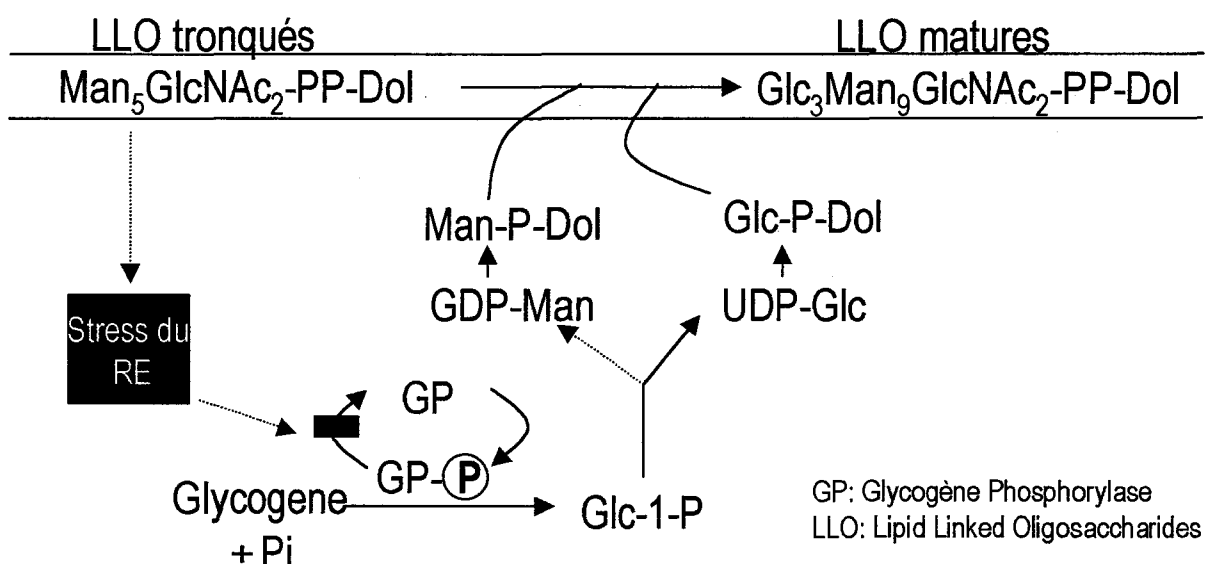


Figure 25: Modèle expliquant l'allongement du donneur oligosaccharidique par activation de la glycogénolyse régulée par l'UPR (selon Gill *et al.*, 2002).

fondé sur l'activation rapide, par phosphorylation, d'une glycogène phosphorylase. Une fois phosphorylée, cette enzyme, en favorisant la glycogénolyse, augmente les concentrations de Glc-1-P et de Glc-6-P. Ces métabolites permettront ainsi la production de GDP-Man, Dol-P-Man et Dol-P-Glc indispensables pour permettre l'allongement de LLO tronqués en LLO matures.

Ces résultats suggèrent ainsi, qu'en plus des aspects que nous venons de voir, l'UPR est également capable de contrôler le métabolisme des hexoses d'une manière bénéfique dans le processus de *N*-glycosylation.

D'après toutes ces données, se dégage dans la réponse UPR, la notion de gradation. En effet, il semblerait que selon la gravité du stress occasionné à la cellule, différents niveaux d'UPR soient activés. En effet, alors qu'un stress léger n'activera que le premier niveau, un traitement à la tunicamycine prolongé activera les quatre niveaux de cette réponse (Shang et al., 2002).

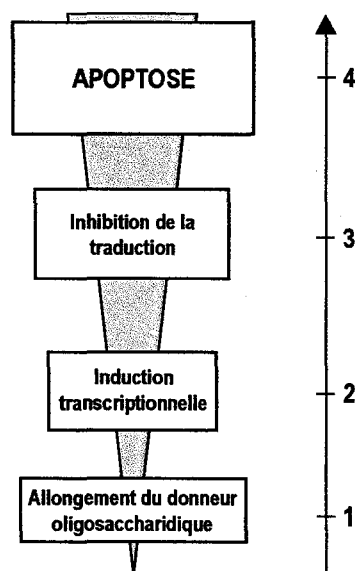


Figure 26: Les différents niveaux d'UPR activés selon l'intensité du stress occasionné à la cellule.

5. UPR et pathologies

Parmi les pathologies susceptibles de déclencher l'UPR, il faut distinguer deux grandes classes de maladies : les maladies génétiques, et les maladies conformationnelles.

Selon les maladies génétiques, toutes n'activeront pas l'UPR. En effet, deux phénomènes sont indispensables pour déclencher cette réponse : une accumulation de protéines mal conformées et une reconnaissance de ces dernières par la protéine chaperonne BiP.

Dans les pathologies telles que la mucoviscidose ou une déficience en α -1-antitrypsine, l'accumulation de protéines mal conformées au sein de la lumière du RE est observée, cependant, l'UPR n'est pas activée, étant donné que ces protéines n'interagissent pas avec la BiP. Par contre, dans le cas de l'ostéogénèse imparfaite qui résulte d'une mutation dans le procollagène, les protéines produites lient BiP et l'UPR est ainsi activée de façon constitutive (Lamande et Bateman, 1999).

Les maladies conformationnelles causées par la répétition de motifs polyglutamiques ainsi que les maladies neurodégénératives, telles que la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson, représentent également une large classe de maladies où l'UPR est activée. Cependant, dans ces pathologies, l'accumulation de protéines mal conformées se situe, non pas au niveau de la lumière du RE, mais du cytoplasme ou du noyau. En fait, il semblerait que la présence d'agrégats protéiques dans ces compartiments, perturbe la machinerie de dégradation cytosolique. Pour la cellule, une perte de ses capacités à dégrader conduit alors à l'accumulation de protéines mal conformées dans la lumière du RE, qui elles, vont déclencher la réponse UPR. Ainsi, l'UPR est non seulement capable de signaler une accumulation de

protéines mal conformées dans le RE mais également une accumulation de protéines mal conformées dans le cytosol, *via* une inhibition du protéasome et des fonctions de l'ERAD.

TRAVAUX PERSONNELS

Introduction

La N-glycosylation, étape clé correspondant au transfert de $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ sur les protéines en cours de synthèse, est un processus extrêmement conservé au cours de l'évolution, identique chez la plupart des espèces étudiées (mammifères, plantes et cellules d'insectes). Seuls quelques organismes unicellulaires tels que *Trypanozoma cruzi* utilisent, pour ce processus, un donneur oligosaccharidique contenant entre 6 et 9 résidus de mannose dépourvu en glucoses terminaux (Bosch, 1988).

Chez les mammifères, les travaux de Gilmore et collaborateurs concernant les substrats utilisés par l'oligosaccharyltransférase (OST) ont déterminé que celle-ci montrait une préférence très nette pour le donneur oligosaccharidique triglucosylé $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$. Cependant, la présence dans certaines pathologies, telles que les CDG, de structures glycaniques tronquées sur les protéines, montrent que potentiellement, l'OST est également capable de transférer d'autres donneurs oligosaccharidiques. C'est ainsi, que les patients atteints dans les gènes équivalents à ALG12, ALG6, et ALG3, transfèrent respectivement sur leurs protéines du $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ et du $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$. Il faut également noter que la mesure de l'activité de l'OST *in vitro*, se fait en utilisant comme donneur le $\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$, montrant ainsi une large spécificité dans la nature des donneurs.

Parmi toutes les structures glycaniques susceptibles d'être transférées dans les cellules eucaryotes, le $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ occupe une place particulière. En effet, cette structure peut être transférée sur les protéines en cours de synthèse dans un grand nombre de circonstances détaillées ci-après.

I- Tout d'abord, une diminution de la concentration en GDP-Man intracellulaire provoquée par une diminution de la concentration en Glc du milieu de culture, une déficience en phosphomannomutase ou encore une diminution de la charge énergétique de la cellule, sont des conditions qui vont favoriser l'accumulation et le transfert du donneur oligosaccharidique $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$. En effet, de part la réversibilité de la réaction $\text{GDP-Man} + \text{Dol-P} \leftrightarrow \text{Man-P-Dol} + \text{GDP}$, une baisse de la concentration en GDP-Man entraîne une diminution de la concentration en Man-P-Dol.

II- Une déficience en Man-P-Dol synthase peut également conduire à une diminution du pool de Man-P-Dol. Ceci concerne en particulier la famille des mutants de glycosylation Lec15. Dans celle-ci, on notera particulièrement les cellules B3F7 que nous avons utilisées au cours de notre étude.

III- Un défaut dans la Man-P-Dol flippase caractérise le mutant PIR (Processing Inhibitor Resistance). Dans ce cas, le donneur oligosaccharidique correspond également à du $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$. Des travaux *in vitro*, ont montré que l'incapacité de ces cellules à utiliser le Man-P-Dol et le Glc-P-Dol peut être corrigée par l'addition de détergents (Anand *et al.*, 2001). Ces résultats ont conduit ainsi à l'hypothèse, que la déficience touche une protéine responsable du mouvement de "flip-flop" du Man-P-Dol et du Glc-P-Dol.

IV- Pour terminer, un défaut dans la dernière étape de synthèse du dolichol (Polyprenol reductase), engendre l'accumulation de polyprenol-P qui possède une affinité beaucoup plus faible que le Dolichol-P pour les enzymes du cycle des dolichols et en particulier la

Man-P-Dol synthase. Ceci conduit au phénotype de type Lec15 avec l'accumulation et le transfert de Man₅GlcNAc₂-PP-Dol (Stoll *et al.*, 1988).

Ainsi, la présence de structures glycaniques tronquées de type Man₅GlcNAc₂ peut être considérée, comme un témoin de toute une série de désordres des voies métaboliques conduisant au processus de *N*-glycosylation.

Alors que potentiellement, rien n'empêche ces structures glycaniques tronquées d'être maturées par les enzymes golgiennes en glycannes de type complexe, différents travaux tendent à corrélérer la présence de ces structures avec un phénomène de sous-glycosylation et l'activation du premier niveau de la réponse UPR (Shang *et al.*, 2002). C'est ainsi, que nous avons comparé la destinée des glycoprotéines portant des glycannes tronqués de type Man₅GlcNAc₂ avec celle portant des glycannes de type Man₉GlcNAc₂, lorsque ces deux populations glycoprotéiques sont synthétisées au sein du même RE.

Ces travaux ont fait l'objet d'un article, accepté pour publication dans *European Journal of Biochemistry* et intitulé : « **Endoplasmic reticulum associated degradation of glycoproteins bearing Man₅GlcNAc₂ and Man₉GlcNAc₂ species in the MI8-5 CHO cell line** ».

ARTICLE 1**Endoplasmic reticulum associated degradation of glycoproteins bearing Man₅GlcNAc₂
and Man₉GlcNAc₂ species in the MI8-5 CHO cell line.**

FRANCOIS FOULQUIER, SANDRINE DUVET, ANDRE KLEIN, ANNE-MARIE MIR,
FREDERIC CHIRAT, RENE CACAN

*Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, CNRS-UMR 8576, IFR 118, GDR CNRS 2590,
Université des Sciences et Technologies de Lille,
F-59655 Villeneuve d'Ascq*

Accepté pour publication dans European Journal of Biochemistry

Endoplasmic reticulum associated degradation of glycoproteins bearing $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ and $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ species in the MI8-5 CHO cell line

François Foulquier, Sandrine Duvet, André Klein, Anne-Marie Mir, Frédéric Chirat, René Cacan.

Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, CNRS-UMR 8576, IFR 118, GDR CNRS 2590, Université des Sciences et Technologies de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.

Corresponding author: René Cacan : Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, CNRS-UMR 8576, Université des Sciences et Technologies de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France. Phone: (33) 3-20-43-44-30. Fax: (33) 3-20-43-65-55. E-mail: rene.cacan@univ-lille1.fr

Running title: Endoplasmic Reticulum Associated Degradation

Subdivision: Glycobiologie

Abbreviations: CHO, Chinese Hamster Ovary; Cst, castanospermine; DIM, 1,4-Dideoxy-1,4-imino-D-mannitol; dMM, deoxymannojirimycine ERAD, Endoplasmic Reticulum Associated Degradation; ER, Endoplasmic Reticulum; Kif, kifunensine; LLO, Lipid Linked Oligosaccharide; UGGT, UDP-Glc: Glycoprotein Glucosyltransferase; UPR, Unfolded Protein Response.

Enzymes: PNGase F: EC 3.2.2.18, β -galactosidase: EC 3.2.1.23, β -hexosaminidase: EC 3.2.1.30

Key Words: N-glycosylation, lipid intermediates, degradation signal, soluble oligomannosides, mannosidase activity.

SUMMARY

Endoplasmic reticulum associated degradation of newly synthesized glycoproteins has been demonstrated using various mammalian cell lines. According to the cell type, it has been demonstrated that glycoproteins bearing Man₉ glycans and those bearing Man₅ glycans could be efficiently degraded. A wide variety of parameters could lead to a defective synthesis of lipid linked oligosaccharides and thus in mammalian cells, Man₉- and Man₅GlcNAc₂ derived species were often recovered onto newly synthesized glycoproteins. However, the degradation of glycoproteins bearing these two species had never been studied.

We used a CHO cell line lacking Glc-P-Dol dependent glucosyltransferase I to generate various proportions of Man₅- and Man₉GlcNAc₂ populations onto newly synthesized glycoproteins. By studying the structure of the soluble oligomannosides originating from the degradation of glycoproteins, we demonstrated the presence of a higher proportion of soluble oligomannosides originating from truncated glycans demonstrating that glycoproteins bearing Man₅GlcNAc₂ glycans are preferentially degraded.

INTRODUCTION

The *N*-glycosylation process is characterized by the transfer "en bloc" of a preassembled oligosaccharide onto a nascent protein. According to the specificity of the oligosaccharyltransferase, it has been demonstrated *in vitro* that a wide variety of assembly intermediates $\text{Glc}_{(0-3)}\text{Man}_{(0-9)}\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ can serve as the donor substrate for *N*-linked glycosylation [1]. *In vivo*, Gilmore and coworkers have determined that oligosaccharyltransferase shows a preference for the full length oligosaccharide substrate [2].

Once transferred onto proteins, the *N*-linked oligosaccharides play a role of information carrier in the quality control mechanism of *N*-glycoproteins in the endoplasmic reticulum (ER). Indeed, monoglucosylated oligosaccharides generated either after sequential action of glucosidase I and II or by the soluble UDP-Glc glycoprotein glucosyltransferase (UGGT), can be ligands for molecular lectin-like chaperones calnexin or calreticulin until proper folding of *N*-glycoproteins [3, 4].

Concerning *N*-glycoproteins that fail to acquire a correct folding, a $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ species is generated by an ER α 1,2-mannosidase probably the ER mannosidase I and constitutes a putative degradation signal [5]. Recently, Frenkel *et al.*, [6] demonstrated that the degradation of unstable *N*-glycoproteins accumulated in a rough ER subcompartment (QC compartment) involves sugar chain trimming to $\text{Man}_{(6-5)}\text{GlcNAc}_2$ species. Furthermore, by using mutant cell line synthesizing truncated $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ Ermonval *et al.*, [7] demonstrated that the degradation of a soluble form of ribophorin I required the formation of $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$ species. After the trimming of mannose residues, these misfolded *N*-glycoproteins are then degraded by a specific pathway named ERAD for Endoplasmic Reticulum Associated Degradation. This pathway involves a deglycosylation step located in the cytosol and the soluble oligomannosides released by this process were then submitted to the action of a DIM sensitive cytosolic mannosidase [8] leading to the formation of a specific $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_1$ isomer [9] before entering in the lysosomal compartment [10].

Thus, it appears that at least three oligomannoside structures can be involved as degradation signal for ERAD ($\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ and $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ for glycoproteins bearing Man_9 species and $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$ for glycoproteins bearing Man_5 species). However, this has been observed by using different cell lines. So we decided to study the degradation of *N*-glycoproteins when these oligomannoside structures are both transferred onto newly synthesized glycoproteins in a same cell line.

Using M18-5 cell line which is not able to synthesize glucosylated lipid linked oligosaccharides (LLO), but in which UGGT remains active, we show that non glucosylated $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ could be efficiently transferred onto glycoproteins. In contrast to what has been observed *in vitro*, $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ species bound to glycoproteins was efficiently glucosylated. By studying the degradation process as revealed by the structure of the released soluble oligomannosides, we demonstrated that glycoproteins bearing Man_5 population are preferentially degraded compared to glycoproteins bearing Man_9 population.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials

[2-³H] mannose (429 Gbq/mmol) was from Amersham (Little Chalfont, Bucks U.K.). Trypsin and castanospermine were from Sigma. Kifunensine and DIM were from ICN, Orsay, France. Peptide N-glycanase F (PNGase F) was from Biolabs (USA). β -galactosidase (isolated from Jack bean), β -hexosaminidase (isolated from Jack bean) were from Oxford GlycoSystems (Abingdon, UK). Glucosidase II purified from rat liver was a generous gift from Dr T. Butters Oxford Glycobiology Institute, University of Oxford, U.K.

Cell culture

The Glc-P-Dol dependent glucosyltransferase I deficient mutant CHO cell line (MI8-5) was a gift of Dr. S.S. Krag (Johns Hopkins University, Baltimore, USA). This cell line was grown in the α -minimal essential medium (α -MEM) (Gibco BRL) supplemented with 10% (v/v) of fetal calf serum, at 34°C under 5% CO₂.

Metabolic labelling of oligosaccharides and chase experiments

For this purpose, MI8-5 cells were routinely grown in 10 cm Petri dishes. Cells were preincubated at low glucose concentration (0.175 mM) for different times and then metabolically labeled for 1 h with 100 μ Ci/ml (4 μ M) of [2-³H] Man at the same glucose concentration. For chase experiments, the radioactive culture medium was replaced by α -MEM containing the physiological glucose concentration (5mM) supplemented with 5 mM Man. When used, kifunensine (20 μ M) and DIM (1mM) were present throughout the experiment (preincubation, pulse and chase). Sequential extraction and purification of oligosaccharide material were achieved as previously described [9].

Analysis of oligosaccharide material and glycosidase treatments

Soluble oligomannoside fractions obtained after the sequential extraction were desalted on Biogel P2 eluted with a 5% (v/v) acetic acid in solution. Glycoprotein fractions obtained at the end of the sequential extraction were digested by trypsin (1 mg/ml) in 0.1 M ammonium bicarbonate buffer pH 7.9 overnight at room temperature. Glycopeptides were then treated with 0.5 unit of peptide-N-glycanase F (PNGase F) in a 50 mM phosphate buffer pH 7.2 for 4 h to release oligosaccharides. Concerning the lipid linked oligosaccharides (LLO), the oligosaccharide moieties were released by

mild acid treatment (0.1 M HCl in tetrahydrofuran) for 2 h at 50°C. The different oligosaccharide fractions were subsequently desalted on a Biogel P2 eluted with a 5% (v/v) acetic acid solution. Analysis were performed by HPLC on an amino-derivatized Asahipak NH2P-50 (250 mm x 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 90 min. Oligomannosides were identified on the basis of their retention times compared to well-defined standards [11]. Elution of the radiolabeled oligosaccharides was monitored by continuous-flow detection of the radioactivity with a flo-one β detector (Packard, France).

For the sequential glycosidase treatments, oligosaccharides released after PNGase digestion were first dissolved in 2 M acetic acid and hydrolysis was carried out at 80°C during 2 h to release sialyl residues. Incubation with 0.1 U of β -galactosidase was performed in 20 μ L of 100 mM sodium acetate buffer, pH 3.5 overnight at 37°C. Then 0.1 U of β -hexosaminidase was added for an additional overnight incubation. The incubation mixture was then analyzed by HPLC.

RESULTS

Synthesis and transfer of $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ species in M18-5 cell line

We have previously demonstrated that M18-5 CHO cells are deficient in Glc-P-Dol dependent glucosyltransferase I and that the glycans transferred onto glycoproteins are thus non glucosylated [12]. By using incubation with labeled mannose at low glucose concentration (0.175mM Glc), we currently observed that $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$, an intermediate in the formation of $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$, was transferred onto glycoprotein acceptors (Fig 1, panels A and E). Recently, Shang *et al.*, [13] described that when cells were preincubated at low glucose concentration, the truncated LLO were extended as a consequence of UPR activation. To obtain various proportions of Man_5 and Man_9 species onto newly synthesized glycoproteins, M18-5 cells were preincubated up to 120 min at low glucose concentration (0.175mM Glc) and incubated with labeled mannose during 60 min. Figure 1 indicates that when the preincubation period was increased, the UPR was activated since after 20, 40 and 120 min glucose deprivation, the radioactivity shifted from truncated species ($\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ and $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$) to $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ (Fig 1, panels A, B and C). To demonstrate that glycans bound to proteins are not the result of modification by processing enzymes, the same experiment was performed in the presence of kifunensine, an inhibitor of the demannosylation process. Figure 1 panels D and H, revealed that incubation in the presence of 20 μM kifunensine did not affect the proportion of Man_5 and Man_9 species bound onto LLO and onto glycoproteins. This demonstrates that both populations were transferred with different proportions according to the relative abundance of each species present onto LLO (Fig 1, panels E, F and G).

Dual fate of $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ species bound to glycoproteins in M18-5 cell line

As already described for M18-5 cells, the transfer of $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ onto glycoproteins led to the formation of $\text{Man}_8\text{-}$ and $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ since the formation of monoglucosylated glycans by UGGT was not affected in this cell line. In the same manner, the transfer of $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ species was attested onto glycoproteins by three peaks: $\text{Man}_4\text{-}$, $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ and peak X migrating as $\text{Glc}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ (see Fig 1, panels E, F, G and H).

To demonstrate that peak X could be the result of the reglucosylation of $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ species, M18-5 cells were metabolically labeled with [2- ^3H] Man with or without 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of castanospermine an inhibitor of the glucosidases I and II. In the presence of castanospermine, the level of $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ was increased and a similar observation can be made for peak X (Fig 2, panels A and B). Under these conditions, the decreasing amount of $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ and

Man₅GlcNAc₂ species was correlated with the increasing amount of Glc₁Man₉GlcNAc₂ and peak X respectively. Furthermore, as expected, the peak X and Glc₁Man₉GlcNAc₂ were totally sensitive to purified glucosidase II treatment giving Man₅GlcNAc₂ and Man₉GlcNAc₂ species respectively (Fig 2, panel C). Since in MI8-5 cells, Glc-P-Dol dependent glucosyltransferase was not active, the monoglucosylated species detected onto glycoproteins could only originate from the action of UGGT. Furthermore, when incubation was performed in the presence of 20µM kifunensine, the formation of Man₄ and Man₈GlcNAc₂ species was strongly inhibited (Fig 1, panel H). This suggests the involvement of class I mannosidase in these demannosylation processes [14].

Fate of glycoproteins bearing Man₅- and Man₉GlcNAc₂ populations

According to the preincubation time at low glucose concentration, various proportions of Man₅ and Man₉GlcNAc₂ species could be transferred onto proteins. To obtain an equal distribution of the radioactivity between Man₅ and Man₉ populations bound to glycoproteins, cells were preincubated during 40 min in 0.175 mM Glc, labeled for 1 h and chased in the culture medium (5mM Glc with 5mM Man) during 0, 3 and 6 h. At each time, glycans bound to glycoproteins were released by PNGase and sequentially treated to release sialic acid, galactose and *N*-acetylglucosamine residues. As previously described [15], the appearance of Man₃GlcNAc₂ species after these treatments revealed the level of Golgi processing. Fig 3 shows that the radioactivity bound to Man₃GlcNAc₂ species increased from 18% of the radioactivity after the pulse to 38% of radioactivity after 6 h chase. The formation of complex type could be correlated with the decrease of the percentage of radioactivity associated to oligomannoside type glycans mainly Man₉ population. When looking at the end products of the processing, most of the Man₅GlcNAc₂ was converted into Man₄GlcNAc₂ in contrast to the small amount of Man₆GlcNAc₂ originating from Man₉GlcNAc₂ species.

ERAD of glycoproteins bearing Man₅ and Man₉ population in MI8-5 cells

The *N*-glycosylation process is accompanied by the release of soluble oligomannosides. At least part of this soluble material has been demonstrated to originate from glycoprotein degradation [16, 17] after the quality control mechanism. Fig 4, panel A shows the pattern of oligomannosides bound to glycoproteins after 20 min preincubation at 0.175 mM Glc followed by 1 h labeling and 1 h chase in a culture medium containing 5mM Glc and 5mM Man. In these conditions as previously described [17], the profile of soluble oligomannosides revealed three major species: Man₄GlcNAc₁,

Man₅GlcNAc₁ and Glc₁Man₅GlcNAc₁ (Fig 4, panel B). The smaller species (from Man₃GlcNAc₁ to Man₁GlcNAc₁) correspond to lysosomal degradation of the soluble oligomannosides as previously demonstrated [18]. Since these species could be the result of the action of the cytosolic mannosidase [8], the same experiment was performed in the presence of DIM to avoid cytosolic demannosylation of glycans released during the degradation process. Figure 4 panel C shows the profile of soluble oligomannosides when the same experiment was performed in the presence of 1 mM DIM. Although the pattern of oligosaccharides bound to glycoproteins was not affected by the inhibitor (not shown) Man₅ and Man₉ populations were recovered in the soluble oligomannoside fraction. However, when compared the pattern of soluble oligomannosides to the one obtained with glycans bound to proteins (Fig 4, panels C and A respectively), it clearly appears a higher proportion of soluble oligomannosides originating from Man₅ population than the one originating from Man₉ population.

However, it has been demonstrated that part of these soluble oligomannosides could originate from hydrolytic activity of the oligosaccharyltransferase complex using water as acceptor for the oligosaccharide-PP-Dol donor [19]. Since in M18-5 cells glucosylated oligomannosides were present only onto glycoproteins, Glc₁Man₅GlcNAc₁ and Glc₁Man₉GlcNAc₁ can be used as marker for glycoprotein degradation. Table I shows that the ratio Glc₁Man₅GlcNAc₁/Glc₁Man₉GlcNAc₁ obtained with soluble oligomannosides was two fold more important than the ratio Glc₁Man₅GlcNAc₂/Glc₁Man₉GlcNAc₂ obtained with the glycoproteins pattern. This result indicated that when glycoproteins bearing Man₉ and Man₅ populations are synthesized in the same cell line, glycoproteins bearing Man₅ population are more efficiently degraded. Furthermore, when various proportions of Man₅ populations were transferred onto glycoproteins as a result of different preincubation time at low Glc concentration, a direct relationship can be observed between the level of released soluble oligomannosides and the proportion of Man₅ species bound onto the glycoprotein fraction (Fig4, panel D).

Glycoproteins bearing only Man₉ species (0% of Man₅ population) can be obtained in two ways : either by inducing the UPR by an extensive preincubation period at low Glc concentration (this treatment produced the extension of oligomannosides bound to lipid intermediates) as in Fig 4D (0% of Man₅ population), or by incubating cells in the culture medium (5mM Glc) which considerably lowered the labeling. However, in both cases, the degradation of glycoproteins as measured by the ratio radioactivity bound to soluble oligomannosides/ radioactivity bound to glycoproteins is identical between 10 and 13%. Concerning the physiological relevance of the incubation conditions used, this result suggests that glucose deprivation does not significantly affect the degradation process of glycoproteins.

DISCUSSION

The synthesis of oligomannosides linked to lipid intermediates depends on several cellular and extracellular parameters. The glucose concentration in extracellular medium [20], the capacity of the cell to synthesize the different metabolic precursors (GDP-Man, UDP-Glc, Man-P-Dol, Glc-P-Dol), and the variations in the level of expression of the various glycosyltransferases as observed in patients with CDG [21, 22] are parameters which can modify the quality of the lipid linked oligosaccharide donors.

However, several mechanisms avoid the transfer of truncated lipid donors especially $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ onto proteins, first the activation of UPR which promotes the extension of such truncated LLO intermediates to $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ [13] and second, the high turn over rate of lipid donors. These sets of adaptive events concern only the lipid intermediate donors but not the glycans bound to the protein moiety. Thus the fate of glycoproteins bearing $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ glycans has to be envisaged.

For this, we decided to generate glycoproteins bearing Man_5 and Man_9 populations in a same cell type. To avoid preferential transfer of glucosylated species from LLO, we used M18-5 CHO cells deficient in Glc-P-Dol dependent glucosyltransferase I. As already observed for other cell lines [23], the stress induced by a preincubation at low glucose concentration leads to a cellular response named UPR, the first level of which was the extension of LLO. According to the preincubation time, various proportions of Man_5 and $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ species can be transferred onto proteins. The ER processing of these two species has been studied. As expected, Man_9 species gave $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ which revealed the action of UGGT. For $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ species, although it has been claimed that UGGT was not active on this species, we clearly demonstrated the formation of $\text{Glc}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ species. The formation of this species has already been observed in mutant cell lines [24, 25]. However, this result indicates that this reglucosylation step was not specific of Man-P-Dol deficient mutant cell line but could be observed when Man_9 population was present onto newly synthesized glycoproteins. Similarly, Man_9 and Man_5 species undergo demannosylation reactions. The $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ species were converted into $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$ species unable to be reglucosylated and the $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ species could be demannosylated first into $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ and for longer chase period to $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$. This species has been observed onto resident glycoproteins as demonstrated for ribophorin I [26] and for unstable glycoproteins [6].

Most of the evidences obtained for the occurrence of degradation signals involved in ERAD have been obtained by studying the effect of inhibitors of demannosylation (Kif and dMM) on glycoprotein degradation. As we demonstrated that

the glucosylated soluble oligomannosides released during the *N*-glycosylation process of MI8-5 originate only from glycoprotein degradation [17], we compared the ratio Glc₁Man₅/Glc₁Man₉ species on glycoproteins and on the soluble oligomannoside fractions in experiments performed in the presence of DIM an inhibitor of the cytosolic mannosidase. We observed that glycoproteins bearing Man₅ population were more efficiently degraded (2 fold) than glycoproteins bearing Man₉ population. It has to be noted that the release of the glucosylated species was accompanied by the release of Man₈₋₅GlcNAc₁ and Man₄GlcNAc₁ which are putative degradation signals for glycoproteins bearing Man₉ and Man₅ populations respectively. As we took into account only monoglucosylated species, the degradation of Man₅ population was probably under evaluated.

We have already mentioned [27] that the level of soluble oligomannosides released during the *N*-glycosylation process was higher in Man-P-Dol deficient cell lines than in wild type cells able to elongate their lipid intermediates. We also demonstrated that the pattern of these oligomannosides was related to the pattern of the glycans bound to the newly synthesized glycoproteins [18]. We demonstrated here that when Man₅GlcNAc₂ oligosaccharides are transferred onto glycoproteins in cells able to synthesize and transfer Man₉GlcNAc₂, the glycoproteins bearing these truncated glycans are preferentially degraded. It means that the mechanism of degradation discovered in mutant cells was also used by normal cells.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique and the Ministère de l'Education Nationale et de la Recherche Technologique. We are thankful to Dr J-C. Michalski director of U.M.R. 8576, Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle. The authors sincerely acknowledge Dr T. Butters for his generous supply of glucosidase II and Dr S.S. Krag for her gift of MI8-5 cell lines.

REFERENCES

- [1] Jackson, B.J., Warren, C.D., Bugge, B., Robbins, P.W. (1989) Synthesis of lipid-linked oligosaccharides in *Saccharomyces cerevisiae*: $\text{Man}_2\text{GlcNAc}_2$ and $\text{Man}_1\text{GlcNAc}_2$ are transferred from dolichol to protein in vivo. *Arch. Biochem. Biophys.*, 272, 203-209.
- [2] Karaoglu, D., Kelleher, D.J., Gilmore, R. (2001) Allosteric regulation provides a molecular mechanism for preferential utilization of the fully assembled dolichol-linked oligosaccharide by the yeast oligosaccharyltransferase. *Biochemistry.*, 40, 12193-12206.
- [3] Lehrman, M.A. (2001) Oligosaccharide-based information in endoplasmic reticulum quality control and other biological systems. *J. Biol. Chem.*, 276, 8623-8626.
- [4] Helenius, A. and Aebi, M. (2001) Intracellular functions of N-linked glycans. *Science*, 291, 2364-2369.
- [5] Jakob, C.A., Burda, P., Roth, J., 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.
- [6] Frenkel, Z., Gregory, W., Kornfeld, S., Lederkremer, G.Z. (2003) ER-associated degradation of mammalian glycoproteins involves sugar chain trimming to $\text{Man}_6 - 5 \text{GlcNAc}_2$. *J Biol Chem.* Jun., 26 [Epub ahead of print]
- [7] Ermonval, M., Kitzmuller, C., Mir, A.M., Cacan, R., Ivessa, N.E. (2001) N-glycan structure of a short-lived variant of ribophorin I expressed in the Mad1A214 glycosylation-defective cell line reveals the role of a mannosidase that is not ER mannosidase I in the process of glycoprotein degradation. *Glycobiology*, 11, 565-576
- [8] Weng, S., Spiro, R.G. (1996) Endoplasmic reticulum kifunensine-resistant alpha-mannosidase is enzymatically and immunologically related to the cytosolic alpha-mannosidase. *Arch Biochem Biophys.*, 325, 113-123.
- [9] Kmiécik, D., Herman, V., Stroop, C.J., Michalski, J.C., Mir, A.M., Verbert, A., Cacan, R. (1995) Catabolism of glycan moieties of lipid intermediates leads to a single $\text{Man}_5\text{GlcNAc}$ oligosaccharide isomer: a study with permeabilized CHO cells. *Glycobiology.*, 5, 483-494.
- [10] Saint-Pol, A., Bauvy, C., Codogno, P., Moore, S.E. (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.
- [11] Foulquier, F., Harduin-Lepers, A., Duvet, S., Marchal, I., Mir, A.M., Delannoy, P., Chirat, F., Cacan, R. (2002) The unfolded protein response in a dolichyl phosphate mannose-deficient Chinese hamster ovary cell line points out the key role of a demannosylation step in the quality-control mechanism of N-glycoproteins. *Biochem J.*, 362, 491-498.
- [12] Quellhorst, G.J. Jr., O'Rear, J.L., Cacan, R., Verbert, A., Krag, S.S. (1999) Nonglycosylated oligosaccharides are transferred to protein in M18-5 Chinese hamster ovary cells. *Glycobiology.*, 9, 65-72.
- [13] Shang, J., Korner, C., Freeze, H., Lehrman, M.A. (2002) Extension of lipid-linked oligosaccharides is a high-priority aspect of the unfolded protein response: endoplasmic reticulum stress in Type I congenital disorder of glycosylation fibroblasts. *Glycobiology.*, 12, 307-317.
- [14] Herscovics, A. (2001) Structure and function of Class I alpha 1,2-mannosidases involved in glycoprotein synthesis and endoplasmic reticulum quality control. *Biochimie.*, 83, 757-762.
- [15] Verbert, A., Cacan, R. (1999) Trafficking of oligomannosides released during N-glycosylation: a clearing mechanism of the rough endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta.*, 1473, 137-146.

- [16] Moore, S.E.H. and Spiro, R.G. (1994) Intracellular compartmentalization and degradation of free polymannose oligosaccharides released during glycoprotein synthesis. *J. Biol. Chem.*, 269, 12715–12721
- [17] Cacan, R., Duvet, S., Labiau, O., Verbert, A., Krag, S.S. (2001) Monoglucosylated oligomannosides are released during the degradation process of newly synthesized glycoproteins. *J. Biol. Chem.*, 276, 22307-22312.
- [18] Duvet, S., Labiau, O., Mir, A.M., Kmieciak, D., Krag, S.S., Verbert, A., Cacan, R. (1998) Cytosolic deglycosylation process of newly synthesized glycoproteins generates oligomannosides possessing one GlcNAc residue at the reducing end. *Biochem J.*, 335, 389-396.
- [19] Spiro, M.J., 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.
- [20] Rearick, J.I., Chapman, A., Kornfeld, S. (1981) Glucose starvation alters lipid-linked oligosaccharide biosynthesis in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.*, 256, 6255-6261.
- [21] Marquardt T., Freeze H. (2001) Congenital disorders of glycosylation: glycosylation defects in man and biological models for their study. *Biol Chem.*, 382, 161-177.
- [22] Freeze, H.H. (2002) Human disorders in N-glycosylation and animal models. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1573, 388-393.
- [23] Doerrler, W.T., Lehrman, M.A. (1999) Regulation of the dolichol pathway in human fibroblasts by the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 96, 13050-13055.
- [24] Ermonval, M., Duvet, S., Zonneveld, D., Cacan, R., Buttin, G., Braakman, I. (2000) Truncated N-glycans affect protein folding in the ER of CHO-derived mutant cell lines without preventing calnexin binding. *Glycobiology*, 10, 77-87.
- [25] Duvet, S., Chirat, F., Mir, A.M., Verbert ; A., Dubuisson, J., Cacan, R., (2000) Reciprocal relationship between alpha 1,2 mannosidase processing and reglucosylation in the rough endoplasmic reticulum of Man-P-Dol deficient cells. *Eur. J. Biochem.*, 267, 1146-1152.
- [26] Rosenfeld, M.G., Marcantonio, E.E., Hakimi, J., Ort, V.M., Atkinson, P.H., Sabatini, D., Kreibich, G. (1984) Biosynthesis and processing of ribophorins in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.*, 99, 1076-1082.
- [27] Villers, C., Cacan, R., Mir, A.M., Labiau, O., Verbert, A. (1994) Release of oligomannoside-type glycans as a marker of the degradation of newly synthesized glycoproteins. *Biochem J.*, 298, 135-142.

Table I

**Radioactivity bound to Glc₁Man₅ and Glc₁Man₉ species during chase experiments in MI8-5 cells
in presence of 1 mM DIM**

MI8-5 cells in presence of 1 mM DIM were pulsed for 1 h and chased in the culture medium containing 5mM Glc and 5mM Man for 1 h after 20 min preincubation in 0.175 mM Glc. Cells were then submitted to the sequential extraction procedure. The radioactivity bound to Glc₁Man₅ and Glc₁Man₉ species was measured after counting of the glycoprotein and the soluble oligomannoside fractions taking into account the percentage of these species as determined by HPLC.

	Glc ₁ Man ₅ species (DPM)*	Glc ₁ Man ₉ species (DPM)*	Ratio Glc ₁ Man ₅ species/ Glc ₁ Man ₉ species
Glycoprotein fraction	113512	127650	0,88
	114070	134000	0,85
	114418	134350	0,85
Soluble oligomannoside released during the chase experiment	14520	7100	2,04
	13250	8206	1,61
	13510	8214	1,64

* Values of three different experiments

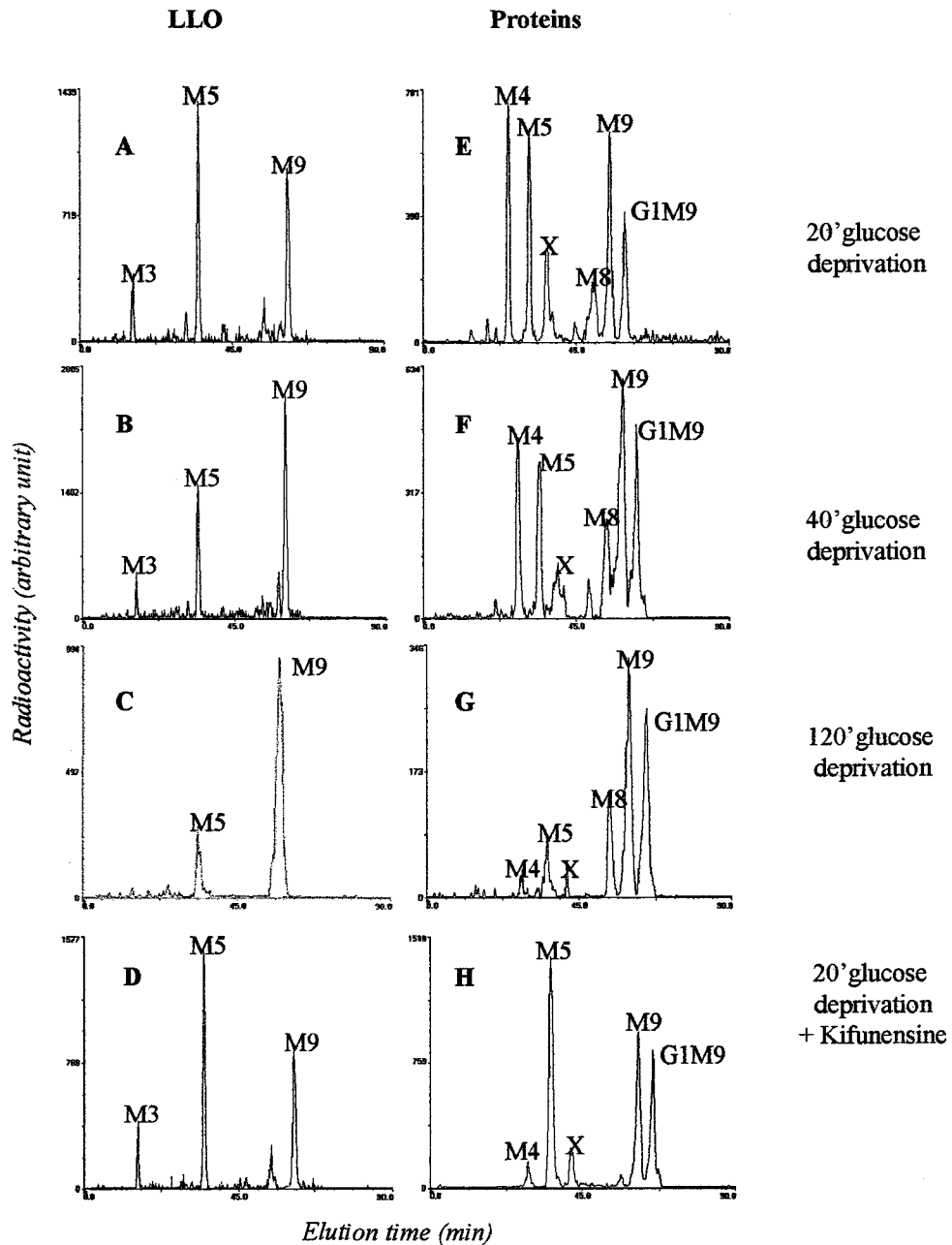


Figure 1: HPLC analysis of LLO and oligomannoside species bound to newly synthesized glycoproteins during glucose deprivation of M18-5 cells.

M18-5 cells were preincubated in 0.175 mM Glc during 20, 40 and 120 min and then pulsed during 1h with [2-³H] Man in the same culture medium. Cells were then submitted to the sequential extraction procedure. Oligomannosides bound to LLO (Panels A, B, C and D) and to glycoproteins (Panels E, F, G and H) were analyzed by HPLC as described under experimental procedures. Panels D and H correspond to the pattern of oligomannosides bound to LLO and to glycoproteins respectively when the incubation was performed in the presence of 20 μM Kif after a 20 min preincubation.

G1M9 indicates oligomannosides containing one glucose, nine mannose and two N-acetyl glucosamine residues. M3, M4, M5, M8 and M9 indicate oligomannosides containing 3,4,5,8 and 9 mannose residues and two N-acetyl glucosamine residues, respectively. X indicates an unidentified peak.

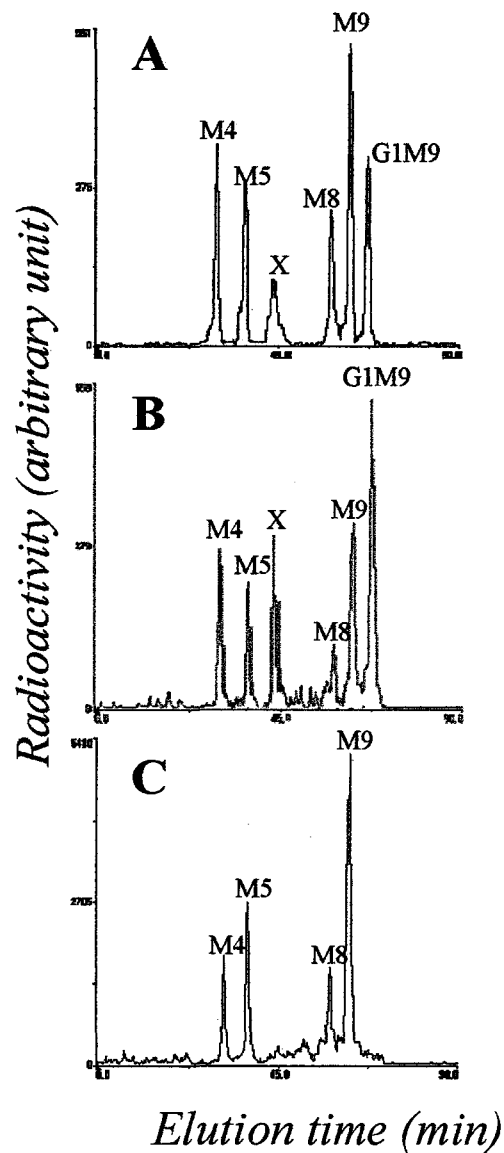


Figure 2: Reglucosylation of Man_5 - and $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ species in M18-5 cells.

M18-5 cells were preincubated during 20 min in the presence of 0.175 mM Glc and pulse-labeled with $[2\text{-}^3\text{H}]$ Man during 1 h without (Panel A) or with 100 $\mu\text{g/ml}$ castanospermine (Panel B). After incubation and sequential extraction, oligomannosides bound to glycoproteins were analyzed by HPLC as described in experimental procedures. Panel C displays the HPLC chromatogram of oligomannosides obtained after incubation with purified glucosidase II.

G1M9 indicates oligomannosides containing one glucose, nine mannose and two N-acetyl glucosamine residues. M4, M5, M8 and M9 indicate oligomannosides containing 4, 5, 8 and 9 mannose residues and two N-acetyl glucosamine residues, respectively. X indicates an unidentified peak.

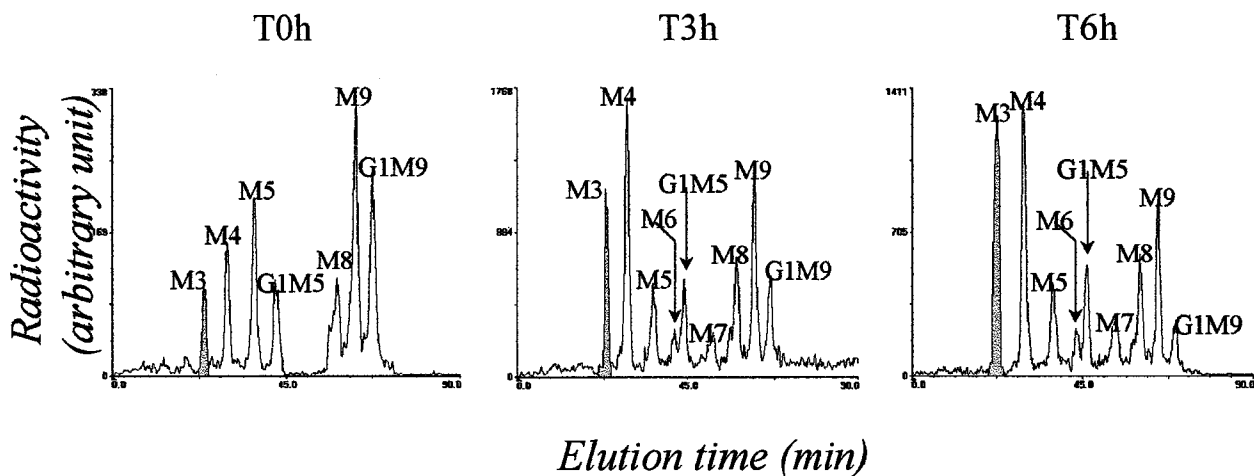


Figure 3: Evolution of Man₉ and Man₅ populations bound to proteins during a pulse-chase experiment.

M18-5 CHO cells were pulse labeled with [2-³H] Man for 1 h after 40 min of preincubation in 0.175 mM Glc (T0h) and chased in a culture medium containing 5mM Glc and 5mM Man during 3 and 6 h (T3h and T6h respectively). After the pulse and chase, cells were submitted to the sequential extraction procedure. Glycans were released from the glycoprotein fraction by the action of PNGase. Glycans were then analyzed by HPLC after mild acid treatment and sequential action of β-galactosidase and β-hexosaminidase as described under Experimental procedures section. M3,M4,M5,M6,M7,M8,M9 indicated digomannosides with 3,4,5,6,7,8 and 9 mannose residues and two N-acetyl glucosamine residues at the reducing end. G1M5 indicates oligomannosides with five mannose, two N-acetyl glucosamine at the reducing end and one glucose residues respectively. G1M9 indicates digomannosides with one glucose residue and nine mannose and two N-acetyl glucosamine residues at the reducing end.

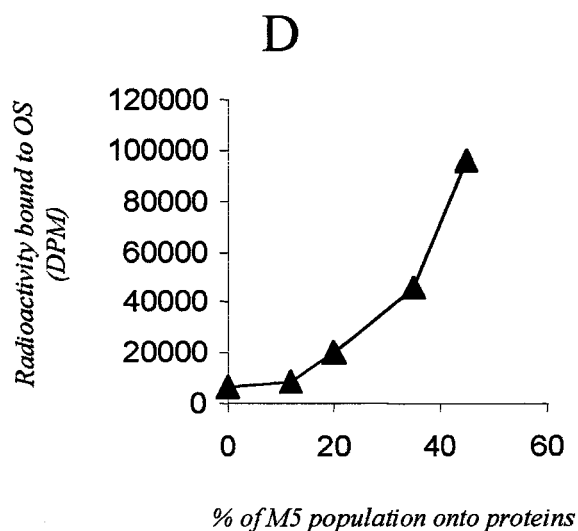
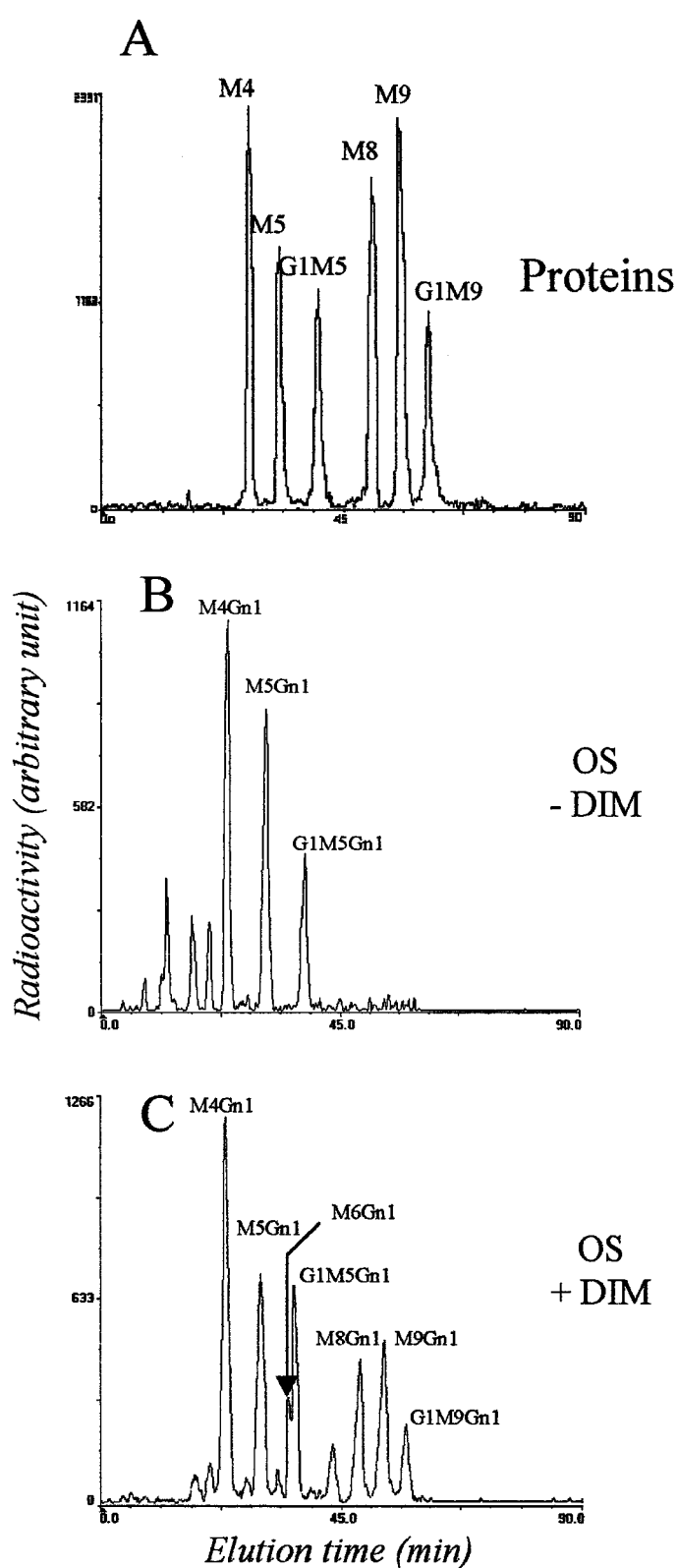


Figure 4: Pattern of oligomannosides released by MI8-5 CHO cells during the N-glycosylation process.

MI8-5 cells were pulsed for 1 h after 20 min preincubation in 0.175 mM Glc and chased for 1 h in a culture medium containing 5mM Glc and 5mM Man in the presence (Panel C) or in the absence of 1mM DIM (Panels A and B). Cells were then submitted to the sequential extraction procedure. Glycoproteins were extracted and glycans species were analyzed by HPLC (Panel A). The soluble oligomannoside material was purified and analyzed by HPLC in absence of DIM (Panel B) or in presence of DIM (Panel C). Panel D shows the relationship between the radioactivity bound to soluble oligomannoside material and the proportion of Mans species (Man⁺, Man⁻ and Glc:Man⁺GlcNAc₂) transferred onto glycoproteins. These various proportions were obtained by using different preincubation times in 0.175 mM Glc before the 1 h pulse (from 120 min preincubation for 0% Man⁵ species to 20 min preincubation for 50% Man⁵ species).

OS: Soluble Oligomannosides. M4, M5, M6, M7, M8, M9 indicated oligomannosides with 3, 4, 5, 6, 7, 8 and 9 mannose residues and two N-acetyl glucosamine residues at the reducing end. G1M5 indicates oligomannosides with five mannose, two N-acetyl glucosamine at the reducing end and one glucose residues respectively. G1M9 indicates oligomannosides with one glucose residue and nine mannose and two N-acetyl glucosamine residues at the reducing end. M4Gn1, M5Gn1, M6Gn1, M7Gn1, M8Gn1, and M9Gn1 indicated oligomannosides with 4, 5, 6, 7, 8, 9 mannose residues and one GlcNAc residue at the reducing end. G1M5Gn1 and G1M9Gn1 indicated oligomannosides with one glucose residue, five or nine mannose residues and one GlcNAc residue at the reducing end.

Discussion

Afin de comparer la dégradation des glycoprotéines portant une population glycanique à $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ et $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, nous avons généré au sein d'un même RE, des proportions variables de ces deux populations glycoprotéiques. En prenant comme témoin de la dégradation des glycoprotéines, les oligomannosides solubles (OS) retrouvés dans le cytoplasme, nous avons démontré que la population glycoprotéique à $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ était préférentiellement dégradée par rapport à celle à $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$.

Les oligosaccharides solubles, retrouvés dans le cytoplasme et possédant un seul résidu d'*N*-acétylglucosamine à leur extrémité réductrice (OSGn_1), peuvent avoir une double origine :

1- Ils peuvent être les produits de la

dégradation des glycoprotéines néosynthétisées par l'ERAD (Voie 1 de la figure 27).

2- Ils peuvent provenir de l'activité hydrolytique de l'oligosaccharyltransférase (Voie 2 de la figure 27).

Cette activité, qui génère au niveau de la lumière du RE, des OS possédant deux résidus d'*N*-acétylglucosamine à leur extrémité réductrice (OSGn_2), rejoignent le cytoplasme où ils sont transformés par l'activité chitobiase en OSGn_1 , se surajoutant ainsi à ceux issus de la dégradation des glycoprotéines (Kmiécik *et al.*, 1995 ; Moore *et al.*, 1995) (Figure 27).

Pour cette étude, afin de distinguer, la part respective du matériel oligosaccharidique soluble provenant de la dégradation de celle provenant du transfert sur l'eau, nous avons pris comme témoin de la

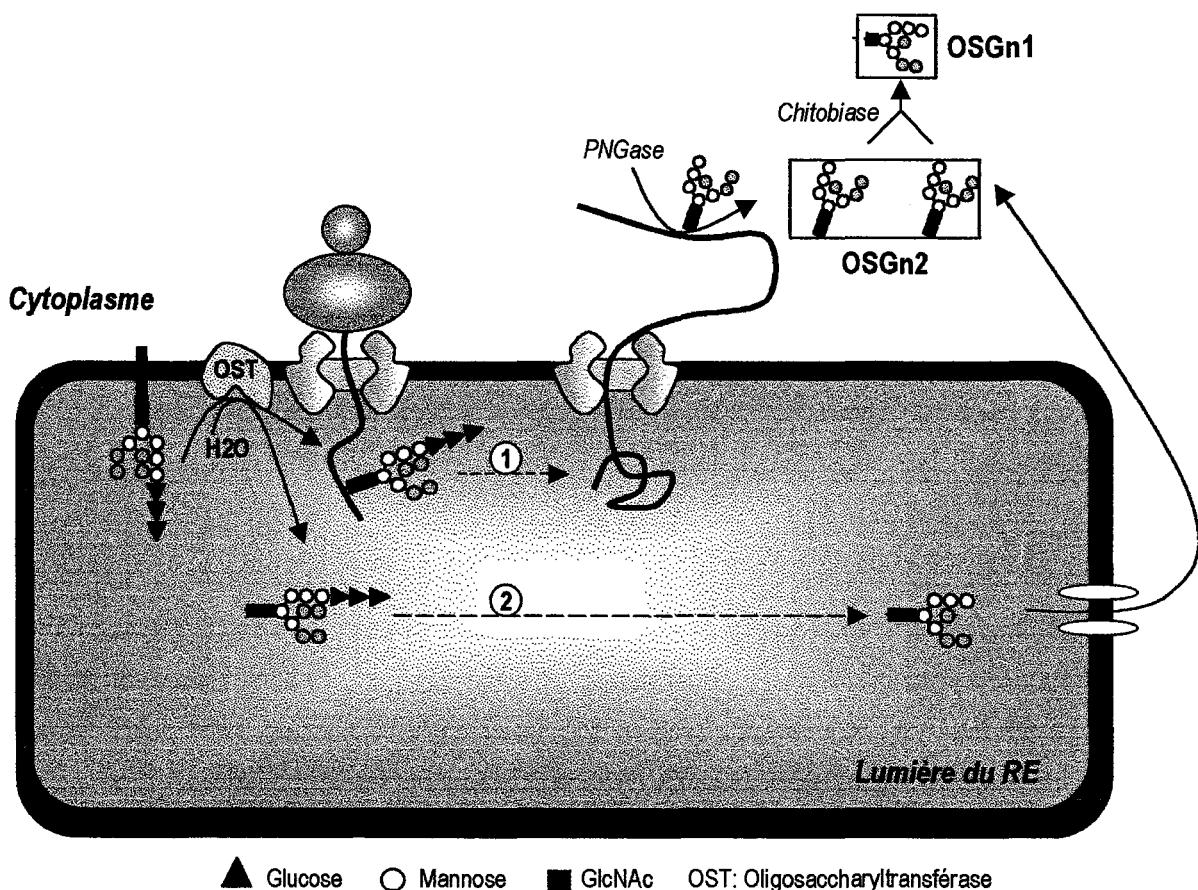


Figure 27: Double origine des OSGn_1 .

dégradation des glycoprotéines, les OS monoglucosylés. Etant donné que les cellules M18-5 sont déficientes en Glc-P-Dol transférase, ces espèces ne peuvent donc provenir que de la dégradation des glycoprotéines.

Pour étudier l'apparition d'oligomannosides solubles monoglucosylés, nous avons d'abord démontré que la population glycoprotéique à $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ pouvait aussi efficacement être reglucosylée que celle à $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (Article 1, figure 2), puis nous avons inhibé la mannosidase cytosolique par le DIM. Ainsi, dans ces conditions, l'analyse du matériel oligosaccharidique soluble nous a permis de montrer :

- ◆ que la population glycoprotéique à $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ est préférentiellement dégradée par rapport à celle à $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (le rapport $\text{Glc}_1\text{Man}_5/\text{Glc}_1\text{Man}_9$ étant plus élevé pour les produits de dégradation (OS) que pour les glycoprotéines),

- ◆ que les populations d'oligosaccharides solubles sont strictement identiques à celles retrouvées sur les glycoprotéines.

Ce dernier point, suggère fortement que la quasi totalité du matériel oligosaccharidique présent dans les cellules M18-5, provient de la dégradation cytosolique des glycoprotéines. Ceci a déjà été observé pour d'autres mutants de glycosylation transférant sur les protéines des glycanes tronqués (Duvet *et al.*, 1998). Compte tenu des connaissances actuelles concernant l'implication de la structure glycanique dans le processus de mise en conformation des glycoprotéines, il est concevable d'imaginer que la présence de glycanes tronqués puisse perturber l'étape de mise en conformation des glycoprotéines et favoriser ainsi le processus de dégradation des glycoprotéines *via* l'ERAD.

Si l'efficacité du contrôle qualité sur les glycoprotéines possédant des glycanes de type $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ est bien démontrée, l'efficacité du contrôle qualité sur des glycoprotéines portant des glycanes de type $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ reste encore très controversée.

1. Contrôle qualité des glycoprotéines portant des glycanes de type $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$

Afin de prouver que la population glycoprotéique à $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ pouvait subir un contrôle qualité efficace, nous avons cherché à démontrer les trois points suivants :

- ◆ la reglucosylation du $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ par l'UGGT,
- ◆ la déglucosylation du $\text{Glc}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$,
- ◆ l'association à la calnexine des glycoprotéines de type $\text{Glc}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$.

1.1 La reglucosylation

Dans l'article précédent, nos résultats ont montré que les glycoprotéines portant des glycanes tronqués de type $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, pouvaient subir l'action de l'UGGT, suggérant qu'*in vivo*, cette enzyme était aussi active sur la population glycoprotéique à $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ que sur celle à $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (Article 1, figure 2).

Pour étudier les deux points restants, nous avons utilisé les cellules B3F7 qui sont déficientes en Man-P-Dol synthase.

1.2 La déglucosylation

Afin de démontrer que l'étape de déglucosylation pouvait s'effectuer *in vivo*, nous avons réalisé, en utilisant les cellules B3F7, un marquage métabolique

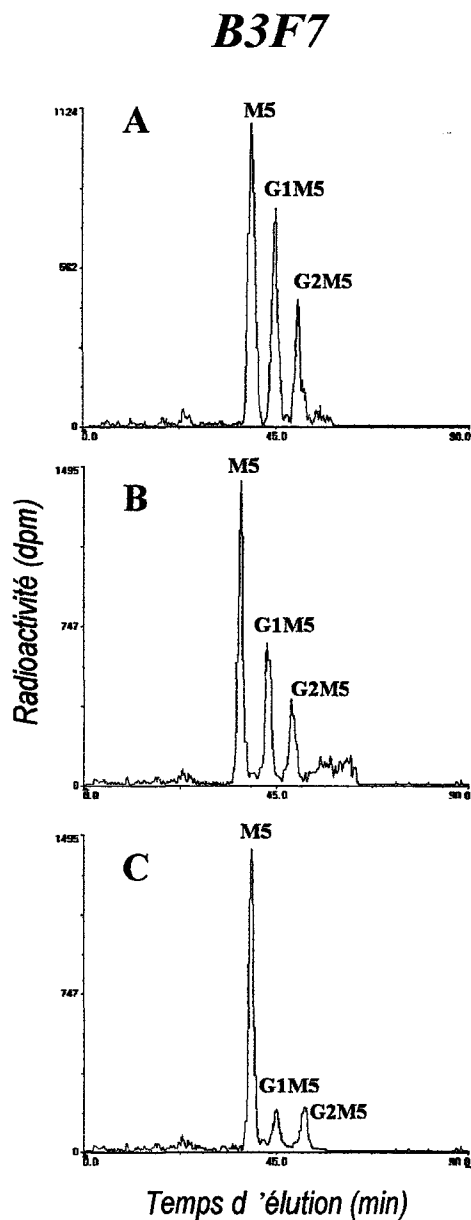


Figure 29: Déglucosylation de l'espèce $\text{Glc}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$

Après un marquage d'1h des cellules B3F7 au 2- ^3H Man en présence de 20 μM de kifunensine (Panel A), les cellules ont été ensuite perméabilisées avec la digitonine puis soumises à une expérience de chasse métabolique pour 30 min et 1h (Panels B et C). Après la perméabilisation, les différentes espèces oligosaccharidiques libérées des protéines ont été analysés par HPLC.

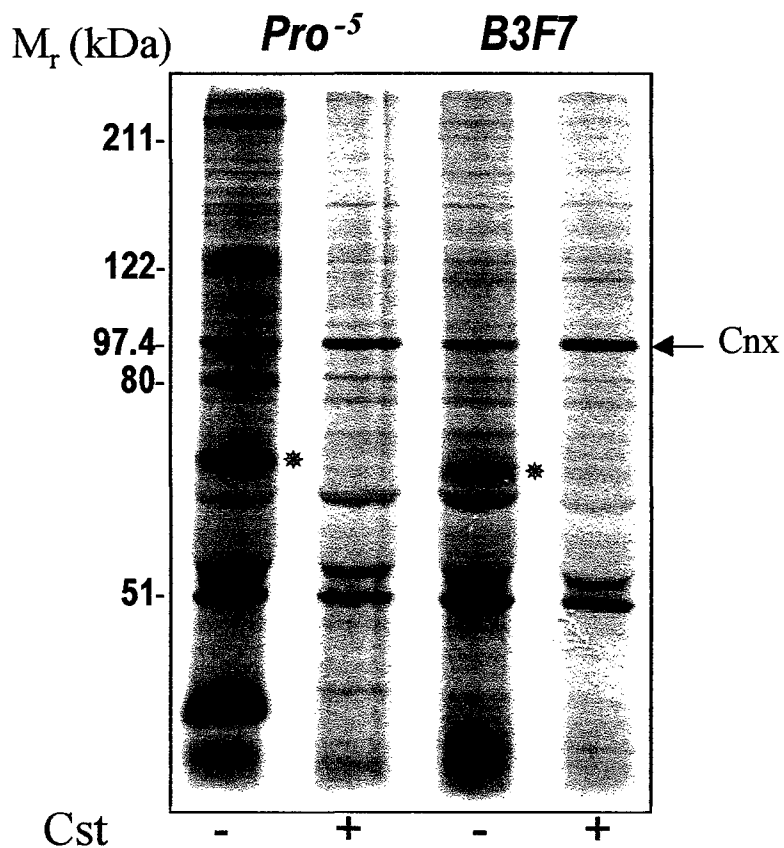


Figure 30: Association des glycoprotéines portant du *Glc1Man5GlcNAc2* avec la calnexine

Les cellules *Pro*⁻⁵ et *B3F7* sont marquées pendant 30 min avec 100 μ Ci/mL de [³⁵S]Met en présence et en absence de 100 μ g/mL de castanospermine. Après le marquage, les cellules sont lavées puis lysées. Le lysat est ensuite soumis à une immunoprécipitation avec un anticorps anti-calnexine. Les glycoprotéines marquées sont séparées par SDS-PAGE puis analysées à l'aide d'un Phosphor Imager.

* Glycoprotéine dont l'interaction avec la calnexine est inhibée en présence de castanospermine (Cst +).

d'une heure avec du mannose tritié en présence de kifunensine (un inhibiteur de mannosidases de classe I). Pour empêcher des interférences possibles avec le processus de dégradation ou de sécrétion, les cellules ont été perméabilisées par la digitonine afin de bloquer le trafic intracellulaire (Plutner *et al.*, 1992). Après le marquage suivi de la perméabilisation, une chasse a été réalisée pendant 30 et 60 minutes. Les glycanes liés aux glycoprotéines ont été analysés par HPLC. Les profils obtenus sont représentés dans la figure 28.

On observe très nettement, pendant la chasse, la déglucosylation des espèces $\text{Glc}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ et $\text{Glc}_2\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ produites durant le marquage. La radioactivité, liée aux espèces glucosylées est d'ailleurs entièrement retrouvée dans le $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, prouvant ainsi que les glycoprotéines portant des glycanes tronqués monoglucosylés peuvent, *in vivo*, être déglucosylés vraisemblablement par la glucosidase II.

1.3 L'association à la calnexine

Etant donné que l'étape de reglucosylation des glycoprotéines est intimement impliquée dans la reconnaissance par la calnexine, nous avons étudié, *in vivo*, l'association des glycoprotéines portant des glycanes monoglucosylés de type $\text{Glc}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ avec la calnexine, selon la méthode de Ou *et al.*, (1993). Pour cela, les cellules B3F7 et Pro⁻⁵ (cellules parentales des B3F7) ont été marquées pendant 30 minutes avec de la méthionine [³⁵S], après une préincubation de 12 heures en présence et en absence de 100µg/mL de castanospermine. Ensuite, le lysat cellulaire a été soumis à une immunoprécipitation avec des anticorps anti-calnexine. Les glycoprotéines marquées ont été séparées par SDS-PAGE, puis analysées par autoradiographie. L'autoradiogramme est représenté dans la figure 29.

Les résultats obtenus montrent ici que 70% de la radioactivité liée à la calnexine n'est pas retrouvée lorsque les cellules Pro⁻⁵ et B3F7 subissent une préincubation avec la castanospermine. Ceci suggère donc que les glycoprotéines portant des glycanes de type $\text{Glc}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ peuvent, *in vivo*, s'associer à la calnexine.

Ainsi, contrairement à ce qui était admis, nos résultats tendent à prouver que les glycoprotéines portant des glycanes tronqués de type $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ peuvent, au même titre que celles portant des glycanes de type $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, subir un véritable contrôle qualité, incluant un cycle de glucosylation-déglucosylation et une association à la calnexine.

Comme nous l'avons noté au cours des généralités, la présence de glycoprotéines portant des glycanes de type $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ active le premier niveau de l'UPR. Cependant, lorsque nous avons entrepris ces travaux, la relation entre la qualité du glycanne et l'activation de cette réponse n'était pas évidente chez les mammifères. C'est l'étude de l'UPR dans les cellules mutantes de glycosylation B3F7 qui nous a permis de préciser l'implication de la structure du glycanne dans le déclenchement de cette réponse. Cette étude a fait l'objet d'un article paru dans *Biochemical Journal* et intitulé : « **The unfolded protein response in a dolichyl phosphate mannose-deficient Chinese hamster ovary cell line points out the key role of a demannosylation step in the quality control mechanism of N-glycoproteins** ».

ARTICLE 2

The unfolded protein response in a dolichyl phosphate mannose-deficient Chinese hamster ovary cell line points out the key role of a demannosylation step in the quality control mechanism of N-glycoproteins.

FRANCOIS FOULQUIER, ANNE HARDUIN-LEPERS, SANDRINE DUVET, INGRID MARCHAL, ANNE-MARIE MIR, PHILIPPE DELANNOY, FREDERIC CHIRAT AND RENE CACAN

*Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, CNRS-UMR 8576, IFR 118, GDR CNRS 2590,
Université des Sciences et Technologies de Lille,
F-59655 Villeneuve d'Ascq*

Biochemical Journal (2002) 362, 491-498

Discussion

Au cours de ce travail, nous avons démontré que les cellules B3F7 étaient constitutivement en UPR et avons mis en évidence, l'implication d'une étape de démannosylation dans le contrôle qualité des glycoprotéines à $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$. L'hypothèse à laquelle nous arrivons est résumée dans la figure 30.

En absence de kifunensine (-Kif), l'action d'une $\alpha 1,2$ mannosidase de classe I génère une population glycoprotéique de type $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$, qui ne peut plus être glucosylée, et qui soustrait ainsi les glycoprotéines synthétisées au contrôle qualité. Le taux de glycoprotéines mal conformées va augmenter dans la lumière du RE, déclenchant ainsi la réponse UPR.

En présence de kifunensine (+Kif), l'inhibition de

cette mannosidase favorise le contrôle qualité des glycoprotéines ce qui entraîne une diminution de la proportion de glycoprotéines mal conformées au niveau de la lumière du RE, une diminution du niveau de l'UPR, ainsi qu'une augmentation de la sécrétion des glycoprotéines.

Dans cette étude, se pose donc la question de la nature de cette $\alpha 1,2$ -mannosidase de classe I. Potentiellement, trois mannosidases sont susceptibles de remplir cette fonction : la ER mannosidase I, la Man_9 -mannosidase et la mannosidase I golgienne. Etant donné, que la transformation $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ en $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$ est maintenue pour des glycoprotéines strictement résidentes de la lumière du RE, l'hypothèse de la mannosidase I golgienne semble peu probable (Duvet *et al.*, 2000).

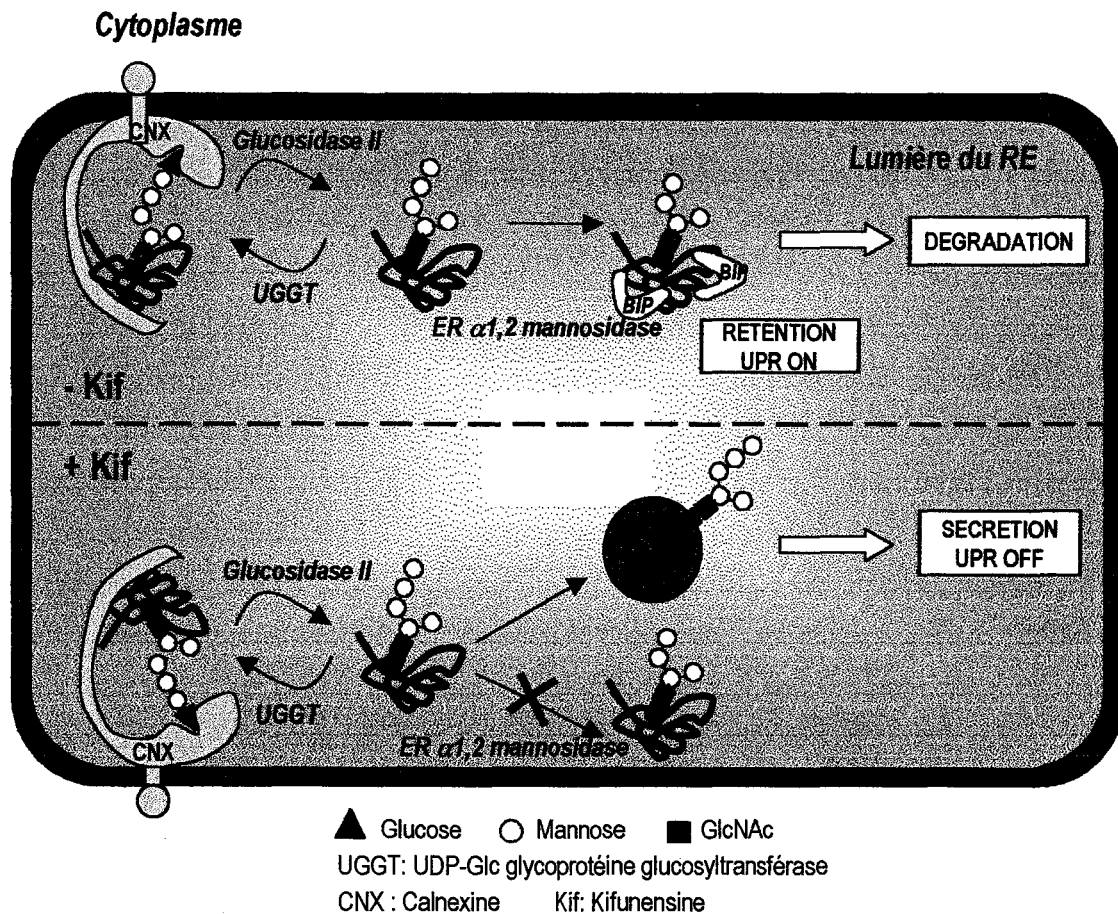


Figure 31: Rôle clé de l'étape de démannosylation dans l'activation de l'UPR dans les cellules B3F7.

The unfolded protein response in a dolichyl phosphate mannose-deficient Chinese hamster ovary cell line points out the key role of a demannosylation step in the quality-control mechanism of N-glycoproteins

François FOULQUIER, Anne HARDUIN-LEPERS, Sandrine DUVET, Ingrid MARCHAL, Anne Marie MIR, Philippe DELANNOY, Frédéric CHIRAT and René CACAN¹

Laboratoire de Chimie Biologique, CNRS-UMR 8576, Université des Sciences et Technologies de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cédex, France

The CHO (Chinese hamster ovary) glycosylation mutant cell line, B3F7, transfers the truncated glycan $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ on to nascent proteins. After deglycosylation, the resulting $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ glycan is subjected to two reciprocal enzymic processes: the action of an endoplasmic-reticulum (ER) kifunensine-sensitive α 1,2-mannosidase activity to yield a $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$ glycan, and the reglycosylation involved in the quality-control system which ensures that only correctly folded glycoproteins leave the ER. We show that the recombinant secreted alkaline phosphatase (SeAP) produced in stably transfected B3F7 cells, is co-immunoprecipitated with the GRP78 (glucose-regulated protein 78), a protein marker of the unfolded protein response

(UPR). The level of GRP78 transcription has been evaluated by reverse transcription-PCR (RT-PCR) and we demonstrate that B3F7 cells present a constitutively higher level of UPR in the absence of inductors, compared with Pro^{-5} cells. Interestingly, a decrease was observed in the UPR and an increase in SeAP secretion in the kifunensine-treated B3F7 cells. Altogether, these data highlight the relationships between the glycan structure, the quality control system and the UPR. Moreover, they support the idea that a specific demannosylation step is a key event of the glycoprotein quality control in B3F7 cells.

Key words: mannosidase activity, N-glycosylation.

INTRODUCTION

The normal process of N-glycosylation corresponds to the transfer *en bloc* of the $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ oligosaccharide chain on an asparagine residue of a nascent protein. This process takes place in the endoplasmic reticulum (ER) in which newly synthesized glycoproteins encounter a favourable folding environment, essential for the acquisition of their biological properties. This environment comprises enzymes [e.g. the peptidyl disulphide-isomerase (PDI)], molecular chaperones including GRP78 (glucose-regulated protein 78) and lectin-like chaperones such as calnexin (CNX) or calreticulin (CRT) [1]. Moreover, a quality-control system which ensures that only the correctly folded glycoproteins leave the ER is mediated by the soluble UDP-Glc: glycoprotein glucosyltransferase (UGGT) and glucosidase II, resident of the ER. This first enzyme recognizes hydrophobic patches on incorrectly folded or unassembled glycoproteins and, as a consequence, adds a glucose residue on the outermost mannose residue of the α 1,3 arm of oligomannoside glycans. Resulting monoglucosylated glycoproteins can then interact specifically with molecular chaperones CNX or CRT in a folding complex with ERp57 (a PDI-like protein) in order to correct their folding. The removal of the glucose residue by glucosidase II allows the release of glycoproteins from the folding complex. UGGT, which serves as a folding sensor, detects the still misfolded glycoproteins which undergo a new gluco-degluco cycle (for a review, see [2]). Finally, the glycoproteins that fail to acquire a correct folding are directed into the ER-associated degradation (ERAD) pathway [3]. An ER α 1,2-mannosidase, probably the ER mannosidase I, has been shown to play a

pivotal role in this pathway [4–7]. However, there is very little information concerning the relationships between the glycan structure, the quality-control system and the secretion of correctly folded glycoproteins [8].

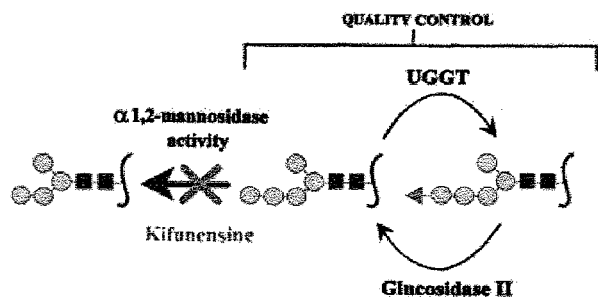
Accumulation of unfolded proteins in the ER lumen induces a specific response named UPR (unfolded protein response) [9]. This response leads to the transcriptional activation of numerous genes (more than 350 in yeast), most of which encode factors involved in the folding process, such as molecular chaperones or folding enzymes [10], and also in the ERAD process [11,12].

The relationships between the glycan structure and the UPR have been well documented in yeast. Indeed, it has been shown in some glycosylation mutants which transfer truncated glycans on to their nascent glycoproteins that an UPR was triggered in the absence of exogenous stimuli [13]. Conversely, direct relationships between glycan structure and UPR have never been demonstrated in mammalian cells, since the appearance of truncated glycan chains on glycoproteins was always the result of exogenous stimulations such as long-term glucose starvation, or the use of inhibitors of either glycosylation (tunicamycin) or glycan processing (e.g. castanospermine) [14].

In the dolichyl phosphate mannose (Dol-P-Man)-deficient Chinese hamster ovary (CHO) mutant cell line B3F7, a truncated $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ oligosaccharide is transferred on to nascent protein chains [15]. Indeed, the newly transferred $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ ($\text{Glc}\alpha$ 1-2 $\text{Glc}\alpha$ 1-3 $\text{Glc}\alpha$ 1-3 $\text{Man}\alpha$ 1-2 $\text{Man}\alpha$ 1-3 [$\text{Man}\alpha$ 1-6] $\text{Man}\beta$ 1-4 $\text{GlcNAc}\beta$ 1-4 GlcNAc) is rapidly trimmed by glucosidases I and II [16]. We have recently demonstrated that the generated $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ glycans can be either reglycosylated to yield $\text{Glc}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, which is able to interact

Abbreviations used: Ap-Ab, antiserum against human placental alkaline phosphatase; CHO, Chinese hamster ovary; CNX, calnexin; CRT, calreticulin; Dol-P-Man, dolichyl phosphate mannose; ER, endoplasmic reticulum; ERAD, endoplasmic-reticulum-associated degradation; GRP78, glucose-regulated protein 78; α -MEM, α -minimal essential medium; PDI, peptidyl disulphide-isomerase; PNGase F, peptide N-glycanase F; pNPP, p-nitrophenyl phosphate; PTA, phosphotungstic acid; SeAP, secreted alkaline phosphatase; UGGT, UDP-Glc: glycoprotein glucosyltransferase; UPR, unfolded protein response.

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



Scheme 1 Processing of oligomannoside bound to glycoproteins in B3F7 cells

In the Dol-P-Man-deficient CHO cell line B3F7, the truncated $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ oligosaccharide which is transferred *en bloc* on to nascent proteins is rapidly deglycosylated to yield the $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ glycan. This glycan structure undergoes two reciprocal enzymic actions: (i) the action of a kifunensine-sensitive ER $\alpha 1,2$ -mannosidase activity to generate the $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$ glycan which cannot be further reglycosylated, and (ii) the reglycosylation by the UGGT to generate $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ glycans involved in the quality control system. (■, GlcNAc; ●, Man; ◀, Glc and UGGT).

with calnexin [17,18], or are the substrate of a kifunensine-sensitive ER $\alpha 1,2$ -mannosidase activity yielding $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$ glycans, unable to be reglycosylated [19] (see Scheme 1).

In the present paper we show that, in these glycosylation mutant CHO B3F7 cells, the UPR is constitutively activated compared with the parental CHO cell line, Pro⁻⁵. More interestingly, we demonstrate that, in kifunensine-treated B3F7 cells, the level of the UPR was decreased and the secretion of glycoproteins increased.

EXPERIMENTAL

Materials

[2-³H]Mannose (429 GBq/mmol) and radioactive [³⁵S]Met/Cys mixture (Promix; 37 TBq/ml, 1000 Ci/mol) were from Amersham (Little Chalfont, Bucks., U.K.). Trypsin and p-nitrophenyl phosphate tablets (pNPP) were from Sigma. Peptide N-glycanase F (PNGase F) was from New England Biolabs, Beverly, MA, U.S.A., Kifunensine was from ICN, Orsay, France, and protease-inhibitor-cocktail tablets were from Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany and the $\alpha 1,2$ -mannosidase (from *Aspergillus saitoi*) was from Glyko, Novato, CA, U.S.A. Promega, Charbonnière-les-bains, France, supplied dNTPs. Polyclonal anti-serum against human placental alkaline phosphatase (AP-Ab) was purchased from Dako, Glostrup, Denmark, and was coupled directly to Protein A-Sepharose CL4B beads (Pharmacia). Polyclonal antibody against GRP78 was from Stressgen, Biotechnologies Corp., Victoria, BC, Canada. Goat anti-rabbit IgG conjugated to horseradish peroxidase was from Dako, Glostrup, Denmark. Hi-Taq DNA polymerase and RNeasy Mini Kit were from Qiagen GmbH, Hilden, Germany, and First-strand cDNA synthesis kit was from Amersham Pharmacia Biotech. The oligonucleotide primers were synthesized and purified from Eurogentec, Liège, Belgium.

Cell culture

The Dol-P-Man synthase-deficient mutant CHO cell line (B3F7), derived from parental Pro⁻⁵ (proline auxotroph) CHO cell line was a gift from Dr S. S. Krag (Biochemistry Department, School of Hygiene and Public Health, Johns Hopkins University,

Baltimore, U.S.A.). The AP2-1 cell line was derived from the B3F7 cell line, which was stably transfected by electroporation with plasmid pBC12RSVSeAP encoding a secreted truncated form of human placental alkaline phosphatase (SeAP) [18]. The MadIA214 cell line was a gift from Dr Myriam Ermonval (Institut Pasteur, Paris, France), the Mi8-5 cell line was a gift of Dr S. S. Krag and the Lec23 cell line was a gift from Dr Pamela Stanley (Department of Cell Biology, Albert Einstein College of Medicine, New York, U.S.A.). All these cell lines were grown in the α -minimal essential medium (α -MEM) (Gibco BRL) supplemented with 10% (v/v) fetal-calf serum, at 34 °C under 5% CO₂.

Protein labelling, immunoprecipitation and gel electrophoresis

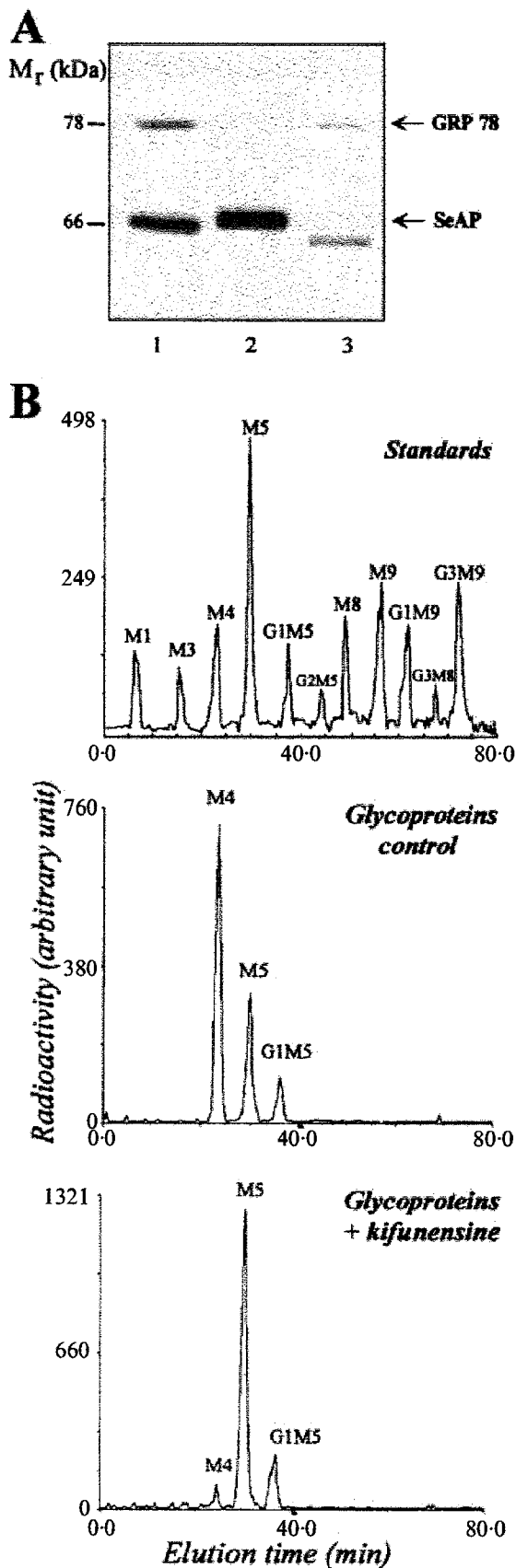
Cells (2.5×10^5 per 35 mm-diameter dish) were cultured overnight at 34 °C. Following a pre-incubation period of 45 min in a methionine/cysteine-free medium, cells were pulsed for 30 min with 100 $\mu\text{Ci/ml}$ (0.1 μM) of [³⁵S]Met/Cys. After 2 h of chase in 500 μl of cell culture medium containing unlabelled methionine and cysteine to a final concentration of 14 mg/l and 100 mg/l respectively, supernatant was removed and cells were lysed in NET buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, pH 7.4, 5 mM EDTA and 1% Triton X-100). Cell extracts were then immunoprecipitated for 30 min at 4 °C using 50 μl of anti-AP-Ab solution previously mixed with 50 μl of Protein A-Sepharose CL-4B beads. After incubation for 1 h at 4 °C, beads were washed four times with 1 ml of NET buffer containing 0.5 M NaCl followed by two washes with a 40 mM Hepes buffer (pH 7.4) prior to SDS/PAGE analysis. For this purpose, immunoprecipitates were boiled in 25 μl of 10% SDS/1 M 2-mercaptoethanol/25 mM Tris/HCl, pH 8.0, buffer solution and subjected to SDS/PAGE for 4 h. Hyperfilms (Amersham) were used for autoradiography of intensified gels. Unless otherwise indicated, an inhibitor of glycan processing, kifunensine, at a final concentration of 20 μM , was added 45 min before pulse-labelling and throughout the labelling and chase period.

Metabolic labelling of oligosaccharides and chase experiments

For this purpose, B3F7 cells were routinely grown in 10 cm-diameter Petri dishes. Cells were metabolically labelled for 1 h with 100 $\mu\text{Ci/ml}$ (4 μM) of [2-³H]mannose in the culture medium containing 5 mM glucose. For chase experiments, the radioactive culture medium was replaced by the α -MEM supplemented with 5 mM mannose. When used, kifunensine was present throughout the experiment (preincubation, pulse and chase) at a final concentration of 20 μM . Sequential extraction and purification of oligosaccharide materials were achieved as previously described [20].

Analysis of oligosaccharide material

The glycoprotein fraction obtained at the end of the sequential extraction was digested with trypsin (1 mg/ml) in 0.1 M ammonium bicarbonate buffer, pH 7.9, overnight at room temperature. Glycopeptides were then treated with 0.5 unit of peptide-N-glycanase F (PNGase F) in a 50 mM phosphate buffer, pH 7.2, for 4 h to release oligosaccharides, which were subsequently desalted on a Bio-Gel P2-size exclusion chromatography column eluted with a 5% (v/v) acetic acid solution. Then they were fractionated by HPLC (apparatus from Spectra-Physics GmbH, Darmstadt, Germany) 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 to 50:50 (v/v) at a flow rate of 1 ml/min over 80 min. Oligomanno-



sides were identified on the basis of their retention times compared with well-defined standards. Standard oligomannosides with two GlcNAc residues at their reducing end were obtained after PNGase F digestion of glycoprotein fractions from cells labelled with $[2\text{-}^3\text{H}]\text{mannose}$. $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ was obtained from SF9 (*Spodoptera frugiperda*) insect cells [21], $\text{Man}_1\text{GlcNAc}_2$ was isolated after extensive digestion of $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ with jack-bean (*Canavalia ensiformis*) mannosidase according to [21]. $\text{Man}_1\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_2\text{GlcNAc}_2$, and $\text{Glc}_{1,2}\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ were obtained after incubation of Lec 15 CHO cells as described in [19]. $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_2\text{GlcNAc}_2$, and $\text{Glc}_1\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ were obtained from Mi8-5 cells [22]. $\text{Glc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ and $\text{Glc}_3\text{Man}_2\text{GlcNAc}_2$ were obtained from Lec23 CHO cells [23]. Elution of the radiolabelled oligosaccharides was monitored by continuous-flow detection of the radioactivity with a Flo-One β Detector (Packard, Rungis Cedex, France).

Western blot analysis of the GRP78

At confluence, the B3F7 and Pro⁻⁵ cells were lysed in the lysis buffer (Tris/HCl, pH 7.5, and 1% Triton X-100) and protein concentration was measured using the BCA (bicinchoninic acid) Kit (Interchim, Montluçon, France). A 20 μg portion of protein per lane was loaded on to SDS/PAGE gels. After the gel run was complete, proteins were electrotransferred to nitrocellulose and visualized by Ponceau Red staining (Sigma). The nitrocellulose membranes were blocked in 2% gelatin (Sigma) in TBS buffer (15 mM Tris/HCl, pH 8, 140 mM NaCl and 0.05% Tween 20). The proteins were detected by using the polyclonal anti-GRP78 antibody as the primary antibody (1/500 in TBS buffer) and a goat anti-rabbit IgG conjugated to horseradish peroxidase (1:1000 in TBS buffer). The immunoreactive bands were detected by chemiluminescence using an ECL[®] (enhanced chemiluminescence) kit from Amersham Pharmacia (Uppsala, Sweden).

Quantification of secreted glycoproteins

B3F7 cells were pulsed for 30 min with 100 $\mu\text{Ci/ml}$ (0.1 μM) of $[^35\text{S}]\text{Met/Cys}$ following a pre-incubation for 15 h in the absence or presence of 20 μM kifunensine. Cells were then chased for 6 h and, every hour, culture medium was precipitated by 0.6% phosphotungstic acid (PTA) in 12% (v/v) trichloroacetic acid. After 30 min at 4 °C, precipitates were recovered on a glass filter, and successively washed with 10% trichloroacetic acid, water and ethanol. Filters were then dried and counted for radioactivity by liquid scintillation using a Beckman scintillation counter. The enzymic activity of SeAP was determined as previously described [24].

Figure 1 Effect of kifunensine on the processing of glycoproteins in B3F7 cells

(A) AP2-1 cells were pulse-labelled for 15 min with $[^35\text{S}]\text{Met/Cys}$ mixture and chased for 2 h with unlabelled amino acids without (lane 1) or with 20 μM kifunensine (lane 2). At the end of the chase period, cells were lysed in a total volume of 200 μl and the SeAP was immunoprecipitated. In lane 3, a mixture of immunoprecipitated SeAP synthesized in the presence or the absence of kifunensine was pooled, and digested by $\alpha 1,2$ -mannosidase (*A. saitoi*) prior to analysis by SDS/PAGE and autoradiography. (B) AP2-1 was pulse-labelled for 1 h with $[2\text{-}^3\text{H}]\text{mannose}$ and chased for 2 h in the presence or in the absence of 20 μM kifunensine. Glycoproteins were extracted and the N-glycan species were released with the PNGase F prior to being analysed by HPLC as described in the Experimental section. Oligomannosides were identified on the basis of their retention times compared with standards. M1, M3, M4, M5 and G1M5, G2M5 correspond to $\text{Man}_1\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_2\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_2\text{GlcNAc}_2$, $\text{Glc}_1\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ and $\text{Glc}_2\text{Man}_2\text{GlcNAc}_2$, respectively. M8, M9, G1M9, G3M8 and G3M9 correspond to $\text{Man}_2\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, $\text{Glc}_1\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, $\text{Glc}_3\text{Man}_2\text{GlcNAc}_2$ and $\text{Glc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, respectively.

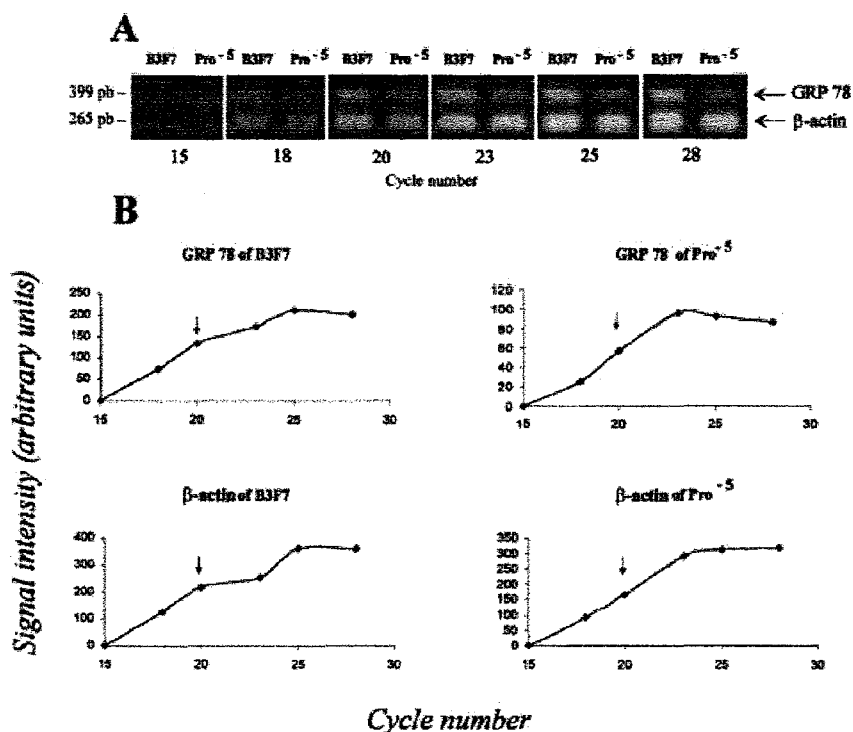


Figure 2 Kinetics of the PCR amplification of GRP78 and β -actin mRNAs isolated from B3F7 and Pro⁻⁵ cells

For each experiment, the PCR products obtained as described in the Experimental section were run on a 1% agarose gel, stained with ethidium bromide (A) and quantified (B). Arrows indicate the cycle number chosen for relative quantitative RT-PCR (20 cycles for GRP78 and β -actin).

RNA extraction, cDNA synthesis and reverse transcription-PCR (RT-PCR)

Total RNA was extracted from B3F7 or Pro⁻⁵ cells using the RNeasy Mini Kit and quantified by spectrophotometry at 260 nm.

Total cellular RNA (5 μ g) was denatured at 65 °C for 10 min and placed on ice for 2 min. RT into cDNA was achieved using the First-Strand cDNA Synthesis kit, according to the manufacturer's protocol. Oligonucleotide primer pairs corresponding to *Cricetulus griseus* GRP78 and β -actin nucleotide sequences found in a public domain database (Genbank[®] accession number M97169 and U20114 respectively) were designed for the specific PCR amplification of two cDNA fragments of 399 bp and 265 bp respectively. In addition, these primers were designed such that they could be used under identical PCR conditions [i.e. similar GC content and T^m (melting temperature) values]. Of each primer (GRP78 sense primer 5'-CGCCTCATCGG-ACGCACTTG-3', GRP78 antisense 5'-AGGTTCCACCGCC-CAGGTCA-3', β -actin sense 5'-GGCCGTCTCCCATCCA-TCG-3', β -actin antisense 5'-CACCCCTTGGCCTTGGGGTTC-3') 150 pmol was combined with 0.7 unit of Hi-Taq DNA polymerase, 100 μ M dNTPs, in the Hi-Taq DNA polymerase buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris/HCl, pH 9, 0.1% TritonX-100, 2.5 mM MgCl₂ and 150 ng of the first-strand cDNA) in a 50 μ l reaction volume. PCR was performed as follows: after 1.5 min of a denaturation step at 95 °C, a variable number of cycles were achieved at 93 °C for 30 s, 66 °C for 30 s and 72 °C for 45 s, followed by a 10 min extension step at 72 °C. In all experiments,

negative control reactions were done in which cDNA templates were replaced with sterile water. A 10 μ l portion of amplification products were size-separated on a 1% agarose gel containing ethidium bromide, visualized under UV light, photographed using Polaroid film and analysed using Quantiscan Software (Bio-Rad, Hemel Hempstead, Herts., U.K.).

RESULTS

Processing of glycoproteins in B3F7 cells

In order to study the role of the kifunensine-sensitive α 1,2-mannosidase activity in the *N*-glycosylation process of B3F7 cells, a reporter recombinant glycoprotein SeAP, stably expressed in these cells (named AP2-1), was used as a model. As observed in Figure 1(A), the electrophoretic mobility study of intracellular SeAP in the absence or presence of kifunensine shows that, in the control (lane 1), SeAP migrates as a single band (approx. 66 kDa) whereas, when cells were treated with 20 μ M kifunensine, the migration was slightly reduced (lane 2). To analyse the oligomannosides bound to proteins, AP2-1 cells were pulse-labelled with [2-³H]mannose as described in the Experimental section and chased for 2 h. HPLC analysis (Figure 1B) reveals a major peak of Man₅GlcNAc₂ in the presence of kifunensine compared with the control incubation, for which the major peak was represented by Man₄GlcNAc₂ species.

A mixture of control SeAP bearing Man₅GlcNAc₂ species plus SeAP synthesized in the presence of kifunensine-bearing Man₃GlcNAc₂ species was treated *in vitro* with the α 1,2-manno-

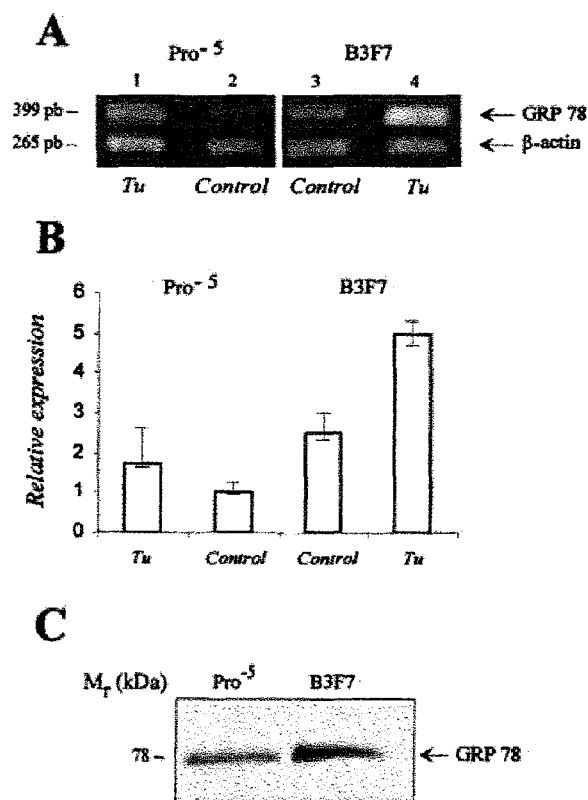


Figure 3 Transcriptional and transductional levels of GRP78 expression in B3F7 cells are higher than those in the parental Pro⁻⁵ cells

(A) Multiplex RT-PCR analysis of GRP78 and β -actin mRNA expression in B3F7 and Pro⁻⁵ cells cultured under physiological conditions in the absence (-) or in the presence (+) of 10 μ g/ml of tunicamycin (Tu) during 8 h. RNA was then extracted and amplified by 20 cycles of PCR. (B) Signals obtained from three separate experiments were integrated by Quantiscan software. The relative GRP78 level is expressed as the ratio of the densitometric data GRP78/ β -actin, which is arbitrarily set to 1 in the Pro⁻⁵ cells treated in the absence of tunicamycin. (C) Western-blotting analysis of GRP78 protein after electrophoresis of 20 μ g of protein of B3F7 and Pro⁻⁵ cells respectively as described in the Experimental section.

sidase from *A. saitoi*. As shown in Figure 1A (lane 3), autoradiography revealed a single band with a higher electrophoretic mobility. As already demonstrated [19], this treatment led to the formation of Man₅GlcNAc₂ glycans from both Man₅GlcNAc₂ and Man₄GlcNAc₂ species. This result allowed us to conclude that, indeed, the difference in the electrophoretic migration previously observed between lane 1 and 2 was due to the loss of one α 1,2-linked mannose residue. Altogether, these data indicated that, after 2 h chase, the oligomannoside species bound to SeAP were mainly Man₄GlcNAc₂.

Interestingly, the electrophoregram (Figure 1A, lane 1) also revealed that SeAP was co-immunoprecipitated with a protein with an apparent molecular mass of 78 kDa which has been clearly identified as the GRP78 [18,24]. Moreover, this co-immunoprecipitation was not observed when cells were incubated in the presence of kifunensine (Figure 1A, lane 2). Since it is well established that the GRP78 is one of the major molecular chaperones produced during the UPR [25], we decided to examine first the level of UPR in B3F7 cells and to compare it with that of parental Pro⁻⁵ cells and then the consequence of the inhibition of the mannose trimming on this response.

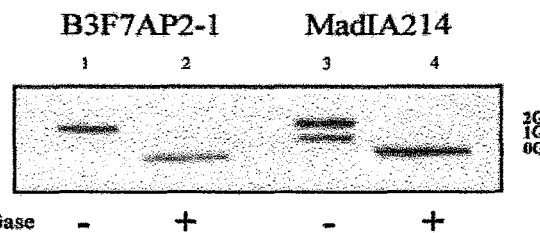


Figure 4 Newly synthesized glycoproteins in B3F7 are not underglycosylated

AP2-1 cells (lane 1 and 2) and MadIA214 cells (lanes 3 and 4) were metabolically labelled with [³⁵S]Met/Cys amino acids for 15 min. After cell lysis with 1% Triton, the total SeAP was immunoprecipitated from the cell lysates, digested with (lane 2 and 4) or without (lane 1 and 3) PNGase F and analysed using SDS/10%-PAGE. OG, 1G and 2G correspond to non-, mono- and diglycosylated forms of SeAP respectively.

The UPR occurs in B3F7 cells at a higher level than in the parental Pro⁻⁵ cells

The expression of GRP78 mRNA was estimated in B3F7 cells by semi-quantitative RT-PCR [26] and compared with that of the parental Pro⁻⁵ cells. The optimal number of PCR cycles was determined in order to work in the linear phase of amplification. To avoid variation from one tube to another, the amplification of GRP78 mRNA was simultaneously carried out with that of β -actin mRNA used as an internal control. Electrophoregrams (Figure 2A) and densitometry graphs (Figure 2B) indicate that the optimum number of cycles for GRP78 and β -actin PCR co-amplification ranged from 18 to 23 cycles. Thus 20 PCR cycles were chosen. Under these conditions it clearly appears that the expression level of GRP78 mRNA is higher in B3F7 cells than that observed in Pro⁻⁵ cells (compare Figure 3A, lanes 2 and 3). On the basis of β -actin level, densitometric analysis revealed that the expression of GRP78 in B3F7 cells was 2.5-fold higher compared with that in Pro⁻⁵ cells (Figure 3B, control). As a positive control, the two cell lines were treated for 8 h with tunicamycin, which is known to trigger a strong UPR. Figure 3A (lanes 1 and 4) shows that, in both cell lines, a high transcription level of GRP78 was induced by this inhibitor (a 2-fold increase compared with the basal level in both cell lines; Figure 3B).

Taken together, these results indicate that the UPR pathway was constitutively higher in the Man-P-Dol synthase-deficient cell line B3F7, in the absence of exogenous stimulation. The fact that this transcriptional response was accompanied by an increase of protein synthesis was demonstrated by Western blotting using a polyclonal GRP78-specific antibody. Figure 3(C) shows an increase of GRP78 protein in B3F7 cells compared with Pro⁻⁵ cells. The densitometric analysis revealed that the expression of GRP78 protein in B3F7 cells is 2-fold higher compared with that in Pro⁻⁵ cells.

Glycoproteins synthesised in B3F7 cells are not underglycosylated

The increase of UPR observed in B3F7 cells reflects an increase in misfolded newly synthesized glycoproteins. In our case, this response could be explained either by the influence of truncated glycans on the protein folding process, or by an underglycosylation due to a lower affinity of the oligosaccharyltransferase for truncated oligosaccharides, as already reported for MadIA214 cell line, another glycosylation mutant which transfers only non-glycosylated Man₃GlcNAc₂ glycans [24]. To verify that glycoproteins

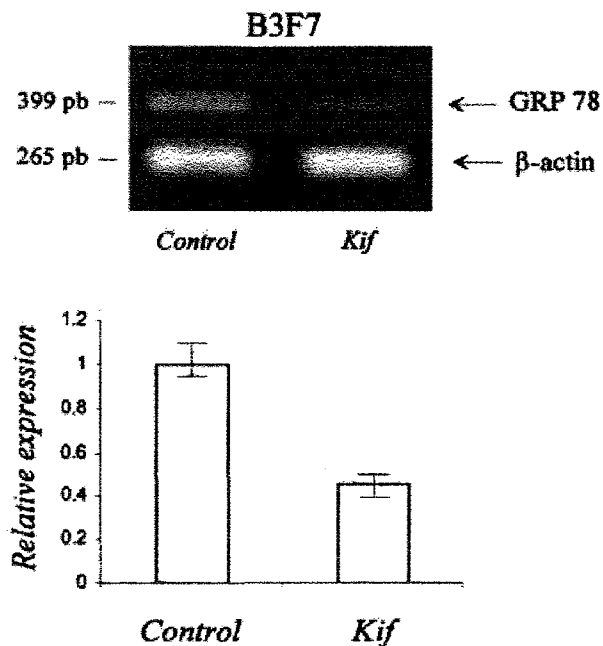


Figure 5 Action of kifunensine on GRP78 mRNA expression in B3F7 cells

(A) The B3F7 cells were incubated in the absence (Control) or in the presence of 20 μ M kifunensine for 15 h. Total RNA was extracted and amplified by 20 cycles of relative quantitative RT-PCR. The PCR products were run on 1% agarose gel, ethidium bromide-stained and signals obtained from three individual experiments were integrated by Quantiscan Software. (B) The transcription level of GRP78 mRNA was established as described in Figure 3. The densitometric data GRP78/ β -actin was arbitrarily set to 1 in the B3F7 cells treated in the absence of kifunensine.

teins are not underglycosylated, we used SeAP, which possesses two *N*-glycosylation sites. The intracellular SeAP was then immunoprecipitated after a 15 min pulse in the presence of [35 S] Met/Cys, and analysed by SDS/PAGE. In contrast with the two bands of SeAP produced in MadIA214 (Figure 4, lane 3), which corresponds to the two glycoforms with one and two glycans respectively [18], SeAP produced by AP2-1 cells revealed only one band, corresponding to the fully glycosylated glycoproteins (Figure 4, lane 1). To verify that all these bands corresponded to different extents of glycosylation, immunoprecipitated SeAP produced in both AP2-1 and MadIA214 cells was treated with PNGase F prior to the analysis by SDS/PAGE. In both cases (Figure 4, lanes 2 and 4), the resulting SeAP molecules exhibit an identical electrophoretic mobility in accordance with the lack of their glycan chains.

Kifunensine decreases the UPR and increases the secretion of SeAP in B3F7 cells

As depicted in Figure 1(A), lane 2, GRP78 did not co-immunoprecipitate with SeAP when cells were treated with kifunensine. To ascertain whether this absence was due to a decrease in UPR, B3F7 cells were cultured for 15 h with 5 mM glucose in the absence or presence of kifunensine, and the level of GRP78 mRNA was analysed using the RT-PCR technique previously described. As shown in Figure 5, GRP78 transcript expression was lower in kifunensine-treated cells. Densitometric analysis indicates a 2.5-fold decrease of GRP78 mRNA in the presence of 20 μ M kifunensine. This effect was not detectable in the parental

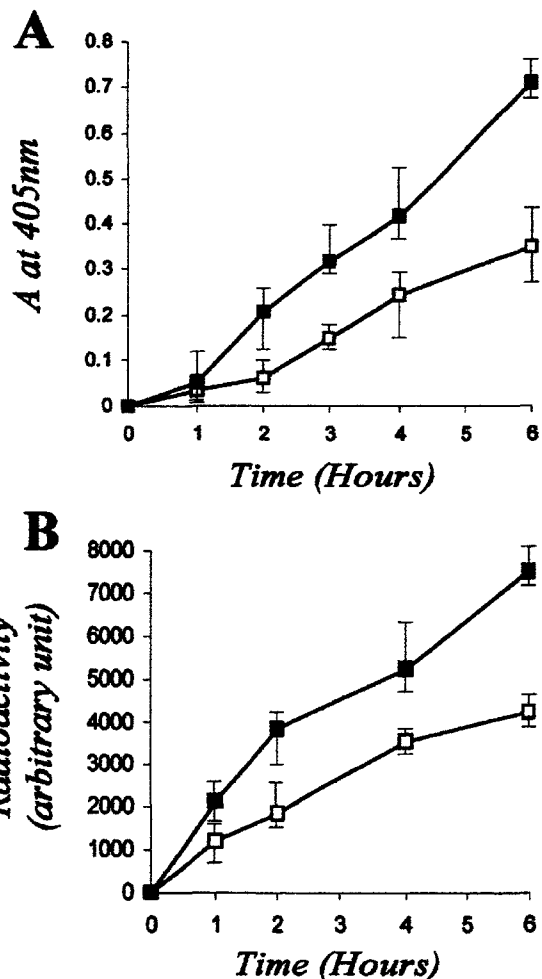


Figure 6 Effect of kifunensine on the SeAP secretion

(A) AP2-1 cells were preincubated for 15 h in α -MEM culture medium in the absence (\square) or presence (\blacksquare) of 20 μ M kifunensine. Culture medium was then recovered at various times to determine the enzymic activity of the secreted SeAP. (B) AP2-1 cells were preincubated for 15 h in α -MEM culture medium in the absence (\square) or presence (\blacksquare) of 20 μ M kifunensine and metabolically labelled with [35 S]Met/Cys amino acids for 15 min. Culture media were recovered and the protein material was precipitated by 1 ml of a mixture of 0.6% PTA in 12% (v/v) trichloroacetic acid. Radioactivity associated with each precipitate was then counted by liquid scintillation.

Pro $^{-5}$ cells (results not shown). This result strongly suggests that the inhibition of ER α 1,2-mannosidase activity by kifunensine leads to a decrease in the ER pool of misfolded glycoproteins, as reflected in the decrease of the UPR.

We thus decided to monitor the secretion of SeAP in the presence or absence of kifunensine. For this purpose, the SeAP secreted in the culture medium was determined both by measuring enzymic activity (Figure 6A), and the level of 35 S radioactivity associated to acid-precipitated glycoproteins (Figure 6B) in which the SeAP was found to represent approx. 90% of the bulk of secreted glycoproteins (results not shown). In both cases, it clearly appears that the secretion of SeAP is enhanced when B3F7 cells are pre-incubated with kifunensine.

Altogether, these results reveal that, in addition to a decrease of the UPR, the kifunensine treatment leads to an increase in the secretion of glycoproteins in the B3F7 cells.

DISCUSSION

The fate of newly synthesized glycoproteins is under the control of two different processes in wild-type cells. The first one concerns the cleavage of α 1,2-linked mannose residue and the second one involves the so-called gluco-degluco cycle, which allows mono-glucosylated glycoproteins to transiently interact with lectin-like chaperone molecules CNX or CRT for efficient folding [27]. In wild-type cells, the two above-described processes can occur concomitantly, since Man₅ to Man₇ oligomannoside species can be reglucosylated [28]. In contrast, compared with the wild-type cells, the B3F7 cell model is much simpler, since the glycans can be the substrate of a kifunensine-sensitive α 1,2-mannosidase activity, leading to a unique Man₄ isomer which cannot be further reglucosylated. Therefore, demannosylation and gluco-sylation in these cells appear to be two reciprocal processes. The key point of the quality control of *N*-glycoproteins in mammalian cells is the detection of unfolded glycoproteins by an enzyme, UGGT, or molecular chaperones such as GRP78 [29]. In the present study, we used the UPR to assess the folding state of proteins in the ER lumen. This response activates the transcription of several genes, particularly that of GRP78. Thus we monitored the level of GRP78 mRNA by a semi-quantitative RT-PCR technique. Compared with β -actin used as an internal standard, we demonstrated that the level of transcription of GRP78 was approx. 2.5-fold higher in B3F7 than in the parental Pro⁻⁵ cells. Furthermore we demonstrated, using Western blotting, that GRP78 protein was 2-fold more expressed in B3F7 than in Pro⁻⁵ cells. To our knowledge, this is the first observation in mammalian cells of a spontaneous UPR without external stress such as glucose starvation or use of drugs interfering with either the glycosylation process or the glycan processing.

The defect in glycoprotein folding could be induced by three parameters: (i) underglycosylation due to the presence of truncated oligosaccharide lipid donor, (ii) a local effect of the truncated glycan on the protein backbone itself or (iii) the efficient action of the ER α 1,2 kifunensine-sensitive mannosidase activity, thus preventing further glucosylation needed for efficient folding via interaction with CNX or CRT. We clearly demonstrated that glycoproteins synthesized in B3F7 cells are not underglycosylated, in contrast with those observed in a similar glycosylation mutant MadIA214 (transferring only non-glucosylated Man₅GlcNAc₂ glycans), for which a strong underglycosylation has been demonstrated [18,24]. The question was whether the high level of misfolded glycoproteins in B3F7 is due to the truncated nature of oligosaccharide bound to proteins or the appearance of Man₄GlcNAc₂ species. The results obtained in the present study show that, when the transformation of Man₅GlcNAc₂ to Man₄GlcNAc₂ is prevented, a decrease in the level of misfolded glycoproteins is observed as reflected by the decrease of UPR. In this glycosylation mutant cell line B3F7, we propose that the formation of Man₄GlcNAc₂ oligomannoside species, which cannot be further reglucosylated, prevents numerous glycoproteins from entering the gluco-degluco cycle. This was supported by two observations: first, we showed that the Man₄GlcNAc₂ was generated at the expense of Glc,Man₅GlcNAc₂ species [19] and, secondly, it has been recently demonstrated, by using truncated ribophorin as a model glycoprotein which was rapidly degraded, that the Man₄GlcNAc₂ glycans could act as a degradation signal by triggering its degradation [30].

Another effect of kifunensine was the increase of the secretion of the reporter glycoprotein SeAP. Such an effect has already been observed in mammalian wild-type cells [5,8], but the relationships between the inhibitory effect of kifunensine on the ER α 1,2-mannosidase activity, the quality control system

and secretion were not clearly established. In our model, a clear correlation can be made between the positive effect of kifunensine on the folding process and the enhanced secretion of SeAP. The action of kifunensine makes the ER folding machinery more efficient as revealed by an increase of the secretion of glycoproteins.

Although the nature of the α 1,2-mannosidase remains to be determined, in our model this enzyme acts as a timer in the folding of newly synthesized glycoproteins, as already proposed by several workers [4,31] for the ER mannosidase I in mammalian wild-type cells.

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique and the Ministère de l'Éducation Nationale et de la Recherche Technologique (U.M.R. 8576, Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Director: Dr J.-C. Michalski). We thank Dr M. A. Krzewinski for her assistance in the PCR analysis.

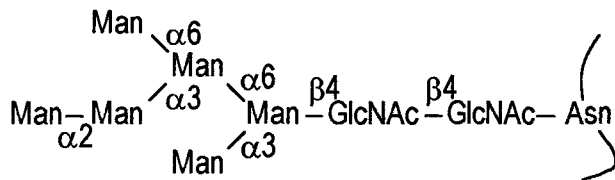
REFERENCES

- Helenius, A. and Aebi, M. (2001) Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* **291**, 2364–2369
- Parodi, A. J. (2000) Role of N-oligosaccharide endoplasmic reticulum processing reactions in glycoprotein folding and degradation. *Biochem. J.* **15**, 1–13
- Bonifacio, J. S. and Weissman, A. M. (1998) Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **14**, 19–57
- Liu, Y., Choudhury, P., Cabral, C. M. and Sifers, R. N. (1999) Oligosaccharide modification in the early secretory pathway directs the selection of a misfolded glycoprotein for degradation by the proteasome. *J. Biol. Chem.* **274**, 5861–5867
- Cabral, C. M., Choudhury, P., Liu, Y. and Sifers, R. N. (2000) Processing by endoplasmic reticulum mannosidases partitions a secretion-impaired glycoprotein into distinct disposal pathways. *J. Biol. Chem.* **275**, 25015–25022
- Wilson, C. M., Farmery, M. R. and Bulleid, N. J. (2000) Pivotal role of calnexin and mannose trimming in regulating the endoplasmic reticulum-associated degradation of major histocompatibility complex class I heavy chain. *J. Biol. Chem.* **275**, 21224–21232
- Tokunaga, F., Brostrom, C., Koide, T. and Arvan, P. (2000) Endoplasmic reticulum (ER)-associated degradation of misfolded N-linked glycoproteins is suppressed upon inhibition of ER mannosidase I. *J. Biol. Chem.* **275**, 40757–40764
- Marcus, N. Y. and Perlmutter, D. H. (2000) Glucosidase and mannosidase inhibitors mediate increased secretion of mutant alpha1 antitrypsin Z. *J. Biol. Chem.* **275**, 1987–1992
- Patil, C. and Walter, P. (2001) Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **13**, 349–355
- Travers, K. J., Patil, C. K., Wodicka, L., Lockhart, D. J., Weissman, J. S. and Walter, P. Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* **101**, 249–258
- Casagrande, R., Stern, P., Diehn, M., Shamu, C., Osario, M., Zuniga, M., Brown, P. O. and Ploegh, H. (2000) Degradation of proteins from the ER of *S. cerevisiae* requires an intact unfolded protein response pathway. *Mol. Cell.* **5**, 729–735
- Friedlander, R., Jarosch, E., Urban, J., Volkwein, C. and Sommer, T. (2000) A regulatory link between ER-associated protein degradation and the unfolded-protein response. *Nat. Cell. Biol.* **2**, 379–384
- Ng, D. T., Spear, E. D. and Walter, P. (2000) The unfolded protein response regulates multiple aspects of secretory and membrane protein biogenesis and endoplasmic reticulum quality control. *J. Cell. Biol.* **150**, 77–88
- Doerrler, W. T. and Lehman, M. A. (1999) Regulation of the dolichol pathway in human fibroblasts by the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 13050–13055
- Stoll, J. (1986) The isolation and characterization of mammalian glycoprotein mutants, PhD. Thesis, The Johns Hopkins University
- 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 glycoproteins. *Biochem. J.* **298**, 135–142
- 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
- Ermonval, M., Duvel, S., Zonneveld, D., Cacan, R., Buttin, G. and Braakman, I. (2000) Truncated N-glycans affect protein folding in the ER of CHO-derived mutant cell lines without preventing calnexin binding. *Glycobiology* **10**, 77–87
- Duvel, S., Chirat, F., Mir, A. M., Verbert, A., Dubuisson, J. and Cacan, R. (2000) Reciprocal relationship between α 1,2 mannosidase processing and reglucosylation in the rough endoplasmic reticulum of Man-P-Dol deficient cells. *Eur. J. Biochem.* **267**, 1146–1152

- 20 Cacan, R. and Verbert, A. (1997) Glycosyltransferases of the phosphodolichol pathways. In *Methods on Glycoconjugates, a Laboratory Manual* (Verbert, A., ed.), pp. 191–199, Harwood Academy Publishers, Chur, Switzerland
- 21 Marchal, I., Mir, A. M., Kmiecik, D., Verbert, A. and Cacan, R. (1999) Use of inhibitors to characterize intermediates in the processing of N-glycans synthesized by insect cells: a metabolic study with Sf9 cell line. *Glycobiology* **7**, 645–654
- 22 Cacan, R., Duvet, S., Labiau, O., Verbert, A. and Krag, S. S. (2001) Monoglucosylated oligomannosides are released during the degradation process of newly synthesized glycoproteins. *J. Biol. Chem.* **276**, 22307–22312
- 23 Ray, M. K., Yang, J., Sundaram, S. and Stanley, P. (1991) A novel glycosylation phenotype expressed by Lec23, a Chinese hamster ovary mutant deficient in alpha-glucosidase I. *J. Biol. Chem.* **266**, 22818–22825
- 24 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
- 25 Chapman, R., Sidrauski, C. and Walter, P. (1998) Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **14**, 459–485
- 26 Brucato, S., Harduin-Lepers, A., Godard, F., Bocquet, J. and Villers, C. (2000) Expression of glypican-1, syndecan-1 and syndecan-4 mRNAs protein kinase C-regulated in rat immature Sertoli cells by semi-quantitative RT-PCR analysis. *Biochim. Biophys. Acta.* **1474**, 31–40
- 27 Hebert, D. N., Zhang, J. X., Chen, W., Foellmer, B. and Helenius, A. (1997) The number and location of glycans on influenza hemagglutinin determine folding and association with calnexin and calreticulin. *J. Cell. Biol.* **139**, 613–623
- 28 Parodi, A. J. (2000) Protein glucosylation and its role in protein folding. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 69–93
- 29 Wooden, S. K., Li, L. J., Navarro, D., Qadri, I., Pereira, L. and Lee, A. S. (1991) Transactivation of the grp78 promoter by malformed proteins, glycosylation block, and calcium ionophore is mediated through a proximal region containing a CCAAT motif which interacts with CTF/NF-1. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 5612–5623
- 30 Ermonval, M., Kitzmuller, C., Mir, A. M., Cacan, R. and Ivessa, N. E. (2001) N-glycan structure of a short-lived variant of ribophorin I expressed in the MadIA214 glycosylation-defective cell line reveals the role of a mannosidase that is not ER mannosidase I in the process of glycoprotein degradation. *Glycobiology* **11**, 565–576
- 31 Helenius, A. (1994) How N-linked oligosaccharides affect glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell.* **5**, 253–265

Received 27 July 2001/16 November 2001; accepted 17 December 2001

Concernant les deux mannosidases réticulaires, la Man_9 -mannosidase pourrait effectivement remplir cette fonction, puisqu'à partir d'un $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, cette mannosidase est capable d'hydrolyser les résidus de mannose de la branche en $\alpha 1,3$, conduisant ainsi à l'isomère suivant du $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$.



Quant à la spécificité de la ER mannosidase I sur le $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, celle-ci n'a jamais été étudiée.

CONCLUSION

Conclusion générale

La *N*-glycosylation est la modification post-traductionnelle majeure rencontrée chez les eucaryotes et correspond au transfert d'une structure glycanne de type $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ sur les protéines en cours de synthèse. Une fois transférés, les glycannes subissent dans la lumière du RE, ainsi que dans l'appareil de Golgi, toute une série de modifications qui génèrent des structures glycaniques très diverses.

D'une façon très schématique, le long de la voie de sécrétion, le précurseur $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ transféré sur la protéine va subir deux types majeurs de modifications :

- ◆ un élagage progressif des résidus de glucose et de mannose dans la lumière du RE,
- ◆ un ajout de monosaccharides dans l'appareil de Golgi (Figure 31 A).

Ces transformations, conduiront à l'élaboration d'une structure glycanne de type complexe, présente uniquement sur les glycoprotéines matures. Il

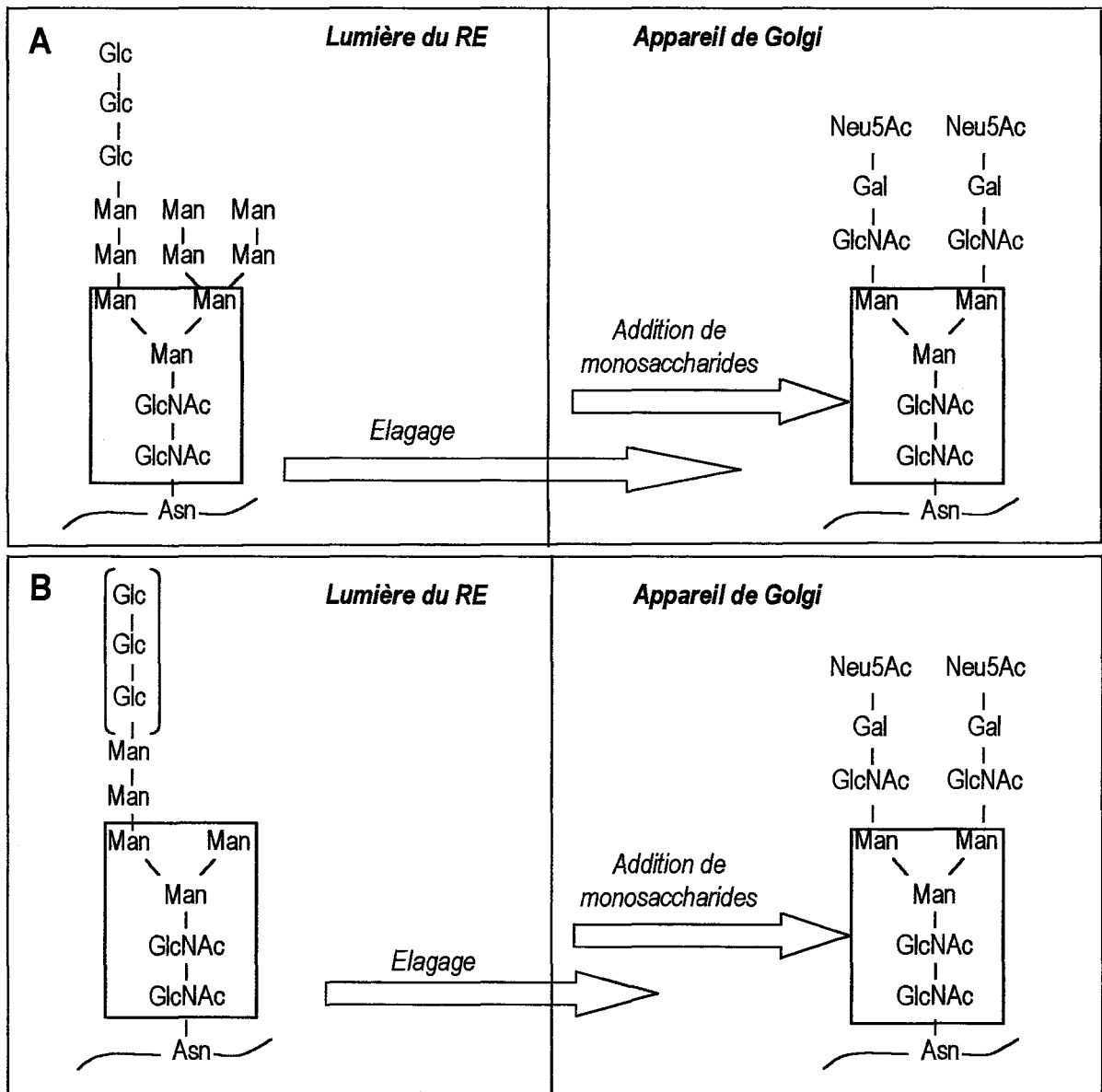


Figure 31 : Modifications des glycannes le long de la voie de sécrétion. La structure en jaune représente la structure pentasaccharidique commune à la fois aux glycoprotéines matures et aux différents types de donneurs oligosaccharidiques.

est intéressant, de noter, que la seule partie commune au donneur oligosaccharidique initial et au glycanne de type complexe, est le noyau pentasaccharidique $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, commun à toutes les glycoprotéines matures. Se pose alors, la question de la finalité du transfert d'un tétradecasaccharide, alors que seuls, cinq monosaccharides suffisent pour élaborer une structure glycanne de type complexe.

Depuis une dizaine d'années, de nombreux travaux démontrent que les structures oligosaccharidiques réticulaires, générées au cours de l'élagage, vont jouer des rôles cruciaux dans la mise en conformation des glycoprotéines, l'accès à la voie de sécrétion ou de dégradation, ainsi que dans le ciblage vers l'ubiquitination et le protéasome (Lehrman, 2001 ; Trombetta, 2003). Au contraire, l'addition des antennes et des sucres périphériques au niveau de l'appareil de Golgi, permet l'apparition de signaux de reconnaissance jouant des rôles clé dans l'interaction des glycoprotéines avec l'environnement extracellulaire (Varki, 1997).

Bien que la structure du donneur oligosaccharidique soit extrêmement conservée au cours de l'évolution, des paramètres intracellulaires et/ou extracellulaires, tels que la charge énergétique cellulaire, la concentration en glucose, ou encore un défaut dans la machinerie enzymatique du cycle des dolichols, peuvent interférer avec la structure du donneur oligosaccharidique. Dans ces cas là, le transfert de glycannes tronqués de type $(\text{Glc})_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ à la place du $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ est observé.

Comme indiqué dans la figure 31 B, on retrouve également dans ces glycannes tronqués le noyau pentasaccharidique $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, nécessaire à l'élaboration des structures glycanne de type

complexe. Par contre, au cours de l'élagage réticulaire, le nombre de structures possibles est beaucoup plus limité que pour les espèces à $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$.

Au cours de ce travail, nous nous sommes donc intéressés, aux conséquences d'un transfert de glycannes tronqués de type $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ dans les phénomènes de mise en conformation, de dégradation, et de sécrétion des glycoprotéines.

1. Influence des glycannes tronqués de type $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ sur la mise en conformation des glycoprotéines.

Dans cette étude, nous avons démontré, *via* le niveau de la réponse UPR, que le transfert de glycannes tronqués de type $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ compromettrait le processus de mise en conformation des glycoprotéines. Etant donné, l'influence importante de la structure glycanne dans le contrôle qualité, il était possible d'envisager que la présence de tels glycannes empêchaient les glycoprotéines de subir un contrôle qualité efficace. En dépit des contradictions qui existaient sur l'efficacité du contrôle qualité des glycoprotéines à $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, nos résultats ont clairement démontré que :

- ◆ les glycoprotéines à $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ peuvent être glucosylées par l'UGTT,
- ◆ les glycoprotéines ainsi monoglucosylées peuvent être déglucosylées,
- ◆ les glycoprotéines à $\text{Glc}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ peuvent s'associer à la calnexine.

Ces résultats semblent suggérer que la nature des glycannes transférés ($\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ou $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$), ne devrait pas perturber le processus de mise en conformation de la protéine. Cependant, le niveau de l'UPR nous montre que le taux de

glycoprotéines mal conformées est plus élevé dans la lignée transférant des glycanes tronqués.

Afin d'expliquer le défaut de mise en conformation, nous nous sommes intéressés à l'étape de démannosylation qui permet la transformation des glycoprotéines de type $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ en $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$. Après avoir inhibé cette étape avec un inhibiteur de mannosidase de classe I, nous avons observé, une diminution dans le niveau de l'UPR, suggérant un lien direct entre cette étape de démannosylation et la mauvaise mise en conformation des glycoprotéines.

2. Influence des glycanes tronqués de type $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ sur la sécrétion des glycoprotéines.

Afin d'étudier l'influence de la structure du glycanne sur la sécrétion des glycoprotéines, nous avons généré au sein du RE, deux populations glycoprotéiques : une à $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ et une à $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$. Lors d'une expérience de chasse métabolique, nous avons démontré que ces deux populations se comportaient de façon différente. En effet, alors que la population glycoprotéique à $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ est transformée en type complexe au niveau de l'appareil de Golgi, la population à $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ est retenue sous la forme $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$ dans la lumière du RE. De façon intéressante, lorsque cette étape de démannosylation est inhibée, on observe une diminution du niveau de la réponse UPR corrélée d'une part, à la diminution transcriptionnelle de la protéine chaperonne BiP, et d'autre part, à l'augmentation de la sécrétion de glycoprotéines. Ce résultat implique cette étape de démannosylation dans le phénomène de rétention des glycoprotéines au niveau de la lumière du RE.

3. Influence des glycanes tronqués de type $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ sur la dégradation des glycoprotéines.

Dans le modèle MI8-5, lorsque nous avons généré au sein du même RE deux populations glycoprotéiques, une à $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ et une à $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, nous avons montré, par l'étude des oligosaccharides solubles, que la population glycoprotéique à $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ était préférentiellement dégradée par rapport à celle à $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$.

L'ensemble de ces résultats, nous permet d'imaginer, que l'apparition de structures $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$ constitue un véritable signal dans l'activation de la réponse UPR, étant donné que cette structure apparaît comme nous l'avons vu, à la suite de perturbations métaboliques intracellulaires ou extracellulaires constituant des stress. D'une façon générale, l'étape de démannosylation suivante : $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2 \rightarrow \text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$ serait non seulement, impliquée dans le contrôle qualité des *N*-glycoprotéines portant des glycanes de type $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, mais également, dans l'activation de la réponse UPR. Ces structures, apparaissant à la fois dans les cellules sauvages et mutantes de glycosylation, impliquent que la machinerie cellulaire, capable de générer un pool de glycoprotéines à $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$, serait présente dans toutes les cellules étudiées. Le signal formé, contrairement au $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ et aux différents isomères de $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ et $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$, ne peut plus être glucosylé par l'UGGT, empêchant toutes chances aux glycoprotéines d'entrer dans un cycle de mise en conformation *via* le système CNX-CRT. Le pool de glycoprotéines mal conformées se trouve ainsi retenu dans la lumière du RE, en particulier par la protéine chaperonne BiP, ce qui déclenche l'activation

de la réponse UPR. La dégradation préférentielle observée pour la population glycoprotéique à $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ par rapport à celle à $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, ne serait en fait qu'une conséquence d'une rétention prolongée.

Afin de compléter cette étude, il serait intéressant, d'une part, de préciser la nature de la mannosidase impliquée dans l'apparition du signal $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$ et d'autre part, d'étudier le recrutement des glycoprotéines de type $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$ vers la voie d'ubiquitination. En effet, récemment, le chaînon manquant entre la glycosylation et l'ubiquitination a été découvert avec l'identification de complexes E3 capables de recruter spécifiquement sur la base des glycanes de type oligomannosidique, les glycoprotéines à ubiquitiner destinées à être dégradées par le protéasome. Etant donné, que la base de cette reconnaissance repose sur la structure glycanique portée par la glycoprotéine, il serait intéressant de savoir dans quelle(s) mesure(s), des structures de type $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$ peuvent être reconnues par ces complexes E3.

L'importance de ces mécanismes dans beaucoup de phénomènes pathologiques, comme les CDG, pour lesquels, en plus du $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$, d'autres signaux peuvent apparaître selon le type de déficience ; ou encore, dans les infections virales, au cours desquelles la *N*-glycosylation et le métabolisme cellulaire sont fortement sollicités, sont autant d'exemples, où les relations entre la nature des signaux glycaniques et l'UPR n'ont pas encore été envisagées.

REFERENCES

A

Aebi, M., Hennet, T. (2001) Congenital disorders of glycosylation: genetic model systems lead the way. *Trends Cell Biol.* **11**, 136-141

Anand, M., Rush, J. S., Ray, S., Doucey, M. A., Weik, J., Ware, F. E., Hofsteenge, J., Waechter, C. J., Lehrman, M. A. (2001) Requirement of the Lec35 gene for all known classes of monosaccharide-P-dolichol-dependent glycosyltransferase reactions in mammals. *Mol Biol Cell.* **12**, 487-501.

Arar, C., Carpentier, V., Le Caer, J. P., Monsigny, M., Legrand, A., Roche, A. C. (1995) ERGIC-53, a membrane protein of the endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment, is identical to MR60, an intracellular mannose-specific lectin of myelomonocytic cells. *J Biol Chem.* **270**, 3551-3553.

B

Bause, E. (1983) Structural requirements of N-glycosylation of proteins. Studies with proline peptides as conformational probes. *Biochem J.* **209**, 331-336.

Bischoff, J., Kornfeld, R. (1983) Evidence for an alpha-mannosidase in endoplasmic reticulum of rat liver. *J Biol Chem.* **258**, 7907-7910.

Blobel, G., Dobberstein, B. (1975) Transfer of proteins across membranes I. presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on the membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J Cell Biol.* **67**, 835-851.

Bosch, M., Trombetta, S., Engstrom, U., Parodi, A.J. (1988) Characterization of dolichol diphosphate oligosaccharide: protein oligosaccharyltransferase and glycoprotein-processing glucosidases occurring in trypanosomatid protozoa. *J Biol Chem.* **263**, 17360-17365.

Branza-Nichita, N., Negroiu, G., Petrescu, A. J., Garman, E. F., Platt, F. M., Wormald, M. R., Dwek, R. A., Petrescu, S.M. (2000) Mutations at critical N-glycosylation sites reduce tyrosinase activity by altering folding and quality control. *J Biol Chem.* **275**, 8169-8175.

Breyton, C., Haase, W., Rapoport, T. A., Kuhlbrandt, W., Collinson, I. (2002) Three-dimensional structure of the bacterial protein-translocation complex SecYEG. *Nature.* **418**, 662-665.

Brodsky, J. L., Werner, E. D., Dubas, M. E., Goekeler, J. L., Kruse, K. B., McCracken, A. A. (1999) The requirement for molecular chaperones during endoplasmic reticulum-associated protein degradation demonstrates that protein export and import are mechanistically distinct. *J Biol Chem.* **274**, 3453-3460.

C

Cabral, C. M., Choudhury, P., Liu, Y., Sifers, R. N. (2000) Processing by endoplasmic reticulum mannosidases partitions a secretion-impaired glycoprotein into distinct disposal pathways. *J Biol Chem.* **275**, 25015-25022.

Cacan, R., Dengremont, C., Labiau, O., Kmiecik, D., Mir, A.M., Verbert, A. (1996) Occurrence of a cytosolic neutral chitinase activity involved in oligomannoside degradation: a study with Madin-Darby bovine kidney (MDBK) cells. *Biochem J.* **313**, 597-602.

Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J. H., Hubbard, S. R., Harding H. P., Clark S. G., Ron D. (2002) IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature.* **415**, 92-96.

Cassagrande, R., Stern, P., Diehn, M., Shamu, C., Osario, M., Zuniga, M., Brown, P.O., Ploegh, H. (2000) Degradation of proteins from the ER of *S. cerevisiae* requires an intact unfolded protein response pathway. *Mol Cell.* **5**, 729-735.

Chen, X., van Valkenburgh, C., Liang, H., Fang, H., Green, H. (2001) Signal peptidase and oligosaccharyltransferase interact in a sequential and dependent manner within the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **276**, 2411-2416.

Colussi, P. A., Taron, C. H., Mack, J. C., Orlean, P. (1997) Human and *Saccharomyces cerevisiae* dolichol phosphate mannose synthases represent two classes of the enzyme, but both function in *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**, 7873-7878.

Connolly, T., Rapiejko, P. J., Gilmore, R. (1991) Requirement of GTP hydrolysis for dissociation of

- the signal recognition particle from its receptor. *Science*. **252**, 1171-1173
- Cox, J. S., Walter, P. (1996) A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell*. **87**, 391-404.
- Crick, D. C., Scoocca, J. R., Rush, J. S., Frank, D. W., Krag, S. S., Waechter, C. J. (1994) Induction of dolichyl-saccharide intermediate biosynthesis corresponds to increased long chain cis-isoprenyltransferase activity during the mitogenic response in mouse B cells. *J Biol Chem*. **269**, 10559-10565.
- Crowley, K. S., Liao, S., Worrell, V. E., Reinhart, G. D., Johnson, A. E. (1994) Secretory proteins move through the endoplasmic reticulum membrane via an aqueous, gated pore. *Cell*. **78**, 461-471.
- D**
- Daniel, P. F., Winchester, B., Warren, C. D. (1994) Mammalian alpha-mannosidases—multiple forms but a common purpose? *Glycobiology*. **4**, 551-66.
- Danilczyk, U. G., Cohen-Doyle, M. F., Williams, D. B. (2000) Functional relationship between calreticulin, calnexin, and the endoplasmic reticulum luminal domain of calnexin. *J Biol Chem*. **275**, 13089-13097.
- de Virgilio, M., Kitzmuller, C., Schwaiger, E., Klein, M., Kreibich, G., Ivessa, N. E. (1999) Degradation of a short-lived glycoprotein from the lumen of the endoplasmic reticulum: the role of N-linked glycans and the unfolded protein response. *Mol Biol Cell*. **10**, 4059-4973.
- Doerrier, W. T., Lehrman, M. A. (1999) Regulation of the dolichol pathway in human fibroblasts by the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **96**, 13050-13055.
- Duvet, S., Labiau, O., Mir, A. M., Kmiecik, D., Krag, S. S., Verbert, A., Cacan R. (1998) Cytosolic deglycosylation process of newly synthesized glycoproteins generates oligomannosides possessing one GlcNAc residue at the reducing end. *Biochem J*. **335**, 389-396.
- Duvet, S., Chirat, F., Mir, A. M., Verbert, A., Dubuisson, J., Cacan, R. (2000) Reciprocal relationship between alpha1,2 mannosidase processing and reglucosylation in the rough endoplasmic reticulum of Man-P-Dol deficient cells.
- Duvet, S., Op De Beeck, A., Cocquerel, L., Wychowski, C., Cacan, R., Dubuisson, J. (2002) Glycosylation of the hepatitis C virus envelope protein E1 occurs posttranslationally in a mannosylphosphoryldolichol-deficient CHO mutant cell line. *Glycobiology*. **12**, 95-101.
- E**
- Ermonval, M., Duvet, S., Zonneveld, D., Cacan, R., Buttin, G., Braakman, I. (2000) Truncated N-glycans affect protein folding in the ER of CHO-derived mutant cell lines without preventing calnexin binding. *Glycobiology*. **10**, 77-87.
- F**
- Fagioli, C., Sitia, R. (2001) Glycoprotein quality control in the endoplasmic reticulum. Mannose trimming by endoplasmic reticulum mannosidase I times the proteasomal degradation of unassembled immunoglobulin subunits. *J Biol Chem*. **276**, 12885-12892.
- Fassio, A., Sitia, R. (2002) Formation, isomerisation and reduction of disulphide bonds during protein quality control in the endoplasmic reticulum. *Histochem Cell Biol*. **117**, 151-157.
- Fayadat, L., Siffroi-Fernandez, S., Lanet, J., Franc, J.L. (2000) Degradation of human thyroperoxidase in the endoplasmic reticulum involves two different pathways depending on the folding state of the protein. *J Biol Chem*. **275**, 15948-15954.
- Fernandez, F., Rush, J. S., Toke, D. A., Han, G. S., Quinn, J. E., Carman, G. M., Choi, J.Y., Voelker, D. R., Aebi, M., Waechter, C. J. (2001) The CWH8 gene encodes a dolichyl pyrophosphate phosphatase with a lumenally oriented active site in the endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. **276**, 41455-41464.
- Ferris, R. L., Hall, C., Sipsas, N. V., Safritz, J. T., Trocha, A., Koup, R. A., Johnson, R. P., Siliciano, R. F. (1999) Processing of HIV-1 envelope glycoprotein for class I-restricted recognition: dependence on TAP1/2 and mechanisms for cytosolic localization. *J Immunol*. **162**, 1324-1332.

- Fisher, E. A., Zhou, M., Mitchell, D. M., Wu, X., Omura, S., Wang, H., Goldberg, A. L., 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.
- Freedman, R. B., Hirst, T. R., Tuite, M. F. (1994) Protein disulphide isomerase: building bridges in protein folding. *Trends Biochem Sci.* **19**, 331-336.
- Freeze, H. H. (2002) Human disorders in N-glycosylation and animal models. *Biochim Biophys Acta.* **1573**, 388-93.
- Frenkel, Z., Gregory, W., Kornfeld, S., Lederkremer, G.Z. (2003) Endoplasmic reticulum-associated degradation of mammalian glycoproteins involves sugar chain trimming to Man6-5GlcNAc2. *J Biol Chem.* **278**, 34119-24.
- Frickel, E. M., Riek, R., Jelesarov, I., Helenius, A., Wuthrich, K., Elgaard, L. (2002) TROSY-NMR reveals interaction between ERp57 and the tip of the calreticulin P-domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**, 1954-1959.
- Fulga, T. A., Sinning, I., Dobberstein, B., Pool, M. R. (2001) SR β coordinates signal sequence release from SRP with ribosome binding to the translocon. *EMBO J.* **20**, 2338-2347.
- G**
- Gao, N., Lehrman, M. A. (2002) Coupling of the dolichol-P-P-oligosaccharide pathway to translation by perturbation-sensitive regulation of the initiating enzyme, GlcNAc-1-P transferase. *J Biol Chem.* **277**, 39425-39435.
- Garcia-Mata, R., Bebok, Z., Sorscher, E. J., Sztul, E.S. (1999) Characterization and dynamics of aggresome formation by a cytosolic GFP-chimera. *J Cell Biol.* **146**, 1239-1254.
- Gavel, Y., von Heijne, G. (1990) Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. *Protein Eng.* **3**, 433-42.
- Gill, A., Gao, N., Lehrman, M. A. (2002) Rapid activation of glycogen phosphorylase by the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *J Biol Chem.* **277**, 44747-44753.
- Gillece, P., Luz, J. M., Lennarz, W. J., de La Cruz, F. J., Romisch, K. (1999) Export of a cysteine-free misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum for degradation requires interaction with protein disulfide isomerase. *J Cell Biol.* **147**, 1443-1456.
- Gorlich, D., Rapoport, T. A. (1993) Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell.* **75**, 615-630.
- Grant, S.R., Lennarz, W. J. (1983) Relationship between oligosaccharide-lipid synthesis and protein synthesis in mouse LM cells. *Eur J Biochem.* **134**, 575-583.
- Grard, T., Herman, V., Saint-Pol, A., Kmiecik, D., Labiau, O., Mir, A. M., Alonso, C., Verbert, A., Cacan, R., Michalski, J. C. (1996) Oligomannosides or oligosaccharide-lipids as potential substrates for rat liver cytosolic α -D-mannosidase. *Biochem J.* **316**, 787-92.
- Grinna, L. S., Robbins, P. W. (1980) Substrate specificities of rat liver microsomal glucosidases which process glycoproteins. *J Biol Chem.* **255**, 2255-2258.
- Grunewald, S., Imbach, T., Huijben, K., Rubio-Gozalbo, M. E., Verrips, A., de Klerk, J. B., Stroink, H., de Rijk-van Andel, J.F., Van Hove, J. L., Wendel, U., Matthijs, G., Hennet, T., Jaeken, J., Wevers R. A. (2000) Clinical and biochemical characteristics of congenital disorder of glycosylation type Ic, the first recognized endoplasmic reticulum defect in N-glycan synthesis. *Ann Neurol.* **47**, 776-81.
- Grunewald, S., Matthijs, G., Jaeken, J. (2002) Congenital disorders of glycosylation: a review. *Pediatr Res.* **52**, 618-24.
- Gruss, O. J., Feick, P., Frank, R., Dobberstein, B. (1999) Phosphorylation of components of the ER translocation site. *Eur J Biochem.* **260**, 785-793.
- H**
- Haas, I. G., Wabl, M. (1983) Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature.* **306**, 387-389.
- Haeuw, J. F., Strecker, G., Wieruszkeski, J. M., Montreuil, J., Michalski, J.C. (1991) Substrate specificity of rat liver cytosolic α -D-mannosidase. Novel degradative pathway for

- oligomannosidic type glycans. *Eur J Biochem.* **202**, 1257-68.
- Hammond, C Helenius, A. (1995) Quality control in the secretory pathway. *Curr Opin Cell Biol.* **7**, 523-9.
- Hara-Kuge, S., Ohkura, T., Ideo, H., Shimada, O., Atsumi, S., Yamashita, K. (2002) Involvement of VIP36 in intracellular transport and secretion of glycoproteins in polarized Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells. *J Biol Chem.* **277**, 16332-16339.
- Harding, C. V., Geuze, H. J. (1993) Antigen processing and intracellular traffic of antigens and MHC molecules. *Curr Opin Cell Biol.* **5**, 596-605.
- Harding, H. P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M., Ron, D. (2000) Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell.* **6**, 1099-1108.
- 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.
- Heesen, S., Lehle, L., Weissmann, A., Aebi, M. (1994) Isolation of the ALG5 locus encoding the UDP-glucose:dolichyl-phosphate glucosyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem.* **224**, 71-79.
- Helenius, A. (1994) How N-linked oligosaccharides affect glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell.* **5**, 253-265.
- Helenius, J., Ng, D.T., Marolda, C. L., Walter, P., Valvano, M.A., Aebi, M. (2002) Translocation of lipid-linked oligosaccharides across the ER membrane requires Rft1 protein. *Nature.* **415**, 447-450.
- Hendrick, J. P., Hartl, F. U. (1995) The role of molecular chaperones in protein folding. *FASEB J.* **9**, 1559-1569.
- Herscovics A. (2001) Structure and function of Class I alpha 1,2-mannosidases involved in glycoprotein synthesis and endoplasmic reticulum quality control. *Biochimie.* **83**, 757-62.
- High, S., Martoglio, B., Gorlich, D., Andersen, S. S., Ashford, A.J., Giner, A., Hartmann, E., Prehn, S., Rapoport, T.A., Dobberstein, B. (1993) Site-specific photocross-linking reveals that Sec61p and TRAM contact different regions of a membrane-inserted signal sequence. *J Biol Chem.* **268**, 26745-26751.
- Hosokawa, N., Wada, I., Hasegawa, K., Yorihuzi, T., Tremblay, L. O., Herscovics, A., Nagata, K. (2001) A novel ER alpha-mannosidase-like protein accelerates ER-associated degradation. *EMBO reports.* **2**, 415-422.
- Hoyvik, H., Gordon, P. B., Berg, T. O., Stromhaug, P.E., Seglen, P.O. (1991) Inhibition of autophagic-lysosomal delivery and autophagic lactolysis by asparagine. *J Cell Biol.* **113**, 1305-12.
- Hubbard, S. C., Robbins, P. W. (1980) Synthesis of the N-linked oligosaccharides of glycoproteins. Assembly of the lipid-linked precursor oligosaccharide and its relation to protein synthesis in vivo. *J Biol Chem.* **255**, 11782-11793.
- I
- Ihara, Y., Cohen-Doyle M. F., Saito, Y., Williams, D. B. (1999) Calnexin discriminates between protein conformational states and functions as a molecular chaperone in vitro. *Mol Cell.* **4**, 331-341.
- J
- Jakob, C. A., Burda, P., Roth, J., 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., Riordan, J. R. (1995) Multiple proteolytic systems, including the proteasome, contribute to CFTR processing. *Cell.* **83**, 129-135.
- Johnson, A. E., van Waes, M. A. (1999) The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **15**, 799-842
- K
- Karaivanova, V. K., Spiro, R. G. (2000) Effect of proteasome inhibitors on the release into the cytosol of free polymannose oligosaccharides from glycoproteins. *Glycobiology.* **10**, 727-35.

- Karaoglu, D., Kelleher, D. J., Gilmore, R. (2001) Allosteric regulation provides a molecular mechanism for preferential utilization of the fully assembled dolichol-linked oligosaccharide by the yeast oligosaccharyltransferase. *Biochemistry*. **40**, 12193-12206.
- Kean, E. L., Wei, Z., Anderson, V. E., Zhang, N., Sayre, L. M. (1999) Regulation of the biosynthesis of N-acetylglucosaminylpyrophosphoryldolichol feedback and product inhibition. *J Biol Chem*. **274**, 34072-34082.
- Kitzmuller, C., Caprini, A., Moore, S. E., Frenoy, J. P., Schwaiger, E., Kellermann, O., Ivessa, N. E., Ermonval, M. (2003) Processing of N-linked glycans during the endoplasmic reticulum associated degradation of a short-lived variant of ribophorin I. *Biochem J*. Sep 3
- Kmieciak, D., Herman, V., Stroop, C. J., Michalski, J.C., Mir, A. M., Labiau, O., Verbert, A., 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.
- Knittler, M. R., Dirks, S., Haas, I. G. (1995) Molecular chaperones involved in protein degradation in the endoplasmic reticulum: quantitative interaction of the heat shock cognate protein BiP with partially folded immunoglobulin light chains that are degraded in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **92**, 1764-8.
- Koegl, M., Hoppe, T., Schlenker, S., Ulrich, H. D., Mayer, T.U., Jentsch, S. (1999) A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell*. **96**, 635-644.
- Konig, R., Ashwell, G., Hanover, J.A. (1988) Glycosylation of CD4. Tunicamycin inhibits surface expression. *J Biol Chem*. **263**, 9502-9507.
- Kornfeld, R., Kornfeld, S. (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem*. **54**, 631-64
- L**
- Lamande, S. R., Bateman, J. F. (1999) Procollagen folding and assembly: the role of endoplasmic reticulum enzymes and molecular chaperones. *Semin Cell Dev Biol*. **10**, 455-64.
- Lehrman, M. A. (2001) Oligosaccharide-based information in endoplasmic reticulum quality control and other biological systems. *J Biol Chem*. **276**, 8623-8626.
- Liu, Y., Choudhury, P., Cabral, C. M. and Sifers, R. N. (1999) Oligosaccharide modification in the early secretory pathway directs the selection of a misfolded glycoprotein for degradation by the proteasome. *J. Biol. Chem*. **274**, 5861-5867.
- Lord, J. M., Frigerio, L. (2002) ER quality control: a function for sugars in the cytosol. *Curr Biol*. **12**, 663-665.
- Löwe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickl, P., Baumeister, W., Huber, R. (1995) Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science*. **268**, 533-539.
- M**
- Makishima, T., Nakashima, T., Nagata-Kuno, K., Fukushima, K., Iida, H., Sakaguchi, M., Ikehara, Y., Komiyama, S., Nishimoto, T. (1997) The highly conserved DAD1 protein involved in apoptosis is required for N-linked glycosylation. *Genes Cells*. **2**, 129-141.
- Mancini, R., Aebi, M., Helenius, A. (2003) Multiple ER-associated pathways degrade mutant yeast carboxypeptidase Y (CPY*) in mammalian cells. *J Biol Chem*. Sep 3.
- Marek, K. W., Vijay, I. K., Marth, J. D. (1999) A recessive deletion in the GlcNAc-1-phosphotransferase gene results in peri-implantation embryonic lethality. *Glycobiology*. **9**, 1263-1271.
- Mesaeli, N., Nakamura, K., Zvaritch, E., Dickie, P., Dziak, E., Krause, K. H., Opas, M., MacLennan, D. H., Michalak, M. (1999) Calreticulin is essential for cardiac development. *J Cell Biol*. **144**, 857-868.
- Molinari, M., Helenius, A. (2000) Chaperone selection during glycoprotein translocation into the endoplasmic reticulum. *Science*. **288**, 331-333.
- Mononen, I., Karjalainen, E., (1999) Structural comparison of protein sequences around potential N-glycosylation sites. *Biochem Biophys Acta*, **788**, 364-367.

- Moore, S. E., Bauvy, C., Codogno, P. (1995) Endoplasmic reticulum-to-cytosol transport of free polymannose oligosaccharides in permeabilized HepG2 cells. *EMBO J.* **14**, 6034-6042.
- Moussalli, M., Pipe, S. W., Hauri, H. P., Nichols, W. C., Ginsburg, D., Kaufman, R. J. (1999) Mannose-dependent endoplasmic reticulum (ER)-Golgi intermediate compartment-53-mediated ER to Golgi trafficking of coagulation factors V and VIII. *J Biol Chem.* **274**, 32539-32542.
- Munro, S., Pelham, H. R. (1986) An Hsp70-like protein in the ER: identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell.* **46**, 291-300.
- ## N
- Nakatsukasa, K., Nishikawa, S., Hosokawa, N., Nagata, K., Endo, T. (2001) Mnl1p, an alpha-mannosidase-like protein in yeast *Saccharomyces cerevisiae*, is required for endoplasmic reticulum-associated degradation of glycoproteins. *J. Biol. Chem.* **276**, 8635-8638.
- Ng, D. T., Spear, E. D., Walter, P. (2000) The unfolded protein response regulates multiple aspects of secretory and membrane protein biogenesis and endoplasmic reticulum quality control. *J Cell Biol.* **150**, 77-88.
- Nilsson, I., von Heijne, G. (1993) Determination of the distance between the oligosaccharyltransferase active site and the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem.* **268**, 5798-5801.
- Novoa, I., Zeng, H., Harding, H. P., Ron, D. (2001) Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha. *J Cell Biol.* **153**, 1011-1022.
- ## O
- Ogier-Denis E, Codogno P. (2003) Autophagy: a barrier or an adaptive response to cancer. *Biochim Biophys Acta.* **1603**, 113-28.
- Ogier-Denis, E., Bauvy, C., Cluzeaud, F., Vandewalle, A., Codogno, P. (2000) Glucose persistence on high-mannose oligosaccharides selectively inhibits the macroautophagic sequestration of N-linked glycoproteins. *Biochem J.* **345**, 459-66.
- Oliver, J. D., van der Wal, F. J., Bulleid, N. J., High, S. (1997) Interaction of the thiol-dependent reductase ERp57 with nascent glycoproteins. *Science.* **275**, 86-88.
- Oriol, R., Martinez-Duncker, I., Chantret, I., Mollicone, R., Codogno, P. (2002) Common origin and evolution of glycosyltransferases using Dol-P-monosaccharides as donor substrate. *Mol Biol Evol.* **19**, 1451-63.
- Ou, W. J., Cameron, P. H., Thomas, D. Y., Bergeron, J. J. (1993) association of folding intermediates of glycoproteins with calnexin during protein maturation. *Nature.* **364**, 771-776.
- ## P
- Pan, Y. T., Elbein, A. D. (1990) Control of N-linked oligosaccharide synthesis: cellular levels of dolichyl phosphate are not the only regulatory factor. *Biochemistry.* **29**, 8077-8084.
- Patil, A. R., Thomas, C. J., Surolia, A. (2000) Kinetics and the mechanism of interaction of the endoplasmic reticulum chaperone, calreticulin, with monoglucosylated (Glc1Man9GlcNAc2) substrate. *J Biol Chem.* **275**, 24348-24356.
- Pilon, M., Schekman, R., Romisch, K. (1997) Sec61p mediates export of a misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum to the cytosol for degradation. *EMBO J.* **16**, 4540-4548.
- Pind, S., Riordan, J. R., Williams, D. B. (1994) Participation of the endoplasmic reticulum chaperone calnexin (p88, IP90) in the biogenesis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem.* **269**, 12784-12788.
- Plempner, R. K., Wolf, D. H. (1999) Retrograde protein translocation: ERADication of secretory proteins in health and disease. *Trends Biochem Sci.* **24**, 266-270.
- Plutner, H., Davidson, H. W., Saraste, J., Balch, W. E. (1992) Morphological analysis of protein transport from the ER to Golgi membranes in digitonin-permeabilized cells: role of the P58 containing compartment. *J Cell Biol.* **119**, 1097-1116.
- Pollard, M. G., Travers, K. J., 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., Perlmutter, D. H. (1996) Degradation of a mutant secretory protein, alpha1-antitrypsin Z, in the endoplasmic reticulum requires proteasome activity. *J Biol Chem.* **271**, 22791-22795.

R

Rabinovich, E., Kerem, A., Frohlich, K. U., Diamant, N., Bar-Nun, S. (2002) AAA-ATPase p97/Cdc48p, a cytosolic chaperone required for endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Mol Cell Biol.* **22**, 626-34.

Rapiejko, P. J., Gilmore, R. (1997) Empty site forms of the SRP54 and SR alpha GTPases mediate targeting of ribosome-nascent chain complexes to the endoplasmic reticulum. *Cell.* **89**, 703-713

Rutishauser, J., Spess, M. (2002) Endoplasmic reticulum storage diseases. *Swiss Med.* **132**, 211-222.

S

Saint-Pol, A., Bauvy, C., Codogno, P., Moore, S. E. (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.

Schroder, K., Martoglio, B., Hofmann, M., Holscher, C., Hartmann, E., Prehn, S., Rapoport, T. A., Dobberstein, B. (1999) Control of glycosylation of MHC class II-associated invariant chain by translocon-associated RAMP4. *EMBO J.* **18**, 4804-4815.

Seglen, P. O., Gordon, P. B. (1982) 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **79**, 1889-92.

Selby, M., Erickson, A., Dong, C., Cooper, S., Parham, P., Houghton, M., Walker, C. M. (1999) Hepatitis C virus envelope glycoprotein E1 originates in the endoplasmic reticulum and requires cytoplasmic processing for presentation by class I MHC molecules. *J Immunol.* **162**, 669-76.

Shamu, C. E., Flierman, D., Ploegh, H. L., Rapoport, T. A., Chau, V. (2001) Polyubiquitination is required

for US11-dependent movement of MHC class I heavy chain from endoplasmic reticulum into cytosol. *Mol Biol Cell.* **12**, 2546-55.

Shamu, C. E., Walter, P. (1996) Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *EMBO J.* **15**, 3028-3039.

Shang, J., Korner, C., Freeze, H., Lehrman, M. A. (2002) Extension of lipid-linked oligosaccharides is a high-priority aspect of the unfolded protein response: endoplasmic reticulum stress in Type I congenital disorder of glycosylation fibroblasts. *Glycobiology.* **12**, 307-317.

Sidrauski, C., Cox, J. S., Walter, P. (1996) tRNA ligase is required for regulated mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell.* **87**, 405-413.

Silva, C. L., Portaro, F. C., Bonato, V. L., de Camargo, A. C., Ferro, E. S. (1999) Thimet oligopeptidase (EC 3.4.24.15), a novel protein on the route of MHC class I antigen presentation. *Biochem Biophys Res Commun.* **255**, 591-595.

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

Sousa, M. C., Ferrero-Garcia, M. A., Parodi, A. J. (1992) Recognition of the oligosaccharide and protein moieties of glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase. *Biochemistry.* **31**, 97-105.

Sousa, M., Parodi, A. J. (1995) The molecular basis for the recognition of misfolded glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase. *EMBO J.* **14**, 4196-4203.

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.

Stibler, H., Hultcrantz, R. (1987) Carbohydrate-deficient transferrin in serum in patients with liver diseases. *Alcohol Clin Exp Res.* **11**, 468-473.

Stoll, J., Rosenwald, A. G., Krag, S. S. (1988) A Chinese hamster ovary cell mutant F2A8 utilizes polyprenol rather than dolichol for its lipid-

- dependent asparagine-linked glycosylation reactions. *J Biol Chem.* **263**, 10774-10782.
- Stronge, V. S., Saito, Y., Ihara, Y., Williams, D. B. (2001) Relationship between calnexin and BiP in suppressing aggregation and promoting refolding of protein and glycoprotein substrates. *J Biol Chem.* **276**, 39779-39787.
- Suzuki, T., Kitajima, K., Emori, Y., Inoue, Y., Inoue, S. (1997) Site-specific de-N-glycosylation of diglycosylated ovalbumin in hen oviduct by endogenous peptide: N-glycanase as a quality control system for newly synthesized proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**, 6244-9.
- Suzuki, T., Park, H., Kwofie, M. A., Lennarz, W. J. (2001) Rad23 provides a link between the Png1 deglycosylating enzyme and the 26 S proteasome in yeast. *J. Biol. Chem.* **276**, 21601-21607
- ## T
- Tamura, N., Lottspeich, F., Baumeister, W., Tamura, T. (1998) The role of tricorn protease and its aminopeptidase-interacting factors in cellular protein degradation. *Cell.* **95**, 637-648.
- Tokunaga, F., Brostrom, C., Koide, T., Arvan, P. (2000) Endoplasmic reticulum (ER)-associated degradation of misfolded N-linked glycoproteins is suppressed upon inhibition of ER mannosidase I. *J Biol Chem.* **275**, 40757-40764.
- Travers, K. J., Patil, C. K., Wodicka, L., Lockhart, D. J., Weissman, J. S., Walter, P. (2000) Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell.* **101**, 249-258.
- Tremi, K., Meimaroglou, D., Hentges, A., Bause, E. (2000) The alpha- and beta-subunits are required for expression of catalytic activity in the heterodimeric glucosidase II complex from human liver. *Glycobiology.* **10**, 493-502. *Trends Cell Biol.* **11**, 136-141.
- Trombetta, S. E., Bosch, M., Parodi, A.J. (1989) Glycosylation of glycoproteins by mammalian, plant, fungal, and trypanosomatid protozoa microsomal membranes. *Biochemistry.* **28**, 8108-8116.
- Trombetta, E. S., Helenius, A. (2000) Conformational requirements for glycoprotein reglucosylation in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.* **148**, 1123-1129.
- Trombetta, E. S., Fleming, K.G., Helenius, A. (2001) Quaternary and domain structure of glycoprotein processing glucosidase II. *Biochemistry.* **40**, 10717-10722.
- Trombetta, E. S. (2003) The contribution of N-glycans and their processing in the endoplasmic reticulum to glycoprotein biosynthesis. *Glycobiology.* **13**, 77R-91R.
- Turco, S. J., Robbins, P. W. (1979) The initial stages of processing of protein-bound oligosaccharides in vitro. *J Biol Chem.* **254**, 4560-4567.
- ## U
- Urano, F., Bertolotti, A., Ron, D. (2000) IRE1 and efferent signaling from the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci.* **113** 3697-3702.
- ## V
- Van Leeuwen, J. E., Kears, K. P. (1996) The related molecular chaperones calnexin and calreticulin differentially associate with nascent T cell antigen receptor proteins within the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* **271**, 25345-25349.
- Varki, A. (1996) "Unusual" modifications and variations of vertebrate oligosaccharides: are we missing the flowers for the trees? *Glycobiology.* **6**, 707-710.
- Velloso, L. M., Svensson, K., Schneider, G., Pettersson, R. F., Lindqvist, Y. (2002) Crystal structure of the carbohydrate recognition domain of p58/ERGIC-53, a protein involved in glycoprotein export from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* **277**, 15979-15984.
- Villers, C., Cacan, R., Mir, A. M., Labiau, O., Verbert, A. (1994) Release of oligomannoside-type glycans as a marker of the degradation of newly synthesized glycoproteins. *Biochem J.* **298**, 135-42.
- Vollenweider, F., Kappeler, F., Itin, C., Hauri, H. P. (1998) Mistargeting of the lectin ERGIC-53 to the endoplasmic reticulum of HeLa cells impairs the secretion of a lysosomal enzyme. *J Cell Biol.* **142**, 377-89.

Von Heijne G. (1985) Signal sequences. The limits of variation. *J. Mol. Biol.* **184**, 99-105.

Von Heijne G. (1990) Protein targeting signals. *Curr. Op. Cell. Biol.* **2**, 604-608.

Von Heijne G. (1998) Life and death of a signal peptide. *Nature* **396**, 111-113.

W

Walter, P., Lingappa, V. R. (1986) Mechanism of protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane. *Annu Rev Cell Biol.* **2**, 499-516.

Wang, C., Eufemi, M., Turano, C., Giartosio, A. (1996) Influence of the carbohydrate moiety on the stability of glycoproteins. *Biochemistry.* **35**, 7299-7307.

Wang, J. and White, A. L. (2000) Role of calnexin, calreticulin, and Endoplasmic Reticulum Mannosidase I in Apolipoprotein (a) intracellular targeting. *Biochemistry.* **39**, 8993-9000.

Ward, C. L., Omura, S., 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., Williams, D. B. (1995) The molecular chaperone calnexin binds Glc1Man9GlcNAc2 oligosaccharide as an initial step in recognizing unfolded glycoproteins. *J Biol Chem.* **270**, 4697-4704.

Weng, S., Spiro, R. G. (1993) Demonstration that a kifunensine-resistant alpha-mannosidase with a unique processing action on N-linked oligosaccharides occurs in rat liver endoplasmic reticulum and various cultured cells. *J Biol Chem.* **268**, 25656-25663.

Wiertz, E. J., Tortorella, D., Bogoy, M., Yu, J., Mothes, W., Jones, T. R., Rapoport, T. A., Ploegh H. L. (1996) Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature.* **384**, 432-438.

Wilson, C. M., Farmery, M. R. and Bulleid, N. J. (2000) Pivotal role of calnexin and mannosyl trimming in regulating the Endoplasmic Reticulum-associated Degradation of Major Histocompatibility Complex

Class I Heavy Chain. *J. Biol. Chem.* **275**, 21224-21232.

Y

Yang, M., Omura, S., Bonifacino, J. S. and Weissman, A. M. (1998) Novel aspects of degradation of T cell receptor subunit ϵ from the endoplasmic reticulum (ER) in T cells: importance of oligosaccharide processing, ubiquitination, and proteasome-dependent removal from ER membranes. *J. Exp. Med.* **187**, 835-846.

Yao, T., Cohen, R.E. (1999) Giant proteases: beyond the proteasome. *Curr Biol.* **9**, 551-553.

Yoshida, H., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., Mori, K. (1998) Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J Biol Chem.* **274**, 2592.

Yoshida, H., Okada, T., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., Negishi, M., Mori, K. (2001) Endoplasmic reticulum stress-induced formation of transcription factor complex ERSF including NF-Y (CBF) and activating transcription factors 6 α and 6 β that activates the mammalian unfolded protein response. *Mol Cell Biol.* **21**, 1239-1248.

Yoshida, Y., Tokunaga, F., Chiba, T., Iwai, K., Tanaka, K., Tai, T. (2003) Fbs2 is a new member of the E3 ubiquitin ligase family that recognizes sugar chains. *J Biol Chem.* Aug 25.

Yu, H., Kaung, G., Kobayashi, S., Kopito, R.R. (1997) Cytosolic degradation of T-cell receptor alpha chains by the proteasome. *J Biol Chem.* **272**, 20800-20804.

Z

Zinszner, H., Kuroda, M., Wang, X., Batchvarova, N., Lightfoot, R. T., Remotti, H., Stevens, J. L., Ron, D. (1998) CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* **12**, 982-995.

