

Processus « glyco-deglyco » au cours de la biosynthèse des N-glycosylprotéines

par André Verbert et René Cacan

Laboratoire de Chimie Biologique, UMR n° 111 du CNRS/USTL, Bâtiment C-9, Université des Sciences et Techniques de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq cedex.

Reçu le 26 octobre 1998

RÉSUMÉ

Au cours des quinze dernières années, quelques équipes, dont la nôtre, ont montré que la N-glycosylation des protéines était accompagnée de la production d'oligomannosides solubles. Ce matériel était constitué d'oligosaccharide-phosphates et d'oligosaccharides neutres possédant un ou deux résidus de N-acétylglucosamine à leur extrémité réductrice (nommé OS-Gn1 et OS-Gn2, respectivement). Nous avons démontré que les oligosaccharide-phosphates provenaient de la coupure, par une pyrophosphatase spécifique, des oligosaccharide-pyrophospho-dolichols localisés sur la face cytoplasmique du réticulum endoplasmique rugueux (principalement le $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$). Les OS-Gn2 proviennent de l'hydrolyse des intermédiaires lipidiques localisés à la face interne de la membrane du réticulum endoplasmique rugueux (du $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ au $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$). Ces divers OS-Gn2 subissent l'action des α -glucosidases et mannosidases du réticulum endoplasmique rugueux et c'est en tant que $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ qu'ils sont transportés dans le cytoplasme où ils subissent l'action séquentielle d'une chitobiase et de mannosidase(s) cytoplasmique(s) pour être réduits à la structure de $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_1$. Ce matériel peut être ensuite complètement dégradé dans les lysosomes.

Les OS-Gn1 retrouvés dans le cytoplasme peuvent avoir une double origine, soit à partir des OS-Gn2

comme indiqué ci-dessus, soit ils peuvent provenir de l'hydrolyse des glycoprotéines naissantes. Au cours de ces dernières années, des exemples de plus en plus nombreux soutiennent l'hypothèse que des glycoprotéines mal conformées sont dégradées par les protéasomes après retro-translocation dans le cytoplasme et qu'un préalable à cette dégradation soit la libération de leur partie glycanique par l'action d'endoglycosidases (PNGase ou endo-N-acetylglucosaminidase).

Considérés tout d'abord comme un événement mineur, ces phénomènes conduisent actuellement à élaborer des concepts plus généraux sur la régulation de la biosynthèse des glycoprotéines *via* des processus successifs de « glycosylation-déglycosylation ».

Cette revue est dédiée au Professeur Paul Boulanger dont une grande part de la carrière fut consacrée à l'étude de la structure des protéines pour en comprendre les fonctions. S'il est bien admis que beaucoup de fonctions biologiques sont portées par les protéines, il apparaît de plus en plus évident que les modifications co- et post-traductionnelles jouent un rôle essentiel dans la modulation de ces fonctions. Parmi ces modifications, la glycosylation est un événement majeur qui intervient à la fois dans la mise en conformation et la durée de vie biologique des protéines mais également dans de nombreux processus de reconnaissance.

INTRODUCTION

La N-glycosylation des protéines est une modification post-traductionnelle majeure des protéines dans les cellules eucaryotes. Elle implique deux voies métaboliques distinctes qui sont toutes deux localisées dans le réticulum endoplasmique rugueux : le cycle des dolichols qui mènent à la synthèse des intermédiaires lipidiques en ce qui concerne les donneurs des réactions de glycosylation, et la biosynthèse des protéines en ce qui concerne l'accepteur.

L'étape princeps de la N-glycosylation est le « transfert en bloc » d'un tétradecasaccharide sur un résidu asparaginyl de la protéine naissante. Ce tétradecasaccharide est pré-assemblé sur un résidu polyisoprénique particulier, le dolichol, *via* une liaison pyrophosphosphate pour former le $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-dolichol}$. Cet assemblage s'effectue étape par étape dans le réticulum endoplasmique rugueux. Le $\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ est tout d'abord formé par l'addition de GlcNAc-1-P sur le P-Dol, puis de GlcNAc sur le GlcNAc-P-P-Dol ainsi formé, le donneur,

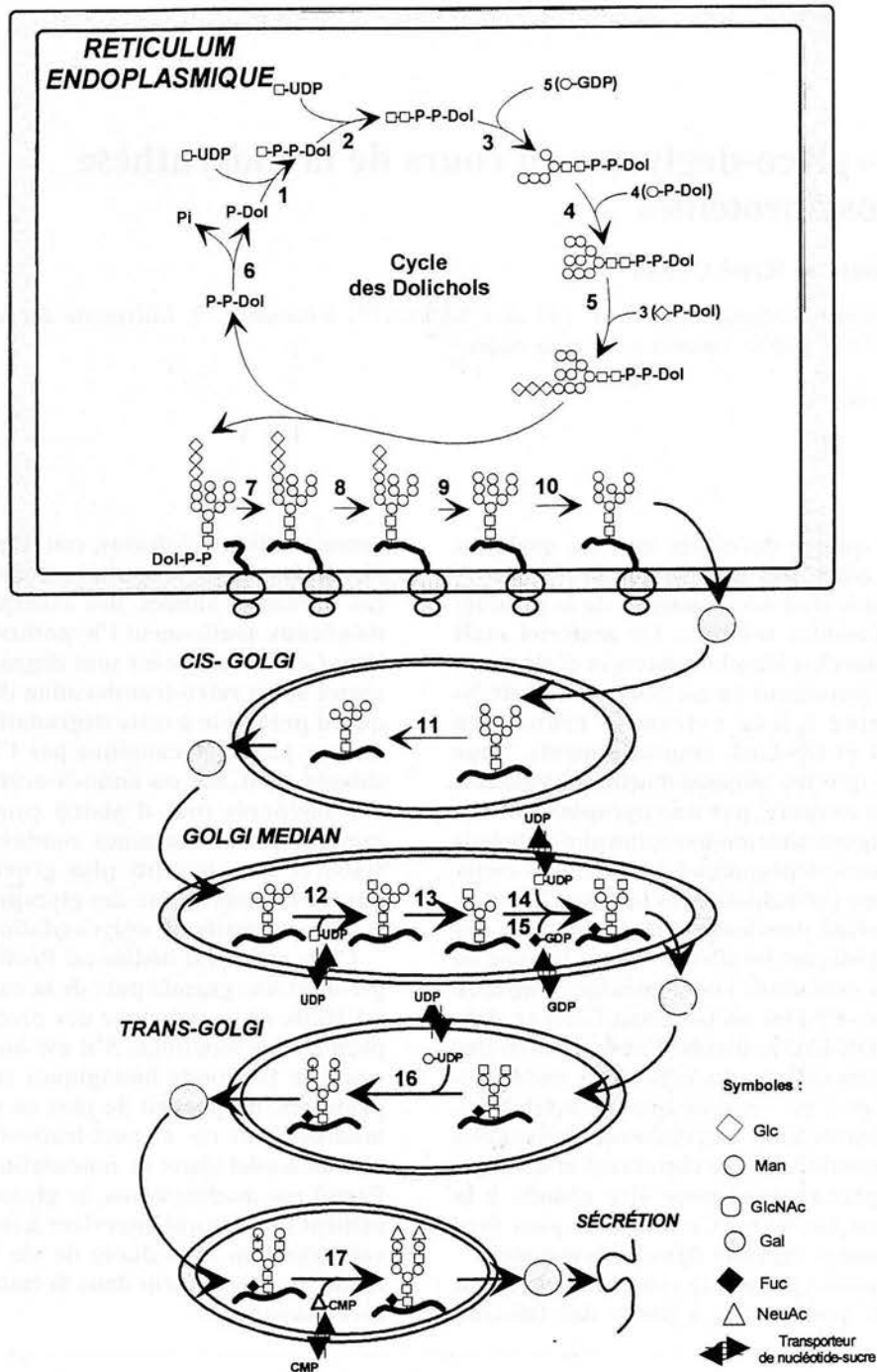


FIG. 1. — Le processus de N-glycosylation (adapté de Kornfeld & Kornfeld, Ref. 16).

La synthèse de l'intermédiaire lipidique se déroule dans la membrane du reticulum endoplasmique rugueux (RER). Les enzymes suivants sont impliqués :

étape 1 : GlcNAc-P-transférase ; étape 2 : GlcNAc-transférase ; étape 3 : cinq mannosyltransférases utilisant le GDP-Man comme donneur ; étape 4 : quatre mannosyl-transférases utilisant le Man-P-Dol comme donneur ; étape 5 : trois glucosyl-transférases utilisant le Glc-P-Dol comme donneur ; étape 6 : Dolichol-pyrophosphatase ; étape 7 : Oligosaccharidyl-transférase.

Les glycanes des glycoprotéines sont ensuite soumis aux réactions de déglycosylation :

étape 8 : Glucosidase I ; étape 9 : Glucosidase II ; étape 10 : Mannosidase du RER ; étape 11 : Mannosidase I ; étape 13 : Mannosidase II ;

et aux réactions de reglycosylation :

étape 12 : GlcNAc-transférase I ; étape 14 : GlcNAc-transférase II ; étape 15 : Fucosyltransférase ; étape 16 : Galactosyltransférase et étape 17 : Sialyltransférase (dans cet exemple).

étant dans les deux cas, l'UDP-GlcNAc. Ces deux réactions se déroulent sur la face cytoplasmique du réticulum endoplasmique rugueux.

Les étapes suivantes vont consister en l'addition de neuf résidus de mannose. Les cinq premiers le seront à partir de GDP-Man en une suite de réactions se déroulant sur la face cytoplasmique, les quatre derniers s'ajoutant, au contraire, sur la face luminale.

Ce dernier processus soulève deux questions : le retournement de l'intermédiaire $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ vers la face interne de la membrane et le transport des quatre résidus de mannose au site de glycosylation. La question du retournement d'un oligosaccharide-P-P-Dol dans la membrane reste encore énigmatique. La seconde question a trouvé sa réponse par l'implication d'un donneur secondaire, le Man-P-Dol, synthétisé face cytoplasmique à partir de GDP-Man et capable, étant donné son caractère hydrophobe, d'être donneur pour une réaction localisée dans la couche lipidique interne du réticulum endoplasmique rugueux.

C'est sur la même hypothèse que s'appuie l'addition des trois derniers résidus de glucose : synthèse face cytoplasmique de Glc-P-Dol à partir de l'UDP-Glc cytoplasmique, transport membranaire et réaction de glucosylation face luminale pour conduire au produit final, le $\text{Glc}_3\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$.

L'étape finale de glycosylation de l'intermédiaire lipidique lui confère une affinité plus grande pour l'oligosaccharyltransférase qui en fait son substrat préférentiel pour transférer la fraction glycannique sur la protéine. Il est connu depuis longtemps que le résidu asparaginyll doit être dans un triplet consensus : Asn-X-Thr (X étant un acide aminé quelconque, sauf la proline) pour pouvoir contracter une liaison N-glycosidique, mais on est loin de connaître tous les contrôles qui doivent s'exercer sur cette réaction-clef. La séquence Asn-X-Thr est nécessaire mais pas suffisante et il y a donc d'autres contraintes. Celles-ci sont-elles exercées par des acides aminés avoisinants comme la proline qui joue un rôle privilégié en affectant la structure secondaire ? Sont-elles exercées par l'environnement protéique plus large ? Cette question s'insère dans le problème général de la mise en conformation des protéines naissantes et de leur association aux chaperons protéiques. Sous quelle forme la protéine naissante portant une séquence consensus glycosylable se présente-t-elle à l'oligosaccharyltransférase ?

Il faut également remarquer que le processus de N-glycosylation est à la rencontre de deux voies anaboliques distinctes : la biosynthèse des protéines d'une part, la formation des intermédiaires lipidiques d'autre part. Comment ces deux processus sont-ils qualitativement et quantitativement ajustés ?

Une fois l'étape de transfert « en bloc » achevée, on est encore loin de la variété de structures que l'on observera sur la protéine mature. Les processus complexes de déglycosylation et de reglycosylation vont prendre place tout au long du trajet de la protéine dans les divers sacculs de l'appareil de Golgi (16), (Fig. 1) et conduire à l'élaboration des diverses familles de N-glycannes : le type oligomannosidique, le type N-acétyllactosaminique et le type hybride.

L'accès à ces compartiments golgiens sera conditionné par divers signaux portés à la fois par la protéine et le glycanne. En ce qui concerne la protéine, il s'agit par exemple de l'absence de séquence de rétention dans le réticulum endoplasmique rugueux. En ce qui concerne le glycanne, des glucosidases spécifiques et des mannosidases conduisent à la structure principale $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2\text{-protéine}$.

Il a été démontré récemment l'action d'une glucosyltransférase spécifique des glycoprotéines mal conformées qui permet leur rétention transitoire dans le réticulum jusqu'à ce qu'elles aient acquis leur conformation adéquate.

À côté de cette voie anabolique, l'idée de l'existence de voies cataboliques commence à avoir des supports expérimentaux. Il s'agit, par exemple, de la destruction de glycoprotéines faisant partie de complexes multimériques synthétisés en excès par rapport aux autres sous-unités.

LES PREMIÈRES OBSERVATIONS

En 1980, utilisant des lymphocytes spléniques de Rat, nous observions que lors d'une expérience de chasse réalisée avec du GDP-mannose, il n'y avait qu'une petite proportion des oligosaccharides-PP-Dol qui étaient utilisés pour les réactions de transfert « en bloc » sur les protéines naissantes. En fait, la majeure partie de la radioactivité chassée se retrouvait sous forme d'oligosaccharides libres (4). L'analyse de ce matériel oligosaccharidique révélait qu'il était formé d'oligosaccharides phosphorylés sur l'extrémité réductrice ou d'oligosaccharides neutres dont les tailles étaient de l'ordre d'un décasaccharide. De cette observation initiale nous suggérons que la destinée des oligosaccharide-PP-Dols n'était pas seulement la glycosylation des protéines mais qu'ils pouvaient être hydrolysés et produire des oligosaccharides phosphates (OSP) ou des oligosaccharides neutres (OS-Gn2 et OS-Gn1). Des observations semblables avaient été faites lors d'expériences réalisées avec des microsomes de myélome murin (14), de foie de Porc (21) ou de foie de Rat (27).

CARACTÉRISATION DU MATÉRIEL OLIGOSACCHARIDIQUE SOLUBLE ET MODÈLES BIOLOGIQUES

Deux approches expérimentales furent utilisées pour caractériser ce matériel oligosaccharidique. La première consiste en marquage métabolique de cultures cellulaires avec des monosaccharides radiomarqués (principalement le 2- ^3H mannose). Cette méthode conduit à un marquage très efficace et permet la détermination de la structure de ces composés sur la base de leur comportement chromatographique, de leur sensibilité à divers enzymes et, dans certains cas, par l'analyse directe sur la base de la méthylation. La seconde approche fut l'utilisation de cellules dont seule la membrane plasmique était rendue perméable aux glycosyl-nucléotides. Ceci permettait l'accès de ces précurseurs aux vésicules intracellulaires tout en évitant

les inconvénients ou artefacts du fractionnement cellulaire. Plusieurs techniques de perméabilisation ont été utilisées : la perméabilisation mécanique par « arrachage » des cellules adhérentes au support utilisé en culture cellulaire, par l'utilisation ménagée de détergent ou par la perméabilisation sélective par la streptolysin O (17, 20). Toutes précautions étant prises, la perméabilisation des membranes plasmiques permet de préserver l'intégrité des vésicules intracellulaires et nous a permis d'étudier du trafic intracellulaire de ce matériel oligosaccharidique.

Le protocole expérimental utilisé pour leur caractérisation structurale est résumé dans la figure 2. Brièvement, après avoir effectué l'extraction séquentielle des lipides, le matériel oligosaccharidique récupéré dans la phase aqueuse est purifié par chromatographie sur Biogel P-2 puis sur QAE Sephadex qui permet la séparation des oligosaccharides neutres (OS, non retenus) des oligosaccharides phosphates (OSP). La nature de ces oligosaccharides est déterminée par HPLC, par comparaison avec les glycanes liés aux intermédiaires lipidiques et aux glycanes liés aux glycoprotéines (15)

DÉGLYCOSYLATION « EN BLOC » DES OLIGOSACCHARIDE-PP-DOL

Formation d'oligosaccharide-phosphates

Le fait que la tunicamycine et la bacitracine inhibaient la formation d'oligosaccharide-phosphates (4) nous a sug-

géré qu'ils provenaient d'une coupure enzymatique de la liaison pyrophosphate des oligosaccharide-PP-Dols. Par la suite, nous avons caractérisé cette activité pyrophosphatase dans la levure et montré qu'elle était spécifique des intermédiaires lipidiques non glycosylés (2).

Grâce à l'utilisation de mutants de cellules CHO (5), nous avons démontré que, quelles que soient les populations d'intermédiaires lipidiques, les oligosaccharide-phosphates formés étaient toujours de structure à cinq mannoses ($\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P}$) ou à deux mannoses ($\text{Man}_2\text{GlcNAc}_2\text{-P}$). Étant donné la topographie transmembranaire des intermédiaires lipidiques (30), ce résultat suggère que les oligosaccharide-phosphates sont issus des intermédiaires lipidiques formés à la face cytoplasmique des membranes du réticulum endoplasmique. Des expériences ultérieures ont démontré que ces oligosaccharide-phosphates étaient effectivement libérés dans le cytoplasme (6).

Cette hydrolyse des intermédiaires constitue une étape de régulation de la glycosylation en contrôlant leur disponibilité pour la glycosylation ultérieure des protéines.

Formation d'oligosaccharides neutres

Dans nos premières observations (4) en 1980, nous décrivions également la présence d'oligosaccharides neutres dans la phase aqueuse des extractions lipidiques. Cette observation était également faite par Hannover et Lennarz (9, 10) en 1981 et par Anumula et Spiro (1) en 1983. Ces derniers retrouvaient deux populations d'oli-

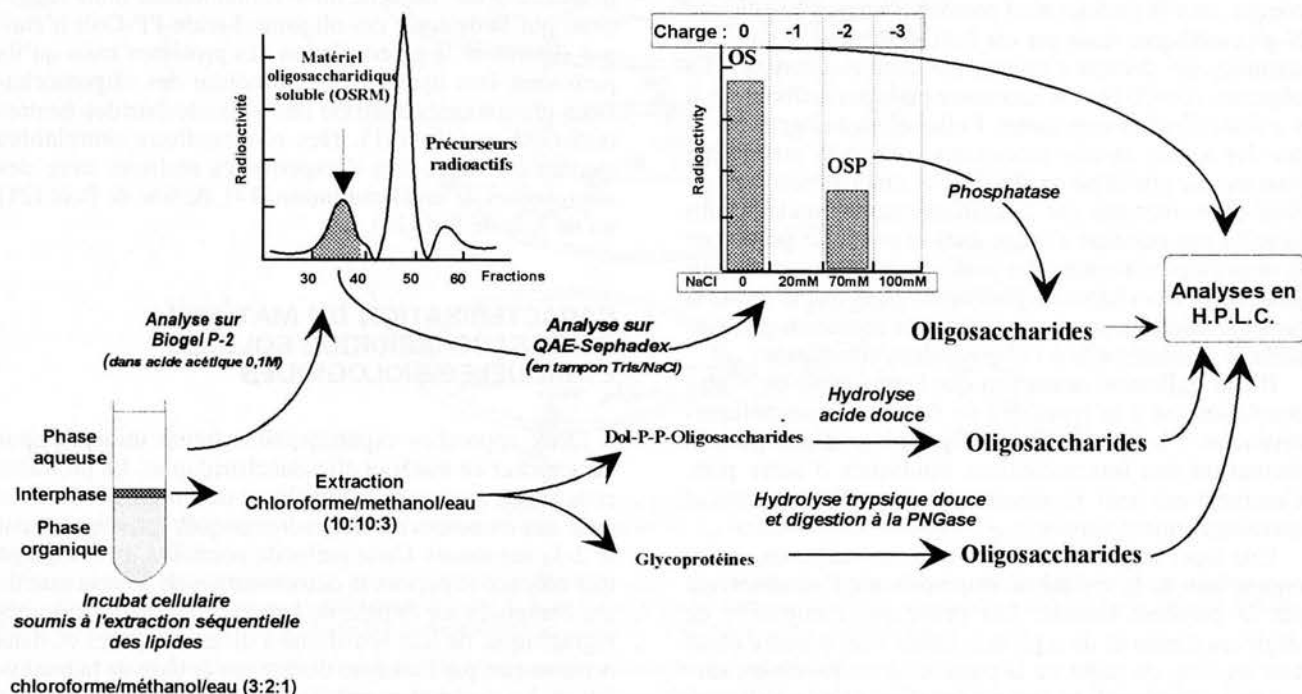


FIG. 2. — Diagramme expliquant la méthodologie d'isolement des fractions oligosaccharidiques.

Les oligosaccharides solubles sont isolés à partir de la phase soluble de l'extraction lipidique séquentielle. Les copules glycaniques des intermédiaires lipidiques et des glycoprotéines sont coupées et analysées ensuite par Chromatographie Liquide Haute Pression.

gomannosides, l'une possédant une unité de chitobiose en position reductrice (OS-Gn2), l'autre ne possédant qu'un seul résidu de N-acétylglucosamine en position reductrice (OS-Gn1). Il était suggéré que les OS-Gn2 provenaient de l'hydrolyse des oligosaccharide-PP-Dols comme si l'oligosaccharidyltransférase utilisait l'eau comme accepteur.

En 1989, nous démontrions (6), à l'aide de cellules perméabilisées, que cette hydrolyse des oligosaccharide-PP-Dols se déroulait dans la lumière du réticulum endoplasmique rugueux.

En 1994, Moore et Spiro (18) montraient que les OS-Gn2 se distribuaient également dans le cytoplasme et la lumière du réticulum endoplasmique rugueux alors que les OS-Gn1 étaient strictement retrouvés dans le cytoplasme. En 1995, nous avons suivi la cinétique de formation de ces oligosaccharides neutres, et démontré que les OS-Gn2 étaient effectivement formés dans la lumière du réticulum endoplasmique, qu'ils étaient ensuite transportés dans le cytoplasme (15, 19) où ils subissaient l'action séquentielle d'une chitobiase spécifique, puis de

mannosidases pour atteindre la structure limite $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_1$. La dégradation de cet oligomannoside se poursuit après son transport dans le lysosome (29) (Fig. 3).

RÔLES POSSIBLES DE LA DÉGLYCOSYLATION DES INTERMÉDIAIRES LIPIDIQUES

Les processus de déglycosylation des intermédiaires lipidiques peuvent être envisagés comme jouant un rôle dans le contrôle de la glycosylation. Nous avons montré que les premiers intermédiaires lipidiques synthétisés sur la face cytoplasmique du réticulum endoplasmique pouvaient être hydrolysés par une pyrophosphatase spécifique. Celle-ci contrôlerait le taux d'intermédiaires lipidiques dès les premières étapes de leur formation. De plus, cette étape régénère le phosphodolichol et constitue un by-pass du cycle des dolichols (5).

Des expériences de chasse ont montré clairement que les intermédiaires lipidiques sont à l'origine de la forma-

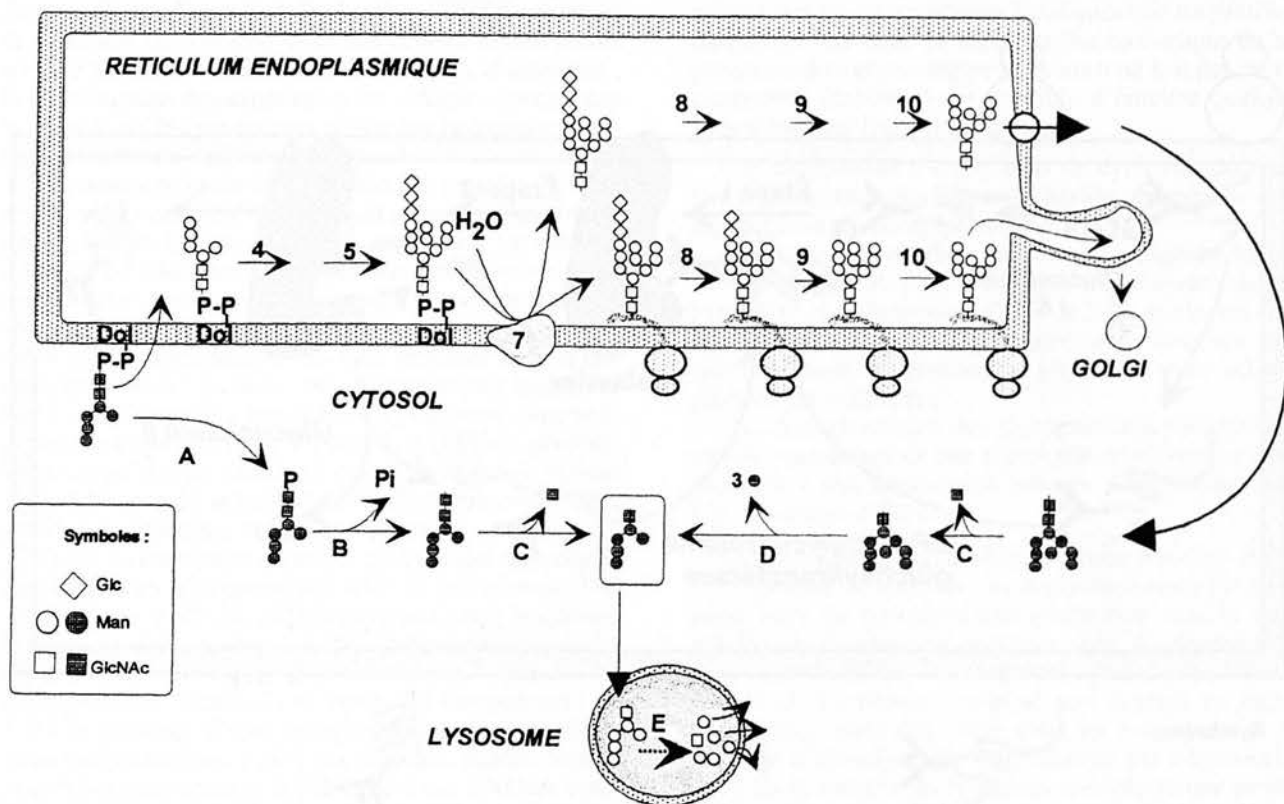
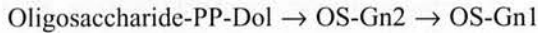


FIG. 3. – Le trafic intracellulaire des oligosaccharides.

Les oligosaccharide-phosphates (OSP) sont libérés à partir du $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P}$ à la face cytoplasmique des vésicules du réticulum endoplasmique par une oligosaccharide-P-P-dolichyl-pyrophosphatase (A), et le $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P}$ libéré est soumis à l'action d'une phosphatase (B), puis d'une chitobiase (C).

Après avoir été transportée sur la face luminale de la membrane du RER, la copule glucidique du $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ est allongée par des mannosyltransférases situées sur la face luminale du RER (4), puis des glucosyl-transférases (5). L'intermédiaire lipidique complet $\text{Glc}_2\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$, qui est le substrat de l'oligosaccharidyltransférase (7), est transféré soit sur une protéine en cours de synthèse, soit sur l'eau. L'oligosaccharide $\text{Glc}_2\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ libéré suite à un transfert sur l'eau est successivement soumis à l'action des glucosidases I et II (8) et (9), et de la mannosidase spécifique du RER (10). Le $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ est ensuite transporté vers le cytosol et séquentiellement dégradé par une chitobiase (C), puis une mannosidase cytosolique (D). Le $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_1$ est transporté dans le lysosome où sa dégradation se poursuit en libérant du mannose et de la N-Acétylglucosamine (E).

tion d'oligosaccharides neutres selon le schéma simple, voire simpliste, suivant :



En fait, Anumula et Spiro (1) ont démontré les premiers, en 1983, que la formation des OS-Gn2 entrainait en compétition avec la glycosylation des protéines et que l'oligosaccharyltransférase utilisait le même substrat pour glycosyler les protéines et pour générer les OS-Gn2 (32). Ainsi, un autre contrôle du taux d'intermédiaires lipidiques disponibles pour la glycosylation des protéines pouvait être exercé par l'activité hydrolytique de l'oligosaccharyltransférase qui ajusterait le taux d'intermédiaires lipidiques au taux de protéines à glycosyler (36).

DÉGLYCOSYLATION ET RÉGLYCOSYLATION DES N-GLYCOPROTÉINES

Il est bien connu que la formation des glycanes de type N-acétyllactosaminique ou de type hybride passe

par toute une série d'étapes de déglycosylation et reglycosylation qui se déroulent dans l'appareil de Golgi comme il a été rapidement décrit dans l'introduction.

Deux autres processus de « glyco-déglyco » n'ont été découverts que plus récemment, ils prennent place dans le reticulum endoplasmique rugueux.

Déglycosylation et mécanismes de contrôle-qualité des glycoprotéines

Les réactions d'épissage des glycanes qui se déroulent dans le reticulum endoplasmique dès la réaction de transfert sur la protéine commencent par l'élimination des trois résidus de glucose par l'action successive des glucosidases I et II. Cependant, une reglycosylation temporaire (22, 31, 35) peut avoir lieu sous l'action d'une glycosyltransférase interagissant spécifiquement avec des sites hydrophobes des glycoprotéines n'étant pas encore sous leur conformation compatible avec leur migration vers l'appareil de Golgi. Ainsi, la glycosyltransférase agit comme un « capteur » de structures protéiques dénaturées.

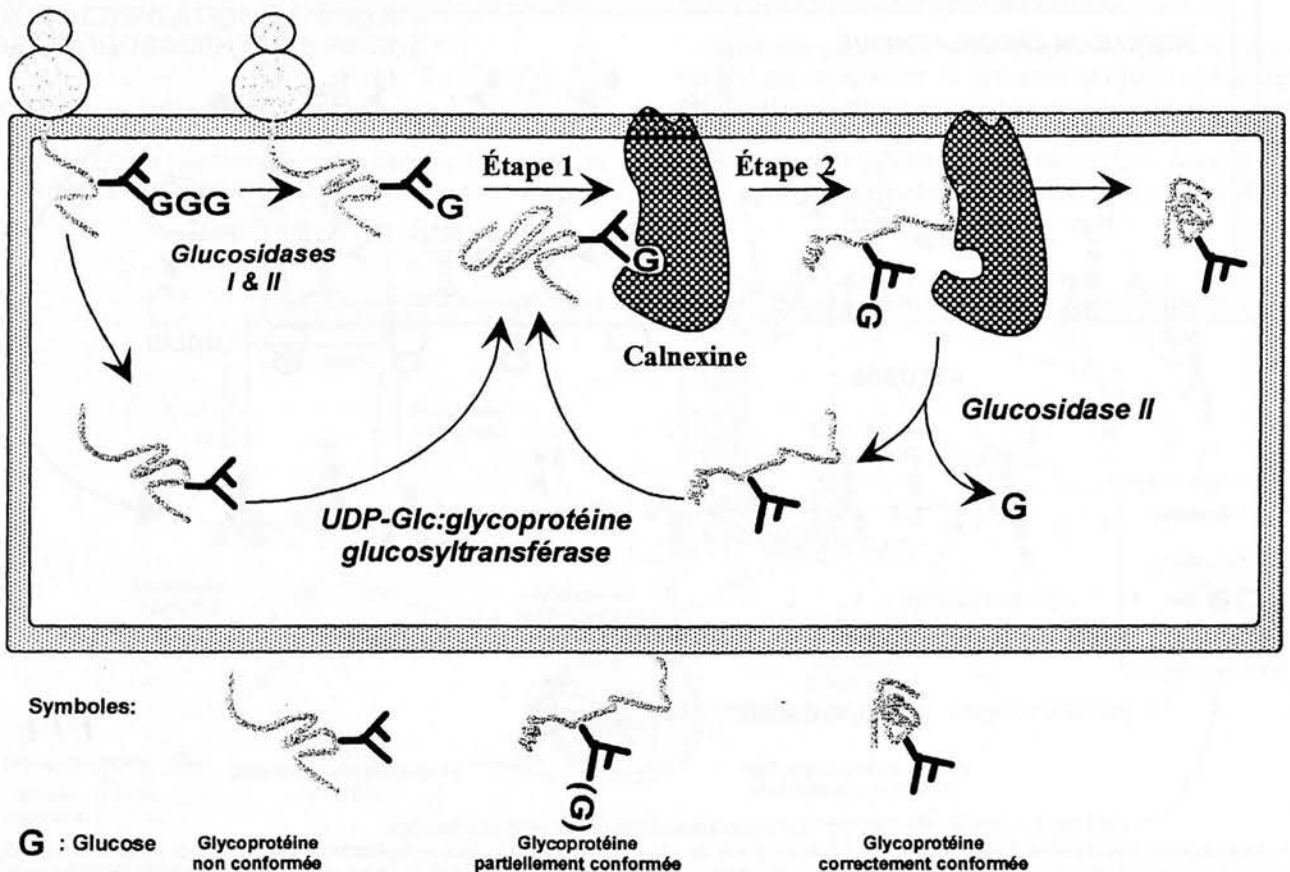


FIG. 4. – Modèle expliquant la liaison de la calnexine à son substrat : une glycoprotéine en voie de conformation.

Après avoir subi une déglycosylation sous l'action des glucosidases I et II, le glycanne monoglycosylé sert de médiateur à l'interaction entre la glycoprotéine et la calnexine (étape 1). Suite à cette association initialement assurée par les sucres, de fortes interactions protéine-protéine ont lieu entre le chaperon protéique (calnexine) et des séquences peptidiques de son substrat (la protéine) (étape 2). La libération de glycoprotéine partiellement ou mal conformée se déroule en impliquant une déglycosylation par la glucosidase II. Des cycles d'association-dissociation des glycoprotéines peuvent se produire suite à la reglycosylation des copules glycaniques par l'UDP-Glc:glycoprotéine glucosyltransférase jusqu'à ce que la glycoprotéine acquiert sa conformation spatiale correcte.

rées, partiellement conformées ou non encore capables de s'associer dans des structures oligomériques (23). Des chaperons protéiques, telles la calnexine ou la calréticuline s'associent à ces glycoprotéines monoglycosylées et les retiennent dans le réticulum jusqu'à ce qu'elles aient atteint leur repliement correct. Cette « navette » de déglycosylation et reglycosylation permet un contrôle-qualité des glycoprotéines naissantes (11, 12, 23, 28) (Fig. 4).

Un autre système de déglycosylation implique la coupure du chaînon Glc α 1-3 Man par l'action d'une endomannosidase. La copurification de la calréticuline et de cette endomannosidase suggère que la dissociation de la glycoprotéine liée à la calréticuline subviendrait plutôt par l'action de cet enzyme que *via* l'action de la glucosidase II (33).

Déglycosylation « en bloc » des glycoprotéines naissantes

Ci-dessus, nous avons montré que des OS-Gn1 pouvaient provenir de la dégradation d'OS-Gn2 sous l'action d'une chitobiase cytosolique (7). Cependant, une analyse plus fine des résultats ne permet pas de leur attribuer cette origine de façon exclusive. D'une part, l'utilisation d'EDTA qui inhibe la formation des OS-Gn2 dans des cellules thyroïdiennes n'empêche pas la formation d'OS-Gn1 (32), d'autre part, la quantification des expériences de « chasse » montre que la quantité d'OS-Gn1 est plus élevée que la quantité d'OS-Gn2 au début de l'expérience (36).

Une autre origine doit être recherchée pour les OS-Gn1 et il a été envisagé qu'ils pouvaient provenir d'un clivage des glycannes liés aux protéines naissantes. En utilisant à la fois un inhibiteur de la synthèse des protéines (anisomycine) et la castanospermine pour empêcher la déglycosylation des oligosaccharides solubles, nous démontrons que la formation d'OS-Gn1 provient bien d'une déglycosylation « en bloc » des glycoprotéines naissantes (8). Cette libération a lieu dans le cytoplasme comme le prouve la présence, dans le cytosol, d'OS-Gn1 glycosylés alors qu'il a été démontré que la présence de résidus glycosylés interdit le transport des oligomannosides de la lumière du réticulum vers le cytoplasme.

Il reste à comprendre comment peut se faire cette déglycosylation des glycoprotéines dans le cytoplasme. Dès 1979, Pierce *et al.* (24, 25) découvraient, dans le cytosol, la présence d'une endoglycosidase capable de couper des glycannes de type oligomannosidique portés par des N-glycoprotéines. Anumula et Spiro (1) démontraient en 1983 la présence d'une endoglycannase dans des fractions microsomiques. Enfin, ces dernières années, Suzuki *et al.* (34) démontraient la présence d'une PNGase cytosolique qui pourrait générer des OS-Gn2 dans le cytoplasme mais, à l'inverse, Weng et Spiro (38) décrivaient une PNGase dans la lumière du réticulum endoplasmique.

Il se pose également la question du transport d'une glycoprotéine naissante hors de la lumière du réticulum endoplasmique. Récemment, il a été démontré que cette dégradation pouvait se dérouler dans le complexe cytosolique du protéasome (39, 40). La glycoprotéine à dégrader doit alors repasser la membrane du réticulum endoplasmique pour y être préalablement déglycosée puis

ubiquitinyllée (3, 13, 26, 37, 39). Il a été démontré que c'est par le complexe enzymatique du « translocon », ce complexe même qui avait permis la synthèse de la protéine et sa pénétration dans la lumière du réticulum, que la protéine retransverse la membrane.

La dégradation de glycoprotéines qui viennent d'être synthétisées serait due à la nécessité de détruire des protéines mal conformées, qui ne pourront plus jouer leur rôle biologique et pour lesquelles il est inutile de laisser poursuivre le trafic vers la membrane plasmique.

CONCLUSIONS

Il apparaît donc que le processus de N-glycosylation des protéines est une suite d'étapes de glycosylation et de déglycosylation qui permettent de contrôler à tout instant son bon déroulement. A côté des étapes bien établies d'une alternance d'élagages et d'additions de monosaccharides qui constitue les étapes permettant l'élaboration des divers types de glycannes N-liés aux protéines, nous avons décrit des étapes de « déglycosylation en bloc » qui affecte tant les intermédiaires lipidiques que les protéines naissantes. Quoique la signification biologique de ces processus de « glyco-déglycosylation » ne soit pas encore clairement établie, il est possible d'émettre quelques hypothèses sur leur raison d'être :

- la constitution d'un by-pass du cycle des dolichols *via* la formation des oligosaccharide-phosphates et la régénération du phospho-dolichol ;
- l'ajustement du taux de donneurs oligosaccharide-PP-Dol au taux de sites protéiques à glycosyler *via* leur hydrolyse et la formation d'OS-Gn2. Le cycle des dolichols semble en effet fonctionner en permanence alors que la quantité de protéines à glycosyler varie selon la physiologie cellulaire ;
- la déglycosylation des glycoprotéines naissantes en vue du remodelage de leur glycosylation ou comme étape préalable à leur dégradation précoce. Ceci conduit alors à la formation d'OS-Gn1.

Le matériel oligosaccharidique neutre (OS-Gn1 et OS-Gn2) produit au cours de ces déglycosylations est transporté hors du réticulum endoplasmique vers le cytoplasme où il subit une première série de dégradations jusqu'à la formation d'un composé cytosolique ultime, le Man5Gn1. Ce dernier composé sera dégradé en monosaccharides après être entré dans les lysosomes. Il est possible d'envisager que l'élimination des oligosaccharides de la lumière du réticulum endoplasmique permet d'éviter le dysfonctionnement, par compétition, de protéines dont l'activité biologique requiert la reconnaissance d'oligosaccharides : c'est le cas des chaperons protéiques de type calnexine, c'est le cas des glycosidases, c'est le cas des glycosyltransférases. Dans ces cas, l'accumulation d'oligosaccharides dans la lumière viendrait perturber leur bon fonctionnement par inhibition compétitive. La figure 5 résume notre vue actuelle des différentes étapes des processus « glyco-déglyco » qui s'établissent au cours de la N-glycosylation des protéines.

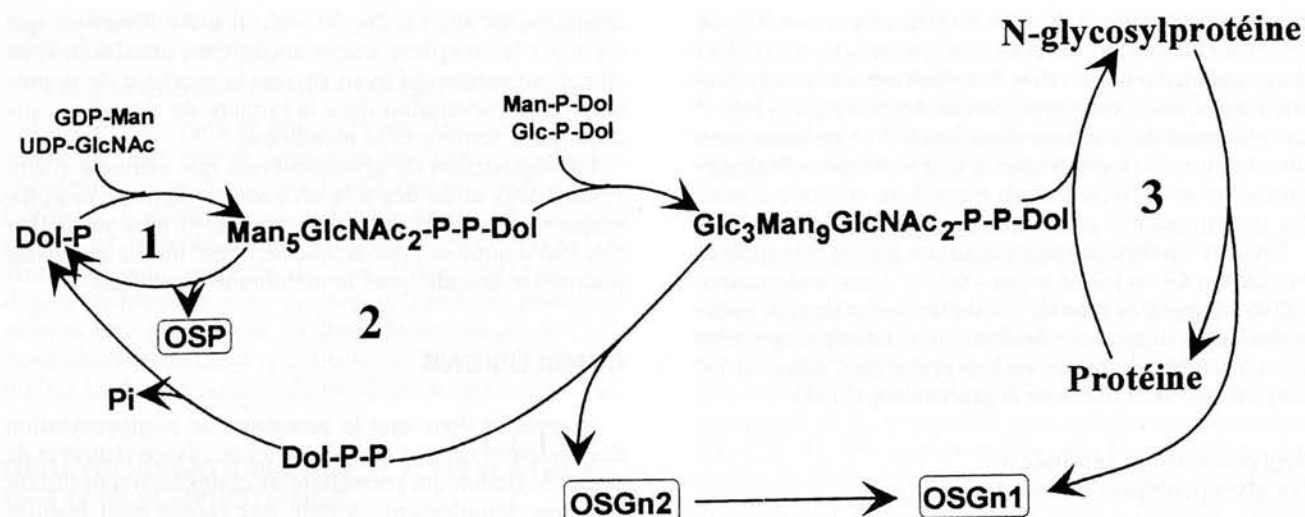


FIG. 5. — Représentation schématique des processus « glyco-déglyco » lors de la N-glycosylation.

Les processus « glyco-déglyco » sont résumés de la manière suivante :

- 1 : Synthèse du $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ et libération des oligosaccharide-phosphates (OSP).
- 2 : Synthèse du $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ et libération d'oligosaccharides neutres possédant deux GlcNAc à leur extrémité réductrice (OS-Gn2).
- 3 : Glycosylation de la protéine et libération d'oligosaccharides neutres possédant un GlcNAc à leur extrémité réductrice (OS-Gn1).

SUMMARY "Glyco-deglyco" processes during the biosynthesis of N-glycoproteins

For the past fifteen years, it has appeared increasingly evident that the N-glycosylation process was accompanied by the release of oligomannoside type oligosaccharides. This material is constituted of oligosaccharide-phosphates and of neutral oligosaccharides possessing one GlcNAc (OS-Gn1) or two GlcNAc (OS-Gn2) at the reducing end.

It has been demonstrated that oligosaccharide-phosphates originated from the cleavage, by a specific pyrophosphatase, of non-glucosylated cytosolic faced oligosaccharide-PP-Dol and chiefly the $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$. The $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P}$, as the main product, is recovered in the cytosolic compartment and is further degraded to $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_1$ by not-yet depicted enzymes.

In contrast, OS-Gn2 produced from hydrolysis of oligosaccharide-PP-Dol (presumably as a transfer reaction onto water) when the amount of protein acceptor is limiting, are generated into the lumen of rough endoplasmic reticulum (rough ER). They are further submitted to processing α -glucosidases and rough ER mannosidase and are (mainly as $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$) exported into the cytosolic compartment. This material is further degraded into a single component, the $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_1$, by the sequential action of a cytosolic neutral chitobiase followed by cytosolic mannosidase(s).

Furthermore, OS-Gn1 could have a dual origin : in

one hand, they originate from OS-Gn2 by the cytosolic degradation pathway indicated above, on the other hand, we will discuss a possible origin from the degradation or remodelling of newly synthesized glycoproteins.

Considered first as a minor phenomenon, these observations have lead to the concept of intracellular oligomannoside trafficking, a process which results from more fundamental phenomena such as the control of the dolichol cycle, and the so-called quality-control of glycoprotein. In this review, we would like to describe the evolution of ideas on the origin, intracellular trafficking and putative roles of these oligomannosides released during the N-glycosylation process. We propose that these early stage "glyco-deglyco" processes represent a way of control of N-glycosylation and of the fate of N-glycoproteins.

This review is dedicated to Pr Paul Boulanger who has spent a large part of his career to determine the structure of proteins in order to understand their functions. If it is well established that many biological functions are born by proteins, it appears more and more evident that co- or post translational modifications are of importance in the modulation of these functions. Among them, the glycosylation appears as a major event which intervene in the 3D structure of the protein, which control his biological time-life and which may act in many recognition processes.

BIBLIOGRAPHIE

1. Anumula K. R. & Spiro R. G., Release of glucose-containing polymannose oligosaccharides during glycoprotein biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, 1983, 258, 15274-15282.
2. B  lard M., Cacan R. & Verbert A., Characterization of an oligosaccharide-pyrophosphodolichol pyrophosphatase in yeast. *Biochem. J.*, 1988, 255, 235-242.
3. Bonifacino J. S., Reversal of fortune for nascent proteins. *Nature*, 1996, 384, 405-406.
4. Cacan R., Hoflack B. & Verbert A., Fate of oligosaccharide-lipid intermediates synthesized by resting rat-spleen lymphocytes. *Eur. J. Biochem.*, 1980, 106, 473-479.
5. Cacan R., Villers C., B  lard M., Kaiden A., Krag S.S. & Verbert A., Different fates of the oligosaccharide moieties of lipid intermediates. *Glycobiology*, 1992, 2, 127-136.
6. Cacan R., Lepers A., B  lard M. & Verbert A., Catabolic pathway of oligosaccharide-diphosphodolichol: subcellular sites of the degradation of the oligomannoside moiety. *Eur. J. Biochem.*, 1989, 185, 173-179.
7. Cacan R., Dengremont, C. Labiau O., Kmi  cik D., Mir A.-M. & Verbert A., Occurrence of a cytosolic neutral chitinase activity involved in oligomannoside degradation: a study with Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK) cells. *Biochem. J.*, 1996, 313, 597-602.
8. Duvet S., Labiau O., Mir A.-M., Kmi  cik D., Krag S.S., Verbert A. & Cacan R., Cytosolic deglycosylation process of newly synthesized glycoproteins generates oligomannosides possessing one GlcNAc residue at the reducing end. *Biochem. J.*, 1998, 34 (sous presse).
9. Hanover J. A. & Lennarz J., Transmembrane assembly of membrane and secretory glycoproteins. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1981, 211, 1-19.
10. Hanover J. A. & Lennarz J., Transmembrane assembly of N-linked glycoproteins. *J. Biol. Chem.*, 1982, 257, 2787-2794.
11. Hebert D. N., Foellmer B. & Helenius A., Glucose trimming and reglucosylation determine glycoprotein association with calnexin in the endoplasmic reticulum. *Cell*, 1995, 81, 425-433.
12. Hebert D.N., Foellmer B. & Helenius A., Calnexin and calreticulin promote folding, delay oligomerization and suppress degradation of influenza hemagglutinin in microsomes. *EMBO J.*, 1996, 15, 2961-2968.
13. Hughes E.A., Hammond C. & Cresswell P., Misfolded major histocompatibility complex class I heavy chains are translocated into the cytoplasm and degraded into the proteasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94, 1896-1901.
14. Hsu A. F., Baynes J. W. & Heath E. C., The role of a dolichol-oligosaccharide as an intermediate in glycoprotein biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1974, 71, 2391-2395.
15. Kmi  cik D., Herman V., Stroop C. J. M., Michalski J.-C., Mir A.-M., Labiau O., Verbert A. & Cacan R., Catabolism of glycan moieties of lipid intermediates leads to a single Man₅GlcNAc oligosaccharide isomer: a study with permeabilized CHO cells. *Glycobiology*, 1995, 5, 483-494.
16. Kornfeld R. & Kornfeld S., Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Ann. Rev. Biochem.*, 1985, 54, 631-664.
17. Lepers A., Cacan R. & Verbert A., Permeabilized cells as a way of gaining access to intracellular organelles: an approach to glycosylation reactions. *Biochimie*, 1990, 72, 1-5.
18. Moore S. E. H. & Spiro R. G., Intracellular compartmentalization and degradation of free polymannose oligosaccharides released during glycoprotein biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, 1994, 269, 12715-12721.
19. Moore S. E. H., Bauvy C. & Codogno P., Endoplasmic reticulum to cytosol transport of free polymannose oligosaccharides in permeabilized HepG2 cells. *EMBO J.*, 1995, 14, 6034-6042.
20. Ojcus D. M. & Young J. D.-E., Cytosolic pore-forming proteins and peptides: is there a common structural motif? *TIBS*, 1991, 16, 225-229.
21. Oliver G. J. A., Harrison J. & Hemming F. W., The mannosylation of dolichol-diphosphate oligosaccharides in relation to the formation of oligosaccharides and glycoproteins in pig liver endoplasmic reticulum. *Eur. J. Biochem.*, 1975, 58, 223-229.
22. Parodi A.J., Mendelzon D.H. & Lederkremer G. Z., Transient glucosylation of protein-bound Man₅GlcNAc₂, Man₆GlcNAc₂ and Man₇GlcNAc₂ in calf thyroid cells: a possible recognition signal in the processing of glycoproteins. *J. Biol. Chem.*, 1983, 258, 8260-8265.
23. Parodi A.J., The UDP-Glc: glycoprotein glucosyltransferase and the quality control of glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum. *TIGG*, 1996, 8, 1-12.
24. Pierce R. J., Spik G. & Montreuil J., Cytosolic location of an endo-N-acetyl-  -D-glucosaminidase activity in rat liver and kidney. *Biochem. J.*, 1979, 180, 673-676.
25. Pierce R. J., Spik G. & Montreuil J., Demonstration and cytosolic location of an endo-N-acetyl-  -D-glucosaminidase activity towards an asialo-N-acetyl-lactosaminic-type substrate in rat liver. *Biochem. J.*, 1980, 185, 261-264.
26. Qu D., Teckman J. H., Omura S. & Perlmutter D. H., Degradation of a mutant secretory protein,   ₁-antitrypsin Z, in the endoplasmic reticulum requires proteasome activity. *J. Biol. Chem.*, 1996, 271, 22791-22795.
27. Richard M., Tytgat F. & Louisot P., Study of nuclear mannosyl-transferase: lipid intermediates. *Biochimie*, 1978, 60, 593-599.
28. Rodan A. R., Simons J. F., Trombetta E.S. & Helenius A., N-linked oligosaccharides are necessary and sufficient for association of glycosylated forms of bovine RNase with calnexin and calreticulin. *EMBO J.*, 1996, 15, 6921-6930.
29. Saint-Pol A., Bauvy C., Codogno P. & Moore S. E. H., Transfer of free polymannose type oligosaccharides from the cytosol to lysosomes in cultured human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *J. Cell. Biol.*, 1997, 136, 45-59.
30. Snider M. D. & Rogers O. C., Transmembrane movement of oligosaccharide-lipids during glycoprotein synthesis. *Cell*, 1984, 36, 753-761.
31. Sousa, M. C., Parodi A. J., The interaction of the UDP-Glc: glycoprotein glucosyltransferase with the acceptor glycoprotein. *Cell. Mol. Biol.*, 1996, 42, 609-616.
32. Spiro M. J. & Spiro R. G., Potential regulation of N-glycosylation precursor through oligosaccharide-lipid hydrolase action and glucosyltransferase-glucosidase shuttle. *J. Biol. Chem.*, 1991, 266, 5311-5317.
33. Spiro R. G., Zhu Q., Bhoyroo V. & S  ling H.-D., Definition of the lectin-like properties of the molecular chaperone calreticulin and demonstration of its copurification with endomannosidase from rat liver Golgi. *J. Biol. Chem.*, 1996, 271, 11588-11594.
34. Suzuki T., De-N-glycosylation system does occur ubiquitously in animal cells! *TIGG*, 1996, 8, 367-368.
35. Trombetta E.S., Bosch M. & Parodi A.J., Glucosylation of glycoproteins by mammalian, plant, fungal and trypanosomatid protozoa microsomal membranes. *Biochemistry*, 1989, 28, 8108-8116.
36. Villers C., Cacan R., Mir A.-M., Labiau O. & Verbert A., Release of oligomannoside-type glycans as a marker of the degradation of newly synthesized glycoprotein. *Biochem. J.*, 1994, 298, 135-142.

37. Ward, C. L., Omura S. & Kopito R. R., Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell*, 1995, 83, 121-127.
38. Weng S. & Spiro R. G., Demonstration of a peptide: N-glycosidase in the endoplasmic reticulum of rat liver. *Biochem. J.*, 1997, 322, 655-661.
39. Wiertz E. J. H. J., Jones T. R., Sun L., Bogoy M., Geuze H. J. & Ploegh H. L., The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Cell*, 1996, 84, 769-779.
40. Wiertz E. J. H. J., Tortorella D., Bogoy M., Yu J., Mothes W., Jones T. R., Rapoport T. A. & Ploegh H. L., Sec 61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature*, 1996, 384, 432-438.