Université des Sciences et Technologies de Lille
Ecole Doctorale Biologie-Santé de Lille

Thèse de doctorat

Présentée par

Vanessa DEHENNAUT

En vue de l'obtention du grade de

Docteur de l'université de Lille I

Spécialité : sciences de la Vie et de la Santé

Implication de la *O*-GlcNAc dans la régulation de la transition G2/M ovocytaire et l'embryogenèse précoce chez *Xenopus laevis*

Présentée le 30 octobre 2008 devant la commission d'examen

Président :	Dr Jean-Claude MICHALSKI
Rapporteurs :	Pr Gerald Warren HART
	Dr Catherine JESSUS
Examinateurs :	Pr Jean-François BODART
	Pr Ralph SCHWARZ
	Dr Frank CHESNEL
Directeurs de thèse:	Pr Tony LEFEBVRE
	Pr Jean-Pierre VILAIN

© 2009 Tous droits réservés. http://doc.univ-lille1.fr

*A **Tony**, sans qui je ne serais rien…*

*A ma **mère**, mon **père**, mon **« bio-papa »** et ma **grand-mère** qui ont toujours cru en moi.*

© 2009 Tous droits réservés.

http://doc.univ-lille1.fr

*Bien entendu, mes premiers remerciements vont au **Pr Tony LEFEBVRE** qui a dirigé ce travail. J'ai tellement de raisons de te remercier que je ne sais par où commencer ! Merci de m'avoir transmis ta passion pour la recherche et de me faire partager chaque jour tes connaissances immenses en Sciences et dans bien d'autres domaines ! Tu mérites amplement ta nomination de Professeur et les étudiants qui travailleront à tes côtés ont beaucoup de chance ! Merci de m'avoir guidée, soutenue et encouragée durant ces 4 années. Je sais que çà n'a pas toujours été facile pour toi d'exercer ton rôle de « tuteur » étant donné les sentiments qui nous unissent et surtout mon mauvais caractère ! Mais tu as rempli ton rôle avec brio, tu as su me recadrer quand il le fallait. Je suis consciente de la chance que j'ai eue de faire une thèse dans ces conditions et je t'en serai toujours reconnaissante. Bien évidemment, j'ai encore des milliers d'autres raisons de te remercier, mais celles-ci, elles ne regardent que nous…*

*Je remercie le Pr **Jean-Pierre VILAIN,** qui a co-dirigé ce travail, de m'avoir accueillie dans son laboratoire. Merci pour la confiance que vous m'avez accordée, je pense que cela a été productif ! Merci pour nos nombreuses discussions et vos conseils. Vos constants encouragements ont été un moteur pour moi.*

*Merci également au **Pr Jean-François BODART** qui a co-encadré ce travail. Je vous remercie pour la liberté que vous m'avez laissée quant à la gestion de mon travail et de mon emploi du temps. Cela a beaucoup contribué à mon épanouissement professionnel. Je vous souhaite bonne chance dans vos nouvelles fonctions.*

*Je remercie le **Dr Jean-Claude MICHALSKI** de m'avoir ouvert les portes du C9 et d'avoir accepté la présidence de ce jury.*

*Je remercie le **Pr Gerald Warren HART** et le **Dr Catherine JESSUS** d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs. Mes remerciements vont également au **Pr Ralph SCHWARZ** et au **Dr Frank CHESNEL** pour avoir accepté d'être les examinateurs de ce travail.*

*Je remercie le Dr **Anne-Sophie VERCOUTTER-EDOUART** de m'avoir initiée à l'electrophorèse bidimensionnelle mais aussi pour sa gentillesse et sa bonne humeur constante !*

*Je remercie vivement le **Dr Adeline PAGE** ainsi que **Marie-Christine SLOMIANNY** pour leur collaboration précieuse dans la partie « analyse protéomique » de ce travail.*

*Un ENORME MERCI à mes collègues du 020 : **Sandrine**, **Anne-Marie**, **Coralie** et **Wendy** (même si tu ne connais pas Johnny Hallyday !) qui supportent chaque jour ma folie ! C'est un pur plaisir de partager ce bureau avec vous, vous êtes toutes les 4 des personnes formidables! Merci également à **René** de m'avoir fait une place dans ce bureau et de m'avoir fait découvrir Saint-Jean d'Aulps !*

© 2009 Tous droits réservés.

*Merci à **Matthieu** et **Anne** qui m'ont fait une petite place dans leur bureau. Merci à **Claude**, **Edith**, **Katia**, **Valérie** et **Rémy** pour leur sympathie. Une mention toute particulière à **Arlette** avec qui j'ai partagée mes séances de « défolliculation », merci pour toutes nos discussions et nos fous rires. Merci également de m'avoir remontée le moral à plusieurs reprises !*

*Je remercie également **Chanchan** pour son immense gentillesse, je te souhaite toute la réussite que tu mérites.*

*Enfin, je voulais souhaiter la bienvenue à **Stéphanie**, **Ludivine** et **Julie** qui vont se « frotter » à la O-GlcNAc. Bonne chance et bon courage pour cette année de Master-Recherche.*

© 2009 Tous droits réservés.

Table des matières

© 2009 Tous droits réservés.

http://doc.univ-lille1.fr

Table des matières

ABREVIATIONS 7

INDEX DES FIGURES ET TABLEAUX 10

RESUME 12

SUMMARY 13

AVANT-PROPOS 14

GENERALITES 19

PARTIE I : Introduction générale : le cycle cellulaire. 19

I. Les différentes phases du cycle cellulaire. 19

II. Les points de contrôle du cycle cellulaire. 21

III. Dérégulations du cycle cellulaire et cancer. 23

PARTIE II: La reprise méiotique de l'ovocyte de Xénope. 25

I. Introduction : la méiose, une division cellulaire spécialisée. 25

II. L'ovogenèse chez le Xénope. 25

1) la vitellogenèse. 27

2) Activité transcriptionnelle au cours de l'ovogenèse. 28

3) Autres événements de l'ovogenèse et caractéristiques de l'ovocyte de stade VI. 30

III. Reprise méiotique de l'ovocyte de Xénope. 31

1) Stimulation de la reprise méiotique. 31

a) Les hormones stéroïdes. 31

b) Les récepteurs aux stéroïdes. 32

c) L'insuline et l'IGF1. 34

2) Evénements morphologiques de la reprise méiotique. 34

a) Rupture de l'enveloppe nucléaire (GVBD, Germinal Vesicle BreakDown). 34

b) Organisation et formation du fuseau de division méiotique. 35

α. Les protéines associées aux microtubules (MAP, « Microtubule Associated Proteins »). 37

β. Les « petites » protéines G. 37

χ. Rôle des microfilaments d'actine. 38

© 2009 Tous droits réservés. http://doc.univ-lille1.fr

3) Evénements précoces de la reprise méiotique. 40

a) Inhibition de l'adénylate cyclase, chute du niveau d'AMPc et inhibition de la PKA. 40

α. Importance des protéines G hétérotrimériques. 40

β. Cibles de la PKA lors de la reprise méiotique ? 42

b) La phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K). 44

4) Contrôle de la traduction par la polyadénylation cytoplasmique. 45

a) Formation et régulation du complexe de polyadénylation. 46

b) Régulation temporelle de la polyadénylation. 47

5) le MPF : M-phase Promoting Factor. 48

a) Nature moléculaire du MPF. 48

α. Cdk1 (cdc2). 49

β. La cycline B. 50

b) Variation de l'activité du MPF au cours de la reprise méiotique. 50

c) Mécanismes de régulation de l'activité du MPF au cours de la reprise méiotique. 51

α. Régulation de l'activité du MPF par phosphorylation/déphosphorylation. 51

- CAK. 52
- Myt1. 52
- Wee1. 53
- Cdc25C. 53
- Rôle de la phosphorylation de la cycline B. 55

β. Régulation de l'activité du MPF par l'alternance entre synthèse et dégradation de la cycline B. 55

- Synthèse de la cycline B. 55
- Dégradation de la cycline B. 56

χ. Les protéines associées à Cdc2. 57

- Xe-p9. 57
- Ringo/Speedy. 57

δ. La boucle d'auto-amplification du MPF. 58

d) Les cibles du MPF. 60

6) La voie p39mos/MEK/Erk2/p90Rsk. 60

© 2009 Tous droits réservés.

a) Activation de la voie MAPK-Erk2 lors de la reprise méiotique de l'ovocyte de Xénope. **60**

α. Synthèse et accumulation de p39mos lors de la reprise méiotique. **61**

β. Activation de Raf au cours de la reprise méiotique. **63**

χ. Les MAPK phosphatases (MKP). **64**

b) Implication de la voie mos/MEK/Erk2/p90Rsk dans la reprise méiotique. **65**

α. Interactions entre MPF et MAPK. **65**

- Activation du MPF par la voie MAPK. **65**
- Activation de la voie MAPK par le MPF. **65**

β. Rôle de la voie MAPK dans la GVBD. **65**

χ. Rôle de la voie MAPK dans la suppression de la phase S. **66**

δ. Rôle de la voie MAPK dans la formation du fuseau de division et en tant que point de contrôle de l'assemblage du fuseau. **66**

ε. MAPK et activité cytostatique (CSF). **67**

PARTIE III: La *O*-N-acétylglucosaminylation ou *O*-GlcNAc. **71**

I. Introduction : les modifications post-traductionnelles et la glycosylation chez les eucaryotes. **71**

1) Un seul gène peut coder plusieurs activités protéiques. **71**

2) Les modifications post-traductionnelles. **71**

3) La glycosylation. **72**

II. La *O*-N-acétylglucosaminylation : *O*-GlcNAc. **73**

1) Caractéristiques générales de la *O*-GlcNAc. **73**

a) Définition. **73**

b) Localisation cellulaire de la O-GlcNAc. **74**

c) Les sites de O-GlcNAc. **74**

d) Dynamique de la O-GlcNAc. **74**

e) Conservation phylogénétique **75**

2) Les enzymes de la *O*-GlcNAc. **75**

a) L'Uridine diphospho-N-acétylglucosamine : polypeptide β-N-acétylglucosaminyltransférase ou O-GlcNAc transférase (OGT, EC 2.4.1.94). **76**

α. les isoformes de l'OGT. **76**

© 2009 Tous droits réservés.

β. Structure de l'OGT. 77
- Structure de la partie N-terminale. 77
- Structure de la partie C-terminale. 78
χ. Phylogénie de l'OGT. 78
δ. Régulation de l'activité enzymatique de la ncOGT . 80
- Régulation par les PTM. 81
- Régulation par la concentration en UDP-GlcNAc. 81
- Importance des TPR. 81
- Autres régulations. 82
ε. Les inhibiteurs de l'OGT. 82
b) La N-acétyl β-D- glucosaminidase ou O-GlcNAcase (OGA, EC 3.2.1.52). 83
α. Gène et conservation phylogénétique. 83
β. Les isoformes de la O-GlcNAcase et leur localisation. 84
χ. Données structurales. 84
δ. Régulation de l'activité de la O-GlcNAcase. 85
ε. Les inhibiteurs de la O-GlcNAcase. 86
3) La voie de biosynthèses des hexosamines : source de l'UDP-GlcNAc. 87
III. Fonctions associées à la *O*-GlcNAc. 89
1) *O*-GlcNAc et phosphorylation : une relation complexe. 93
2) Modulation des interactions protéine-protéine par la *O*-GlcNAc. 95
3) Influence de la *O*-GlcNAc sur la localisation subcellulaire des protéines. 95
4) La *O*-GlcNAc, protectrice de la dégradation protéasomale ? 96
a) La O-GlcNAc augmente la demi-vie des protéines. 97
b) Le protéasome est lui même O-GlcNAc. 98
c) Relation Ubiquitine/O-GlcNAc. 98
5) Régulation de la transcription par la *O*-GlcNAc. 99
6) Rôle de la *O*-GlcNAc dans la réponse au stress. 101
a) La O-GlcNAc, un senseur du stress cellulaire. 101
b) la O-GlcNAc, un puissant cardioprotecteur. 102
α. Cas de l'ischémie-reperfusion (I/R). 102
β. Cas du traumatisme hémorragique (TH). 103
χ. Cas de la destruction de l'endothélium. 104
7) *O*-GlcNAc et développement. 104

© 2009 Tous droits réservés.

8) *O*-GlcNAc et cycle cellulaire. 105

IV. Dérégulation des mécanismes de *O*-GlcNAc et pathologies. 107

1) *O*-GlcNAc, résistance à l'insuline et diabète de type II 107

a) Voie HBP et résistance à l'insuline. 109

b) Dérégulations des mécanismes de O-GlcNAc et résistance à l'insuline. 110

c) O-GlcNAc et voie de signalisation de l'insuline. 111

d) O-GlcNAc, néoglucogenèse et toxicité du glucose. 111

e) O-GlcNAc et complications associées au diabète. 112

2) *O*-GlcNAc et maladies neurodégénératives. 112

3) *O*-GlcNAc et cancer. 114

TRAVAUX PERSONNELS 117

PARTIE I : Régulation de la reprise méiotique ovocytaire par la *O*-GlcNAc . 117

I. Contexte de l'étude. 117

II. Résultats. 117

1) L'augmentation du niveau de *O*-GlcNAc est essentielle à la transition G2/M de l'ovocyte de Xénope. 117

2) Identification de protéines cibles de l'OGT lors de la transition G2/M de l'ovocyte de Xénope. 120

III. Discussion et conclusion. 123

- **PUBLICATION 1** 126

Dehennaut V, Lefebvre T, Sellier C, Leroy Yves, Gross B, Walker S, Cacan R, Michalski J-C, Vilain J-P and Bodart J-F. (2007). « *O*-linked N-acetylglucosaminyltransferase inhibition prevents G2/M transition in Xenopus laevis oocytes ». *J. Biol. Chem.* 282(17):12527-36.

- **PUBLICATION 2** 136

Dehennaut V, Hanoulle X, Bodart J-F, Vilain J-P, Michalski J-C, Landrieu I, Lippens G and Lefebvre T. (2008). « Microinjection of recombinant O-GlcNAc transferase potentiates Xenopus oocytes M-phase entry ». *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 369(2):539-46.

- **PUBLICATION 3** 144

Dehennaut V, Slomianny MC, Page A, Vercoutter-Edouart AS, Jessus C, Michalski JC, Vilain JP, Bodart JF, Lefebvre T. (2008) « Identification of structural and functional *O*-linked N-Acetylglucosamine-bearing proteins in Xenopus laevis oocyte ». *Mol. Cell. Proteomics.* Epub ahead of print.

© 2009 Tous droits réservés.

Table des matières

PARTIE II : Dynamique de la *O*-GlcNAc de l'ovogenèse à l'embryogenèse chez *Xenopus laevis*. 166

I. Contexte de l'étude. 166

II. Introduction à l'embryogenèse chez *Xenopus laevis*. 166

1) La fécondation. 167

2) La segmentation 168

3) La gastrulation. 169

4) La neurulation. 170

5) L'organogenèse. 171

III. Résultats. 171

IV. Discussion et conclusion. 173

- **PUBLICATION 4** 176

Dehennaut V, Lefebvre T, Leroy Y, Vilain JP, Michalski JC and Bodart JF. (2008) « Survey of O-GlcNAc level variations in Xenopus laevis from oogenesis to early development. » *Glycoconjugate J.* Epub ahead of print.

ANNEXE 187

- **PUBLICATION 5** 188

Guinez C, Mir AM, **Dehennaut V**, Cacan R, Harduin-Lepers A, Michalski JC, Lefebvre T. (2008). « Protein ubiquitination is modulated by O-GlcNAc glycosylation » *FASEB J.*22: 2901-11.

- **PUBLICATION 6** 299

Lefebvre T, Guinez C, **Dehennaut V**, Beseme-Dekeyser O, Morelle W and Michalski JC. (2005). « Does O-GlcNAc play a role in neurodegenerative diseases? » *Expert Rev Proteomics.* 2, 265-75.

- **PUBLICATION 7** 210

Lefebvre T, **Dehennaut V**, Guinez C and Michalski JC. (2007). « Involvement of O-linked N-acetylglucosamine in type-2 diabetes, neurological disorders and cancer. » *Research signpost, "New developments in therapeutic glycomics"*. 37/661(2) 377-392

BIBLIOGRAPHIE 225

© 2009 Tous droits réservés.

Abréviations

© 2009 Tous droits réservés.

http://doc.univ-lille1.fr

Abréviations

AD : Androstènedione
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique
AMPK : AMP activated Protein Kinase
APC/C: Anaphase Promoting Complexe/Cyclosome
AR : récepteur aux androgènes
ARNi : ARN interférent
ARNm : ARN messager
ARNr : ARN ribosomique
ATP : Adénosine TriPhosphate
BADGP : Benzyl-2-Ac2tamido-2-Déoxy-alpha-D-GalactoPyranoside
CAK : Cdk Activating Kinase
CaMK : Calcium/calmodulin dependent protein Kinase
CBP : CREB-Binding Protein
Cdc : Cell division cycle
Cdk : Cyclin dependent kinase
Chk1/2 : Checkpoint kinase 1/2
CK2 : Caséine Kinase II
CKI : Cdk Inhibitor
CPE : Cytoplasmic Polyadenylation Element
CPEB : Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding protein
CPSF : Cleavage and Poly(A) Specificity Factor
CREB : C-AMP Responsive Element-Binding protein
CSF : Cytostatic Factor
CTD : Domaine carboxyterminal
Cyk : Cyclin B2 kinase
DDCP : DNA Damage CheckPoint
DON : 6-Diazo-5-Oxo-Norleucine
eIF4E: eucaryotic Initiation Factor 4E
Emi1 : Early mitotic inhibitor 1
Erk2 : Extracellular signal regulated kinase 2
FAM : Facteur d'Assemblage des Microtubules
FSH : Follicle Stimulating Hormone
F6P : Fructose-6-Phosphate
GalNAc : N-Acétylgalactosamine
$GlcNH_2$: Glucosamine
GLUT : Transporteur de glucose
GDP : Guanosine DiPhosphate
Gln : Glutamine
GEF : Guanine Exchange Factor
GFAT : Glutamine : Fructose-6-phosphate Amido Transférase
GNAT : GCN5-related acétyltransférase
GnRH : Gonadotropin Releasing Hormone
GPR : Récepteur couplés aux protéines G
GRIF1 : $GABA_A$ Receptor-Interacting Factor 1
GS : Glycogène Synthétase
GSK3β : Glycogène Synthétase Kinase 3β
G6P : Glucose-6-phosphate
GTP : Guanosine TriPhosphate
GVBD : Germinal Vesicle BreakDown

© 2009 Tous droits réservés. http://doc.univ-lille1.fr

HAT : Histone Acétyl Transférase
HBP : Hexosamine Biosynthetic Pathway
HDAC: Histone Désacétylase
HSP: Heat Shock Protein
IGF1 : Insulin-like Growth Factor 1
I/R : Ischémie/Reperfusion
IRS-1/2 : Insulin Receptor Substrate 1/2
KAP: cyclin-dependent Kinase-Associated Phosphatase
LH : Hormone lutéinisante
LV : LipoVitelline
MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase
MAPKK : Mitogen Activated Protein Kinase Kinase
MAPKKK : Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase
MEK : MAPK Erk Kinase
METRO : MEssage TRansport Organizer region
MGEA5 : MeninGioma Expressed Antigen 5
MKP : MAPK phosphatase
Mos : Moloney sarcoma
MPF : M-phase Promoting Factor
mOGT : mitochondrial OGT
MTOC : MicroTubule Organizing Center
MTS : Mitochondrial Targeting Sequence
NCOAT : Nuclear and Cytoplasmic O-GlcNAcase and Acetyl Transferase
ncOGT : nuclear and cytoplasmic OGT
NLS : Nuclear Localisation Signal
OGA : N-acétyl-β-D-glucosaminidase ou *O*-GlcNAcase
***O*-GlcNAc** : *O*-N-acétylglucosaminylation
OGT : polypeptidę β-N-acétylglucosaminyltransférase ou *O*-GlcNAc transférase
OIP106 : OGT-Interacting Protein 106
PABP : Poly(A) Binding Protein
PARN : Poly(A) RiboNucléase
PBE : Pumilio Binding Element
PDE : AMPc phosphodiestérase
PDK1 : Phosphatidylinositol Dependent protein Kinase 1
PEPCK : PhosphoEnolPyruvate CarboxyKinase
PG : Progestérone
Pgm3: phosphoglucomutase 3
pHi : pH intracellulaire
PI3K : PhosphoInositide-3-Kinase
PIP2 : Phosphatidylinositol 4, 5 bisphosphate
PIP3 : Phosphatidylinositol 3, 4, 5 triphosphate
PKA : Protéine Kinase dépendante de l'AMPc
PKB/Akt : Protéine Kinase B/RAC(Related to the A and C kinases)-alpha Ser/Thr protein kinase
Plx1 : Polo-like kinase xenopus 1
pRb : protéine du Rétinoblastome
PRE : Polyadenylation Response Element
PTM : Post-Translational Modification
PUGNAc : O-(2-acétamido-2-déoxy-D-glucopyranosylidène) amino-N-phénylcarbamate
PV : PhosVitine

© 2009 Tous droits réservés.

RanGAP1 : Ran GTPase Activating Protein 1
RCC1 : Regulation of Chromosomes Condensation 1
RCP : Replication Checkpoint
RINGO/speedy : Rapid INducer of G2-M in Oocyte
Rsk : Ribosomal S6 kinase
SAC: Spindle Assembly Checkpoint
SIP/SHIP : Signaling Inositol Phosphatase/SH2 containing Inositol Phosphatase
sOGT : small OGT
SPY/SEC : Spindly/SECret agent
STAT5 : Signal Transducer and Activator of Transcription 5
TAF110 : TATA- binding- protein Associated Factor110
Tau : Tubulin associated unit
TH : Traumatisme Hémorragique
TMA : Transient Microtubule Array
TPR : TetratricoPeptide Repeat
UDP : Uridine DiPhosphate
UDP-GlcNAc : Uridine DiPhospho- N-AcétylGlucosamine
UMP : Uridine MonoPhosphate
UPS : Ubiquitin-Proteasome System
UTR 3' : UnTranslated Region 3'
VG : Vésicule Germinative
VTG : Vitellogénine
WGA : Wheat Germ Agglutinin
XErp1/Emi2: Xenopus Emi related protein 1/Early mitotic inhibitor 2
xGld2 : Xenopus Germ-line development factor 2
XMAP : Xenopus Microtubule Asssociated Protein
XmPR : Xenopus membrane Progesterone Receptor
xPlkk1 : xenopus Polo-like kinase kinase 1
xPR : xenopus Progesterone Receptor
YY1 : YinYang-1

© 2009 Tous droits réservés.

Index des figures et tableaux

© 2009 Tous droits réservés.

http://doc.univ-lille1.fr

Index des figures et tableaux

Figures :

Figure 1 : les 4 phases du cycle cellulaire **20**
Figure 2 : représentation schématique des différentes phases de la mitose **21**
Figure 3 : les complexes cyclines/cdk et les points de contrôle du cycle cellulaire **22**
Figure 4 : la méiose **25**
Figure 5 : les différents stades de l'ovogenèse chez le Xénope **26**
Figure 6 : de l'ovogonie au zygote chez le Xénope **27**
Figure 7 : schématisation de la vitellogenèse chez le Xénope **28**
Figure 8 : représentation schématique d'une coupe méridienne d'ovocyte de stade VI **31**
Figure 9 : stimulation de la reprise méiotique par les stéroïdes dans l'ovocyte de Xénope. **33**
Figure 10 : évènements cytologiques associés à la reprise méiotique de l'ovocyte de Xénope **35**
Figure 11 : photographies d'ovocytes immatures et matures de *Xenopus laevis* vus par le pôle animal. **35**
Figure 12 : organisation des microtubules et du fuseau de division durant la méiose de l'ovocyte de Xénope **36**
Figure 13 : libération de facteurs d'assemblage des microtubules par Ran **38**
Figure 14 : l'ovocyte mature de Xénope est bloqué en métaphase II **39**
Figure 15 : activation de l'adénylate cyclase et de la PKA **41**
Figure 16 : l'inhibition de la PKA conduit à la reprise méiotique de l'ovocyte de Xénope **43**
Figure 17 : implication de la PI3K dans la reprise méiotique stimulée par la progestérone **45**
Figure 18 : activation de la polyadénylation cytoplasmique au cours de la reprise méiotique **47**
Figure 19 : régulation de l'activité des cdk par association à leur cycline **49**
Figure 20 : représentation schématique de la structure des cyclines **50**
Figure 21 : variation de l'activité du MPF au cours de la reprise méiotique de l'ovocyte de Xénope **51**
Figure 22 : activation de la phosphatase Cdc25C au cours de la reprise méiotique de l'ovocyte de Xénope **54**
Figure 23 : activation et auto-amplification du MPF au cours de la reprise méiotique de l'ovocyte de Xénope **59**
Figure 24 : synthèse et stabilisation de p39mos au cours de la reprise méiotique de l'ovocyte de Xénope **63**
Figure 25 : modèle d'activation de la voie p39mos/Erk2 après stimulation de la reprise méiotique par la progestérone ou l'insuline **64**
Figure 26 : mise en évidence de l'activité CSF **67**
Figure 27 : modèle d'arrêt CSF dans les ovocytes d'Amphibiens **69**
Figure 28 : du gène à l'activité protéique **72**
Figure 29 : structure schématique d'une séquence peptidique modifiée par la *O*-GlcNAc **74**
Figure 30 : la *O*-GlcNAc est une PTM dynamique régulée par un unique couple d'enzymes **76**
Figure 31 : les trois isoformes de l'OGT sont codées par un unique gène **79**
Figure 32 : les différentes isoformes de la *O*-GlcNAcase **86**
Figure 33 : l'UDP-GlcNAc est synthétisé *via* la voie de biosynthèse des hexosamines (HBP) à partir du glucose intracellulaire **89**
Figure 34 : évolution du nombre de publications sur la *O*-N-acétylglucosaminylation pour la période 1987-2007 **90**
Figure 35 : complexité de la relation *O*-GlcNAc/phosphorylation **94**
Figure 36 : régulation du système Ubiquitine-Protéasome par la *O*-GlcNAc **99**
Figure 37 : régulation de la concentration en glucose sanguin par l'insuline **109**
Figure 38 : stratégie utilisée pour moduler les niveaux de *O*-GlcNAc dans l'ovocyte de Xénope **118**

© 2009 Tous droits réservés.

Index des figures et tableaux

Figure 39 : la *O*-GlcNAc est essentielle à la reprise méiotique ovocytaire **119**
Figure 40 : stratégies utilisées pour enrichir et identifier les protéines *O*-GlcNAcylées dans l'ovocyte mature de Xénope **121**
Figure 41: protéines *O*-GlcNAcylées identifiées dans l'ovocyte mature de Xénope par approche protéomique **122**
Figure 42 : hypothèse d'une régulation de la glycolyse par la *O*-GlcNAc. **125**
Figure 43 : représentation schématique du cycle de reproduction des amphibiens **167**
Figure 44 : la segmentation chez *Xenopus laevis* **168**
Figure 45 : variation de la durée du cycle cellulaire au cours de la segmentation chez *Xenopus laevis* **169**
Figure 46 : la gastrulation chez *Xenopus laevis* **170**
Figure 47 : la neurulation chez *Xenopus laevis* **171**
Figure 48 : le bourgeon caudal chez *Xenopus laevis* **171**
Figure 49 : régulation de la destinée du glucose par un « switch » glycolyse/HBP : division ou migration cellulaire ? **174**

Tableaux :

Tableau I : taille et pigmentation des différents stades ovocytaires chez le Xénope **26**
Tableau II : principales cibles du MPF au cours de l'entrée en phase M **60**
Tableau III : liste non exhaustive des protéines *O*-GlcNAc identifiées **91**
Tableau IV : influence de la *O*-GlcNAc sur l'activité transcriptionnelle de Sp1 **100**

© 2009 Tous droits réservés. http://doc.univ-lille1.fr

Résumé

© 2009 Tous droits réservés.

http://doc.univ-lille1.fr

Résumé

La *O*-N-acétylglucosaminylation, ou *O*-GlcNAc, est une modification post-traductionnelle dynamique et réversible de nombreuses protéines nucléo-cytoplasmiques. Cette glycosylation, souvent comparée à la phosphorylation avec laquelle elle peut d'ailleurs entrer en compétition, semble prendre part à la régulation de nombreux processus biologiques parmi lesquels le cycle cellulaire et l'embryogenèse.

Le cycle cellulaire est le processus par lequel une cellule-mère se divise pour former deux cellules-filles génétiquement identiques entre elles. De nombreux acteurs moléculaires contrôlent l'entrée et la progression des cellules dans les quatre phases du cycle (G1, S, G2, M) et sa dérégulation participe activement aux processus de cancérisation. Dans un premier temps, nos travaux ont porté sur l'étude de la *O*-GlcNAc dans le contrôle de la reprise méiotique de l'ovocyte de *Xenopus laevis*, un processus analogue à la transition G2/M du cycle cellulaire. Cette transition G2/M est caractérisée par l'activation simultanée du MPF, pour « M-phase promoting factor », facteur universel d'entrée en phase M, de la voie MAPK p39mos/MEK/erk2 mais aussi par une augmentation du niveau global de *O*-GlcNAc intra-ovocytaire.

Nous avons démontré que cette augmentation du niveau de *O*-GlcNAc était primordiale pour la reprise méiotique ovocytaire puisque l'inhibition de l'OGT, l'enzyme catalysant le transfert du résidu de GlcNAc sur la protéine, empêche la transition G2/M de l'ovocyte alors que sa surexpression potentialise ce phénomène. Nous avons également identifié 24 protéines dont le niveau de *O*-GlcNAc augmente au cours de la reprise méiotique et appartenant à des classes fonctionnelles différentes dont des protéines du cytosquelette (la bêta-actine et l'alpha-tubuline), la kinase erk2, la phosphatase PP2A, plusieurs enzymes de la glycolyse et certaines protéines ribosomales.

Dans un second temps, nous avons entrepris l'étude des variations des niveaux de *O*-GlcNAc, d'OGT et d'UDP-GlcNAc (le nucléotide-sucre donneur pour l'addition de *O*-GlcNAc) au cours de l'ovogenèse et de l'embryogenèse précoce chez *Xenopus laevis.* Nos résultats montrent que la dynamique de la *O*-GlcNAc est complexe tout au long de l'ovogenèse et de l'embryogenèse. Notamment, nous avons observé une diminution drastique et transitoire de la *O*-GlcNAc dès le début de la gastrulation suggérant une implication de la glycosylation dans les phénomènes de migration cellulaire caractéristiques de cette étape du développement qui permet la mise en place des trois feuillets embryonnaires à l'origine de tous les tissus de l'adulte. Au regard de ces résultats nous proposons que les processus de reprise méiotique mais également d'ovogenèse et d'embryogenèse sont en partie orchestrés par la *O*-GlcNAc.

© 2009 Tous droits réservés.

Summary

© 2009 Tous droits réservés.

http://doc.univ-lille1.fr

Summary

O-linked-N-acetylglucosaminylation or *O*-GlcNAc is a dynamic and reversible post-translational modification of numerous nucleo-cytoplasmic proteins. This glycosylation, often compared to phosphorylation with which it can compete, seems to take part in the regulation of many cellular processes among which cell cycle and embryogenesis.

Cell cycle is the process by which a cell can divide to produce two daughter cells genetically identical. The entry and the progress of the cell through the four phases of the cell cycle (G1, S, G2, M) is controlled by numerous factors and its deregulation is one of the major cause of cancer. First, our works have focused on the study of *O*-GlcNAc implication in the control of *Xenopus laevis* oocyte meiotic resumption, a process analogous to the G2/M transition of the cell cycle. This G2/M transition is characterized by the simultaneous activation of the MPF (M-phase Promoting Factor), the universal regulator of the M-Phase entry and of the MAPK pathway p39mos/MEK/erk2 but also by a sudden increase in the oocyte *O*-GlcNAc content.

We have demonstrated that this *O*-GlcNAc increase was essential for meiotic resumption since the inhibition of OGT, the enzyme that catalyses the transfer of the *O*-GlcNAc moiety to the target proteins, prevents the oocyte G2/M transition whereas overexpression of the enzyme potentiates this process. We have also identified 24 functionally different proteins that *O*-GlcNAc modification increases during meiotic resumption among which cytoskeletal proteins (beta-actin and apha-tubulin), the kinase erk2, the phosphatase PP2A, several glycolysis enzymes and some ribosomal proteins.

Second, we have undertaken the study of *O*-GlcNAc, OGT and UDP-GlcNAc (the sugar-nucleotide for the *O*-GlcNAc modification) variations during the oogenesis and the early development of *Xenopus laevis.* Our results show that the *O*-GlcNAc dynamism is intricate from the Xenopus oogenesis to embryogenesis. In particular, we observed a drastic and transitory *O*-GlcNAc decrease at the onset of gastrulation, suggesting a role for *O*-GlcNAc in the regulation of cell migration. This migration is characteristic of this stage of development since it permits the generation of the three germ layers, precursors of the whole adult tissues. From the point of view of these results, we suggest that meiotic resumption, oogenesis and embryogenesis are in part orchestrated by *O*-GlcNAc.

© 2009 Tous droits réservés.

Avant-propos

© 2009 Tous droits réservés.

http://doc.univ-lille1.fr

Avant-propos

Ce travail a été effectué en co-tutelle au sein :

- De l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UMR CNRS 8576 dirigée par le Dr Jen-claude MICHALSKI) sous la direction du Pr Tony LEFEBVRE
- Du laboratoire de Régulation des Signaux de Divisions (EA 4020) sous la direction du Pr Jean-Pierre VILAIN et l'encadrement du Pr Jean-François BODART

Cette étude a été financée par le ministère de l'Education Nationale et de la Recherche.

© 2009 Tous droits réservés. http://doc.univ-lille1.fr

Avant-propos

L'ensemble des travaux accomplis au cours de la thèse a fait l'objet des publications et communications suivantes :

Publications :

- **Dehennaut V**, Lefebvre T, Leroy Y, Vilain JP, Michalski JC and Bodart JF. (2008) « Survey of O-GlcNAc level variations in Xenopus laevis from oogenesis to early development. » *Glycoconjugate J.* Epub ahead of print.

- **Dehennaut V**, Slomianny MC, Page A, Vercoutter-Edouart AS, Jessus C, Michalski JC, Vilain JP, Bodart JF, Lefebvre T. (2008) « Identification of structural and functional *O*-linked N-Acetylglucosamine-bearing proteins in Xenopus laevis oocyte ». *Mol. Cell. Proteomics.* Epub ahead of print.

- Guinez C, Mir AM, **Dehennaut V**, Cacan R, Harduin-Lepers A, Michalski JC, Lefebvre T. (2008). « Protein ubiquitination is modulated by O-GlcNAc glycosylation » *FASEB J.*22: 2901-11.

- **Dehennaut V**, Hanoulle X, Bodart J-F, Vilain J-P, Michalski J-C, Landrieu I, Lippens G and Lefebvre T. (2008). « Microinjection of recombinant O-GlcNAc transferase potentiates Xenopus oocytes M-phase entry ». *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 369(2):539-46.

- **Dehennaut V**, Lefebvre T, Sellier C, Leroy Yves, Gross B, Walker S, Cacan R, Michalski J-C, Vilain J-P and Bodart J-F. (2007). « *O*-linked N-acetylglucosaminyltransferase inhibition prevents G2/M transition in Xenopus laevis oocytes ». *J. Biol. Chem.* 282(17):12527-36.

- Lefebvre T, Guinez C, **Dehennaut V**, Beseme-Dekeyser O, Morelle W and Michalski JC. (2005). « Does O-GlcNAc play a role in neurodegenerative diseases? » *Expert Rev Proteomics.* 2, 265-75.

© 2009 Tous droits réservés.

Chapitre d'ouvrage :

- Lefebvre T, **Dehennaut V**, Guinez C and Michalski JC. (2007). « Involvement of O-linked N-acetylglucosamine in type-2 diabetes, neurological disorders and cancer. » *Research signpost, "New developments in therapeutic glycomics"*. 37/661(2) 377-392

Communications orales :

- Colloque annuel des doctorants, Journée André Verbert 2007 « English Session »,

5 décembre 2007, Lille, France.
Role of *O*-GlcNAc in cell cycle regulation.
Prix de la meilleure communication en Anglais.

- 18th joint meeting, 4th-6th November 2007, Lille-Lesquin, France.

The *Xenopus laevis* oocyte *O*-GlcNAcome.

- Colloque annuel des doctorants, Journée André Verbert 2007, 27 septembre 2007, Lille, France

La *O*-GlcNAc: une modification post-traductionnelle atypique nécessaire à la progression du cycle cellulaire.

- 17th joint meeting, 5th-7th November 2006, Bruges, Belgium

O-GlcNAc is a regulatory post-translational modification requested for cell cycle progression.

Communications par affiche:

- EMBO workshop on glycosciences and development (GLYCODEV, 2007), 9 au 12 décembre 2007, Lille, France

Dehennaut V, Bodart JF, Michalski JC, Lefebvre T et Vilain JP
OGT activity is required for normal segmentation and gastrulation in *Xenopus laevis.*

© 2009 Tous droits réservés.

- 24èmes Journées Françaises de Spectrométrie de Masse, 17 au 20 Septembre 2007, Pau, France

Dehennaut V, Slomianny MC, Bodart JF, Vercoutter-Edouart AS, Page A, Michalski JC, Vilain JP et Lefebvre T

The *Xenopus laevis* oocyte *O*-GlcNAcome

- XIX International symposium on glycoconjugates , 15th-20th July 2007, Cairns, Australia

Dehennaut V, Bodart JF, Leroy Y, Cacan R, Michalski JC, Vilain JP and Lefebvre T

Xenopus oocyte G2/M transition is governed in part by *O*-GlcNAc dynamism.

- Gordon research conferences Glycobiology, 4th-9th March 2007, Ventura, CA, USA

Dehennaut V, Bodart JF, Leroy Y, Cacan R, Michalski JC, Vilain JP and Lefebvre T

Xenopus oocyte G2/M transition is governed in part by *O*-GlcNAc dynamism.

- 16th joint meeting, 27th-29th October 2005, Hanover, Germany

Dehennaut V, Lefebvre T, Bodart JF, Michalski JC and Vilain JP

O-GlcNAc is a post-translational modification that governs *Xenopus* oocytes G2/M transition.

© 2009 Tous droits réservés.

Avant-propos

La majeure partie de ce travail de thèse a porté sur l'étude de l'implication de la *O*-GlcNAc au cours de la reprise méiotique de l'ovocyte de *Xenopus laevis*, un modèle d'étude de la transition G2/M du cycle cellulaire. L'étude préliminaire des variations des niveaux de *O*-GlcNAc de l'ovogenèse jusqu'à l'embryogenèse précoce chez le Xénope n'a débuté qu'au cours de ma dernière année de thèse.

Ainsi, dans la section « Généralités », je n'introduirai que le cycle cellulaire, la reprise méiotique ovocytaire et la *O*-GlcNAc. Une introduction à l'embryogenèse chez *Xenopus laevis* sera incluse dans la deuxième partie de la section « travaux personnels ».

© 2009 Tous droits réservés. http://doc.univ-lille1.fr

Généralités

© 2009 Tous droits réservés.

http://doc.univ-lille1.fr

PARTIE I

Introduction générale : Le cycle cellulaire

© 2009 Tous droits réservés.

http://doc.univ-lille1.fr

« *Omni cellula e cellula* » ou « Là où apparaît une cellule, il doit y avoir eu une autre cellule auparavant » : c'est en 1858, que Rudolf Virchow, physiologiste allemand établissait ce postulat qui introduisait le concept de division cellulaire, processus essentiel au développement de l'embryon à partir de la cellule-œuf mais aussi au maintien de l'homéostasie de l'organisme adulte. Depuis, la compréhension des mécanismes moléculaires qui contrôlent l'entrée et la progression du cycle cellulaire des quelques 100.000 milliards de cellules qui constituent notre organisme s'est imposé comme un enjeu de taille puisque des dérégulations du cycle aboutissant à des proliférations cellulaires incontrôlées participent activement aux processus de cancérisation.

Jusqu'à la fin des années 1970, bien que les phases du cycle cellulaire avaient été décrites, leurs mécanismes de contrôle n'étaient pas connus. De nombreuses études, menées sur divers modèles biologiques comme les levures, les embryons d'oursins, d'amphibiens ou d'étoiles de mer, ont ensuite révélé que le cycle cellulaire consiste en une série d'événements coordonnés, extrêmement régulés d'un point de vue spatio-temporel par des mécanismes conservés au cours de l'évolution chez tous les eucaryotes. Ces travaux ont été couronnés par l'attribution en 2001, du prix Nobel de Physiologie et de Médecine à Leland Hartwell, Tim Hunt et Paul Nurse.

I. Les différentes phases du cycle cellulaire.

La majorité des cellules de l'organisme est différenciée et ne se divise pas. Les cellules sont alors dites quiescentes ou en phase G0 pour Gap0. Toutefois, sous l'effet de signaux mitogènes tels que ceux portés par les hormones ou les facteurs de croissance, elles peuvent entrer dans le cycle cellulaire aboutissant à la formation de deux cellules filles génétiquement identiques entre elles. Le cycle cellulaire se décompose en quatre phases **(Figure 1)**.

Les cellules s'engagent d'abord en phase G1 (Gap1) où, lorsqu'elles passent le point de restriction (point R), elles progressent dans le cycle indépendamment de tous signaux extérieurs et de manière irréversible. Cette phase G1 est une phase de croissance et de synthèse protéique qui précède la phase S de réplication du matériel génétique par un mécanisme semi-conservatif. Cette dernière est suivie de la phase G2 (Gap2), deuxième phase de croissance qui prépare la phase M (Mitose) de division proprement dite. L'ensemble des phases G1, S et G2 constituent l'interphase.

© 2009 Tous droits réservés.

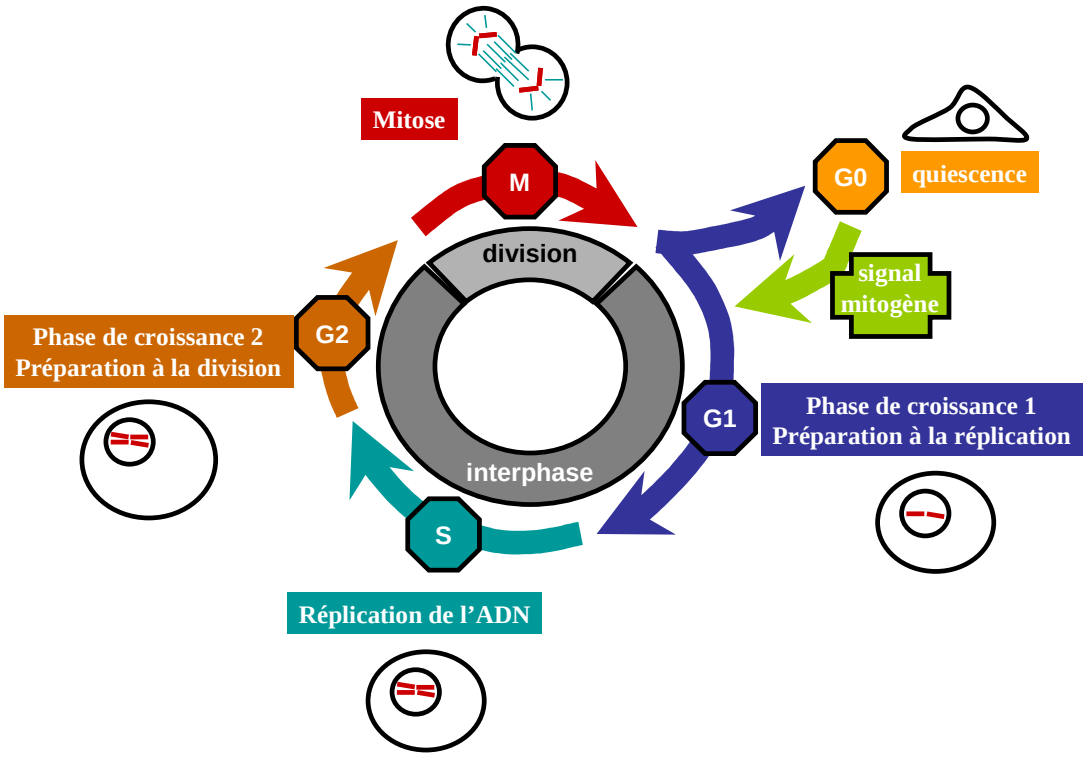


Figure 1 : les 4 phases du cycle cellulaire.
Sous l'effet de signaux mitogènes, une cellule quiesciente (G0), entre dans le cycle de division cellulaire. Celui-ci se divise en deux grandes phases : l'interphase (G1,S,G2) et la mitose (M) au terme de laquelle deux cellules-filles génétiquement identiques entre elles, sont produites.

La phase M quant à elle se divise en 5 phases **(Figure 2)**:

- La prophase, durant laquelle la chromatine se condense. Le fuseau de division se forme à partir des microtubules émanant des centrosomes.
- La prométaphase, au cours de laquelle l'enveloppe nucléaire se rompt. Les chromosomes s'attachent sur les fibres du fuseau de division bipolaire.
- La métaphase, caractérisée par l'alignement des chromosomes en plaque métaphasique (ou plan équatorial).
- L'anaphase, au cours de laquelle les chromatides sœurs se séparent et migrent vers les pôles du fuseau.
- La télophase, pendant laquelle les chromosomes se décondensent, le fuseau disparaît et aboutissant à la cytokinèse ou cytodiérèse, c'est à dire la séparation des cytoplasmes des deux cellules filles. Ce clivage par constriction est permis par la mise en place d'un anneau contractile principalement constitué d'actine et de myosine qui se resserre progressivement jusqu'à former un corps intermédiaire, le « mid-body », formant un passage étroit entre les deux cellules

© 2009 Tous droits réservés.

filles et qui contient le reste du fuseau mitotique. Celui-ci finira par disparaître entièrement et les deux cellules filles se sépareront complètement.

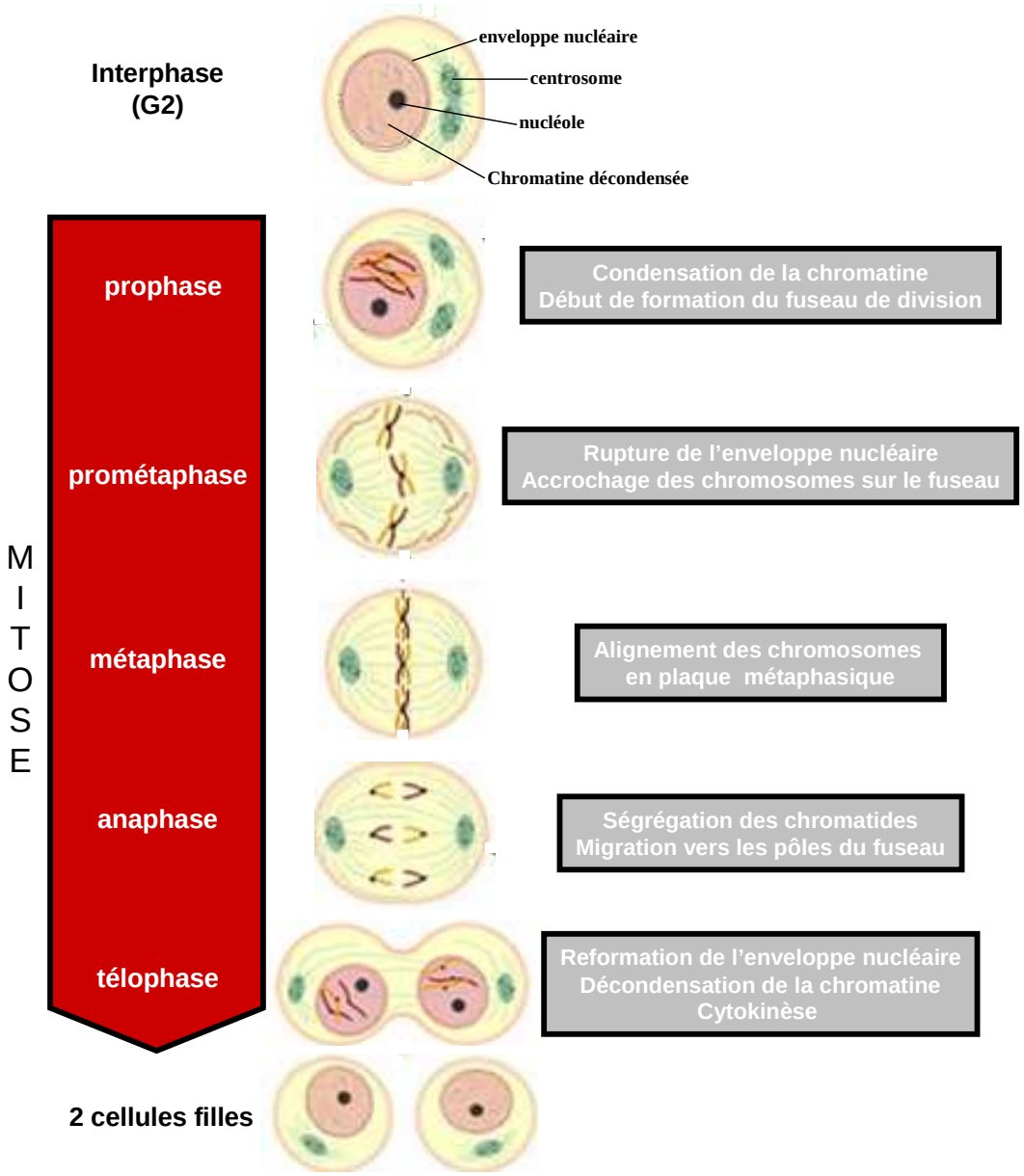


Figure 2 : représentation schématique des différentes phases de la mitose.
Adapté de : http://www.ivy-rose.co.uk/Topics/Cell-Division_Meiosis.php
La mitose représente la phase de division proprement dites et se décompose en 5 phases.

II. Les points de contrôle du cycle cellulaire.

La progression dans le cycle cellulaire est régulée par le franchissement de différents points de contrôle ou « *checkpoints* » aux transitions G1/S, G2/M et métaphase-anaphase **(Figure 3)**. En effet, différents mécanismes de « surveillance » sont mis en place pour

© 2009 Tous droits réservés.

détecter d'éventuels dommages à l'ADN (DDCP, *« DNA Damage CheckPoint »*), pour s'assurer que la cellule ne se divise pas tant que la réplication n'est pas achevée (RCP, *« Replication Checkpoint »*) ou encore pour s'assurer que les chromosomes sont bien appariés et ancrés au fuseau de division lors de la métaphase (SAC, *« Spindle Assembly CheckPoint »*). Ces systèmes sont responsables du maintien de l'intégrité du génome dans les deux cellules filles.

Le déclenchement, la progression et la succession harmonieuse des différentes phases du cycle sont sous le contrôle de complexes du type cycline/cdk (*« cyclin dependent kinase »)* spécifiques de chaque phase **(Figure 3)** et dont l'activité varie au cours du cycle cellulaire. Leur activité est régulée par : (i) une alternance entre la synthèse et la dégradation des sous-unités régulatrices, les cyclines, (ii) interaction des cdk avec les CKI (*« cdk inhibitor »*) et (iii) des mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation des cdk. Lorsqu'une anomalie est repérée, les éléments régulateurs des points de contrôle modulent l'activité de ces complexes cycline/cdk pour stopper la progression du cycle et déclencher des processus de réparation ou de mort par apoptose si les dommages sont trop importants.

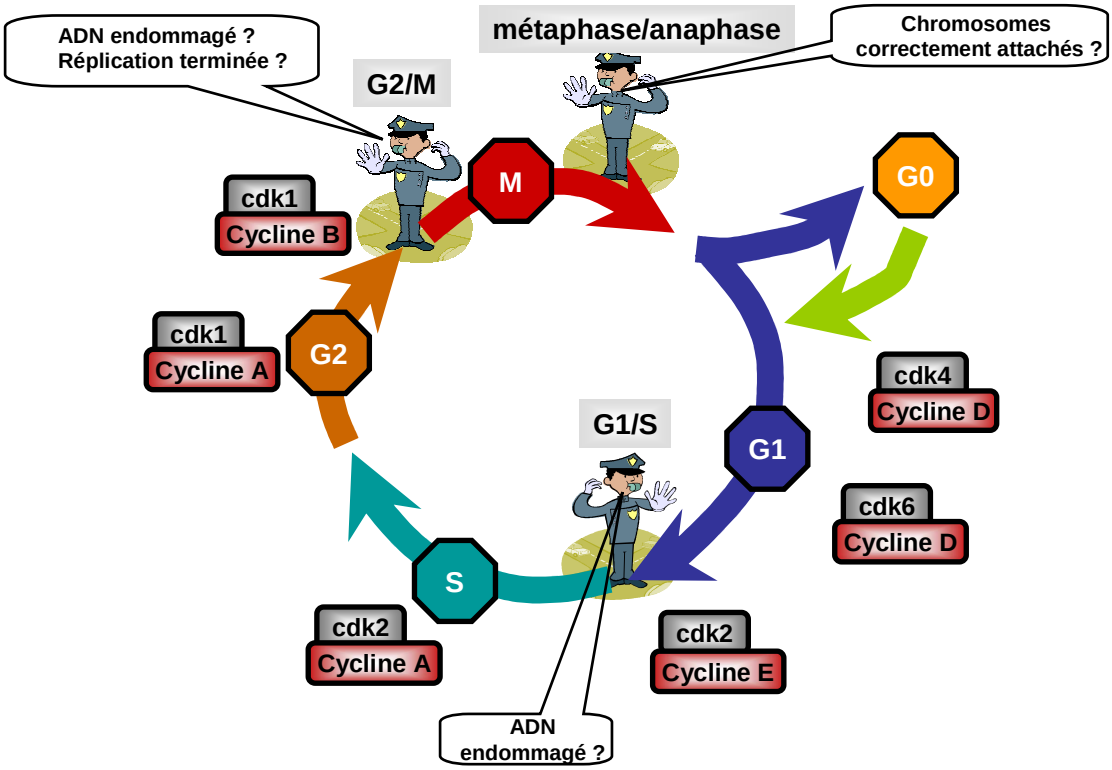


Figure 3 : les complexes cyclines/cdk et les points de contrôle du cycle cellulaire.
Différents complexes cyclines/cdk assurent la succession harmonieuse des différentes phases du cycle cellulaire et sont la cible de différents points de contrôle à la transition G1/S, G2/M et métaphase-anaphase.

© 2009 Tous droits réservés.

III. Dérégulations du cycle cellulaire et cancer.

Avec la résistance à l'apoptose et l'augmentation de l'angiogenèse, les phénomènes de divisions aberrantes et de résistance aux signaux d'arrêts du cycle constituent des caractéristiques majeures des cellules cancéreuses.

En effet, les cellules cancéreuses sont capables de sortir de quiescence indépendamment de tous signaux mitogènes. Cette capacité est souvent le résultat d'une stimulation autocrine : ces cellules synthétisent leur propre facteur de croissance et/ou surexpriment les récepteurs à ces facteurs. Des mutations des protéines des voies de signalisation activées en réponse aux signaux mitogènes sont également fréquemment observées. Par exemple, dans 25% des cancers humains, l'oncoprotéine Ras est constitutivement activée (pour revue, voir Perona, 2006).

Des mutations ou l'inactivation épigénétique des gènes régulant le point R et la progression en G1 sont également fréquemment observées dans les cellules tumorales. On peut citer par exemple, la surexpression des cyclines D1 et E1, l'inhibition des CKI INK4A/B et KIP1, l'inhibition de la protéine du Rétinoblastome (pRB) ou encore la surexpression de SKP2 et de Cdc4, les protéines responsables de la dégradation de KIP1 et de la cycline E1 (pour revue, voir Malumbres et Barbacid, 2001).

Des mutations inhibitrices de Cdc25, phosphatase responsable de l'activation des Cdk, sont à l'origine de l'inactivation des *checkpoints* G1/S, intra S et G2/M permettant ainsi à la cellule cancéreuse de se diviser même en présence d'aberrations génétiques et contribuant donc à l'instabilité génétique caractéristique des cellules tumorales (pour revue, voir Donzelli et Draetta, 2003).

Enfin, des mutations des protéines du SAC comme Mad2, Bub1 ou l'APC/C autorise la division de la cellule même si les chromosomes ne sont pas correctement appariés et ancrés au fuseau de division, entraînant l'apparition d'aneuploïdies et contribuant également à l'instabilité génétique des cellules tumorales (pour revue, Kops *et al.*, 2005).

De plus en plus, les stratégies anti-cancéreuses visent donc les protéines régulatrices de l'entrée et de la progression des cellules dans le cycle. Aussi, la meilleure compréhension des mécanismes moléculaires contrôlant le cycle cellulaire est un enjeu de taille.

Au cours de ma thèse, je me suis focalisée sur l'étude du contrôle de la transition G2/M du cycle cellulaire. L'ensemble de mes travaux de thèse a été effectué dans le modèle

© 2009 Tous droits réservés.

amphibien *Xenopus laevis*. La plupart des études réalisées a concerné un processus particulier : la reprise méiotique ovocytaire. Cette reprise méiotique est analogue à la transition G2/M des cellules somatiques. C'est pourquoi, depuis de nombreuses années, l'ovocyte de Xénope représente un modèle de choix pour l'étude des mécanismes moléculaires qui contrôlent l'entrée en phase M. Dans la deuxième partie de ces généralités, nous présenterons en détail ce modèle d'étude.

© 2009 Tous droits réservés.

PARTIE II

La reprise méiotique de l'ovocyte de Xénope

© 2009 Tous droits réservés.

http://doc.univ-lille1.fr

I. Introduction : la méiose, une division cellulaire spécialisée.

La production des cellules germinales haploïdes, ovocyte et spermatozoïde, à partir de précurseurs diploïdes résulte d'un processus de division cellulaire spécialisée : la méiose. Le cycle cellulaire méiotique consiste en deux divisions successives (phases M) appelées méiose I et méiose II qui se succèdent sans interphase ni réplication de l'ADN (phase S) **(Figure 4).**

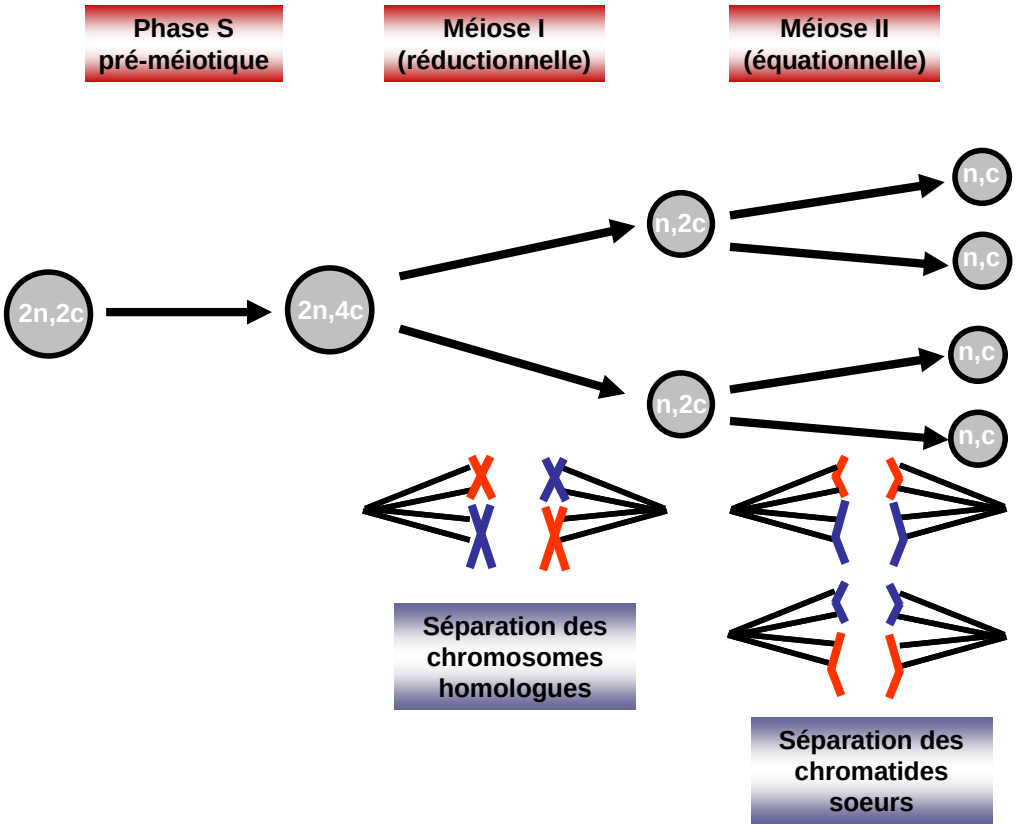


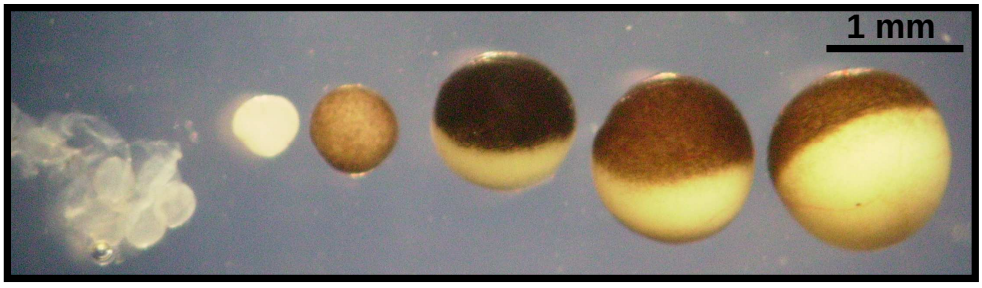
Figure 4 : la méiose.
La méiose représente un type de division cellulaire spécialisée permettant la production de cellules germinales haploïdes à partir de précurseurs diploïdes. n = ploïdie, c = quantité d'ADN par génome haploïde. La méiose I est dite réductionnelle puisqu'elle permet la séparation des chromosomes homologues et donc le passage à un génome haploïde. La méiose II est dite équationnelle et permet la ségrégation des chromatides sœurs.

II. L'ovogenèse chez le Xénope.

Chez le Xénope, l'ovogenèse débute lorsqu'une ovogonie entre en phase S pré-méiotique puis en prophase de première division de méiose (prophase I). Lorsque l'ovocyte atteint le stade diplotène de la prophase I, la méiose s'arrête et l'ovocyte s'entoure de cellules folliculaires. L'ovocyte entame alors une longue période de croissance durant laquelle il accumule des réserves nutritives (le vitellus) et informatives (stock d'ARNm maternels) dans

© 2009 Tous droits réservés.

le but de terminer la méiose mais aussi pour acquérir une compétence à la fécondation et au développement embryonnaire. L'ovogenèse se subdivise arbitrairement en 6 stades de I à VI appelés stades de Dumont (Dumont, 1972) selon des critères de taille et de pigmentation **(Figure 5, Tableau I)**.



Stades: I II III IV V VI

Figure 5 : les différents stades de l'ovogenèse chez le Xénope.
L'ovogenèse est divisée en 6 stades définis essentiellement par la taille et la pigmentation de l'ovocyte (cf le tableau ci-dessous).

Tableau I : taille et pigmentation des différents stades ovocytaires chez le Xénope.
D'après Dumont, 1972.

Stades	I	II	III	IV	V	VI
Taille (µm)	50-300	300-450	450-600	600-1000	1000-1100	1100-1300
Pigmentation	clair transparent	blanc opaque	marron clair homogène	Concentration de pigments noirs au niveau de l'hémisphère animal	Hémisphère animal marron Hémisphère végétatif blanc	Anneau équatorial non pigmenté entre hémisphère animal et végétatif

Au terme de sa croissance, l'ovocyte dit de stade VI ou immature est toujours bloqué en prophase I dans un état « G2-like ». Il restera dans cet état plusieurs mois, dans l'attente d'un signal hormonal qui lève ce blocage. L'ovocyte termine alors la méiose I, débute la méiose II jusqu'à un nouveau blocage qui survient en métaphase II. Ce processus appelé maturation ovocytaire est un modèle privilégié pour l'étude de la transition G2/M du cycle cellulaire. Lors de la fécondation, le spermatozoïde lève le blocage métaphasique pour conduire à la formation d'un zygote diploïde **(Figure 6)**.

© 2009 Tous droits réservés.

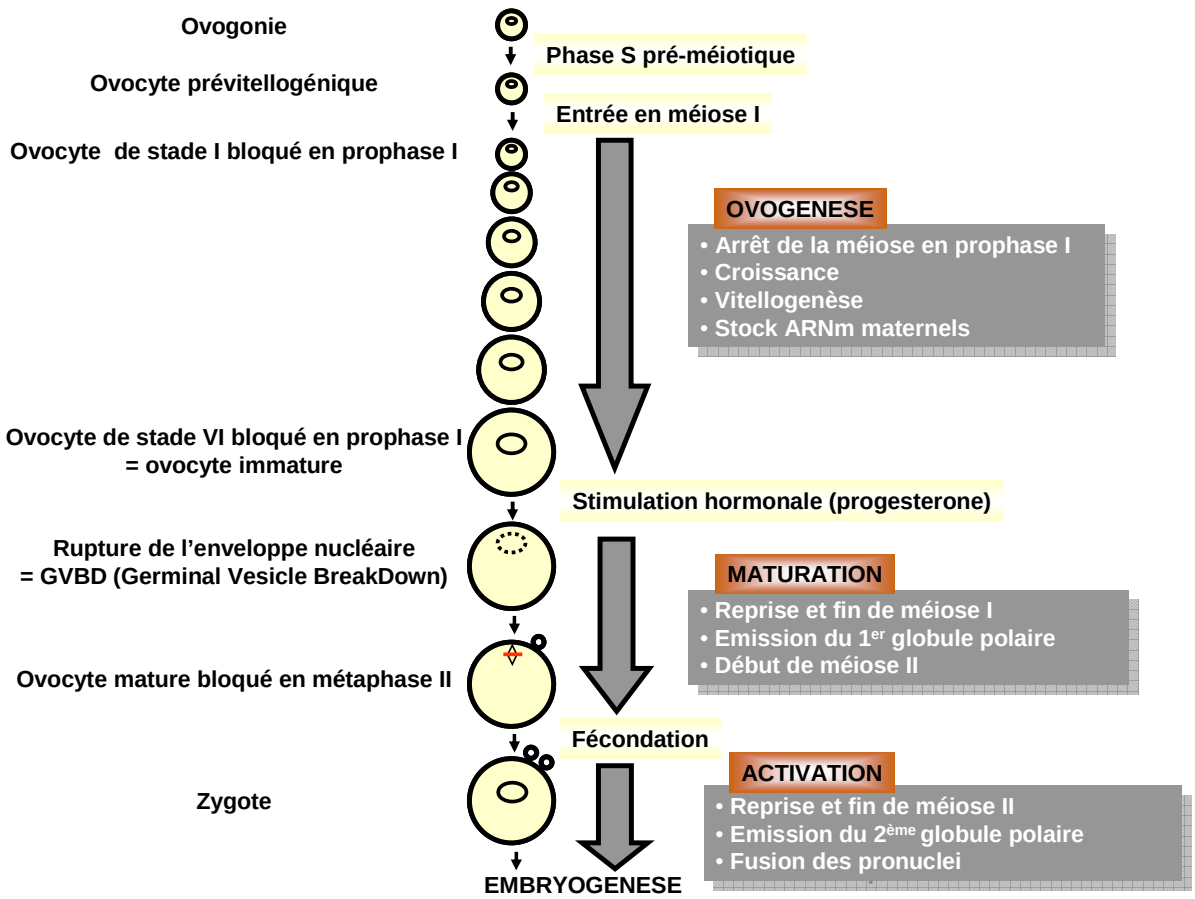


Figure 6 : de l'ovogonie au zygote chez le Xénope.
Au cours de la méiose, l'ovocyte subit deux blocages physiologiques. Le premier survient en prophase I. Il sera levé par stimulation hormonale pour permettre la maturation ovocytaire. Au terme de cette maturation, l'ovocyte sera à nouveau bloqué en métaphase II jusqu'à la fécondation.

1) la vitellogenèse.

La vitellogenèse débute dès le stade III et s'arrête lorsque l'ovocyte devient sensible à la progestérone. Le vitellus est d'abord synthétisé dans le foie sous la forme d'un précurseur glycoprotéique: la vitellogénine ou VTG **(Figure 7)**. Chez le Xénope, quatre gènes de la VTG, A1, A2, B1 et B2, sont transcrits dans les hépatocytes en réponse à l'oestradiol produit par les cellules folliculaires entourant l'ovocyte (Wahli *et al.*, 1979). Cette synthèse d'oestradiol est sous le contrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire : la sécrétion de GnRH (« *Gonadotropin Releasing Hormone* ») par l'hypothalamus stimule l'hypophyse qui libère à son tour l'hormone-folliculo-stimulatrice (FSH, « *Follicle Stimulating Hormone* »). La FSH stimule alors les cellules folliculaires. Une fois synthétisée, la VTG est acheminée par la circulation sanguine jusqu'aux ovaires. Après s'être fixée sur un récepteur spécifique (VTGR) situé à la surface de l'ovocyte, elle est internalisée par endocytose puis clivée par la cathepsine D en phosvitine (PV) et lipovitelline (LV) (Yoshizaki et Yonezawa, 1994). Les

© 2009 Tous droits réservés.

endosomes fusionnent alors avec des corps multivésiculaires pour former des plaquettes vitellines insolubles, qui serviront de source d'énergie durant l'embryogenèse. La taille des plaquettes vitellines augmente durant la croissance de l'ovocyte. Elles se répartissent selon un gradient centripète et pôle animal-pôle végétatif : les plaquettes vitellines jeunes situées en périphérie ont un volume moins important que les plaquettes plus âgées qui se concentrent au pôle végétatif.

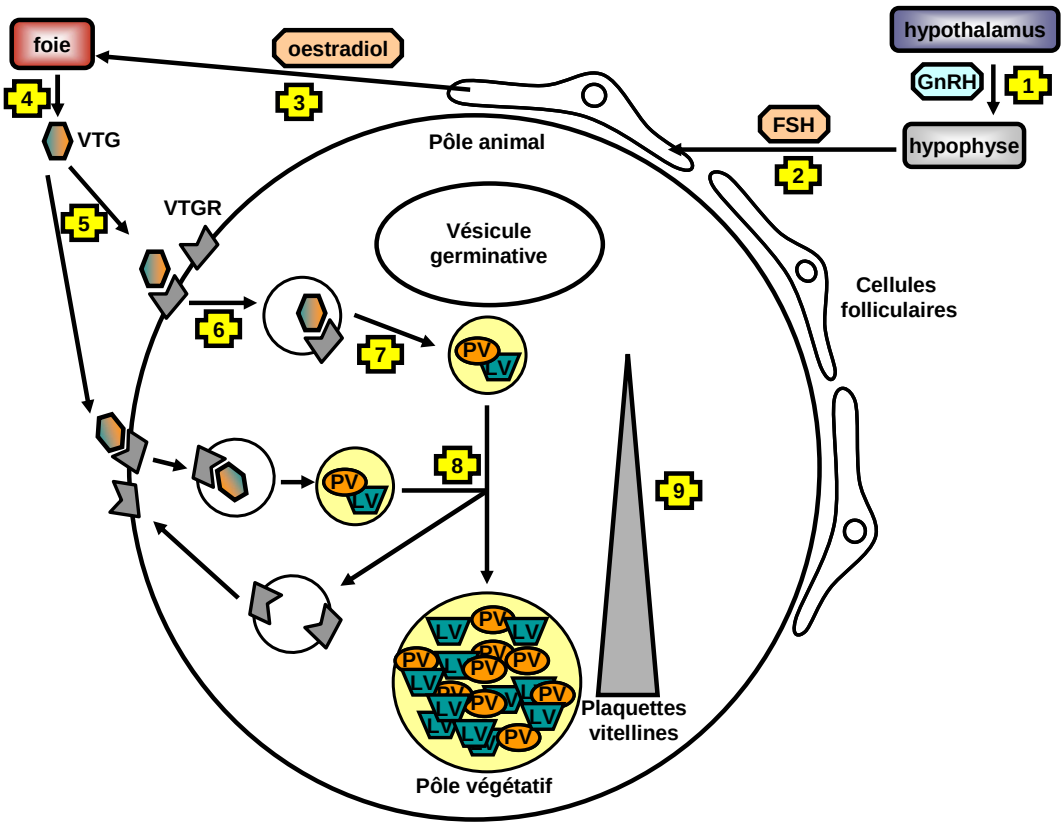


Figure 7 : schématisation de la vitellogenèse chez le Xénope.
1. L'hypothalamus sécrète la GnRH qui va stimuler l'hypophyse.
2. L'hypophyse sécrète la FSH qui va stimuler les cellules folliculaires.
3. Les cellules folliculaires sécrètent l'oestradiol qui va stimuler le foie.
4. Les hépatocytes synthétisent la vitellogénine (VTG)
5. La VTG est libérée dans le sang, transportée aux ovaires et se fixe sur son récepteur (VTGR) présent à la surface ovocytaire.
6. Endocytose des complexes VTG/VTGR.
7. Clivage de la VTG en phosvitine (PV) et lipovitelline (LV)
8. Fusion des endosomes et recyclage des récepteurs.
9. formation d'un gradient de plaquettes vitellines.

2) Activité transcriptionnelle au cours de l'ovogenèse.

Dès le stade II, les chromosomes adoptent une conformation particulière dite en écouvillon. Ces larges boucles appariées sont le siège d'une haute activité transcriptionnelle (Dumont, 1972). Cette activité est maximale au stade III-IV puis décroit au fur et à mesure

© 2009 Tous droits réservés.

que les chromosomes se condensent. Au stade VI, l'activité transcriptionnelle est réduite de moitié par rapport au stade IV. 98% de l'activité transcriptionnelle de l'ovocyte consiste en la synthèse d'ARN ribosomiques (ARNr). Dès le stade I, les gènes ribosomiques sont amplifiés pour atteindre une quantité de 2.10^6 copies par ovocyte et entraînent l'apparition de nucléoles extra-chromosomiques contenant leur propre fragment d'ADNr (Perkowska *et al.*, 1968). Au final, l'ovocyte de stade VI possède 1.10^{12} ribosomes qui vont se disposer selon un gradient inverse à celui du vitellus.

Les 2% d'activité transcriptionnelle restante correspondent à la synthèse d'ARNm codant une trentaine de protéines importantes pour la détermination des feuillets embryonnaires et l'établissement de la lignée germinale (pour revue, voir King *et al.*, 2005). Ces ARNm se répartissent spécifiquement le long de l'axe animal/végétatif et établissent la polarité antéro-postérieure du futur embryon. Certains de ces ARN, dont celui de la fibronectine ou de la sérine/thréonine kinase XPar-1, sont préférentiellement distribués au pôle animal (Oberman et Yisraeli, 1995 ; Ossipova *et al.*, 2002) alors que d'autres vont être relocalisés au niveau du cortex végétatif dans des domaines subcellulaires spécialisés. Si peu d'informations existent concernant les mécanismes permettant la localisation des ARN au pôle animal, deux voies distinctes agissent séquentiellement et localisent au pôle végétatif une vingtaine d'ARNm (Forristal *et al.*, 1995 ; Klock et Etkin, 1995).

Durant l'ovogenèse, les ovocytes accumulent un grand nombre de mitochondries (1.10^5 /ovocyte de stade VI). Dans les ovocytes de stade I, les mitochondries s'agrègent temporairement pour former un corps sphérique unique localisé à la périphérie du noyau appelé nuage mitochondrial ou corps de Balbiani. Les ARNm synthétisés précocement comme Xwnt11, Xcat2 ou DEADsouth (ARN hélicase homologue d'eIF4A) sont associés au nuage mitochondrial (Ku et Melton, 1993 ; Mosquera *et al.*, 1993 ; MacArthur *et al.*, 2000). A partir du stade II, le nuage mitochondrial se disperse et migre vers le cortex végétatif, entrainant avec lui les ARNm synthétisés par la voie précoce. Ces derniers s'accumulent au niveau du plasma germinatif (zone du cytoplasme contenant les déterminants de la lignée germinale) et forment la région METRO *(« MEssage TRansport Organizer region »*).

Une autre voie, dite tardive, se met également en place pour permettre la localisation végétative d'autres ARNm impliqués cette fois dans la destinée des cellules somatiques (plus particulièrement dans le développement du mésoderme et de l'endoderme) comme Vg1 (un membre de la famille du TGFβ) ou VegT (un facteur de transcription de la famille T-box) (Zhang *et al.*, 1998 ; Joseph et Melton, 1998). Au stade I, ces ARNm sont uniformément répartis dans le cytoplasme. Au stade II, ils s'associent au niveau d'un subdomaine du

© 2009 Tous droits réservés.

reticulum endoplasmique puis, à partir du stade III, ils migrent pour s'ancrer au cytosquelette cortical. Des mécanismes de répression traductionnelle sont également mis en place pour éviter des expressions protéiques inappropriées d'un point de vue spatio-temporel.

3) Autres événements de l'ovogenèse et caractéristiques de l'ovocyte de stade VI.

Dès le stade III, des granules pigmentaires contenant de la mélanine se déposent uniformément au niveau du cortex de l'ovocyte. A partir du stade IV, ces pigments migrent pour occuper la partie corticale de l'hémisphère animal alors que l'hémisphère végétatif reste dépourvu de pigments.

Des vésicules de sécrétion renfermant des glycoprotéines appelées granules corticaux s'accumulent également au cours de la croissance ovocytaire pour former une couche dense sous la membrane de l'ovocyte. A la fécondation, l'exocytose de ces granules permettra la formation de la membrane de fécondation, barrière tardive et définitive à la polyspermie.

Au terme de l'ovogenèse, l'ovocyte de stade VI est donc une cellule polarisée selon un axe pôle animal-pôle végétatif (*via* l'établissement de 2 gradients : vitellin et ARNr/ARNm), de grande taille (1,3 mm ; d'un volume approximatif de 1 µL), possédant un hémisphère animal pigmenté. Le noyau appelé vésicule germinative (VG) est de très grande taille (d'environ 400 µm soit 40 à 50 fois la taille d'un noyau d'une cellule somatique). Il est excentré au pôle animal, renferme 18 paires de chromosomes (génome allotétraploïde) et environ 1500 nucléoles. L'ovocyte qui a accumulé un stock d'ARNm est dès lors compétent à poursuivre la méiose (**Figure 8**).

© 2009 Tous droits réservés.

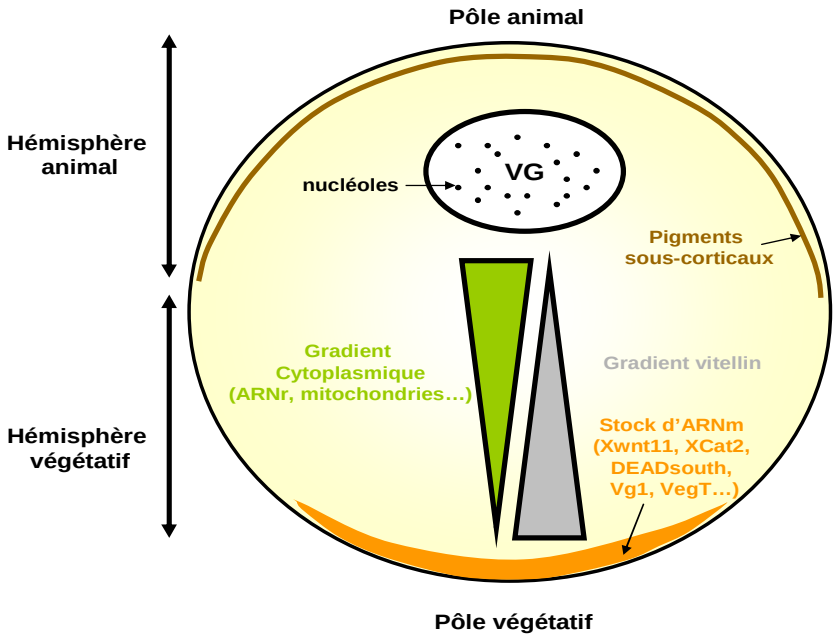


Figure 8 : représentation schématique d'une coupe méridienne d'ovocyte de stade VI.

III. Reprise méiotique de l'ovocyte de Xénope.

La reprise méiotique de l'ovocyte de Xénope est déclenchée par stimulation hormonale. D'un point de vue moléculaire, cette stimulation déclenche toute une série d'événements dit précoces qui aboutissent principalement à l'activation de deux voies de signalisation : la voie MAPK (*« Mitogen Activated Protein Kinase »*) mos/MEK1/Erk2 et la voie du MPF (*« M-phase Promoting Factor »*), facteur universel d'entrée en phase M. Ces voies contrôleront les différents événements morphologiques survenant dans l'ovocyte au cours de la maturation.

1) Stimulation de la reprise méiotique.

Plusieurs types de stimuli peuvent induire la reprise méiotique dans les ovocytes de Xénope.

a) Les hormones stéroïdes.

Chez les amphibiens, les gonadotropines synthétisées par l'hypothalamus stimulent la production d'hormone lutéinisante (LH) par l'hypophyse aboutissant à la production de stéroïdes, pregnelonone et progestérone par les cellules folliculaires entourant l'ovocyte (Fortune *et al.*, 1975 ; Thibier-Fouchet *et al.*, 1976). Si la progestérone est considérée comme

© 2009 Tous droits réservés.

l'inducteur naturel de la reprise méiotique, d'autres stéroïdes sont capables de provoquer la maturation *in vitro* comme l'androstènedione et la testostérone, deux hormones androgènes (Blondeau et Baulieu, 1984 ; Lutz *et al.*, 2001). En réalité, il semble que ces androgènes soient les médiateurs dominants de la reprise méiotique puisqu'ils sont retrouvés en quantité abondante dans le sérum et les ovaires de femelles stimulées par des gonadotropines, alors que la progestérone reste indétectable (Lutz *et al.*, 2001). Cette dernière observation s'explique par l'existence, dans l'ovocyte, d'une 17,20-lyase, CYP17 qui métabolise rapidement la progestérone en androstènedione (Yang *et al.*, 2003).

b) Les récepteurs aux stéroïdes.

L'identification des récepteurs aux stéroïdes dans les ovocytes de Xénope est longtemps restée énigmatique. Plusieurs observations ont montré que ces récepteurs devaient être membranaires et non pas nucléaires comme c'est habituellement le cas. Premièrement, des stéroïdes fixés sur des polymères, incapables de pénétrer dans l'ovocyte, provoquent la maturation (Godeau *et al.*, 1978) alors que l'injection de stéroïdes dans l'ovocyte ne déclenche pas la reprise méiotique (Jacobelli *et al.*, 1974). Deuxièmement, des sites de fixation aux stéroïdes de haute affinité ont été détectés dans des préparations membranaires (Liu et Patiño, 1993 ; Lutz *et al.*, 2000). Troisièmement, l'ovocyte est capable de reprendre la méiose en présence d'actinomycine D, un inhibiteur de la transcription ce qui démontre que la progestérone agit *via* une voie non génomique (Masui et Markert, 1971 ; Lutz *et al.*, 2003).

Deux familles de récepteurs à la progestérone (PR) contribueraient à la reprise méiotique chez les amphibiens (**Figure 9**). Deux membres de la famille des PR « classiques » intracellulaires, xPR-1 et xPR-2, ont été clonés chez le Xénope (Tian *et al.*, 2000 ; Bayaa *et al.*, 2000). La modulation des niveaux de ces deux récepteurs (par surexpression ou par oligonucléotides antisens) modifie la sensibilité des ovocytes à la progestérone (Tian *et al.*, 2000 ; Bayaa *et al.*, 2000). L'ajout d'un signal de palmitoylation et de myristoylation (deux signaux d'adressage des protéines à la face interne de la membrane plasmique) sur les xPR accélère la maturation stimulée par la progestérone (Martinez *et al.*, 2006). 5 à 10% des xPR s'associent à la membrane ovocytaire et peuvent être co-purifiés avec Erk2 et la PI3K (Bagowski *et al.*, 2001). Cette association membranaire se fait par l'intermédiaire du domaine de fixation au ligand alors que la partie N-terminale du récepteur est cytosolique (Martinez *et al.*, 2007).

© 2009 Tous droits réservés.

Des membres d'une nouvelle famille de récepteurs membranaires aux stéroïdes présentant de faibles homologies avec la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G ont également été identifiés chez le Xénope (Zhu *et al.*, 2003). L'injection d'anticorps dirigés contre ces PR membranaires (XmPR) inhibe la maturation stimulée par la progestérone alors que l'injection d'ARNm Myc-XmPR accélère la reprise méiotique (Josefsberg Ben-Yehoshua *et al.*, 2007). La présence de ces deux types de récepteurs suggère l'activation de différentes voies de signalisation en réponse à la stimulation par la progestérone (Maller, 2003).

D'autres travaux ont montré que les récepteurs aux androgènes (AR) participeraient également à la reprise méiotique. En effet, ces AR sont capables de s'associer à la membrane ovocytaire et le traitement des ovocytes à la flutamide, un antagoniste de ces AR, ou l'inhibition de leur expression par ARN interférent, diminue le pourcentage de maturation stimulée par les androgènes *in vitro* (Lutz *et al.*, 2001 ; 2003). Evaul *et al.* ont par ailleurs démontré que la progestérone se liait à la fois sur les PR et les AR avec une haute affinité alors que les androgènes ne sont capables de se fixer aux PR qu'à de fortes concentrations (Evaul *et al.*, 2007).

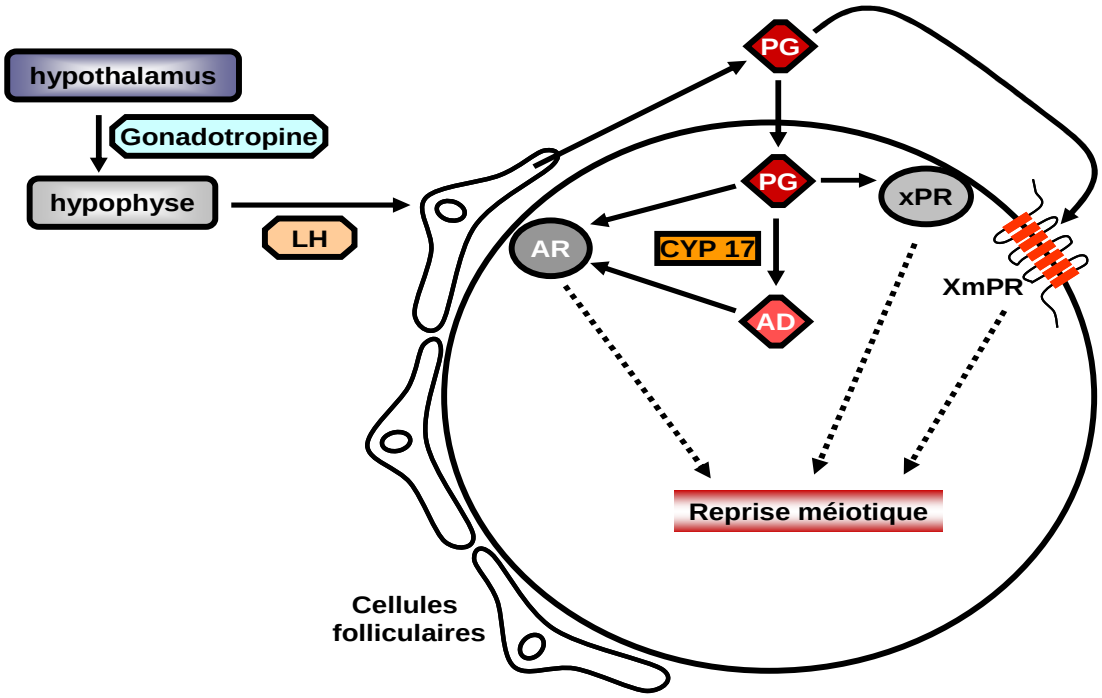


Figure 9 : stimulation de la reprise méiotique par les stéroïdes dans l'ovocyte de Xénope.
Les gonadotropines synthétisées par l'hypothalamus stimulent l'hypophyse. La sécrétion de l'hormone lutéinisante (LH) par cette dernière provoque la synthèse de progestérone (PG) par les cellules folliculaires. Dans l'ovocyte, la PG est rapidement métabolisée en androstènedione (AD) par la 17,20-lyase CYP17. La PG peut se fixer soit sur son récepteur « classique » xPR relocalisé à la membrane, soit sur son récepteur à 7 domaines transmembranaires XmPR, mais aussi sur les récepteurs aux androgènes (AR) pour déclencher différentes voies de signalisation concourant à la reprise méiotique.

© 2009 Tous droits réservés.

c) L'insuline et l'IGF1.

Outre les stéroïdes, l'insuline et l'IGF1 (*« Insulin-like Growth Factor 1 »)* peuvent déclencher la reprise méiotique *in vitro* uniquement et selon une cinétique plus lente qu'en présence de progestérone (El-Etr *et al.*, 1979, Maller et Koontz, 1981) et au travers d'une liaison à un récepteur transmembranaire à l'IGF1 (Hainaut *et al.*, 1991 ; Janicot *et al.*, 1991 ; Zhu *et al.*, 1998). Dans ce cas, deux voies prépondérantes sont activées par l'insuline et l'IGF1 : la voie PI3K/Akt et la voie $p21^{Ras}$/MAPK..

2) Evènements morphologiques de la reprise méiotique.

La ségrégation du matériel génétique nécessite d'importants remaniements du noyau et du cytosquelette de l'ovocyte : un fuseau de division se forme sur lequel s'ancreront les chromosomes.

a) Rupture de l'enveloppe nucléaire (GVBD, Germinal Vesicle BreakDown).

Le premier événement de la reprise méiotique est la rupture de l'enveloppe nucléaire ou GVBD pour *Germinal Vesicle BreakDown*. Cette rupture commence à la base de la vésicule germinative. Dans le même temps où elle se rompt, la vésicule germinative migre au pôle animal de l'ovocyte (**Figure 10**). Cette migration de la VG entraîne l'apparition d'une dépigmentation locale du pôle animal appelée tache de maturation (**Figure 11**).

© 2009 Tous droits réservés.

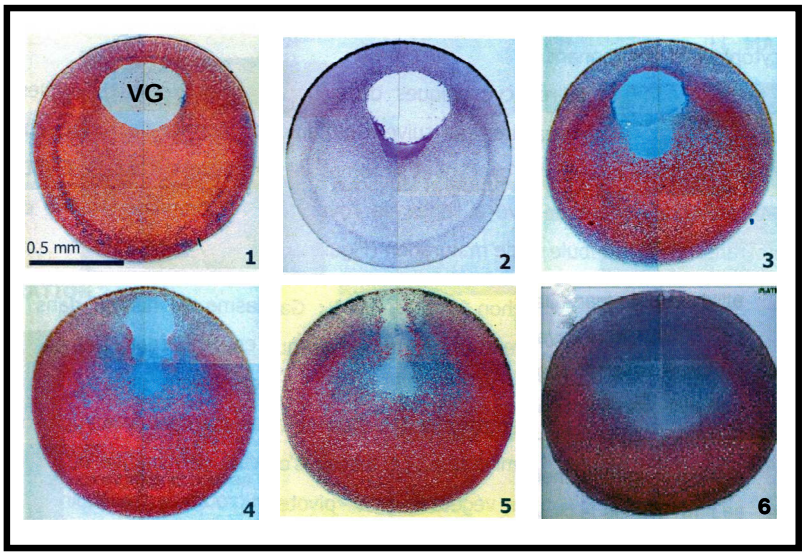


Figure 10 : événements cytologiques associés à la reprise méiotique de l'ovocyte de Xénope (d'après Hausen et Riebesell, 1991).
1. Ovocyte immature présentant une vésicule germinative (VG) intacte.
2. Rupture de l'enveloppe nucléaire à la base de la VG.
3. L'enveloppe nucléaire montre des signes de désorganisation.
4. La VG se rétrécit et migre vers le pôle animal.
5. La VG a pratiquement disparu. Les chromosomes sont condensés.
6. Ovocyte mature.

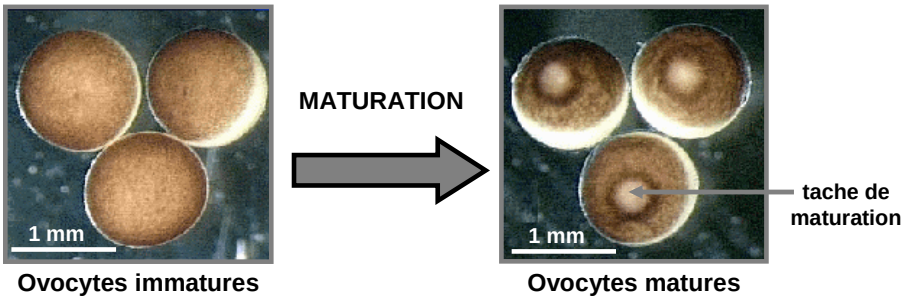


Figure 11 : photographies d'ovocytes immatures et matures de *Xenopus laevis* vus par le pôle animal.
La reprise méiotique est facilement observable par l'apparition d'une tache de maturation au pôle animal de l'ovocyte.

b) Organisation et formation du fuseau de division méiotique.

Simultanément à la GVBD, un réseau de microtubules transitoires (TMA : « *Transient Microtubule Array*) s'organise à la face inférieure de la vésicule germinative à partir d'un centre organisateur des microtubules (MTOC : « *MicroTubule Organizing Center* »). Ce complexe MTOC-TMA migre ensuite rapidement vers le pôle animal en association avec les chromosomes (Huchon *et al.*, 1981a ; Gard, 1992).

Quatre étapes sont alors nécessaires pour former à la fois le fuseau de métaphase I et de métaphase II (Gard, 1992) qui, dans le cas de la méiose, s'effectue en l'absence de centrioles et de centrosome (Huchon *et al.*, 1981a) : le complexe MTOC-TMA se condense d'abord

© 2009 Tous droits réservés.

pour former un agrégat compact de microtubules et de chromosomes puis se réorganise en un court fuseau bipolaire. Durant la prométaphase, ce fuseau, alors orienté transversalement, s'allonge, puis pivote pour s'orienter selon un axe pôle animal/pôle végétatif pour enfin s'ancrer au cortex de l'ovocyte par un de ses pôles (**Figure 12**). L'assemblage correct du fuseau de division est primordial pour assurer une parfaite ségrégation du matériel génétique.

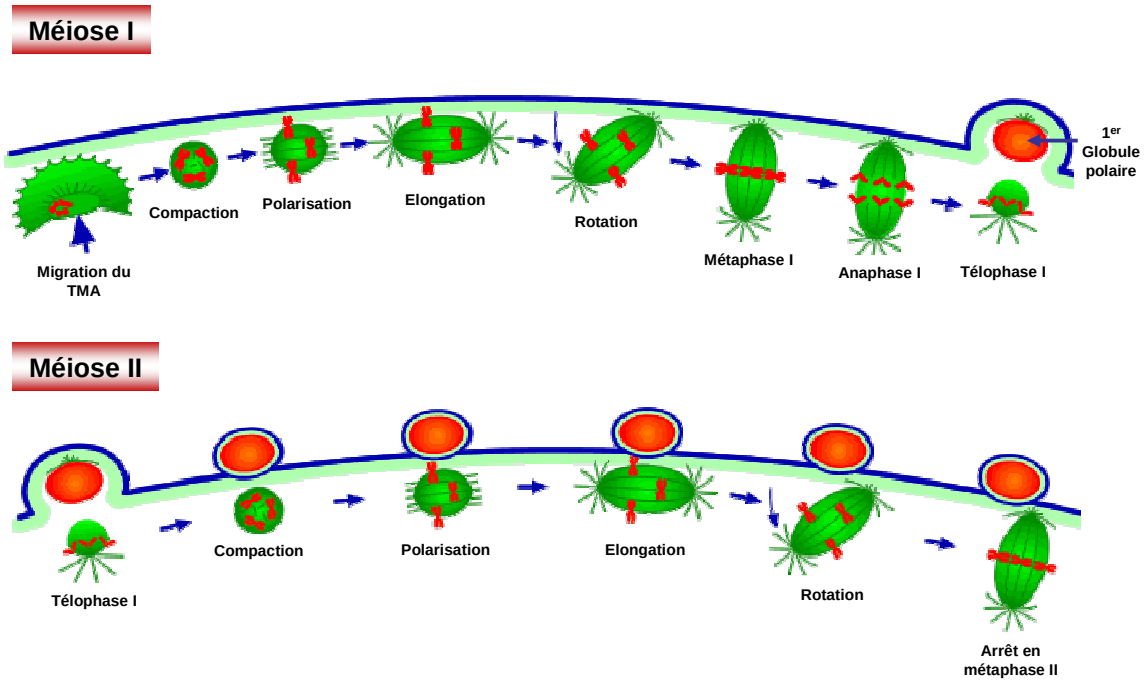


Figure 12 : organisation des microtubules et du fuseau de division durant la méiose de l'ovocyte de Xénope.
Adapté de : http://www.biology.utah.edu/gard/HTML/Oogenesis/Maturation_body.html.
Le TMA se forme à partir du MTOC. Le complexe MTOC-TMA migre au pôle animal emportant avec lui les chromosomes condensés. Ce complexe sert de précurseur au premier fuseau de division. D'abord, il se condense, puis il établit un axe bipolaire avant de s'allonger et de s'orienter transversalement à l'axe pôle animal-pôle végétatif et de s'ancrer au cortex. Après émission du 1er globule polaire, les chromosomes ne se décondensent pas et l'enveloppe nucléaire ne se reforme pas. Un deuxième fuseau de division se forme alors de la même manière que lors de la méiose I. Au terme de la maturation, l'ovocyte reste bloqué en métaphase II.

Les microtubules sont des structures polarisées formées par l'assemblage de 12 à 15 protofilaments. Chaque protofilament résulte de l'association de dimères de tubulines α et β. La nucléation des microtubules à partir du MTOC est un processus dynamique au cours duquel ont lieu en permanence des phénomènes de polymérisation (à l'extrémité (+)) et de dépolymérisation (à l'extrémité (-)) des dimères de tubulines. Les mécanismes moléculaires régulant la formation des microtubules du fuseau méiotique ne sont pas entièrement compris.

© 2009 Tous droits réservés.

Néanmoins, plusieurs protéines jouant un rôle dans ce processus ont été identifiées chez le Xénope.

α. Les protéines associées aux microtubules (MAP, « Microtubule Associated Proteins »).

Les MAP sont des protéines de liaison à la tubuline qui régulent la stabilité des microtubules. Chez le Xénope, trois protéines appartenant à cette famille nommées XMAP pour « *Xenopus Microtubule Asssociated Proteins* » sont impliquées dans la stabilisation des microtubules : XMAP215 (Vasquez *et al.*, 1994 ; Becker *et al.*, 2003 ; Brouhard *et al.*, 2008), XMAP230 (Andersen *et al.*, 1994 ; Cha *et al.*, 1998) et XMAP310 (Andersen et Karsenti, 1997). Ces protéines agissent selon un mode d'action différent : XMAP230 réduit la fréquence de dépolymérisation alors que XMAP310 augmente la fréquence de polymérisation (Andersen et Karsenti, 1997). XMAP215 agit de manière antagoniste avec XKCM1, une protéine de la famille des kinésines et déstabilisatrice des microtubules, pour réguler l'assemblage des microtubules (Becker *et al.*, 2003). XMAP215 permet leur assemblage *via* une activité polymérasique. En effet, elle catalyse directement l'addition de 25 dimères de tubuline sur le microtubule en croissance (Brouhard *et al.*, 2008).

β. Les « petites » protéines G.

Les petites protéines G (ou petites GTPases) forment une superfamille de protéines « interrupteurs » essentielles à la transduction du signal, à l'organisation du cytosquelette et au transport cellulaire. Leur forme active, liée au GTP, interagit avec des partenaires cellulaires appelés « effecteurs » auxquels elles transmettent un signal d'action. Ces GTPases contrôlent également l'assemblage des microtubules lors de la mitose (pour revue voir Zheng, 2004).

Chez le Xénope, trois membres de cette superfamille joue un rôle dans la formation et la migration du fuseau, dans son ancrage au cortex et dans l'extrusion du premier globule polaire : Ran, Cdc42 et RhoA (Dumont *et al.*, 2007 ; Ma *et al.*, 2006).

Dans les cellules somatiques, un gradient de Ran s'établit lors de la mitose aboutissant à une forte concentration de la protéine sous sa forme active liée au GTP autour des chromosomes. Ran-GTP contribue alors à la formation des microtubules en libérant des facteurs d'assemblage, jusqu'alors séquestrés par les importines, dans le voisinage des chromosomes (**Figure 13**) (pour revue, voir Clarke et Zhang, 2008). Chez le Xénope,

© 2009 Tous droits réservés.

l'existence d'un tel gradient de Ran-GTP a été mis en évidence et des expériences de modulation des niveaux de Ran-GTP dans l'ovocyte ont montré que cette GTPase régulait la formation du fuseau de métaphase II mais pas de métaphase I (Dumont *et al.*, 2007).

Par ailleurs, Ma *et al.* ont montré que l'inhibition de cdc42 empêchait l'extrusion du premier globule polaire et que RhoA régulait la migration et l'ancrage au cortex du fuseau de première division de méiose (Ma *et al.*, 2006).

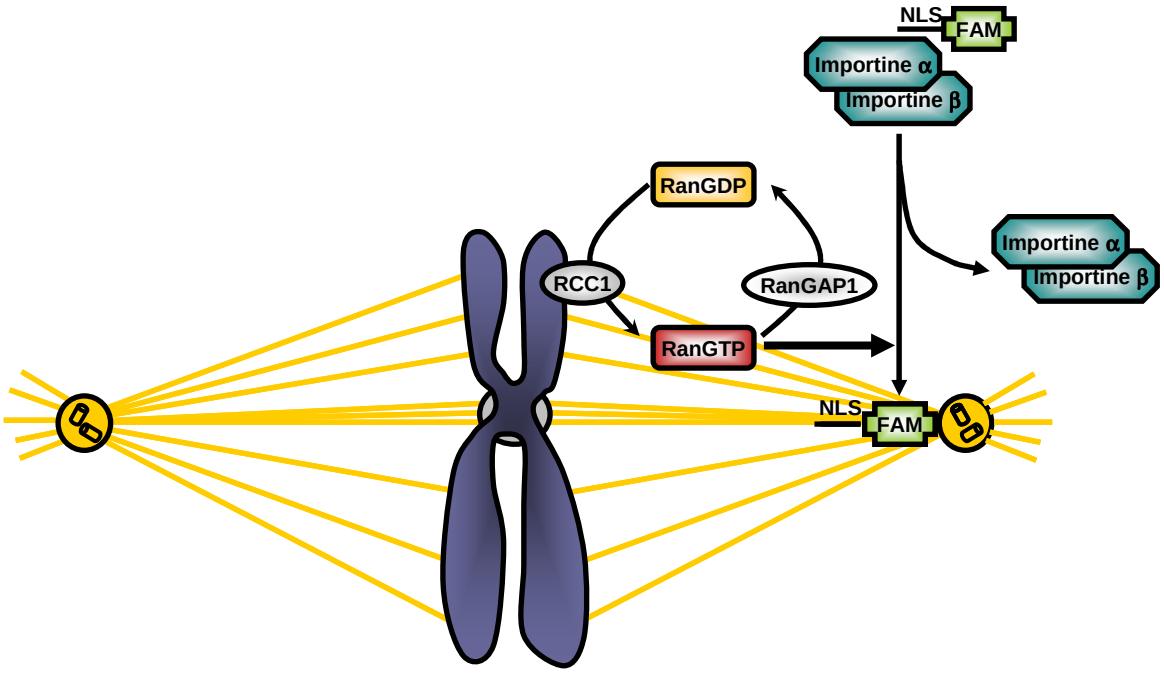


Figure 13 : libération de facteurs d'assemblage des microtubules par Ran. (D'après Clarke et Zhang 2008).
La génération de RanGTP à partir de RanGDP par l'action de RCC1 (*« Regulation of Chromosomes Condensation 1 »*), un facteur d'échange de guanine-nucléotide localisé sur les chromosomes, entraîne une accumulation de RanGTP dans le voisinage des chromosomes. Au fur et à mesure que l'on s'éloigne de ceux-ci, Ran hydrolyse le GTP et est donc inactivé. L'activité GTPasique intrinsèque de Ran est stimulée par RanGAP1 (*« Ran GTPase Activating Protein 1 »*). Aux alentours des chromosomes, RanGTP stimule la libération de facteurs d'assemblage des microtubules (FAM) séquestrés par les importines α et β *via* leur signal de localisation nucléaire (NLS, *« Nuclear Localisation Signal »*).

χ. Rôle des microfilaments d'actine.

Les microfilaments d'actine (actine-F) vont également participer à la régulation de la formation, de la migration et de l'ancrage du fuseau de division.

Dans les ovocytes de stade VI, l'actine s'étend de la vésicule germinative au cortex animal et forme un réseau tridimensionnel entourant les plaquettes vitellines dans le cytoplasme végétatif (Roeder et Gard, 1994). Lors de la reprise méiotique, l'actine F se concentre à la base du MTOC-TMA et des marquages à la phalloïdine-rhodamine ont

© 2009 Tous droits réservés.

également révélé une forte concentration d'actine au niveau du site d'ancrage au cortex du fuseau de méiose I (Gard *et al.*, 1995). Dans cette étude, les auteurs ont montré qu'un traitement des ovocytes à la cytochalasine B (un inhibiteur de la polymérisation de l'actine) perturbait la formation du MTOC-TMA mais n'empêchait pas la migration du fuseau vers la membrane ovocytaire. En revanche, la cytochalasine B empêche le mouvement de rotation du fuseau au niveau du cortex. Récemment, un rôle crucial de la myosine 10 dans la formation et l'ancrage du fuseau méiotique a été mis en évidence chez le Xénope (Weber *et al.*, 2004). Ces travaux ont en effet démontré que ce moteur protéique, normalement impliqué dans la contraction musculaire, était capable de s'associer aux microtubules *in vitro* et *in vivo* et qu'il se concentrait dans la région où le fuseau s'associe avec le cortex riche en actine F. De plus, l'inactivation de la myosine 10 (par dominant-négatif ou injection d'anticorps) provoque des défauts d'assemblage des microtubules, empêche l'association de l'actine F au fuseau ainsi que l'ancrage de ce dernier.

Au terme de la maturation, le premier globule polaire a été expulsé et l'ovocyte est bloqué en métaphase II (**Figure 14**). *In vivo*, les ovocytes matures sont libérés des cellules folliculaires dans la cavité péritonéale à partir de laquelle ils sont transportés dans l'oviducte pour être pondus. En passant dans l'oviducte, la gangue se dépose et un certain nombre de modifications au niveau de la membrane plasmique prépare l'ovocyte à son changement de milieu. La fécondation permettra d'achever la deuxième division de méiose et déclenchera le développement embryonnaire.

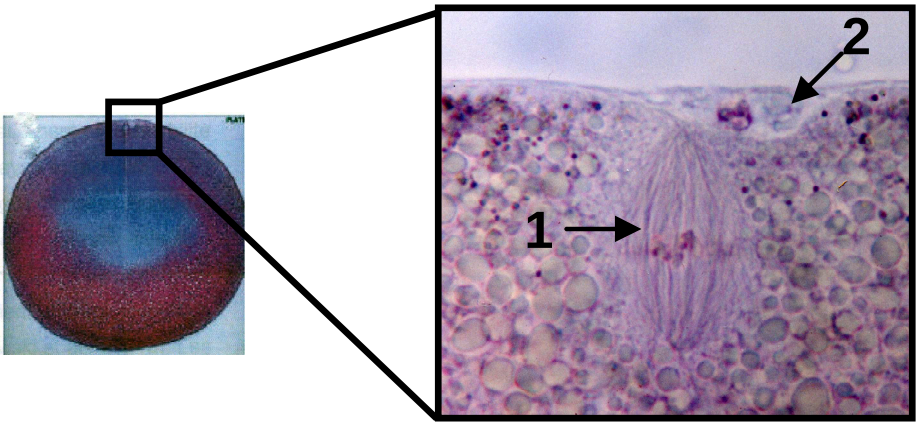


Figure 14 : l'ovocyte mature de Xénope est bloqué en métaphase II.
Les chromosomes condensés sont alignés en plaque équatoriale sur le fuseau de métaphase II **(1)**. Le premier globule polaire **(2)** se situe dans une encoche entre la membrane plasmique et l'enveloppe vitelline.

© 2009 Tous droits réservés.

3) Evènements précoces de la reprise méiotique.

a) Inhibition de l'adénylate cyclase, chute du niveau d'AMPc et inhibition de la PKA.

Dans les minutes qui suivent la stimulation hormonale, l'activité de l'adénylate cyclase, l'enzyme permettant la synthèse d'AMPc (Adénosine MonoPhosphate cyclique) à partir d'ATP (Adénosine TriPhosphate), diminue de moitié (Finidori-Lepicard *et al.*, 1981, Sadler et Maller, 1981) ce qui entraîne une chute de l'ordre de 20% du taux d'AMPc intracellulaire (Mulner *et al.*, 1979 ; Smith, 1989). Cette diminution d'AMPc engendre alors une inactivation de la PKA (Protéine Kinase dépendante de l'AMPc) 30 à 60 minutes après la stimulation hormonale (Wang et Liu, 2004 ; Wang *et al.*, 2006). Les PKA sont des protéines tétramériques constituées de deux sous-unités catalytiques (C) et de deux sous unités régulatrices (R). Sous sa forme tétramérique, la PKA est inactive. La fixation de l'AMPc sur les sous-unités régulatrices entraîne la libération des sous-unités catalytiques qui vont alors phosphoryler leurs protéines cibles (**Figure 15**). De nombreux travaux prouvent que cette inhibition précoce de l'adénylate cyclase, et l'inactivation de la PKA, est nécessaire et suffisante à la reprise méiotique.

Des agents activateurs de l'adénylate cyclase comme les méthylxanthines inhibent la reprise méiotique (O'Connor et Smith, 1976) alors que l'injection d'une forme « dominant-négatif » de l'adénylate cyclase xAC7 provoque des maturations spontanées et accélère la maturation induite par la progestérone (Sheng *et al.*, 2005). De même, l'injection d'une sous unité catalytique constitutivement active de la PKA inhibe la reprise méiotique stimulée par la progestérone alors que l'injection d'un inhibiteur de PKA (PKI) ou de la sous-unité régulatrice induit la maturation indépendamment de toute stimulation hormonale (Maller et Krebs, 1977).

α. Importance des protéines G hétérotrimériques.

Dans la cellule, l'activation de l'adénylate cyclase est sous le contrôle de récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques (formées de trois sous-unités : Gα,Gβ,Gγ). L'activité de l'adénylate cyclase est régulée par deux types de ces protéines G: elle est activée si elle fixe la protéine Gs (G stimulatrice) (**Figure 15**) et inhibée si elle fixe la protéine Gi (G inhibitrice). Plusieurs études suggèrent que les voies de signalisation déclenchées à la fois par

© 2009 Tous droits réservés.

les protéines Gα et Gβγ jouent un rôle crucial dans le maintien de l'arrêt en prophase (**Figure 16**).

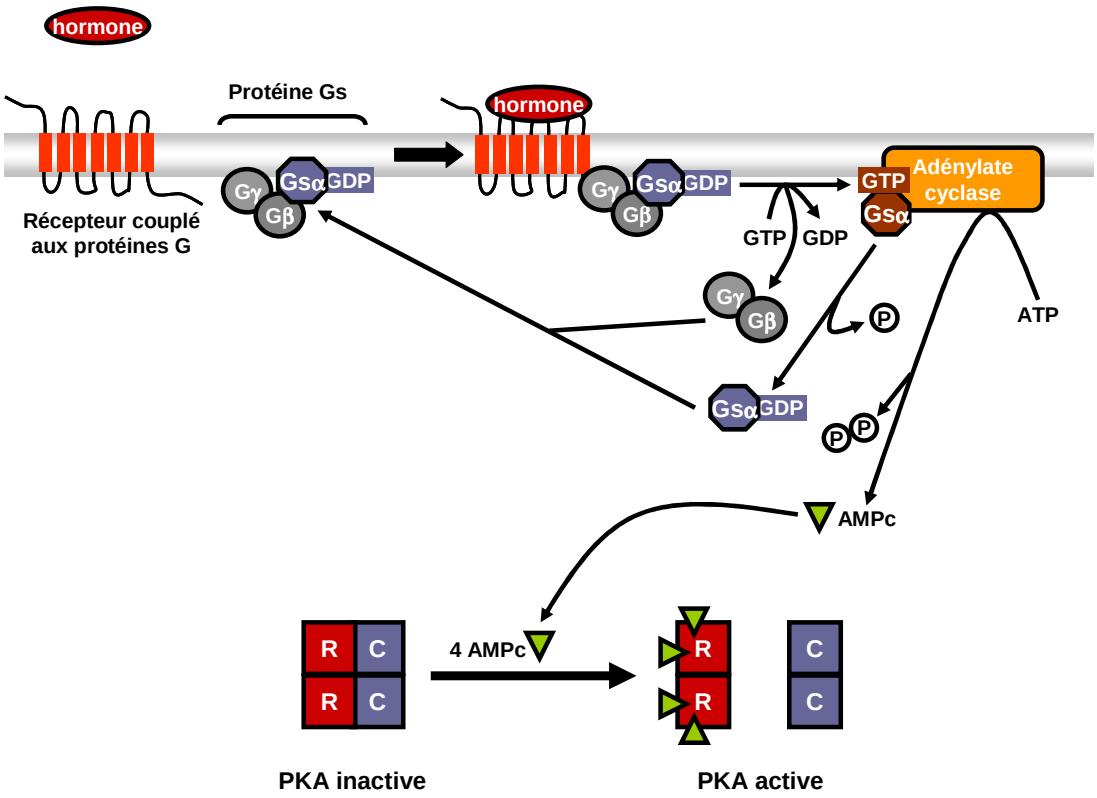


Figure 15 : activation de l'adénylate cyclase et de la PKA.
Après stimulation hormonale, le récepteur s'associe à la protéine Gs. Le GTP se substitue alors au GDP sur Gsα qui se dissocie du complexe Gβγ. Gsα s'associe à l'adénylate cyclase, ce qui provoque la synthèse d'AMPc. La fixation de 4 molécules d'AMPc sur les 2 sous-unités régulatrices (R) de la PKA, libère et active les 2 sous-unités catalytiques (C).

L'injection d'anticorps anti-Gsα ou d'oligonucléotides antisens provoque la reprise méiotique en absence de stimulation hormonale (Gallo *et al.*, 1995; Romo *et al.*, 2002) alors que la surexpression de la sous-unité Gα sauvage ou d'une forme constitutivement active empêche la reprise méiotique stimulée par la progestérone (Romo *et al.*, 2002). Les protéines G ne sont actives que sous une forme liée au GTP. L'injection de l'ARNm de xRic-8, une protéine de la famille GEF (*« Guanine Exchange factor »*) qui stimule l'addition de GTP sur la sous-unité Gα, inhibe la maturation stimulée par la progestérone alors que l'utilisation d'ARNi visant à bloquer l'expression de cette enzyme induit des maturations spontanées ce qui suggère que xRic-8 participerait au maintien de l'activité de l'adénylate cyclase en prophase I (Romo *et al.*, 2008). La surexpression de Gβ1 seule ou associée à Gγ2 bloque la maturation induite par la progestérone (Lutz *et al.*, 2000 ; Sheng *et al.*, 2001) alors que l'injection d'une forme mutante de Gβ1 incapable d'activer l'adénylate cyclase n'empêche

© 2009 Tous droits réservés.

pas la reprise méiotique (Sheng *et al.*, 2005). De plus, la séquestration des sous-unités Gβγ endogènes déclenche des maturations en absence de stimulation hormonale ou accélère la maturation stimulée par la progestérone (Lutz *et al.*, 2000 ; Sheng *et al.*, 2001).

Récemment, deux membres de la famille des récepteurs couplés aux protéines G : GPRx et XGPR3 ont été clonés chez le Xénope par deux équipes indépendantes (Rios-Cardona *et al.*, 2008 ; Deng *et al.*, 2008). Ces récepteurs seraient constitutivement activés et contribueraient ainsi au maintien de l'arrêt en prophase I. La modulation des niveaux de GPRx perturbe la reprise méiotique stimulée par la progestérone (Rios-Cardona *et al.*, 2008). La surexpression de XGPR3 augmente les quantités d'AMPc *via* des mécanismes dépendant des protéines Gβγ et inhibe la maturation *in vitro* et *in vivo* (Deng *et al.*, 2008). De manière intrigante, les auteurs ont également montré que les métalloprotéinases clivaient XGPR3 *in vivo* après stimulation par des gonadotropines et que l'induction de ce clivage par un traitement des ovocytes à la collagénase potentialisait la reprise méiotique stimulée par la progestérone.

β. Cibles de la PKA lors de la reprise méiotique ?

Le lien existant entre l'inhibition de la PKA et l'activation du MPF lors de la reprise méiotique, et plus particulièrement les cibles directes de la PKA sont peu connus. Néanmoins, plusieurs études montrent que l'inhibition de la PKA conduirait dans un premier temps à la synthèse d'une ou plusieurs protéines essentielles à l'activation de cdc2 (Huchon *et al.*, 1981b ; Daar *et al.*, 1993 ; Matten *et al.*, 1994 ; Wang et Liu, 2006) et permettrait dans un second temps le maintien de l'activité du MPF indépendamment de la synthèse protéique (Rime *et al.*, 1992 ; 1994 ; Duckworth *et al.*, 2002 ; Wang et Liu, 2006).

La réactivation artificielle de PKA avant l'activation du MPF empêche la maturation stimulée par la progestérone alors qu'elle n'a aucun effet si la réactivation est provoquée après l'activation du MPF (Wang *et al.*, 2006). L'injection d'une sous-unité catalytique de la PKA (PKAc) empêche la reprise méiotique stimulée par injection de la protéine p39Mos alors qu'elle n'a pas d'effet sur la reprise méiotique induite par la microinjection d'extraits de MPF (Daar *et al.*, 1993). L'injection de PKAc empêche la traduction de la protéine p39Mos stimulée par la progestérone (Matten *et al.*, 1994).

La PKA régulerait également la phosphorylation inhibitrice du résidu de tyrosine 15 de cdc2. Un traitement par des agents provoquant une augmentation des niveaux intracellulaires

© 2009 Tous droits réservés.

d'AMPc provoquent une rephosphorylation de la tyrosine 15 de cdc2 dans des ovocytes stimulés par injection de cycline B ou injection de cdc25 (Rime *et al.*, 1992 ; 1994). Enfin, Duckworth *et al.* (2002) ont montré que la phosphatase Cdc25 était une cible directe de la PKA. La phosphorylation de cdc25 sur la sérine 287 par PKA provoque sa séquestration cytosolique par la protéine 14-3-3 et semble être primordiale pour l'arrêt en prophase I puisque un mutant Cdc25 non phosphorylable sur la sérine 287 inhibe la capacité de PKA à maintenir l'ovocyte bloqué en prophase I.

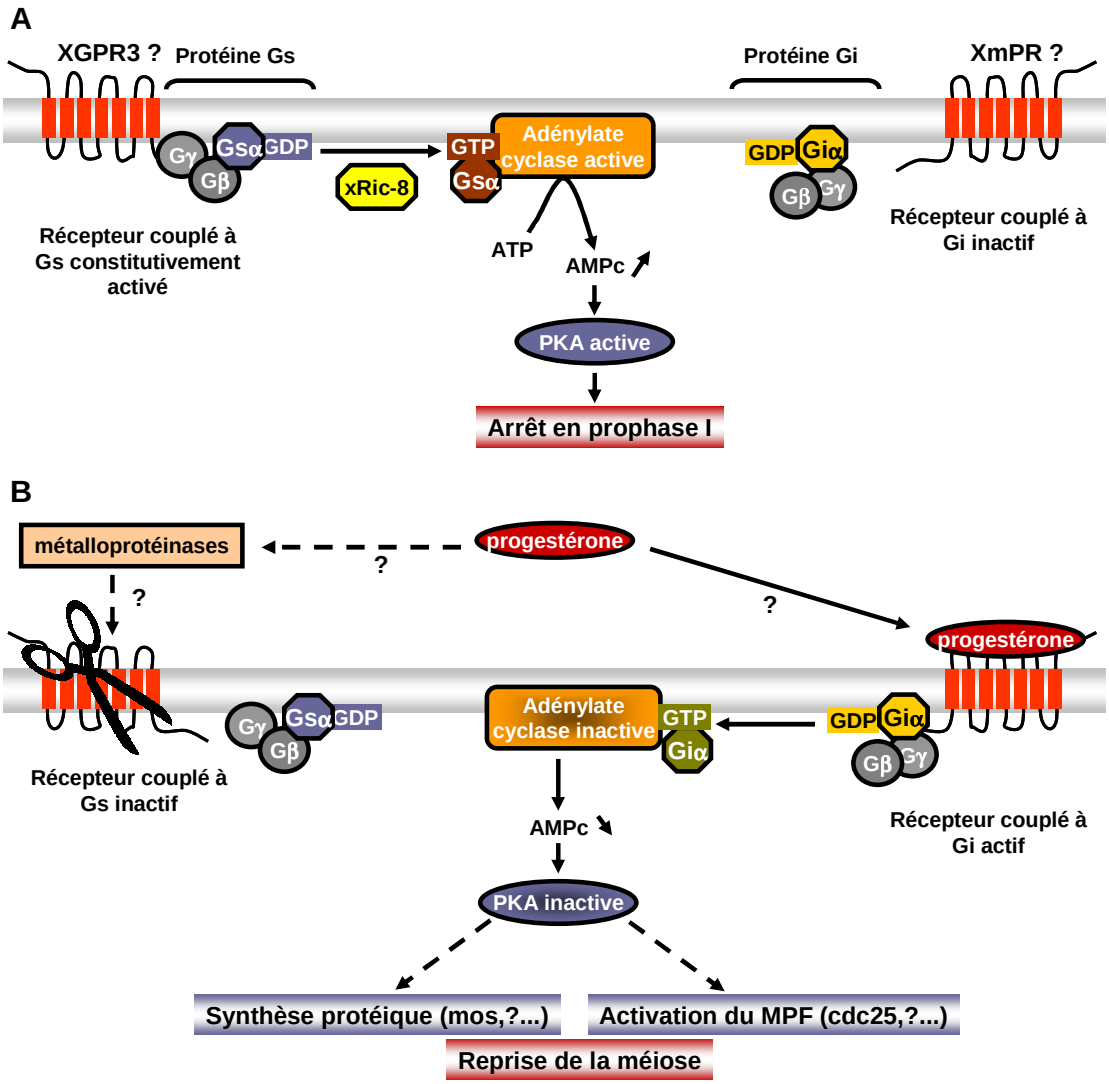


Figure 16 : l'inhibition de la PKA conduit à la reprise méiotique de l'ovocyte de Xénope.
A. Dans l'ovocyte de stade VI, l'activité de l'adénylate cyclase est maintenue grâce à un récepteur couplé à une protéine G stimulatrice (Gs) constitutivement actif, alors que le récepteur couplé à la protéine G inhibitrice (Gi) est inactif. Le taux d'AMPc intracellulaire reste élevé, la PKA est active et va phosphoryler des cibles responsables du maintien de l'arrêt en prophase I.
B. Sous l'effet de la progestérone, le récepteur couplé à la protéine Gs serait clivé par des métalloprotéinases alors que le récepteur couplé à la protéine Gi serait activé induisant une inhibition de l'adénylate cyclase et donc une chute du taux d'AMPc dans l'ovocyte. L'inactivation de la PKA permet alors la synthèse d'une ou plusieurs protéines essentielles à l'activation de cdc2, dont mos, et participe au maintien de l'activité du MPF indépendamment de la synthèse protéique notamment par déphosphorylation de cdc25.

© 2009 Tous droits réservés.

b) La phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K).

La phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) catalyse la phosphorylation du PIP2 (phosphatidylinositol 4, 5 bisphosphate) en PIP3 (phosphatidylinositol 3, 4, 5 triphosphate). La PI3K est un hétérodimère constituée d'une sous-unité catalytique (p110) et d'une sous-unité régulatrice (p85) capable d'activer la protéine kinase B (Akt/PKB). En effet, la liaison d'Akt/PKB au PIP3 provoque sa translocation à la membrane plasmique. Akt est alors phosphorylée par la PDK1 (*« phosphatidylinositol dependent protein kinase 1 »*) et activée. Cette voie de signalisation « PI3K/Akt » régule de nombreux processus cellulaires, en particulier la prolifération et l'apoptose et elle est dérégulée dans de nombreux cancers (pour revue voir Martelli *et al.*, 2007).

En réponse à la progestérone, la PI3K est activée (Muslin *et al.*, 1993a). De plus, la forme active de la PI3K s'associe au récepteur classique à la progestérone (XPR) (Bagowski *et al.*, 2001) ce qui suggère une implication de l'enzyme dans la maturation ovocytaire.

L'injection de formes constitutivement actives de la PI3K provoque la GVBD en absence de stimulation hormonale (Deuter-Reinhard *et al.*, 1997 ; Hehl *et al.*, 2001, Mood *et al.*, 2004). L'expression de la PI3Kγ provoque la phosphorylation d'Akt/PKB et de p42MAPK et son action sur la GVBD semble être dépendante de son activité lipide kinase (Hehl *et al.*, 2001). L'injection de l'ARNm d'Akt/PKB suffit également à induire la reprise méiotique et est associée à une augmentation de l'activité de l'AMPc phosphodiestérase (PDE), enzyme responsable de la conversion de l'AMPc en AMP (Andersen *et al.*, 1998). Ces résultats suggèrent donc que l'activation de la voie « PI3K/Akt » au cours de la reprise méiotique contribuerait à l'inhibition précoce de la PKA (**Figure 17**). Cependant les travaux concernant l'importance de cette enzyme dans le contrôle de la reprise méiotique aboutissent à des résultats contradictoires et tendent à démontrer que la PI3K ne jouerait qu'un rôle modeste au cours de la maturation stimulée par la progestérone.

L'injection d'un mutant de la PI3K adressé à la membrane plasmique ou d'un mutant de la protéine H-ras capable d'activer de manière constitutive la PI3K sont tout deux incapables de déclencher la GVBD en absence de stimulation hormonale (Gaffré *et al.*, 2006). Pour certains auteurs, l'injection d'une forme « dominant-négatif » de la PI3K inhibe la maturation induite par la progestérone (Muslin *et al.*, 1993a) alors que pour d'autres un tel effet n'est jamais observé (Mood *et al.*, 2004). De plus, des inhibiteurs de la PI3K comme la wortmannine ou le LY294002 bloquent la reprise méiotique uniquement stimulée par l'insuline (Liu *et al.*, 1995, Lopez-Hernandez et Santos, 1999) alors qu'elle n'engendre qu'un

© 2009 Tous droits réservés.

retard de la maturation stimulée par la progestérone (Bagowski *et al.*, 2001 ; Hehl *et al.*, 2001, Mood *et al.*, 2004 ; Gaffré *et al.*, 2006). De la même façon, l'inositol phosphatase SIP/SHIP (« *Signaling Inositol Phosphatase/SH2 containing Inositol Phosphatase* ») bloque la maturation induite par l'insuline ou la PI3K mais pas par la progestérone (Deuter-Reinhard, 1997) et l'inhibition d'Akt/PKB ne provoque que 30% d'inhibition de la maturation stimulée par la progestérone alors que l'inhibition est totale si les ovocytes sont traités à l'insuline (Andersen *et al.*, 2003).

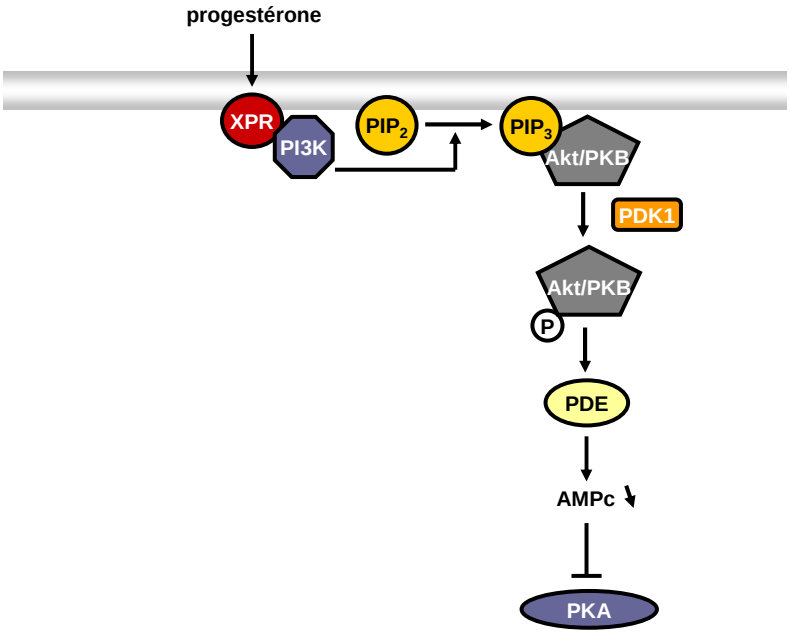


Figure 17 : implication de la PI3K dans la reprise méiotique stimulée par la progestérone.
La génération de PIP3 grâce à l'activation de la PI3K permet l'activation de la protéine kinase Akt/PKB. Cette dernière conduit à l'activation de la phosphodiestérase (PDE) contribuant ainsi à la chute du taux d'AMPc et à l'inhibition de la PKA nécessaire à la reprise méiotique.

4) Contrôle de la traduction par la polyadénylation cytoplasmique.

L'incubation des ovocytes de Xénope en présence d'inhibiteurs de transcription (actinomycine D) ou de traduction (cycloheximide) a révélé que la reprise méiotique est indépendante de la transcription mais qu'elle nécessite en revanche la traduction de certains ARNm maternels dans les étapes qui précèdent l'apparition de l'activité du MPF (Reynhout et Smith, 1974 ; Wasserman et Masui, 1975). La régulation de la traduction de ces ARNm est finement contrôlée d'un point de vue spatial et temporel. La polyadénylation des ARNm maternels apparaît comme un processus essentiel aux mécanismes de régulation traductionnelle.

Dans l'ovocyte immature, les ARNm sont stockés avec une queue poly(A) courte de 20 à 40 nucléotides, ce qui réprime leur traduction. Ces ARNm sont dit « masqués » ou

© 2009 Tous droits réservés.

dormants. Lors de la reprise méiotique, la queue poly(A) de certains ARNm dormants, dont p39Mos, les cyclines A1, B1 et B2, la kinase Wee1 ou encore RINGO/speedy (Rapid INducer of G2-M in Oocyte), un activateur de cdc2, s'allonge jusque 80 à 250 nucléotides et ils deviennent alors traductibles (Sheets *et al.*, 1995 ; Stebbins-Boaz *et al.*, 1996 ; Charlesworth *et al.*, 2000, Padmanabhan et Richter, 2006).

a) Formation et régulation du complexe de polyadénylation.

La reconnaissance de ces ARNm par la machinerie de polyadénylation est permise par le complexe de polyadénylation. Ce complexe se fixe sur l'ARNm dormant *via* deux séquences particulières : l'élément de polyadénylation cytoplasmique (CPE, « *Cytoplasmic Polyadenylation Element* ») dont le consensus est U_5AU (Mc Grew *et al.*, 1989) et le signal de polyadénylation A_2UA_3 (Fox *et al.*, 1989). Le complexe de polyadénylation est constitué de 4 protéines : la protéine CPEB (« *Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding protein* ») qui se fixe sur le CPE (Hake et Richter, 1994 ; Stebbins-Boaz *et al.*, 1996), le facteur CPSF (« *Cleavage and Poly(A) Specificity Factor* ») qui s'associe avec CPEB (Dickson *et al.*, 1999 ; Mendez *et al.*, 2000a), la protéine d'échafaudage symplekine (Hofmann *et al.*, 2002) ainsi que la poly(A) polymérase xGld2 (« *xenopus Germ-line development factor 2* ») (Barnard *et al.*, 2004). Ce complexe CPEB-CPSF-Symplekine-xGld2 est déjà fixé sur les ARNm dormants dans l'ovocyte immature (Barnard *et al.*, 2004) mais il serait maintenu inactif grâce à la fixation de la poly(A) ribonucléase PARN, une enzyme de déadénylation, sur le complexe (Kim et Richter, 2006). Au cours de la reprise méiotique, la phosphorylation de CPEB sur la sérine 174 renforcerait son association au complexe de polyadénylation et surtout permettrait l'éjection de la PARN de celui-ci autorisant alors l'élongation de la queue poly(A) (Mendez *et al.*, 2000a ; 2000b ; Kim et Richter, 2006). L'identité de la kinase responsable de la phosphorylation de la Ser174 de CPEB est un sujet de controverse. Pour certains auteurs, il s'agirait de la kinase Aurora A (encore appelée Eg2) (Mendez *et al.*, 2000a ; 2000b). Cependant, l'inhibition ou la déplétion de Eg2 n'empêche pas la phosphorylation de CPEB (Keady *et al.*, 2007).

La Maskine, une protéine qui s'associe à la fois avec CPEB et avec le facteur d'initiation de la traduction eIF4E au niveau de la coiffe en 5' des ARNm (Stebbin-Boaz *et al.*, 1999) contrôle également la traduction. Lorsque la queue poly(A) est courte, la Maskine reste associée à CPEB et à eIF4E. La phosphorylation de CPEB et l'élongation de la queue poly(A) permettent alors la fixation de la protéine PABP (« *Poly(A) Binding Protein* ») sur

© 2009 Tous droits réservés.

celle-ci (Cao et Richter, 2002) et libère la Maskine de sa fixation à eIF4E permettant donc la traduction (Richter et Sonenberg, 2005) (**Figure 18**).

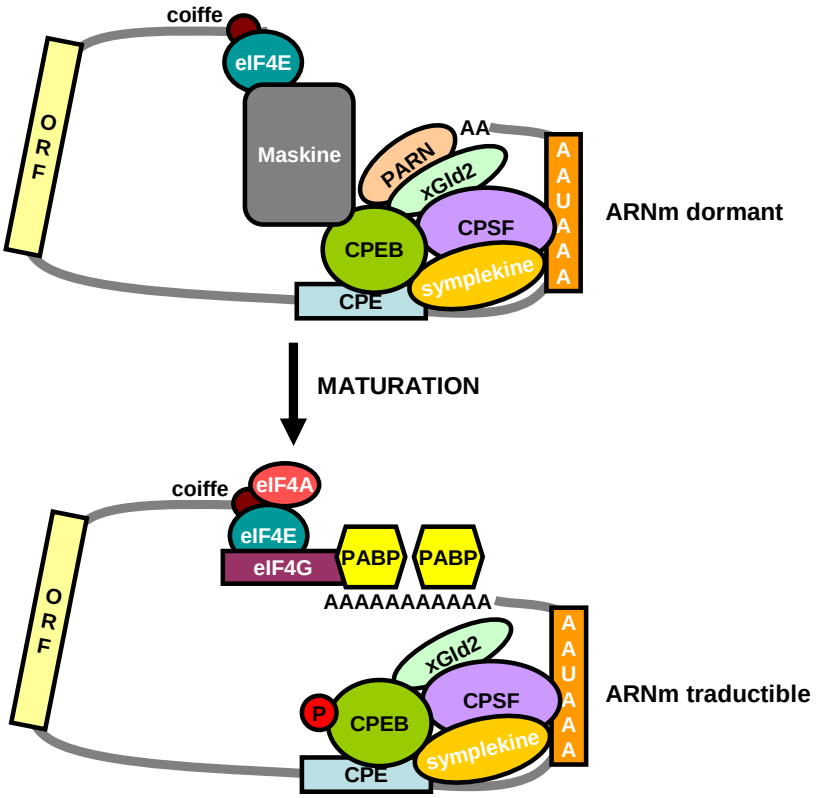


Figure 18 : activation de la polyadénylation cytoplasmique au cours de la reprise méiotique.
Dans l'ovocyte immature, le complexe de polyadénylation CPEB-CPSF-symplekine-xGld2 est déjà fixé sur les ARNm contenant une séquence CPE dans leur région 3'UTR. Cependant, la déadénylase PARN empêche l'élongation de la queue polyA. La Maskine interagit avec CPEB et eIF4E, bloquant ainsi toute traduction. Lors de la reprise méiotique, la phosphorylation de CPEB entraine un réarrangement du complexe de polyadénylation qui aboutit à l'éjection de la PARN et de la Maskine. xGld2 peut alors jouer son rôle de poly(A)-polymérase. PAPB se fixe alors sur la queue poly(A) permettant ainsi de recruter eIF4G, eIF4A et d'activer la machinerie traductionnelle.

b) Régulation temporelle de la polyadénylation.

Lors de la reprise méiotique, tous les ARNm dormants ne sont pas activés en même temps. Il existe deux types d'ARNm : des ARNm de classe I (par exemple, p39Mos) dont la polyadénylation est précoce et les ARNm de classe II (par exemple, la cycline B1) dont la polyadénylation est plus tardive. Les ARNm de classe I sont activés bien avant la GVBD, l'activation du MPF, indépendamment de la synthèse de p39Mos. Les ARN de classe II quant à eux sont activés après la GVBD et dépendent de l'activité du MPF et de p39Mos (Barkoff *et al.*, 1998; de Moor et Richter, 1999 ; Charlesworth *et al.*, 2002).

CPEB jouerait un rôle crucial dans la régulation de la polyadénylation précoce des ARNm de classe I puisque l'injection d'anticorps anti-CPEB ou d'une forme dominant-

© 2009 Tous droits réservés.

négatif de la protéine bloque la polyadénylation de p39Mos ainsi que la GVBD (Stebbins-Boaz, 1996 ; Mendez *et al.*, 2000b). Une autre séquence en *cis* de la région 3'UTR, PRE (*« Polyadenylation Response Element »*) serait également importante pour la régulation de la polyadénylation précoce de p39Mos et dépendrait de l'activation de MAPK (Charlesworth *et al.*, 2002). De plus, Charlesworth *et al.*, (2006) ont démontré que la liaison de la protéine Musashi sur ce PRE régule également la polyadénylation des ARNm de classe I indépendamment de CPEB, cependant son action reste à préciser.

La polyadénylation cytoplasmique tardive est quant à elle essentielle à la transition méiose I-méiose II (Mendez *et al.*, 2002). Les ARNm de classe II possèdent souvent un CPE qui se superpose au signal de polyadénylation et dont la séquence consensus est $U_4A_2UA_3$ (de Moor et Richter, 1997). Avant la GVBD et l'activation du MPF, il existerait un « pool » de CPEB libre capable de se fixer sur ce CPE/signal de polyadénylation. Après la GVBD, la phophorylation de CPEB par cdk1 et Plx1 provoque son ubiquitinylation et sa dégradation par le protéasome. Le complexe de polyadénylation peut alors se fixer sur le CPE/signal de polyadénylation (Mendez *et al.*, 2002, Setoyama *et al.*, 2007).

5) le MPF : M-phase Promoting Factor.

Les expériences pionnières de Masui et Markert, (1971) ont montré que le cytoplasme issu d'un ovocyte mature d'amphibien contient un facteur capable de déclencher la maturation lorsque celui ci était injecté dans un ovocyte immature receveur. Ce facteur fut alors dénommé MPF pour *« Maturation Promoting Factor »*. Par la suite, des expériences de micro-injections croisées entre ovocytes d'espèces différentes ont montré que ce facteur n'était pas spécifique de l'espèce ni du *phylum* (Reynhout et Smith, 1974 ; Wasserman et Smith, 1978). De plus, il est apparu très rapidement que ce MPF régulait également l'entrée en mitose des cellules somatiques (Sunkara *et al.*, 1979 ; Nelkin *et al.*, 1980). Aujourd'hui, Le MPF est considéré comme le facteur universel d'entrée et de sortie de phase M de toutes les cellules eucaryotes et a été rebaptisé *« M-phase Promoting Factor »*.

a) Nature moléculaire du MPF.

Ce n'est qu'en 1988 que le MPF fut purifié et sa nature moléculaire appréhendée (Lohka *et al.*, 1988). Le MPF est un hétérodimère constitué d'une sous-unité catalytique, la

© 2009 Tous droits réservés.

sérine/thréonine kinase p34cdc2 (*« cell division cycle 2 »*) encore appelée cdk1 (*« cyclin dependent kinase* 1) et d'une sous-unité régulatrice, la cycline B (Gautier *et al.*, 1988, 1990).

α. Cdk1 (cdc2).

Cdk1 est le premier membre d'une famille de kinases présentant des caractéristiques communes en termes de taille (30 à 60 kDa), de séquence (plus de 40% d'identité) et de structure tridimensionnelle. La structure des cdk consiste en un lobe N-terminal riche en feuillets β (lobe N) et un lobe C-terminal riche en hélices α (Lobe C). L'intersection de ces deux lobes forme une poche qui correspond au site catalytique dans lequel se loge l'ATP. Deux régions sont caractéristiques des cdk et sont primordiales pour la régulation de leur activité : le domaine PSTAIRE, une région conservée de 16 acides aminés qui adopte une structure en hélice α et la boucle T qui présente un site de phosphorylation activateur. Cdk1, comme toutes les protéines de la famille des cdk, ne peut être activée que lorsqu'elle s'associe avec sa cycline (pour revue voir Dorée et Hunt, 2002). Lorsque la cdk est libre, le domaine PSTAIRE et la boucle T obstruent respectivement le site de fixation à l'ATP et le site de liaison au substrat (**Figure 19**). La fixation de la cycline sur la cdk engendre une rotation du domaine PSTAIRE et un déplacement de la boucle T, libérant ainsi le site catalytique.

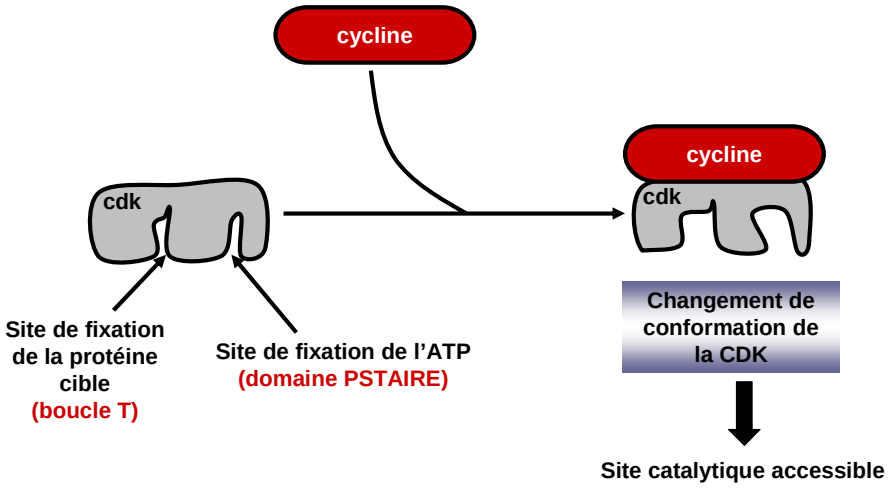


Figure 19 : régulation de l'activité des cdk par association à leur cycline.
A l'état monomérique, le site catalytique de la cdk (site de fixation de la protéine cible et de l'ATP) est obstrué par la boucle T et le domaine PSTAIRE. La fixation de la cycline permet un changement de conformation de la boucle T et du domaine PSTAIRE qui libère l'accès au site catalytique.

© 2009 Tous droits réservés.

β. La cycline B.

La cycline B appartient à une famille de protéines dont le niveau d'expression varie en fonction de la progression du cycle cellulaire : la plupart des cyclines sont synthétisées au cours de l'interphase et sont brusquement dégradées en fin de mitose (Evans *et al.*, 1983).

Les cyclines sont caractérisées par trois séquences essentielles (**Figure 20**) : (1) la « cyclin box », consensus d'une centaine d'acides aminés localisés en C-terminal et impliqués dans la liaison au cdk. (2) la « destruction box », séquence de 9 acides aminée située en N-terminal, responsable de l'ubiquitinylation et de la dégradation de la protéine et (3) un signal de rétention cytoplasmique, d'environ 40 résidus, situé entre les deux domaines précédents (Pines et Hunter, 1994).

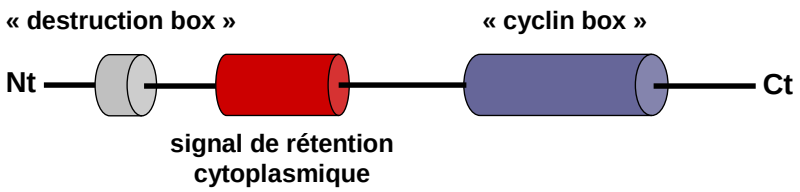


Figure 20 : Représentation schématique de la structure des cyclines.
Les cyclines possèdent 3 séquences essentielles: un domaine de liaison à la cdk (cyclin box), un signal de rétention cytoplasmique contrôlant la localisation subcellulaire de la protéine et un signal de dégradation (destruction box).

b) Variation de l'activité du MPF au cours de la reprise méiotique.

Si l'activation du MPF déclenche l'entrée en phase M, la sortie de phase M nécessite son inactivation. L'activité du MPF n'est pas constante au cours de la méiose (**Figure 21**) : lors de la transition métaphase I-anaphase I, une diminution transitoire de l'activité du MPF est concomitante avec la sortie de méiose I (Kobayashi *et al.*, 1991 ; Ohsumi *et al.*, 1994). L'activité kinasique résiduelle est essentielle à l'absence d'interphase et de réplication de l'ADN entre les 2 divisions de méiose (Furuno *et al.*, 1994 ; Picard *et al.*, 1996 ; Iwabuchi *et al.*, 2000). Lors du blocage en métaphase II, l'activité MPF reste élevée et ne disparaît qu'au moment de la fécondation, permettant la sortie de méiose II et la reformation de l'enveloppe nucléaire du pronucleus femelle (Lorca *et al.*, 1992).

© 2009 Tous droits réservés.

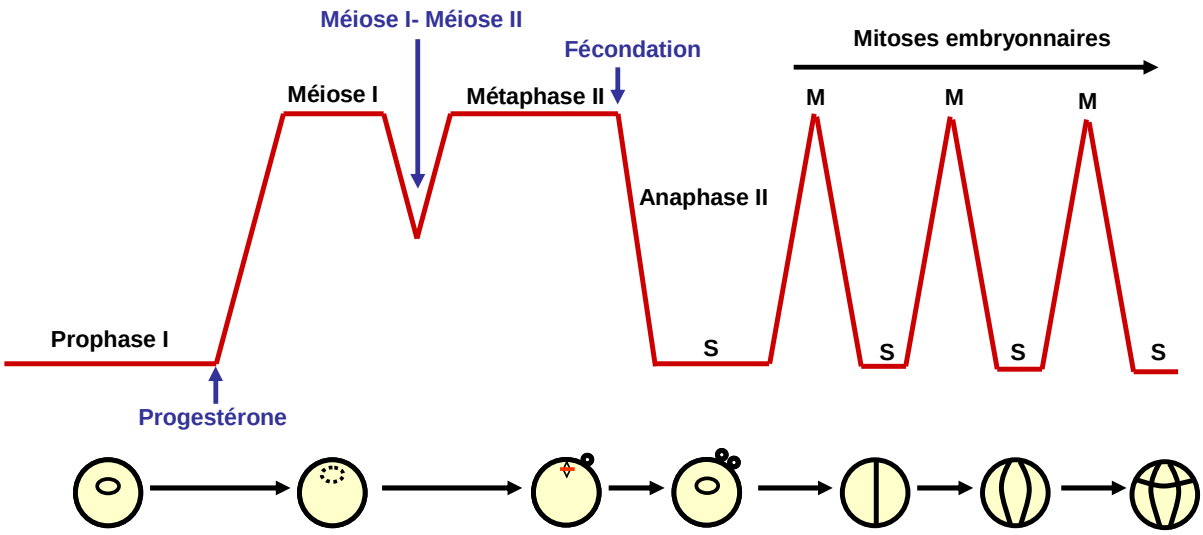


Figure 21 : variation de l'activité du MPF au cours de la reprise méiotique de l'ovocyte de Xénope.
Suite à la stimulation par la progestérone, le MPF est activé. L'activité du MPF décline transitoirement pour permettre la transition métaphase I-anaphase I et la sortie de méiose I. Mais cette chute d'activité est insuffisante pour entrer en interphase. L'activité du MPF augmente à nouveau pour permettre l'entrée en méiose II et restera élevée tant que l'ovocyte restera bloqué en métaphase II. La fécondation provoquera ensuite une chute brutale de l'activité du MPF conduisant ainsi à la sortie de méiose II. Au cours des mitoses embryonnaires, il y aura alternance entre inactivité du MPF en phase S et activité en phase M.

c) Mécanismes de régulation de l'activité du MPF au cours de la reprise méiotique.

Au cours de la reprise méiotique, l'activité du MPF est principalement régulée par des mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation, par l'alternance entre synthèse et dégradation des cyclines et par l'association de Cdc2 avec des activateurs. Une boucle d'auto-amplification de l'activité du MPF se met en place, ce qui permettra de maintenir l'ovocyte mature bloqué en métaphase II.

α. Régulation de l'activité du MPF par phosphorylation/déphosphorylation.

L'activité du MPF dépend majoritairement de l'état de phosphorylation des résidus Thr14, Tyr15 et Thr161. Dans l'ovocyte immature, il se constitue un stock de MPF inactif phosphorylé sur ces trois résidus et appelé pré-MPF. Lors de la reprise méiotique, la déphosphorylation de la Thr14 et de la Tyr15 conduit à l'activation du MPF.

© 2009 Tous droits réservés.

- la CAK.

La CAK (*« Cdk Activating Kinase »*) est responsable de la phosphorylation du MPF sur la Thr161 (Fesquet *et al.*, 1993 ; Poon *et al.*, 1993 ; Solomon *et al.*, 1993). La phosphorylation de ce résidu situé dans la boucle T de cdc2, facilite sa liaison à la cycline B (Jeffrey *et al.*, 1995) mais n'est pas suffisante pour induire l'activité du MPF. Elle se produit en phase G2 et sa déphosphorylation par la phosphatase KAP (*« cyclin-dependent Kinase-Associated Phosphatase »*), nécessaire à l'inactivation de cdk1, se produit après la dégradation de la cycline B (Lorca *et al.*, 1992 ; Hanlon et Barford, 1998).

La CAK est un complexe hétérotrimérique formé par la cdk7, la cycline H et Mat1 (Ménage à trois 1). Cdk7, également appelé MO15, représente la sous-unité catalytique (Solomon *et al.*, 1993) tandis que la cycline H, est la sous-unité régulatrice (Fisher et Morgan, 1994). A la différence des autres cyclines, le taux de cycline H reste constant au cours du cycle cellulaire. Mat1, une protéine de la famille *« RING finger »* régule l'association entre cdk7 et la cycline H (Devault *et al.*, 1995).

- Myt1.

Myt1 est une kinase membranaire à double spécificité, responsable de la phosphorylation inhibitrice des résidus Thr14 et Tyr15 de cdc2 (Mueller *et al.*, 1995), résidus situés au cœur du site de fixation de l'ATP. Présente dès le stade I ovocytaire, la quantité de Myt1 augmente jusqu'au stade IV (Furuno *et al.*, 2003). En phase G2, Myt1 interagirait avec le complexe Cdc2/cycline B *via* son domaine C-terminal, séquestrant ainsi le MPF dans le cytoplasme (Wells *et al.*, 1999). L'injection d'anticorps anti-Myt1 dans l'ovocyte de Xénope suffit à déclencher la reprise méiotique, ce qui suggère que l'inactivation de Myt1 est essentielle pour l'entrée en phase M (Nakajo *et al.*, 2000). L'inactivation de Myt1 semble être sous le contrôle de la phosphorylation (Mueller et al 1995) : chez le Xénope, Myt1 est phosphorylée par la kinase p90Rsk dans son domaine C-terminal régulateur (Palmer *et al.*, 1998) ainsi que par l'oncoprotéine Mos (Peter *et al.*, 2002). Myt1 peut également être phosphorylée par Akt/PKB dans les ovocytes d'étoile de mer (Okumura *et al.*, 2002). Récemment, il a été montré qu'une autophosphorylation de Myt1 sur les sérines 66 et 76 participerait également à l'inhibition de la kinase à la transition G2/M (Kristjánsdóttir *et al.*, 2006).

© 2009 Tous droits réservés.

- Wee1.

Wee1 est une kinase nucléaire présentant de fortes homologies avec Myt1 mais qui n'est capable de phosphoryler que le résidu de Tyr15 de cdc2 (Featherstone et Russell, 1991 ; Watanabe *et al.*, 1995). Présente dans les ovocytes de stade I, cette kinase disparaît dans les ovocytes de stade VI (Furuno *et al.*, 2003). Au cours de la reprise méiotique, la traduction des ARNm Wee1 est finement contrôlée d'un point de vue temporel (Charlesworth *et al.*, 2000 ; Wang *et al.*, 2008). Elle ne réapparait que 90 minutes après la GVBD, puis durant la méiose II et les mitoses embryonnaires (Murakami et Vande Woude, 1998 ; Nakajo *et al.*, 2000). L'activité de cette kinase serait essentielle pour empêcher la réplication de l'ADN entre les deux divisions de méiose (Nakajo *et al.*, 2000).

- Cdc25C.

Cdc25C est une phosphatase à double spécificité responsable de l'activation du MPF par déphosphorylation des résidus Thr14 et Tyr15 de cdc2 (Strausfeld *et al.*, 1991) (**Figure 22**). Dans les ovocytes bloqués en G2, Cdc25C est maintenu inactive par phosphorylation du résidu Ser287 (Kumagai *et al.*, 1998 ; Yang *et al.*, 1999). Cette phosphorylation permettrait sa séquestration cytoplasmique par liaison à la protéine 14-3-3. La Calmoduline kinase II (CamKII) ainsi que les kinases des points de contrôle Chk1 et Chk2 (*« Checkpoint Kinase 1, 2 »*) sont capables de phosphoryler ce résidu (Hutchins *et al.*, 2003 ; Nakajo *et al.*, 1999 ; Guo et Dunphy, 2000). Cependant, l'immunodéplétion de Chk1 et Chk2 n'inhibe qu'à 30% la phosphorylation de la Ser287, suggérant qu'une autre kinase est majoritairement responsable de cette phosphorylation (Guo et Dunphy, 2000). Dans ce sens, Duckworth *et al.* (2002) ont suggéré que Cdc25C était une cible majeure de la PKA.

L'activation de Cdc25C lors de la reprise méiotique implique sa libération de la protéine 14-3-3. La phosphorylation de Cdc25C sur la Thr138 par Cdk2 permettrait cette dissociation (Margolis *et al.*, 2003). Les phosphatases PP1 et PP2A seraient responsables de la déphosphorylation de la Ser287 de Cdc25C (Izumi *et al.*, 1992, Hutchins *et al.*, 2002 ; Margolis *et al.*, 2003). Une fois déphosphorylée, Cdc25C serait capable de s'associer à la cycline B *via* son domaine de liaison à 14-3-3 (Morris *et al.*, 2000).

Par ailleurs, lors de la transition G2/M, Cdc25C devient intensivement phosphorylée dans sa partie N-terminale (Kumagai et Dunphy, 1992 ; Izumi *et al.*, 1992). Plusieurs kinases sont responsables de l'activation de Cdc25C. La polo-like kinase Plx1 (*« Polo-like kinase*

© 2009 Tous droits réservés.

xenopus 1) ») phosphoryle Cdc25C sur de multiples sites et active la phosphatase *in vitro* (Kumagai et Dunphy, 1996). Plx1 est activée au cours de la reprise méiotique (Qian *et al.*, 1998a). Dans des extraits acellulaires de Xénope, son immunodéplétion empêche l'activation de Cdc25C et du MPF en réponse à l'inhibition de la PKA (Qian *et al.*, 2001). La cycline B1 et Myt1 sont également des cibles de Plx1 (Toyoshima-Morimoto *et al.*, 2002 ; Nakajima *et al.*, 2003). La kinase responsable de la phosphorylation activatrice de Plx1 est xPlkk1 (« *xenopus Polo-like kinase kinase 1* ») (Qian *et al.*, 1998b) qui est elle-même activée par phosphorylation catalysée par une kinase qui reste à ce jour inconnue. L'inhibition de PP2A par l'acide okadaïque ou sa déplétion déclenche l'activation du MPF chez le Xénope (Rime *et al.*, 1995 ; Maton *et al.*, 2005). Dans des extraits acellulaires de Xénope, PP2A déphosphoryle Cdc25C de manière antagoniste à Plx1 (Karaiskou *et al.*, 1999). Ces résultats suggèrent que PP2A serait inactivée lors de la reprise méiotique. La Ser/Thr kinase Greatwall pourrait être responsable de cette inactivation (Zhao *et al.*, 2008). Xp38γ/SAPK3, une protéine de la famille des MAPK, participe également à l'activation de Cdc25C par phosphorylation du résidu Ser205 (Perdiguero *et al.*, 2003).

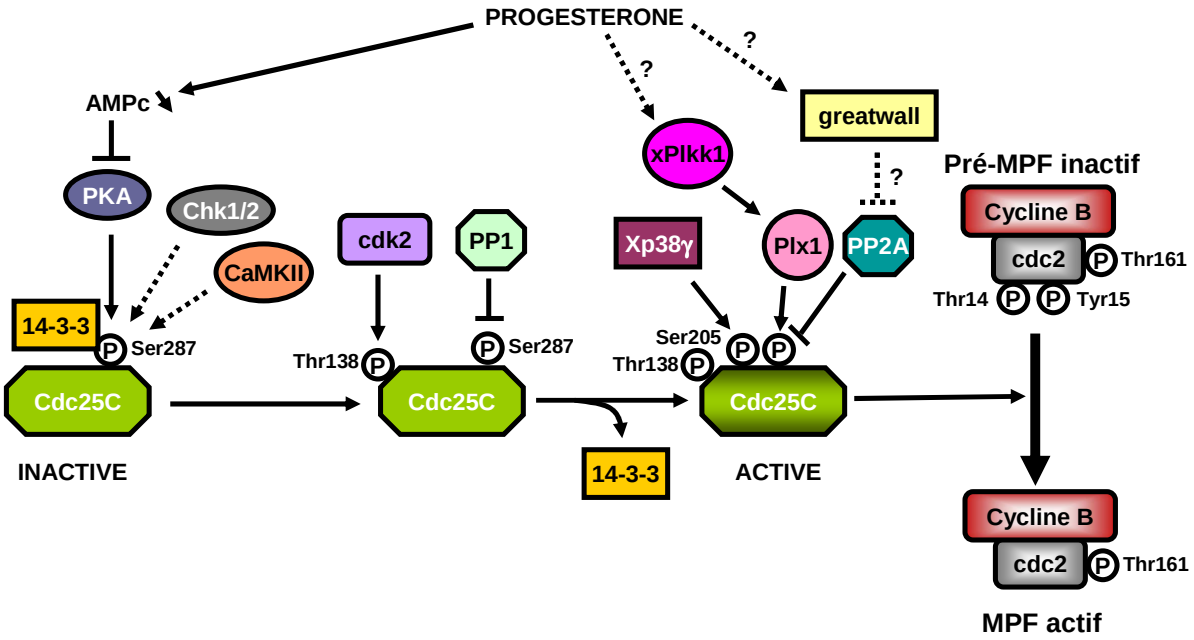


Figure 22 : activation de la phosphatase Cdc25C au cours de la reprise méiotique de l'ovocyte de Xénope. Dans l'ovocyte immature, Cdc25C est maintenue inactive par phosphorylation de la Ser287 catalysée principalement par la PKA, ce qui engendre sa séquestration par 14-3-3. La progestérone conduit à l'inhibition de la PKA et PP1 déphosphoryle la Ser287. La phosphorylation de la Thr138 par Cdk2 semble être également pré-requise pour la libération de 14-3-3. Xp38γ phosphoryle alors la Ser205. xPlkk1 active Plx1 qui va à son tour phosphoryler Cdc25C ce qui provoque son activation. Dans le même temps, PP2A, phosphatase inhibitrice de Cdc25C serait inactivée probablement par la kinase Greatwall.

© 2009 Tous droits réservés.

- Rôle de la phosphorylation de la cycline B.

Lors de la mitose, la phosphorylation de la séquence de rétention cytoplasmique de la cycline B permet l'accumulation de celle-ci dans le noyau (Yang *et al.*, 1998, Hagting *et al.*, 1998 ; Toyoshima-Morimoto *et al.*, 2002). Dans l'ovocyte de Xénope, la phosphorylation de la cycline B se produit au même moment que l'activation du MPF (Minshull *et al.*, 1991). Dans des extraits acellulaires de Xénope, Cdc2 phosphoryle la cycline B1 et B2 (Izumi et Maller, 1991). Dans l'ovocyte d'étoile de mer, la cycline B est phosphorylée par cdc2 de manière « intra-complexe » à la transition métaphase/anaphase. Cependant, cette phosphorylation n'est pas nécessaire à l'activité kinasique de cdc2 (Borgne *et al.*, 1999). De même chez le Xénope, la protéine Cyk (*« Cyclin B2 kinase »*), une forme particulière de la CaMKII, est également capable de phosphoryler la cycline B2 sur laThr41 et la Ser53. Une mutation inhibitrice ou activatrice de ces sites de phosphorylation ne révèle aucune implication de la phosphorylation dans la reprise méiotique ou la dégradation de la cycline (Derua *et al.*, 1997 ; Stevens *et al.*, 1999).

β. Régulation de l'activité du MPF par l'alternance entre synthèse et dégradation de la cycline B.

- Synthèse de la cycline B.

Cinq sous-types de cycline B (B1 à B5) ont été isolés chez *Xenopus laevis* (Minshull *et al.*, 1989 ; Hochegger *et al.*, 2001). Les sous-types B1 et B2 sont majoritairement présents dans les ovocytes et les embryons de Xénope (Kobayashi *et al.*, 1991). La cycline B2 est présente dès le stade I ovocytaire et sa quantité augmente fortement à partir du stade IV (Furuno *et al.*, 2003). Dans l'ovocyte immature les cyclines B2 et B5 sont stockées sous forme de pré-MPF inactif. Environ 10% du stock de Cdk1 s'associent à ces cyclines, les autres 90% restent libres et possèdent une activité kinasique faible (Lorca *et al.*, 1992). Suite à la reprise méiotique, les cyclines B1 et B4 sont synthétisées *de novo* en deux phases : la première juste avant la GVBD et la seconde, plus importante, en méiose II (Kobayashi *et al.*, 1991 ; Hochegger *et al.*, 2001). Bien que les ovocytes contiennent les ARNm codant la cycline B3, ceux-ci ne semblent pas être traduits et la cycline B3 ne jouerait aucun rôle dans la reprise méiotique (Hocheger *et al.*, 2001).

© 2009 Tous droits réservés.

La quantité de cycline B stockée dans les ovocytes immatures sous forme de pré-MPF est suffisante pour permettre la GVBD indépendamment de la synthèse de nouvelles cyclines. En effet, l'inhibition de la synthèse des cyclines B1, B2, B4 et B5 par la technique d'oligonucléotide antisens n'inhibe pas l'activation du MPF induite par la progestérone (Minshull *et al.*, 1991 ; Hochegger *et al.*, 2001). Cependant, la micro-injection des ARNm des cyclines B ou A est suffisante pour déclencher la GVBD en absence de stimulation hormonale et de synthèse protéique (Swenson *et al.*, 1986 ; Roy *et al.*, 1991 ; Huchon *et al.*, 1993). Ces résultats suggèrent, qu'en réponse à la progestérone, la formation de nouveaux complexes MPF actifs par association de Cdk1 monomérique avec la cycline B néosynthétisée jouerait un rôle important dans le recrutement du stock de pré-MPF et la mise en place de la boucle d'auto-amplification du MPF.

- Dégradation de la cycline B.

A la sortie de méiose I, les cyclines B2 et B5 sont dégradées (Hochegger *et al.*, 2001) et l'activité du MPF diminue de 50 à 70% entre les deux divisions de méiose (Kobayashi *et al.*, 1991 ; Ohsumi *et al.*, 1994). Cependant, la dégradation des cyclines B est partiellement masquée par la synthèse de nouvelles cyclines. L'ubiquitinylation suivie de la dégradation des cyclines est essentielle pour la sortie de phase M. Dans ce sens, la micro-injection d'une forme non dégradable de la cycline B dans les ovocytes de Xénope déclenche la reprise méiotique mais les ovocytes restent bloqués en métaphase I (Huchon *et al.*, 1993). L'ubiquitine ligase responsable de l'ubiquitinylation de la cycline B à la transition métaphase-anaphase est l'APC/C pour *« Anaphase Promoting Complex/Cyclosome »*. Son activation nécessite sa liaison soit avec Cdc20/Fizzy soit avec Cdh1/Hct1/Fizzy-related (Lorca *et al.*, 1998). L'activité de ces deux protéines est régulée par leur état de phosphorylation. Dans les ovocytes de Xénope, l'activité de l'APC-Cdc20 ne serait pas nécessaire à la transition métaphase I-anaphase I alors qu'elle est requise pour la sortie de méiose II (Peter *et al.*, 2001 ; Taieb *et al.*, 2001). L'inhibition d'Emi1 (*« Early mitotic inhibitor 1 »*), un inhibiteur de l'APC/C, après la GVBD provoque une chute de l'activité du MPF et une décondensation des chromosomes, ce qui suggère que l'activité de Emi1 est requise pour empêcher l'apparition d'une phase S entre les deux divisions de méiose (Tung et Jackson, 2005).

Le blocage des ovocytes en métaphase II est assuré par un facteur cytostatique, le CSF (*« Cytostatic Factor »*, Masui et Markert, 1971) dont l'activité conduit à l'inhibition de

© 2009 Tous droits réservés.

l'APC-Cdc20 et donc prévient la dégradation de la cycline B maintenant ainsi une activité MPF élevé. La nature moléculaire de ce CSF sera discutée par la suite.

χ. Les protéines associées à Cdc2.

- Xe-p9.

Xe-p9 est un membre de la famille Suc1/Cks, protéines capables de s'associer à cdc2 pour en réguler l'activité. Dans des extraits interphasiques, son immunodéplétion empêche l'entrée en phase M. Ce résultat suggère que Xe-p9 régule l'activation du MPF à la transition G2/M (Patra et Dunphy, 1996). Xe-p9 facilite la phosphorylation de Cdc25, Myt1 et Wee1 par le MPF (Patra *et al.*, 1999) et régule positivement la phosphorylation de la sous-unité Cdc27 de l'APC/C par le MPF (Patra et Dunphy, 1998). Ce dernier résultat suggère une implication de Xe-p9 dans la dégradation de la cycline B par l'APC/C.

- Ringo/Speedy.

La micro-injection d'une forme inactive de Cdc2 ou d'anticorps anti-Cdc2 empêche la reprise méiotique stimulée par la progestérone (Nebreda *et al.*, 1995). Ces résultats suggèrent que l'activation du pool de Cdc2 libre est essentielle à l'entrée en phase M des ovocytes et requiert la synthèse d'activateur(s) de la kinase.

La protéine Ringo (*« Rapid inducer of G2-M in oocyte »*) encore appelée Speedy serait l'un de ces activateurs. Ringo/Speedy appartient à une nouvelle famille de protéines ne présentant aucune homologie avec les cyclines mais capables de se fixer à Cdc2 libre et de l'activer (Ferby *et al.*, 1999 ; Lenormand *et al.*, 1999). En revanche, Ringo n'est pas capable de s'associer au complexe Cdc2/cycline B (Ferby *et al.*, 1999) et l'activation de Cdc2 par Ringo ne nécessite pas la phosphorylation de la Thr161 (Karaiskou *et al.*, 2001). La microinjection de Ringo dans l'ovocyte de Xénope suffit à déclencher l'activation du MPF en absence de stimulation hormonale et de synthèse protéique tandis que l'inhibition de son expression par la technique d'oligonucléotide antisens bloque la reprise méiotique stimulée par la progestérone (Ferby *et al.*, 1999 ; Lenormand *et al.*, 1999). Les complexes cdc2-Ringo permettraient donc d'acquérir rapidement une activité kinasique en réponse à la progestérone conduisant à l'amplification de la quantité initiale de MPF actif. Ils permettraient également la stabilisation et la traduction de certains ARNm (Kim et Richter, 2007).

© 2009 Tous droits réservés.

Dans l'ovocyte bloqué en G2, l'expression de Ringo semble être réprimée par deux mécanismes : d'une part, par répression de la traduction (Padmanabhan et Richter, 2006) et d'autre part, par le système ubiquitine-protéasome (Gutierrez *et al.*, 2006). La répression traductionnelle implique la fixation de Pumilio 2 (Pum2) sur une séquence PBE (*« Pumilio Binding Element »*) située dans la région 3'UTR de l'ARNm. Lors de la reprise méiotique, Pum2 se dissocierait de l'ARNm autorisant alors la polyadénylation et la traduction de Ringo. Ringo s'accumule au cours de la méiose I puis il est dégradé par le système ubiquitine-protéasome (Gutierrez *et al.*, 2006). Après la méiose I, son ubiquitinylation par l'ubiquitine-ligase Siah-2, nécessiterait la phosphorylation du résidu Ser243. Cette dégradation serait importante pour l'absence de phase S entre les deux divisions de méiose. En revanche, en phase G2, son ubiquitinylation impliquerait une autre ubiquitine-ligase, la βTRCP/SCF et nécessiterait la phosphorylation préalable de 3 résidus d'acides aminés par la PKA et GSK3β.

δ. La boucle d'auto-amplification du MPF.

Des expériences de transfert de cytoplasme issu d'ovocytes matures, contenant du MPF actif ont démontré que celui-ci induisait la reprise méiotique de l'ovocyte receveur même en présence d'inhibiteurs de la synthèse protéique (Wasserman et Masui, 1975). De plus, des expériences de transfert en série (où l'ovocyte receveur devient l'ovocyte donneur) ont été réalisées avec succès, suggérant ainsi l'existence d'une amplification auto-catalytique du MPF indépendante de la synthèse protéique.

Le MPF phosphoryle et active Cdc25C sur au moins 5 résidus d'acides aminés situés dans la région N-terminale régulatrice de la protéine : les thréonines 48, 67 et 138 et les sérines 205 et 285. La phosphorylation de ces résidus est nécessaire à l'auto-amplification du MPF (Izumi et Maller, 1993 ; Strausfeld *et al.*, 1994). L'activation directe du MPF par micro-injection de Cdc25 dans l'ovocyte entraine l'activation de Plx1 démontrant qu'il existe un rétrocontrôle positif du MPF sur Plx1 (Qian *et al.*, 1998a). L'activité de Plx1 est nécessaire à la mise en place de la boucle d'auto-amplification et serait sous le contrôle direct de Cdc2 (Abrieu *et al.*, 1998 ; Karaiskou *et al.*, 2004). Enfin, Cdc2 pourrait également participer à l'inhibition de Myt1 par hyperphosphorylation (Booher *et al.*, 1997, Patra *et al.*, 1999).

Au cours de la reprise méiotique, l'activation du MPF se réalise donc en deux étapes : une première étape, précoce, qui nécessite la traduction de certaines protéines dont les

© 2009 Tous droits réservés.

cyclines (Rime *et al.*, 1992) et Ringo/Speedy (Ferby *et al.*, 1999, Lenormand *et al.*, 1999). Cette étape serait sous le contrôle de l'inhibition de la PKA. Ces protéines permettraient de fournir une petite quantité de MPF actif capable de déclencher, dans une seconde étape, son auto-amplification par activation de Plx1 et Cdc25C et inhibition de Myt1, indépendamment de la synthèse protéique (**Figure 23**).

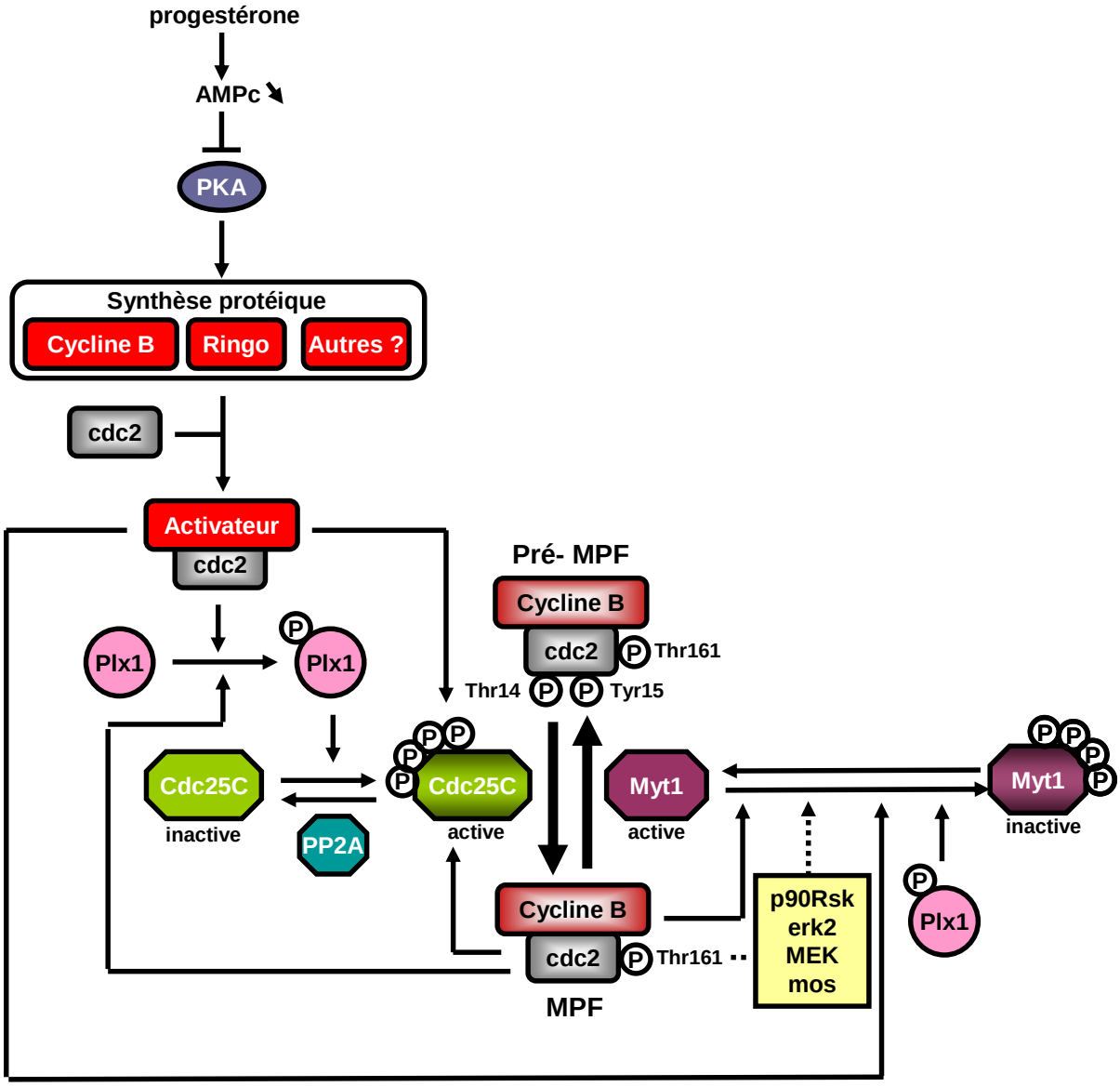


Figure 23 : activation et auto-amplification du MPF au cours de la reprise méiotique de l'ovocyte de Xénope.
Après stimulation par la progestérone, les événements précoces provoquent l'inhibition de la PKA et la synthèse d'activateur de Cdc2 dont la cycline B et Ringo. Le complexe Cdc2/activateur active Plx1, Cdc25 et inhibe Myt1 conduisant ainsi à la conversion d'une petite quantité de pré-MPF en MPF actif. Ce MPF actif maintient alors l'activation de Plx1, Cdc25 et inhibe Myt1 provoquant ainsi la mise en place d'une boucle d'auto-amplification. p90Rsk, une cible de la voie mos/MEK/erk2 est également responsable de l'inhibition de Myt1. Les relations entre le MPF et cette voie seront détaillées par la suite.

© 2009 Tous droits réservés.

d) Les cibles du MPF.

Le MPF phosphoryle de nombreuses cibles requises pour les événements cytologiques de l'entrée en phase M des cellules germinales et somatiques. Ses principales cibles sont résumées dans le **tableau II**.

Tableau II : principales cibles du MPF au cours de l'entrée en phase M.

Protéine cible	Référence
Condensation des chromosomes	
Histone H1	Arion *et al., 1988*
Condensines	Kimura *et al., 1998*
Désorganisation de l'enveloppe nucléaire	
Lamines	Miake-Lye et Kirschner, 1985
Formation du fuseau de division	
MAP2	Faruki *et al., 1992*
MAP4	Ookata *et al., 1995*
XMAP215	Vasquez *et al., 1999*
Réarrangement du cytosquelette (cytokinèse)	
Myosine-II	Satterwhite *et al., 1992*
Fragmentation de l'appareil de Golgi	
GM130 (golgine)	Lowe *et al., 1998*
GRASP65	Lin *et al., 2000*

6) La voie p39Mos/MEK/Erk2/p90Rsk.

Chez les eucaryotes, les MAPK (*« Mitogen Activated Protein Kinases »*) appartiennent à une grande famille de sérine/thréonine kinases fonctionnant en cascades (pour revue, voir Raman *et al.*, 2007). Au cours de la reprise méiotique, la voie p39Mos/MEK/Erk2 (p42MAPK)/p90Rsk est activée simultanément au MPF **(Figure 24).**

a) Activation de la voie MAPK-Erk2 lors de la reprise méiotique de l'ovocyte de Xénope.

Au cours de la reprise méiotique de l'ovocyte de Xénope, la MAPK Erk2 (*« Extracellular signal regulated kinase 2)* encore appelée Xp42/Mpk1 (Sagata *et al.*, 1988 ; Gotoh *et al.*, 1991 ; Posada *et al.*, 1991, 1993) est activée. Présente dès le stade I ovocytaire, son taux ne s'accroit significativement qu'à partir du stade IV (Furuno *et al.*, 2003). La

© 2009 Tous droits réservés.

MAPKK (*Mitogen Activated Protein Kinase Kinase »*) MEK (*« MAPK Erk Kinase)* est responsable de l'activation de Erk2 par phosphorylation des résidus Thr183 et Tyr185 situés dans la boucle d'activation de la kinase (Payne *et al.*, 1991 ; Zhang *et al.*, 1994). MEK est également détectable dès le stade I ovocytaire puis elle s'accumule au cours de l'ovogenèse (Furuno *et al.*, 2003). La cible principale de la voie MAPK au cours de la reprise méiotique est la protéine p90Rsk (*« Ribosomal S6 Kinase »*) (Palmer *et al.*, 1998). Elle a d'abord été découverte dans l'ovocyte pour sa capacité à phosphoryler la sous-unité 60S du ribosome (Erikson et Maller, 1985). Elle est phosphorylée et activée au cours de la reprise méiotique et inactivée lors de la fécondation (Erikson et Maller, 1989). Deux isoformes de Rsk sont exprimées : p90Rsk1 et p90Rsk2. Ces deux isoformes sont des cibles de Erk2 (Sturgill *et al.*, 1988 ; Erikson et Maller, 1991).

Deux MAPKKK *(« Mitogen Activted Protein Kinase Kinase Kinase »)* ont été identifiées dans l'ovocyte : p39Mos et Raf. L'accumulation de p39Mos est primordiale pour l'activation de Erk2 et p90Rsk, tandis que Raf ne semble exercer aucun rôle essentiel.

α. Synthèse et accumulation de p39Mos lors de la reprise méiotique.

p39Mos est le produit du proto-oncogène *c-mos*, homologue cellulaire de l'oncogène *v-mos* du virus responsable du sarcome murin de Moloney (Oskarsson *et al.*, 1980). Absent dans les ovocytes immatures, p39Mos s'accumule au cours de la reprise méiotique puis est rapidement dégradé après la levée du blocage métaphasique (Sagata *et al.*, 1988, Watanabe *et al.*, 1989). Son accumulation résulte d'une part de sa synthèse et d'autre part de sa stabilité (**Figure 24**).

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe III.4).b), l'ARNm de p39Mos est l'un des premiers à être polyadénylé et traduit après stimulation de la reprise méiotique (Sheets *et al.*, 1995).

La protéine p39Mos synthétisée avant la GVBD présente un niveau partiel de phosphorylation associé à une certaine instabilité (Sagata *et al.*, 1989b ; Watanabe *et al.*, 1989). Cependant, cet état est suffisant pour stimuler la cascade MAPK et la GVBD (Sagata *et al.*, 1988 ; 1989b ; Freeman *et al.*, 1989). Pendant et après la GVBD, la phosphorylation de p39Mos augmente progressivement, elle est totalement phosphorylé et métaboliquement stable dans les ovocytes matures (Watanabe *et al.*, 1989). Trois résidus de la protéine, la sérine 3 (Freeman *et al.*, 1992 ; Nishizawa *et al.*, 1992), la sérine 16 (Bai *et al.*, 1991 ; Pham

© 2009 Tous droits réservés.

et al., 1999) et la sérine 25 (Yang *et al.*, 1996) ont été identifiées comme des sites majeurs de phosphorylation.

La phosphorylation de la sérine 3, au moment de la GVBD, est majoritairement responsable de la stabilisation de p39Mos. Elle empêche la dégradation de l'oncoprotéine par le système ubiquitine-protéasome et serait régulée négativement par le résidu de proline 2 (Freeman *et al.*, 1992 ; Nishizawa *et al.*, 1992, 1993 ; Sheng *et al.*, 2002). La phosphorylation de la sérine 3 facilite également l'interaction de p39mos avec sa cible : MEK (Chen et Cooper, 1995). Ce résidu est une cible d'auto-phosphorylation (Freeman *et al.*, 1992 ; Nishizawa *et al.*, 1992). Cependant, les MAPK (Matten *et al.*, 1996) ainsi que le MPF (Liu *et al.*, 1990) sont également capables de phosphoryler la sérine 3 *in vitro.*

Dans les cellules COS7 transfectées exprimant p39Mos, la phosphorylation de la sérine 16 inhibe sa dégradation (Pham *et al.*, 1999). Dans les cellules somatiques, la sérine 25 est phosphorylée par la PKA (Yang *et al.*, 1996). Chez le Xénope, cette phosphorylation influencerait négativement la stabilisation engendrée par la phosphorylation de la sérine 3 (Yang *et al.*, 1998).

La paxilline, une protéine du cytosquelette, serait également requise pour l'accumulation de p39Mos soit en augmentant la synthèse de la protéine soit en inhibant sa dégradation (Rasar *et al.*, 2006). La paxilline est phosphorylée par Erk2 *in vitro*, ce qui suggère qu'elle participe à la mise en place d'un rétrocontrôle positif.

La sous-unité régulatrice de la caséine kinase II (CK2β) s'associe également avec p39Mos et l'inhibe (Chen et Cooper, 1997 ; Chen *et al.*, 1997 ; Lieberman et Ruderman, 2004). Cette association empêcherait une activation prématurée de la voie MAPK au cours de la reprise méiotique et sa dissociation serait nécessaire à l'activation de p39Mos (Yue et Ferrell, 2006). La protéine chaperonne Hsp90 serait également nécessaire pour l'activation de p39Mos (Fisher *et al.*, 2000).

La micro-injection de l'ARNm p39Mos provoque l'activation du MPF et la GBVD en absence de stimulation hormonale (Sagata *et al.*, 1989a). Cependant, p39Mos et l'activation subséquente de la voie MAPK ne semblent pas essentiels à la GVBD puisque l'inhibition de sa synthèse par l'injection d'oligonucléotides antisens ne bloque pas la GVBD induite par la progestérone (Dupré *et al.*, 2002 ; Baert *et al.*, 2003).

© 2009 Tous droits réservés.

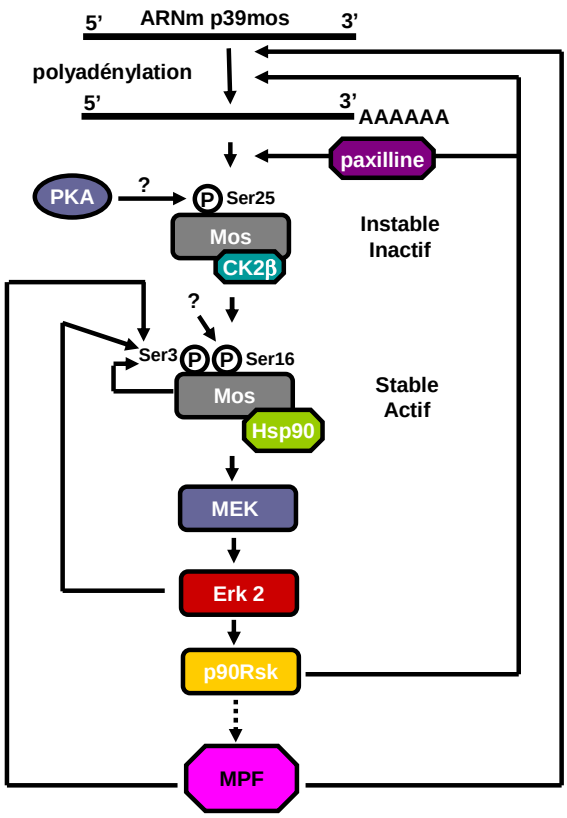


Figure 24 : synthèse et stabilisation de p39Mos au cours de la reprise méiotique de l'ovocyte de Xénope. Lors de la reprise méiotique, l'ARNm de p39Mos est polyadénylé et traduit précocement. Avant la GVBD, la protéine mos est instable et rapidement dégradée. Cette instabilité est due en partie à la phosphorylation de la sérine 25 et à l'absence de phosphorylation de la sérine 3. De plus, sa liaison avec la CK2β empêche son activation catalytique. Pendant et après la GVBD, la sérine 3 s'auto-phosphoryle et la sérine 16 est également phosphorylée : mos est ansi protégé de la dégradation protéasomale et s'accumule. La dissociation de CK2β et l'association de Hsp90 sont nécessaires à l'activation de mos. Des mécanismes de rétrocontrôles positifs permettent de maintenir l'expression de mos et l'activation de la voie MAPK lors de la maturation : Erk2 est capable de stimuler la polyadénylation de l'ARNm p39Mos, et entretient son accumulation en phosphorylant le résidu de sérine 3 et la paxilline. Le MPF participe également à ce rétrocontrôle en promouvant la polyadénylation et en phosphorylant le résidu de sérine 3.

β. Activation de Raf au cours de la reprise méiotique.

La protéine Raf a été initialement identifiée comme une oncoprotéine rétrovirale à activité sérine/thréonine kinase (Rapp *et al.*, 1983). Son activation nécessite sa liaison à la GTPase $p21^{ras}$ (Vojtek *et al.*, 1993).

Au cours de la reprise méiotique stimulée par la progestérone, Raf-1 est phosphorylée et activée (Fabian *et al.*, 1993 ; Muslin *et al.*, 1993b). La micro-injection d'une forme oncogénique de Raf entraine l'activation de Erk2 et la GVBD sans stimulation hormonale (Muslin *et al.*, 1993b) alors que l'injection de dominants négatifs de Raf empêchent l'activation de Erk2 stimulés par la progestérone ou l'injection de $p21^{ras}$ (Fabian *et al.*, 1993 ; Muslin *et al.*, 1993b). La micro-injection d'une forme constitutivement active de Raf stimule

© 2009 Tous droits réservés.

l'activation de la voie MAPK dans des conditions où p39Mos est inhibée (Fabian *et al.*, 1993). Ces résultats ont suggéré que Raf est nécessaire à l'activation de la voie MAPK et qu'elle agit en aval de p39Mos. Cependant, d'autres travaux sont en contradiction avec ces résultats. Dans des extraits acellulaires, l'activation de la voie MAPK par une protéine p39Mos purifiée n'est pas bloquée par l'ajout d'un dominant négatif de Raf (Shibuya *et al.*, 1996). L'activation de la voie MAPK stimulée par la progestérone et l'insuline semble dépendre uniquement de l'accumulation de p39Mos. L'inactivation de la voie p39Mos/Erk2 retarde la GVBD mais n'inhibe pas la reprise méiotique, par contre, la phosphorylation complète de Raf requiert l'activation de MEK1/Erk2 (Baert *et al.*, 2003, **Figure 25**). De plus, des travaux récents ont souligné le rôle crucial de la voie PI3K dans les mécanismes par lesquels les voies p21^{ras} déclenchent la GVBD, minimisant tout rôle de Raf dans la reprise méiotique (Gaffré *et al.*, 2006) .

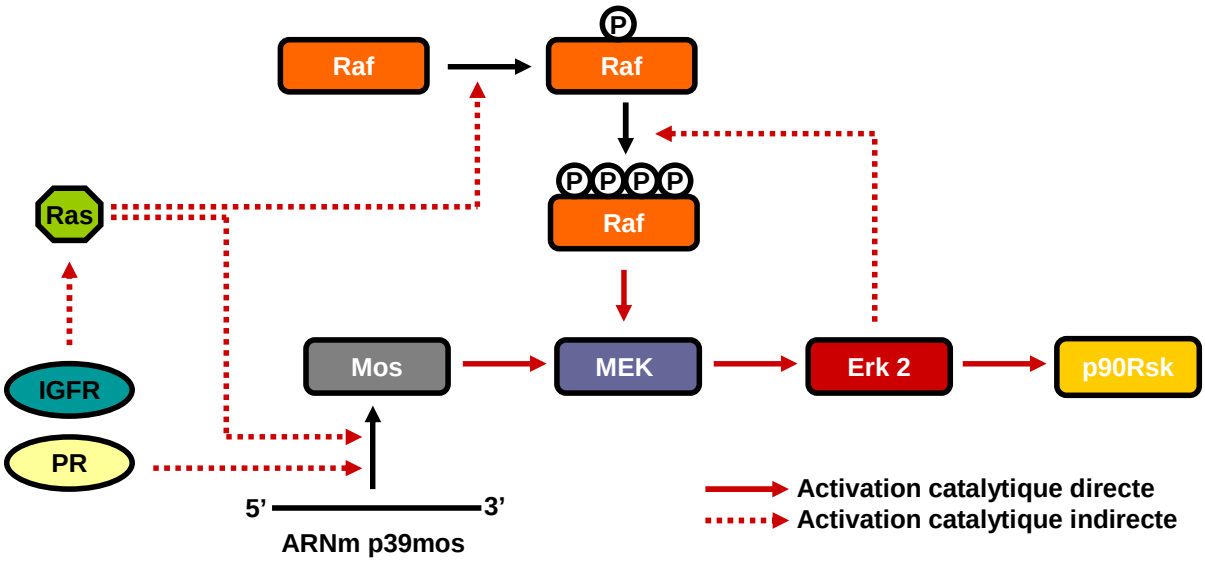


Figure 25 : Modèle d'activation de la voie p39Mos/Erk2 après stimulation de la reprise méiotique par la progestérone ou l'insuline (d'après Baert *et al.*, 2003).
La phosphorylation de Erk2 et de p90Rsk, induite par l'insuline ou la progestérone, nécessite la synthèse de p39Mos. La phosphorylation partielle de Raf est indépendante de la voie MAPK alors que la phosphorylation totale de Raf requiert l'activation de celle-ci. PR : récepteur à la progestérone, IGFR : récepteur à l'insuline/IGF.

χ. Les MAPK phosphatases (MKP).

Les mécanismes de régulation des MKP dans les ovocytes demeurent peu connus. La seule MKP identifiée et clonée dans les ovocyte de Xénope est la protéine XCL100/Mkp1. *In vitro*, XCL100 est capable de déphosphoryler des résidus de thréonine et de tyrosine de Erk2 (Lewis *et al.*, 1995). La surexpression de XCL100 retarde ou inhibe la reprise méiotique

© 2009 Tous droits réservés.

stimulée par la progestérone (Sohaskey et Ferrell, 2002). Au cours de la phase M, l'activation de la voie MAPK provoque sa phosphorylation et sa stabilisation.

b) Implication de la voie mos/MEK/Erk2/p90Rsk dans la reprise méiotique.

Contrairement aux cellules somatiques, la voie MAPK n'a pas de rôle génomique dans l'ovocyte puisque la reprise méiotique est indépendante de la transcription.

α. Interactions entre MPF et MAPK.

- Activation du MPF par la voie MAPK.

La voie MAPK participerait à l'activation du MPF en inhibant Myt1 et en activant Cdc25C. En effet, comme nous l'avons vu dans le paragraphe III.5).c).α., p39Mos et p90Rsk phosphorylent et inhibent Myt1 (Palmer *et al.*, 1998 ; Peter *et al.*, 2002). Cependant, l'inhibition de p39Mos et de p90Rsk n'empêchent pas totalement la phosphorylation de Myt1, suggérant une régulation complexe de la kinase par une voie autre que la voie MAPK (Fisher *et al.*, 1999). Lors de la reprise méiotique, la phosphorylation de Cdc25C sur la Thr48, La Thr138 et la Ser205 par Erk2 favorise l'activité phosphatasique de Cdc25C (Wang *et al.*, 2007).

- Activation de la voie MAPK par le MPF.

En retour et de manière indirecte, l'activité du MPF soutient l'activité de la voie MAPK par la promotion de la synthèse de p39Mos (Hochegger *et al.*, 2001) et sa stabilisation (Castro *et al.*, 2001) (**Figure 24**).

β. Rôle de la voie MAPK dans la GVBD.

Chaque membre de la voie mos/MEK/Erk2/p90Rsk est capable de déclencher la reprise méiotique en absence de stimulation hormonale lorsqu'il est injecté dans l'ovocyte (Sagata *et al.*, 1989a, Yew *et al.*, 1992 ; Huang *et al.*, 1995 ; Haccard *et al.*, 1995 ; Gross *et al.*, 2001 ; a). Dans ce cas, la reprise méiotique est indépendante de la synthèse protéique sauf dans le cas

© 2009 Tous droits réservés.

de l'injection de Erk2 (Haccard *et al.*, 1995). Ces résultats montrent l'importance de cette voie dans le contrôle de la reprise méiotique. Cependant, l'inhibition de la voie MAPK aboutit à des résultats contradictoires selon la stratégie utilisée, la spécificité des outils et la protéine concernée : certaines approches d'inhibition de la voie MAPK inhibe la reprise méiotique stimulée par la progestérone (Sagata *et al.*, 1998; Duesbery *et al.*, 1998 ; Kosako *et al.*, 1994), tandis que d'autres techniques d'inhibition de cette voie ne font que la retarder (Gross *et al.*, 2001 ; Dupré *et al.*, 2002a ; Baert *et al.*, 2003, Bodart *et al.*, 2005). Ces résultats sont expliqués par la spécificité des outils employés et montrent en définitive que la voie MAPK n'est pas nécessaire *per se* à la GVBD.

χ. Rôle de la voie MAPK dans la suppression de la phase S.

La réplication précoce de l'ADN après la première division de méiose dans l'ovocyte de Xénope est provoquée par l'inhibition de la voie MAPK (Furuno *et al.*, 1994 ; Gross *et al.*, 2000 ; *et al.*, 2002a). De même, l'inhibition de cdk1 ou de la synthèse des cyclines B à la transition méiose I-méiose II, entraine la reformation d'une enveloppe nucléaire et la réplication de l'ADN (Furuno *et al.*, 1994). Aussi, la voie p39Mos/MEK/Erk2/p90Rsk est nécessaire pour la réactivation rapide du MPF et le maintien d'un niveau d'activité qui empêche la réplication de l'ADN entre les deux divisions de méiose (Sagata *et al.*, 1989b ; Nebreda *et al.*, 1995 ; Hochegger *et al.*, 2001).

δ. Rôle de la voie MAPK dans la formation du fuseau de division et en tant que point de contrôle de l'assemblage du fuseau.

De nombreuses études réalisées dans les ovocytes de mammifères ont mis en évidence que la voie MAPK-Erk2 intervenait dans le contrôle de la formation et de la stabilité du fuseau de division méiotique (pour revue, voir Fan et Sun, 2004). Dans le modèle amphibien, plusieurs études renforcent cette hypothèse. Dans des extraits ovocytaires de Xénope, l'inhibition de la voie Erk2 induit la formation de fuseaux monopolaires (Horne et Guadagno, 2003). De même, de telles structures de type « aster » ont été mises en évidence suite à un traitement des ovocytes à l'U0126, inhibiteur de MEK1/2 (Gross *et al.*, 2000 ;Bodart *et al.*, 2002a ; Bodart *et al.*, 2005) ou micro-injectés d'oligonucléotides antisens dirigés contre p39Mos (Bodart *et al.*, 2005). De plus, des expériences de restauration de fuseau ont montré que p39Mos et p90Rsk jouaient des rôles essentiels et complémentaires dans la morphogenèse

© 2009 Tous droits réservés.

de ce dernier (Bodart *et al.*, 2005). En effet, l'injection d'une forme constitutivement active de p90Rsk n'est pas suffisante pour induire la formation d'un fuseau bipolaire dans des ovocytes micro-injectés d'oligonucléotides antisens dirigés contre p39Mos et la micro-injection d'une protéine Mos murine ne permet pas non plus la formation d'un fuseau dans le cas d'une inhibition de MEK (et donc d'une non activation de p90Rsk). Bub1, une protéine impliquée dans le point de contrôle de l'assemblage du fuseau (SAC) est phosphorylée et activée par p90Rsk (Schwab *et al.*, 2001). Cependant, p90Rsk ne semble pas nécessaire au SAC dans des extraits acellulaires d'ovocytes de Xénope (Horne et Guadagno, 2003).

ε. MAPK et activité cytostatique (CSF).

L'existence d'une activité cytostatique (CSF) responsable de l'arrêt des ovocytes en métaphase II a été mise en évidence par Masui et Markert (1971) : la micro-injection de cytoplasme issu d'un ovocyte mature dans un blastomère d'embryons au stade 2, provoque l'arrêt de ce blastomère en métaphase alors que le blastomère non-injecté continue à se diviser normalement (**Figure 26**). Cette activité cytostatique présente dans le cytoplasme disparaît 30 à 45 minutes après la fécondation.

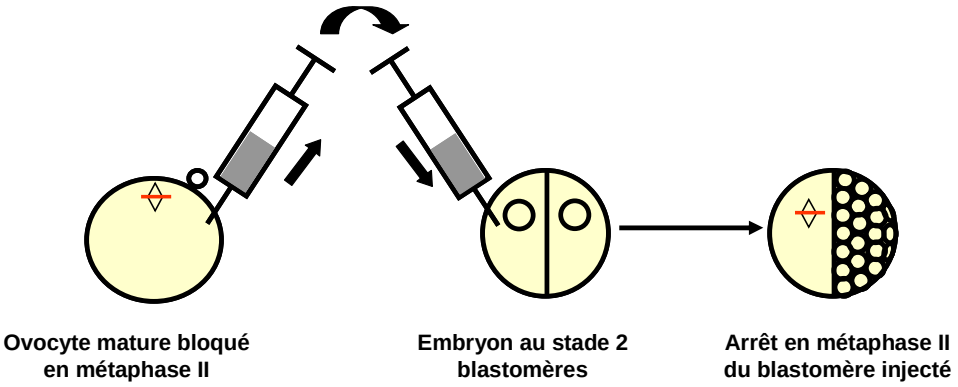


Figure 26 : mise en évidence de l'activité CSF.
La micro-injection de cytoplasme issu d'un ovocyte mature dans un des deux blastomères d'un embryon au stade 2 cellules provoque l'arrêt de sa division en métaphase alors que le blastomère controlatéral continue sa division. Cette expérience montre que le cytoplasme de l'ovocyte mature contient un facteur diffusible, le CSF responsable du blocage en métaphase II.

Dans des extraits mitotiques de Xénope, la dissociation de la cycline B de Cdk1 suffit à inactiver le MPF et permet la sortie de phase M (Chesnel *et al.*, 2006 ; 2007). Cependant, la levée du blocage métaphasique nécessite la dégradation de la cycline B. S'il est admis que l'activité CSF permet de maintenir une activité élevée du MPF en empêchant la dégradation des cyclines B par l'APC/C-Cdc20, la nature moléculaire du CSF est encore débattue (pour revue, voir Schmidt *et al.*, 2006). Cependant, lorsqu'un des membres de la voie MAPK,

© 2009 Tous droits réservés.

p39Mos (Sagata *et al.*, 1989b), MEK1 (Kosako *et al.*, 1994), Erk2 (Haccard *et al.*, 1993) ou p90Rsk (Gross *et al.*, 1999), est injecté dans un des blastomères d'un embryon au stade deux cellules, il bloque la division du blastomère injecté. Ces résultats démontrent que la voie p39Mos/MEK/Erk2/p90Rsk est un composant majeur du CSF. p39Mos phosphoryle la cycline B2 *in vitro* (Roy *et al.*, 1990) et la dégradation des cyclines est inhibée dans des embryons injectés d'ARNm p39Mos (Sagata *et al.*, 1989b). L'inhibition de la protéolyse de la cycline B par la voie MAPK est relayée par l'activation d'un inhibiteur de l'APC/C (Vorlaufer et Peters, 1998). Cependant, les MAPK ne semblent pas inactiver la voie de dégradation des cyclines mais plutôt prévenir la promotion de cette dégradation par le MPF (Abrieu *et al.*, 1996). Comme nous l'avons vu précédemment, le MPF contribue au maintien de l'activation de la voie MAPK (**Figure 24).** Ainsi, le blocage métaphasique serait maintenu grâce à l'établissement d'un équilibre entre CSF et MPF (**Figure 26,** Bodart *et al.*, 2002b).

La levée du blocage métaphasique, entraînant une dégradation complète et rapide de la cycline B et la séparation des chromatides sœurs, requiert une augmentation de la concentration calcique intracellulaire, l'activation de la CaMKII et de la calcineurine (Lorca *et al.*, 1993 ; Mochida et Hunt, 2007). L'activation d'une protéine Tyrosine phosphatase, en aval de la vague calcique, semble également requise, cependant son identité reste à préciser (Bodart *et al.*, 1999b). La protéolyse de p39Mos et la déphosphorylation de Erk2 ont lieu 30 à 40 minutes après la fécondation (Watanabe *et al.*, 1991). L'utilisation d'un inhibiteur de kinases à large spectre, la 6-DMAP (6-Diméthyl Aminopurine) a montré que la protéolyse de p39Mos et de la cycline B est régulée par des mécanismes différents (Bodart *et al.*, 1999a). Dans des extraits CSF, la CaMKII est capable de provoquer la dégradation de la cycline B et la levée du blocage métaphasique sans que Erk2 soit inactivée (Abrieu *et al.*, 1996). Ces résultats suggèrent que, même si la voie MAPK contribue à la stabilisation de la cycline B lors du blocage métaphasique, l'inactivation de cette voie n'est pas requise pour la dégradation de la cycline B lors de la sortie de phase M. Contrairement à la cycline B, la dégradation de p39Mos est indépendante de la libération de calcium et semble être sous le contrôle majoritaire de mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation (Bodart *et al.*, 2001).

La protéine XErp1/Emi2 (*« Xenopus Emi related protein 1/ Early mitoitc inhibitor 2 »*) est un inhibiteur de l'APC/C essentiel pour l'activité CSF (Rauh *et al.*, 2005 ; Schmidt *et al.*, 2005). Lors de la levée du blocage métaphasique, sa phosphorylation par la CaMKII entraîne sa liaison à Plx1 (Liu et Maller, 2005 ; Rauh *et al.*, 2005). La phosphorylation de XErp1 par Plx1 provoque alors son ubiquitinylation par le SCF/βTRCP et sa dégradation. p90Rsk

© 2009 Tous droits réservés.

phosphoryle XErp1 ce qui augmente la stabilité et l'activité de la protéine (Inoue *et al.*, 2007; Nishiyama *et al.*, 2007). Cette augmentation d'activité et de stabilité serait sous la dépendance de son association à PP2A et de sa déphosphorylation subséquente sur deux sites phosphorylés par Cdc2 (Wu *et al.*, 2007). XErp1 apparaît donc comme une protéine pivot du CSF dont l'activité et la stabilité dépendent de la voie mos/MEK/Erk2/p90Rsk (**Figure 26**).

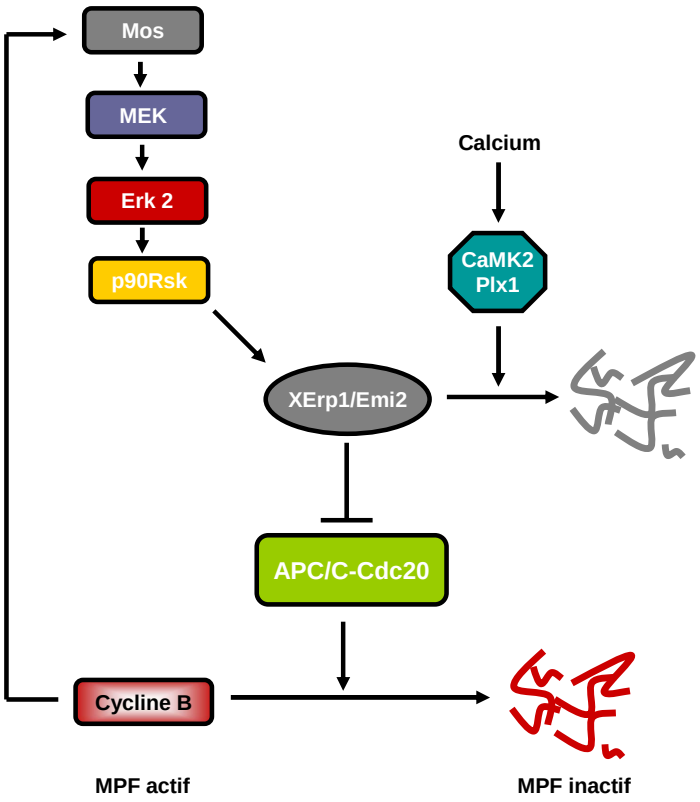


Figure 27 : modèle d'arrêt CSF dans les ovocytes d'Amphibiens.
Dans les ovocytes matures bloqués en métaphase II, la phosphorylation de XErp1 par p90Rsk stabilise la protéine qui peut alors exercer son activité inhibitrice de l'APC/C et donc permettre de maintenir l'activité du MPF. A la fécondation, l'augmentation du calcium intracellulaire active la CaMKII. La phosphorylation de XErp1 par la CaMKII permet sa phosphorylation par Plx1. XErp1 est alors ubiquitinylée puis dégradée. L'APC/C n'est plus inhibé, la cycline B peut être alors dégradée. La chute de l'activité du MPF permet alors la levée du blocage métaphasique.

A l'heure actuelle, les voies de signalisation impliquées dans le contrôle de la reprise méiotique : progestérone/récepteur(s), adénylate cyclase/PKA ; PI3K/Akt ; polyadénylation/traduction ; MPF et MAPK-Erk2 ainsi que leurs mécanismes de contrôle sont largement étudiées. Ces mécanismes impliquent l'activation de nombreuses protéines essentiellement par le jeu de synthèse/dégradation et surtout par la régulation de l'activité de nombreuses kinases/phosphatases. Cependant, ces régulations sont complexes et il reste encore de nombreuses zones d'ombres à éclaircir, notamment en ce qui concerne le déclenchement et la régulation fine des événements précoces ou encore la régulation de la

© 2009 Tous droits réservés.

voie MAPK Erk2. Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à l'étude de l'importance d' modification post-traductionnelle comparable à la phosphorylation: la *O*-N-acétylglucosaminylation ou *O*-GlcNAc, dans la régulation de la reprise méiotique.

© 2009 Tous droits réservés.
http://doc.univ-lille1.fr

PARTIE III

La O-N-acétylglucosaminylation : O-GlcNAc

© 2009 Tous droits réservés.

http://doc.univ-lille1.fr

I. Introduction : les modifications post-traductionnelles et la glycosylation chez les eucaryotes.

Avant le décryptage du génome humain, prédominait le modèle « simpliste » postulant qu'un gène code une seule protéine et on expliquait en partie la complexité fonctionnelle de notre organisme par le jeu de l'"allumage" et de l'"extinction" (on/off) de certains gènes parmi les 100.000 estimés. Cette explication est devenue insuffisante lorsque le séquençage partiel du génome humain a révélé que celui ci ne contenait que 26.500 gènes environ (Venter *et al.*, 2001). Comment expliquer alors la formidable complexité moléculaire et la pléthore d'activités biologiques existant au sein des différents types cellulaires constituant un organisme ?

1) Un seul gène peut coder plusieurs activités protéiques.

Chez les eucaryotes, le processus permettant d'aboutir à une activité protéique donnée à partir d'une séquence d'ADN peut se résumer en trois étapes principales : la transcription, la traduction et les modifications post-traductionnelles. Chacune de ces étapes est hautement régulée et contribue à augmenter la variabilité fonctionnelle du produit final du gène. C'est la raison pour laquelle un seul gène peut engendrer des centaines d'activités protéiques différentes (**figure 28**) : au niveau de l'ARNm, les phénomènes d'épissages alternatifs ainsi que l'utilisation de promoteurs internes représentent un premier niveau de variabilité. Les mécanismes de polyadénylation contribuant à la stabilité des ARNm ou encore l'utilisation de codons STOP alternatifs en constituent un second et enfin il existe des centaines de modifications post-traductionnelles.

2) Les modifications post-traductionnelles.

On regroupe sous le terme de modifications post-traductionnelles (PTM ; « *post-translational modification* »), la modification covalente de certains acides aminés par un groupement fonctionnel. Ces modifications peuvent intervenir indépendamment ou en combinaison sur une même protéine, généralement sous l'influence de stimuli et sont régulées de façon temporelle et spatiale. Les PTM, en modifiant la conformation des protéines et donc

© 2009 Tous droits réservés.

en régulant les interactions protéines-protéines, sont à l'origine de variabilités fonctionnelles puisqu'elles peuvent modifier l'activité enzymatique ou encore la localisation subcellulaire de leur cible (**Figure 28**).

Parmi les PTM répertoriées à ce jour, 20 d'entres elles sont plus communément répandues (Seo et Lee, 2004). A côté de la phosphorylation qui reste à ce jour la plus étudiée des PTM et dont les rôles sont quasiment parfaitement établis, on peut citer la méthylation, l'acétylation, l'ubiquitination, la SUMoylation, la formation des ponts disulfures et la glycosylation.

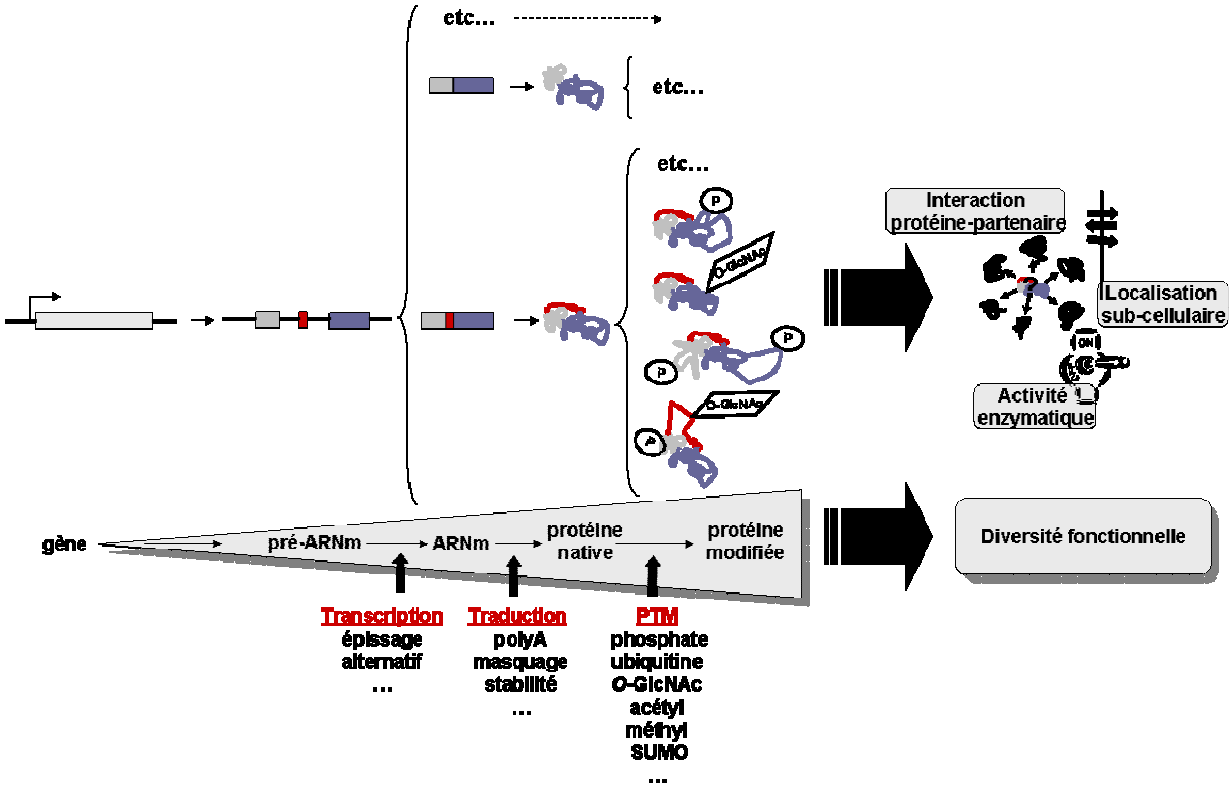


Figure 28 : du gène à l'activité protéique.
Un seul gène peut être à l'origine d'une multitude de produits finaux. Sur la figure, est représentée la complexification se mettant en place au cours des différentes étapes menant de la séquence d'ADN à la protéine modifiée. Trois niveaux principaux de régulation peuvent apparaître : au niveau de la transcription où il est possible d'obtenir plusieurs ARNm à partir d'un même pré-ARNm grâce aux phénomènes d'épissages alternatifs. La quantité d'ARNm traduite va être également sous contrôle, *via* notamment les phénomènes de polyadénylation et de coiffage des ARNm influençant la stabilité de ces derniers. Enfin, la protéine native pourra subir des centaines de modifications post-traductionnelles (PTM) différentes qui peuvent se combiner sur plusieurs sites entraînant des modifications de la structure tridimensionnelle de la protéine cible à l'origine d'une innombrable diversité fonctionnelle.

3) La glycosylation.

Avec la phosphorylation, la glycosylation représente la forme majeure de modification post-traductionnelle puisqu'on estime que 50% des protéines sont glycosylées et que 2 à 4%

© 2009 Tous droits réservés.

du génome humain codent des protéines impliquées dans les processus de glycosylation. Il existe en réalité plusieurs types de glycosylation consistant toutes au greffage de structures mono- ou oligosaccharidiques particulières plus ou moins complexes sur des accepteurs donnés *via* l'activité de différentes glycosyltransférases. La *N*-glycosylation et la *O*-glycosylation représentent les deux formes majeures de glycosylation et leurs voies de biosynthèse sont à ce jour parfaitement définies. Elles affectent exclusivement des protéines du réticulum endoplasmique, de l'appareil de Golgi et des voies de sécrétion. Au contraire, la présence de glycosylation au sein des compartiments cytosoliques et nucléaires est longtemps restée énigmatique puisque aucun modèle de biosynthèse glycoprotéique ou de transport dans ces compartiments n'avait été validé. Par des expériences de reconnaissance lectinique ou de radiomarquage métabolique avec des sucres précurseurs, de telles glycosylations atypiques ont pu être mises en évidence comme par exemple l'alpha-glucosyl lié sur une tyrosine de la glycogénine (impliqué dans la synthèse du glycogène), la N-acétylglucosamine sur l'hydroxyproline, les glycoaminoglycannes (GAG), ou encore la *O*-N-acétylglucosaminylation, communément appelée *O*-GlcNAc.

II. La *O*-N-acétylglucosaminylation : *O*-GlcNAc.

1) Caractéristiques générales de la *O*-GlcNAc.

a) Définition.

La *O*-N-acétylglucosaminylation ou *O*-GlcNAc consiste en l'addition d'un unique monosaccharide de N-acétylglucosamine (GlcNAc) en anomérie bêta sur le groupement hydroxyle d'une sérine (Ser) ou d'une thréonine (Thr) de l'axe peptidique des protéines. Ce résidu de GlcNAc n'est par la suite ni épimérisé ni le substrat d'autres glycosyltransférases **(Figure 29)**.

C'est en 1984 que la *O*-GlcNAc fut découverte de manière fortuite lors d'une étude destinée à marquer les protéines de surface de lymphocytes au [^{3}H]-galactose *via* l'utilisation de la galactosyltransférase bovine (Torres et Hart, 1984).

© 2009 Tous droits réservés.

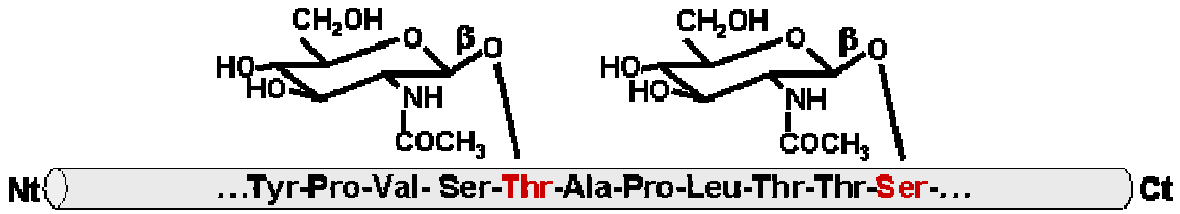


Figure 29 : structure schématique d'une séquence peptidique modifiée par la *O*-GlcNAc.
La *O*-GlcNAc consiste en l'ajout d'un résidu unique de N-acétylglucosamine sur des résidus de Sérine ou de Thréonine des protéines.

b) Localisation cellulaire de la O-GlcNAc.

Deux ans après sa découverte, l'équipe du Pr GW Hart montra que le noyau et la fraction soluble des cellules de foie de rat étaient particulièrement enrichis en *O*-GlcNAc (Holt et Hart, 1986) même si, dans cette étude, cette glycosylation a été retrouvée associée à tous les compartiments intracellulaires (hormis la mitochondrie), ce qui laissait supposer que la *O*-GlcNAc n'avait pas de localisation particulière. Cependant, il est rapidement apparu que la majeure partie de la *O*-GlcNAc était cytosolique et nucléaire (Holt *et al.*, 1987 ; Kearse et Hart, 1991a) et était plus particulièrement abondante au niveau du pore nucléaire (Hanover *et al.*, 1987). Aujourd'hui, la *O*-GlcNAc est considérée comme le principal type de glycosylation nucléocytoplasmique.

c) Les sites de O-GlcNAc.

Il n'existe pas de séquence peptidique consensus pour l'addition de *O*-GlcNAc. Cependant, la présence de sites du type proline-sérine/thréonine-sérine/thréonine (PS/TS/T), proline-valine-sérine/thréonine (PVS/T) ou de sites riches en acides aminés hydroxylés est favorable à cette glycosylation.

d) Dynamique de la O-GlcNAc.

Outre la localisation intracellulaire de la *O*-GlcNAc, une autre caractéristique marquante de cette glycosylation a rapidement suscité l'engouement des glycobiologistes : contrairement aux autres types de glycosylation connues à l'époque, la *O*-GlcNAc n'était pas statique mais dynamique. L'aspect dynamique de la *O*-GlcNAc a été mis en évidence par des expériences de « pulse-chase » sur les cytokératines K8 et K18 (Chou *et al.*, 1992) puis sur l'αB-

© 2009 Tous droits réservés.

cristalline (Roquemore *et al*., 1996). Dans ces études, les auteurs ont démontré que la demi-vie de la *O*-GlcNAc est plus courte que celle de la protéine en elle-même suggérant, qu'à l'instar de la phosphorylation, une protéine pourrait subir plusieurs cycles de *O*-GlcNAc/ dé-*O*-GlcNAc.

e) Conservation phylogénétique.

La *O*-GlcNAc est conservée phylogénétiquement puisqu'elle est retrouvée chez tous les métazoaires étudiés jusqu'ici incluant les mammifères, les amphibiens (Fang et Miller, 2001), les insectes comme la drosophile (Kelly et Hart, 1989) ou encore le nématode *Caenorhabditis elegans* (Hanover *et al.*, 2005). La *O*-GlcNAc a également été mise en évidence chez certains virus (Cytomegalovirus humain : Greis *et al.*, 1994; SV40 : Medina *et al.*, 1998 ; Plum pox virus : Chen *et al.*, 2005), certaines bactéries (*Listeria monocytogenes* : Schirm *et al.*, 2004 ; *Bacteroides thetaiotaomicron* : Dennis *et al.*, 2006), chez plusieurs parasites comme *Plasmodium falciparum* (Dieckmann-Schuppert *et al.*, 1993) mais aussi chez les plantes comme *Arabidopsis thaliana* (Swain *et al.*, 2001). Cependant, sa présence chez les levures reste encore un sujet de controverse.

2) Les enzymes de la *O*-GlcNAc.

Comme la phosphorylation, la *O*-GlcNAc est régulée par un couple d'enzymes responsable du greffage et de l'hydrolyse du résidu. Mais si plus de 500 kinases et 150 phosphatases ont été répertoriées à ce jour, la *O*-GlcNAc semble être régulée par un couple unique d'enzymes conservées au cours de l'évolution. L'uridine diphospho-N-acétylglucosamine : polypeptide β-N-acétylglucosaminyltransférase (*O*-GlcNAc transférase ou OGT) catalyse le transfert de GlcNAc sur la protéine alors que la N-acétyl-β-D glucosaminidase (*O*-GlcNAcase ou OGA) assure l'hydrolyse du résidu **(Figure 30).**

© 2009 Tous droits réservés.

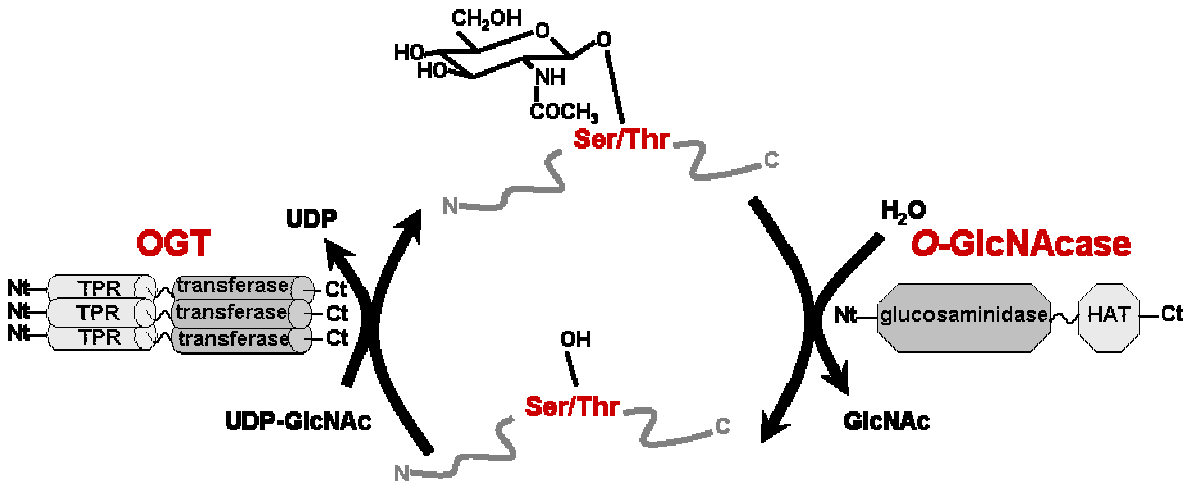


Figure 30 : la *O*-GlcNAc est une PTM dynamique régulée par un unique couple d'enzymes.
L'OGT catalyse le transfert de GlcNAc sur la protéine à partir d'UDP-GlcNAc tandis que la *O*-GlcNAcase est responsable de l'hydrolyse du résidu.

a) L'Uridine diphospho-N-acétylglucosamine : polypeptide β-N-acétylglucosaminyltransférase ou O-GlcNAc transférase (OGT, EC 2.4.1.94).

L'OGT assure le transfert du résidu de GlcNAc en anomérie β sur les résidus de sérine ou de thréonine à partir du nucléotide-sucre donneur, l'UDP-GlcNAc. L'activité *O*-GlcNAc transférase a été caractérisée pour la première fois en 1990 (Haltiwanger *et al.*, 1990) dans le foie de rat à partir duquel l'enzyme fut purifiée (Haltiwanger *et al.*, 1992) puis clonée (Kreppel *et al.*, 1997 ; Lubas *et al.*, 1997).

α. les isoformes de l'OGT.

Lors de sa caractérisation, l'OGT a d'abord été décrite comme une entité hétérotrimérique formée par l'assemblage de deux sous-unités de 110 kDa (p110) et d'une troisième sous-unité de 78 kDa (p78), l'ensemble possédant une masse apparente de 340 kDa (Haltiwanger *et al.*, 1992). Par la suite, il a été montré que l'OGT existait préférentiellement sous la forme d'un homotrimère constitué de trois sous-unités identiques de 110 kDa (Kreppel *et al.*, 1997) et que contrairement à p110, dont l'expression est ubiquitaire, l'expression de p78 n'était restreinte qu'à certains tissus comme le foie, les reins et les muscles suggérant un rôle régulateur de cette sous-unité. Ce rôle régulateur est d'autant plus probable qu'aucune activité catalytique de p78 n'a pu être démontrée *in vitro* (Lazarus *et al.*, 2006). En 2003, une isoforme supplémentaire de 103 kDa a été mise en évidence au niveau de la membrane interne mitochondriale (Love *et al.*, 2003). Bien que l'OGT mitochondriale possède une activité *in*

© 2009 Tous droits réservés.

vitro, aucune *O*-GlcNAcylation de protéines mitochondriales n'a à ce jour été démontrée (Love *et al.*, 2003).

Les 3 isoformes de l'OGT ainsi décrites, à savoir l'isoforme de 110 kDa, 78 kDa et 103 kDa ont été nommées respectivement ncOGT pour *« nuclear and cytoplasmic OGT »* (isoforme la plus étudiée), sOGT pour *« small OGT »* et mOGT pour *« mitochondrial OGT »* (Hanover *et al.*, 2003). La ncOGT ainsi que la sOGT ont une localisation cytoplasmique et nucléaire alors que la mOGT n'est retrouvée que dans la mitochondrie grâce à la présence dans sa partie N-terminale d'une séquence d'adressage à la mitochondrie (MTS, « *mitochondrial targeting sequence* ») (Love *et al.*, 2003).

β. structure de l'OGT.

L'OGT est composée de deux domaines distincts : un domaine d'interaction protéine-protéine situé en N-terminal et un domaine catalytique en C-terminal (Kreppel *et al.*, 1997 ; Lubas *et al.*, 1997) (**figure 30)**. La jonction entre ces deux domaines est assurée par un domaine intermédiaire de liaison dit « linker ». Cette partie centrale semble être une région flexible (Love et Hanover, 2005). Chez *C. elegans*, cette région contient une séquence putative de localisation nucléaire (NLS) mais il est fort probable que cette séquence ne joue aucun rôle dans la localisation nucléaire de l'enzyme puisqu'elle n'a pas été conservée au cours de l'évolution. Une première structure tridimensionnelle de l'OGT obtenue pour l'homologue exprimé chez *Xanthomonas campestris* a révélé que celle-ci adopte une conformation en sillon superhélicoïdal (*« superhelical groove »*) (Martinez-Fleites *et al.*, 2008).

- Structure de la partie N-terminale.

La partie N-terminale de l'OGT est caractérisée par la présence de plusieurs tétratricopeptides (TPR, *« tetratricopeptides repeats »*). Ces TPR correspondent à des répétitions de 34 acides aminés contenant la séquence consensus WLGYAFAP faiblement conservée (pour revue voir D'Andrea et Regan, 2003). Ces TPR sont retrouvés dans de nombreuses protéines distribuées de la levure à l'homme et interviennent dans la modulation des interactions protéine-protéine au cours de divers processus cellulaires comme la régulation du cycle cellulaire, la transcription ou encore la réponse au stress. Les 3 isoformes

© 2009 Tous droits réservés.

de l'OGT possèdent un nombre de TPR différents ; cette hétérogénéité étant en partie responsable de leur spécificité de substrats : chez la souris et l'homme, la ncOGT contient 12 TPR, la mOGT n'en contient plus que 9 et la sOGT 2 (Hanover *et al.*, 2003) (**Figure 31)**. De plus, pour une isoforme donnée le nombre de TPR peut également varier selon l'espèce considérée. Par exemple, il existe 13 domaines TPR chez la ncOGT des nématodes (Kreppel *et al.*, 1997). Des études cristallographiques ont montré que les TPR de l'OGT formait un empilement d'hélices α anti-parallèles dans un long tube cylindrique (Jinek *et al.*, 2004 ; Martinez-Fleites *et al.*, 2008).

- Structure de la partie C-terminale.

Des délétions du domaine C-terminal de l'OGT ont conduit à une perte totale de l'activité enzymatique suggérant que le site catalytique de l'enzyme était bien situé dans cette partie (Lubas et Hanover, 2000). Par comparaison de séquences, la région C-terminale serait divisée en deux domaines conservés CDI et CDII similaires à ceux retrouvés chez les GalNAc transférases (Roos et Hanover, 2000). Le domaine CDI correspondrait au site catalytique de l'enzyme alors que le domaine CDII est un domaine de type « lectin-like » (**Figure 31)**. Par des techniques de modélisation moléculaire, il a été montré que cette partie C-terminale présentait des similarités avec la superfamille des glycogènes phosphorylases/ glycogènes transférases (GPGTF) et que cette partie adopterait une conformation consistant en deux domaines de type Rossman. L'hélice 4 du second domaine Rossman renfermerait un résidu acide conservé définissant le domaine de liaison à l'UDP-GlcNAc (Wrabl et Grishin, 2001). Récemment, des expériences de mutagenèse dirigée au sein des domaines CDI et CDII ont été réalisées et ont montré des diminutions plus ou moins significatives de la capacité de l'OGT mutée à glycosyler la protéine nup62 selon l'acide aminé concerné : par exemple, le remplacement de la cystéine en position 839 (dans le CDII) par une sérine a provoqué une inhibition de l'activité de l'OGT de 96% démontrant l'importance de ce résidu dans son activité enzymatique (Lazarus *et al.*, 2005).

χ. Phylogénie de l'OGT

Les trois isoformes de l'OGT décrites chez les mammifères sont issues de l'épissage alternatif (mOGT) et de l'utilisation d'un promoteur interne (sOGT) au sein d'un unique gène (Hanover *et al.*, 2003) **(Figure 31)**. Chez les mammifères, ce gène est localisé sur le

© 2009 Tous droits réservés.

chromosome X dans la région Xq13.1 (Shafi *et al.*, 2000 ; Nolte et Muller, 2002). Cette région est particulièrement intéressante puisqu'elle est associée à certaines maladies neurodégénératives dont la dystonie Parkinsonienne (locus DYT3 également en Xq13.1, Nolte *et al.*, 2003). Le gène de l'OGT est très conservé : il existe 80% d'homologie entre le gène humain et son orthologue chez *Caenorhabditis elegans* (Lubas *et al.*, 1997). L'OGT est essentielle à la vie puisque chez la souris, le « knock-out » du gène de l'OGT est létal pour l'embryon et provoque également la mort des cellules souches embryonnaires (Shafi *et al.*, 2000).

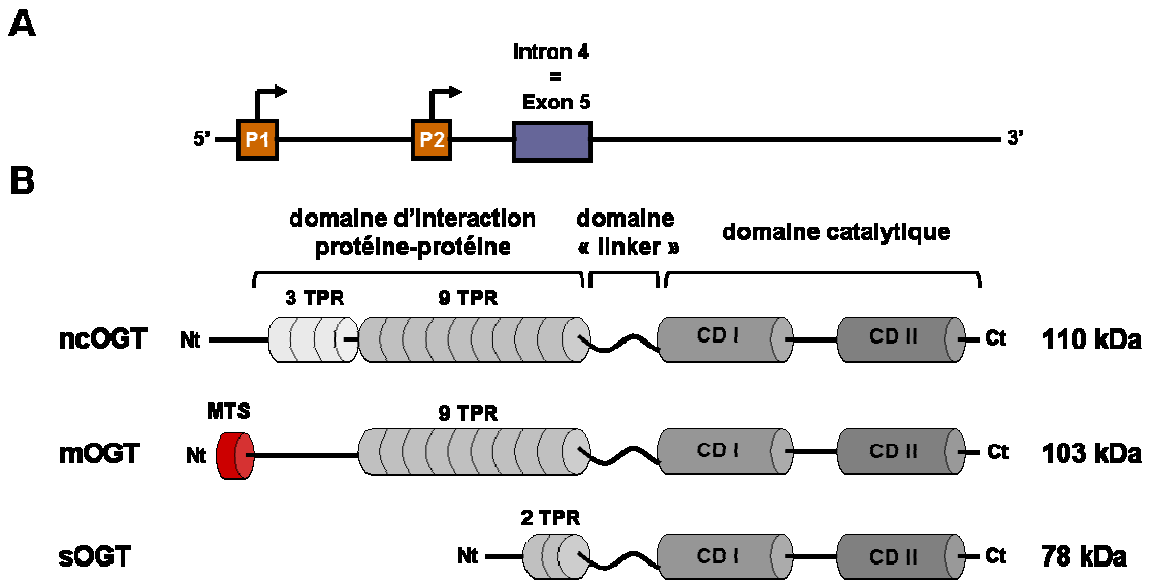


Figure 31 : les trois isoformes de l'OGT sont codées par un unique gène.
A. représentation schématique de la structure du locus de l'OGT mammalienne à l'origine des trois isoformes schématisées en **B**. la sOGT est issu de l'utilisation d'un promoteur interne (P2) alors que les ARN messagers des deux autres isoformes sont transcrits à partir du promoteur P1. La mOGT est engendrée par l'épissage alternatif de l'intron 4. En effet, cet intron normalement excisé devient dans ce cas l'exon 5. La présence de cet exon supplémentaire dans l'ARN messager est à l'origine d'une longue région non traduite en 5' (5'UTR) et introduit la séquence d'adressage à la mitochondrie (MTS).

Chez les plantes, deux gènes homologues de l'OGT animale ont pu être mis en évidence : spindly (SPY) (Robertson *et al.*, 1998) et secret agent (SEC) (Hartweck *et al.*, 2002). La protéine SPY est un composant majeur de la voie des gibbérellines (GA), hormones ayant divers rôles dans le développement de la plante comme la germination des graines ou l'induction florale (pour revue voir Olszewski *et al.*, 2002). Plusieurs travaux ont montré que SPY était un régulateur négatif de la réponse aux gibbérellines chez *A. thaliana* (Jacobsen et Olszewski, 1993 ; Swain *et al.*, 2002, Silverstone *et al.*, 2007), chez l'orge (Robertson *et al.*, 1998) ou encore chez le pétunia (Izhaki *et al.*, 2001). Chez toutes les plantes étudiées, SPY et

© 2009 Tous droits réservés.

SEC s'expriment dans tous les tissus et durant toute la vie végétale (Izhaki *et al.*, 2001 ; Swain *et al.*, 2002 ; Hartweck *et al.*, 2006). Il a été montré que SPY possédait une activité *O*-GlcNAc transférase *in vitro* et que les niveaux de *O*-GlcNAc étaient diminués chez des mutants *spy*, en comparaison avec la souche sauvage, mais pas totalement absents, ce qui suggérait à l'époque la présence d'une activité OGT autre que celle assurée par SPY (Thornton *et al.*, 1999). SEC a été identifiée, à partir de ce constat, chez *A. thaliana* (Hartweck *et al.*, 2002). Dans cette étude, les auteurs ont démontré que lorsqu'il est exprimé chez *E. coli*, SEC est capable de s'autoglycosyler à l'instar de l'OGT animale. Ces auteurs ont également montré qu'une double mutation *spy/sec* était létale pour la plante, démontrant la redondance de fonction de ces deux protéines ainsi que le rôle primordial de l'OGT pour la vie de la plante. La même équipe a observée une augmentation de l'expression de l'ARNm SEC dans des mutants *spy* et *vice versa* une augmentation de l'expression de l'ARNm SPY dans des mutants *sec* renforçant l'hypothèse d'une redondance d'action et d'une complémentation de ces deux protéines (Hartweck *et al.*, 2006). Cependant, des rôles distincts pour SPY et SEC ont été mis en évidence. En effet, Chen *et al.* ont montré chez *A. thaliana* un rôle de SEC dans l'infection de la plante par le Plum Pox virus (Chen *et al.*, 2005). Contrairement à la souche sauvage et au mutant *spy*, les protéines de la capside virale ne sont plus modifiées par la *O*-GlcNAc lorsque ces virus sont mis en contact avec des mutants *sec*, ces événements sont corrélés avec une diminution de la réplication et de la propagation virale.

Récemment, GmaR, une protéine possédant à la fois une activité *O*-GlcNAc transférase et une activité d'« anti-répresseur transcriptionnel » vis à vis de la flagelline a été mise en évidence chez la bactérie *Listeria monocytogenes* (Shen *et al.*, 2006). En revanche, à l'heure actuelle, la présence d'OGT chez les levures, n'a toujours pas été démontrée.

δ. Régulation de l'activité enzymatique de la ncOGT .

La régulation de l'activité de la ncOGT et de sa spécificité de substrat est complexe et n'est pas totalement comprise actuellement. Néanmoins, il apparaît que les concentrations très variables en UDP-GlcNAc, les Km multiples de l'OGT vis-à-vis de ce substrat (Kreppel et Hart,, 1999), la modulation des interactions protéines-protéines par les TPR ainsi que l'existence de PTM (*O*-GlcNAc, phosphorylation d'une tyrosine) sur l'OGT jouent un rôle important dans la régulation de son activité.

© 2009 Tous droits réservés.

- Régulation par les PTM.

L'OGT est elle-même *O*-GlcNAc et est reconnue par des anticorps anti-phosphotyrosine (Kreppel *et al.*, 1997) mais les sites de ces PTM ainsi que leur influence sur l'activité de l'enzyme ne sont pas connus. En revanche, il a été montré récemment dans des cellules de neuroblastome, que la calmoduline kinase de type IV (CaMKIV) phosphoryle l'OGT *in vitro* et *in vivo* et que cette phosphorylation est responsable de l'activation de l'enzyme (Song *et al.*, 2008).

- Régulation par la concentration en UDP-GlcNAc.

L'OGT possède un Km pour l'UDP-GlcNAc très bas : il a été estimé à 545 nM lors de la purification de la ncOGT (Haltiwanger *et al.*, 1992). Ce faible Km procure un avantage compétitif de l'OGT pour l'UDP-GlcNAc vis-à-vis des transporteurs du nucléotide sucre de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique. De manière surprenante, des études réalisées sur la ncOGT recombinante de rat ont montré que l'enzyme possédait 3 Km (6, 35, 217 µM) pour l'UDP-GlcNAc pour des concentrations en nucléotide-sucre de 0,05 µM à 4,8 mM (Kreppel et Hart, 1999). De plus, en utilisant des peptides de synthèse comme substrat de l'OGT, les auteurs ont également démontré que son activité augmente au fur et à mesure que la concentration en UDP-GlcNAc augmente. En outre, des études cinétiques ont révélé que l'enzyme n'est jamais saturée en UDP-GlcNAc même pour de très fortes concentrations à la limite de la solubilité (Comer et Hart, 2001). L'activité de l'OGT est donc intimement dépendante des niveaux d'UDP-GlcNAc intracellulaires, ces derniers subissant des variations extrêmes en réponse à de nombreux facteurs environnementaux et nutritifs. Autrement dit, l'OGT est capable de ressentir ces changements de concentration en nucléotide-sucre qu'elle transmet aux réseaux de signalisation intracellulaire.

- Importance des TPR.

Des expériences de délétions des domaines TPR ont permis de montrer que ces derniers étaient importants pour la multimérisation de l'enzyme (Kreppel et Hart, 1999 ; Yang *et al.*, 2002) mais que cette multimérisation n'influence pas l'activité catalytique de l'OGT *per se*. Les TPR contrôlent également l'interaction de l'enzyme avec ses partenaires lui permettant ainsi soit d'être en contact avec ses substrats et de les modifier, soit d'être acheminée vers un

© 2009 Tous droits réservés.

lieu précis où elle pourra agir, ou encore de la séquestrer. Ces TPR lui confèrent ainsi sa spécificité de substrat et d'action. Dans ce sens, plusieurs partenaires de l'OGT ont été mis en évidence : GRIF1 (*« $GABA_A$ receptor-interacting factor 1 »*) et son homologue OIP106 (*« OGT-interacting protein 106 »*) (Iyer *et al.*, 2003) ainsi que le co-répresseur transcriptionnel mSin3A (Yang *et al.*, 2002). Ces trois protéines sont *O*-GlcNAc mais leur glycosylation n'intervient pas dans leur interaction avec l'OGT. L'interaction de l'OGT avec mSin3A lui permettrait d'être acheminée vers la machinerie de transcription où elle agirait en tant qu'inactivateur transcriptionnel. Récemment, il a été démontré une interaction entre l'OGT et l'ataxine 10 dans les cellules pancréatiques (Andrali *et al.*, 2005) et dans le cerveau (März *et al.*, 2006) influençant l'activité catalytique de l'enzyme. L'OGT interagit également avec les sous unités β et γ de la sérine/thréonine phosphatase 1 (Wells *et al.*, 2004). Cette interaction permettrait la déphosphorylation préalable du substrat avant son *O*-GlcNAcylation.

- Autres régulations.

Récemment, Cheung *et al.* ont démontré une interaction entre le domaine C-terminal de l'OGT et la p38MAPkinase dans des conditions de déprivation en glucose (Cheung *et al.*, 2008). Cette interaction est dépendante de l'état de phosphorylation de p38 : lorsque p38 est phosphorylée, elle achemine l'OGT vers les neurofilaments H (NF-H) en vue de leur modification par la *O*-GlcNAc.

Une régulation de l'OGT par les phosphoinositides a été démontrée : le phosphatidylinositol 3, 4, 5, triphosphate est capable de recruter l'OGT vers la membrane plasmique où elle modifie les protéines de la voie de signalisation de l'insuline provoquant une désactivation de cette voie et participant ainsi à la résistance à l'insuline (Yang *et al.*, 2008).

ε. Les inhibiteurs de l'OGT.

La ncOGT, qui possède un pH optimum de 6, n'est pas dépendante des cations bivalents à l'inverse de nombreuses glycosyltransférases (Haltiwanger *et al.*,, 1992). L'OGT est potentiellement inhibée par le NaCl, l'UDP, l'UMP (Haltiwanger *et al.*,, 1992; Okuyama et Marshall, 2003). L'alloxane, un analogue structural de l'uracile est capable d'inhiber l'enzyme *in vitro* (Konrad *et al.*, 2002) et *in vivo* (Kim *et al.*, 2006 ; Liu *et al.*, ; 2006 ;

© 2009 Tous droits réservés.

Champattanachai *et al.*, 2007). Le benzyl-2-acetamido-2-deoxy-alpha-d-galactopyranoside (BADGP), un inhibiteur de la *O*-Glycosylation à large spectre, a également été utilisé pour inhiber l'OGT dans des cellules béta-pancréatiques de rat (D'alessandris *et al.*, 2004). Enfin, 3 inhibiteurs potentiels de l'OGT, compétiteur de l'UDP-GlcNAc, ont été mis en évidence par une technique fondée sur le déplacement de sonde testée sur plus de 64.000 composés (Gross *et al.*, 2005).

b) La N-acétyl βD glucosaminidase ou O-GlcNAcase (OGA, EC 3.2.1.52).

La *O*-GlcNAcase catalyse l'hydrolyse du résidu de GlcNAc. Elle a été isolée et caractérisée à partir de rate de rat en 1994 (Dong et Hart 1994). Elle fut ensuite purifiée, séquencée à partir du cerveau humain et clonée en 2001 (Gao *et al.*, 2001). Avant cette caractérisation, la *O*-GlcNAcase avait déjà été décrite comme étant l'hexosaminidase C (Braidman *et al.*, 1974). Contrairement aux hexosaminidases acides lysosomales (A et B), elle possède un pH optimum neutre et n'est pas inhibée par la GalNAc. Après son clonage, il a été montré que la *O*-GlcNAcase était identique à la protéine MGEA5 (*« Meningioma expressed antigen 5 »*), une hyaluronidase induisant une réponse immunitaire chez des patients atteints de méningiome (Heckel *et al.*, 1998).

α. Gène et conservation phylogénétique.

Chez l'homme, le gène de la *O*-GlcNAcase est localisé sur le chromosome 10 dans la région q24 (Heckel *et al.*, 1998 ; Gao *et al.*, 2001). Comme c'est le cas pour l'OGT, le locus du gène de la *O*-GlcNAcase est associé à certaines maladies neurodégénératives. En effet, le gène prédisposant à la maladie d'Alzheimer à début tardif est également localisé dans la région 10q24 (Myers *et al.*, 2000). De plus cette région chromosomique est également impliquée dans la prédisposition au diabète de type II chez une population d'Américains d'origine Mexicaine (Lehman *et al.*, 2005) et chez la tribu des Indiens Pimas (Farook *et al.*, 2002). Le gène de la *O*-GlcNAcase est très conservé chez les mammifères (>80% d'homologie) alors qu'il n'existe que 55% d'homologie entre le gène humain et son orthologue chez *C. elegans* (Gao *et al.*, 2001). La *O*-GlcNAcase a également été identifiée chez les procaryotes (Sheldon *et al.*, 2006 ; Dennis *et al.*, 2006 ; Rao *et al.*, 2006).

© 2009 Tous droits réservés.

β. Les isoformes de la O-GlcNAcase et leur localisation.

Chez l'homme, 2 isoformes de la *O*-GlcNAcase ont été identifiées: une isoforme de 130 kDa représentant la forme de pleine longueur et une isoforme de 75 kDa (Gao *et al.*, 2001 ; Comtesse *et al.*, 2001 ; Heckel *et al.*, 1998). Cette dernière serait un variant d'épissage issu de l'utilisation d'un codon STOP alternatif générant une protéine tronquée du tiers de la partie C-terminale (correspondant à un domaine acétyltransférase putatif) par rapport à la forme de pleine longueur (Comtesse *et al.*, 2001) **(Figure 32)**. Les deux isoformes de la *O*-GlcNAcase sont exprimées de façon ubiquitaire dans les compartiments cytosolique et nucléaire et plus particulièrement dans le cerveau (Gao *et al.*, 2001, Comtesse *et al.*, 2001). Dans une lignée cellulaire de glioblastome, le variant de 75 kDa a été localisé principalement dans le noyau alors que la protéine de 130 kDa est préférentiellement cytoplasmique (Comtesse *et al.*, 2001). Cette localisation cytoplasmique de la forme de pleine longueur a également été mise en évidence par fractionnement cellulaire (Gao *et al.*, 2001) et par microscopie en immunofluorescence (Wells *et al.*, 2002a). Même si les 2 isoformes possèdent une activité glucosaminidase *in vitro* (Kim *et al.*, 2006a), l'essentiel de l'activité *O*-GlcNAcase est assurée par l'isoforme de 130 kDa (Wells *et al.*, 2002a) et le(s) rôle(s) du variant de 75 kDa n'est (ne sont) pas connu(s).

Enfin, deux isoformes supplémentaires de la *O*-GlcNAcase de 90 et 84 kDa ont été identifiées respectivement à partir du cerveau de rat Goto Kakizaki et de rat Sprague-Dawley (Toleman *et al.*, 2004). Ces deux isoformes résulteraient également d'épissages alternatifs **(Figure 32)**.

χ. Données structurales.

A l'heure actuelle, la structure de la *O*-GlcNAcase n'a pas été totalement clarifiée et des points de discordes subsistent entre les différentes études.

Lors de son clonage, il est apparu que la *O*-GlcNAcase ne présentait pas d'homologie avec les glycosidases connues mais qu'il existait en revanche de faibles homologies de séquences avec des hyaluronidases dans sa partie N-terminale et des acétyltransférases dans sa partie C-terminale. La comparaison de sa séquence avec celles de plusieurs acétyltransférases ont permis de la classer dans la famille des *« GCN5-related acetyltransférases »* (GNAT) (Schultz et Pils, 2002).

© 2009 Tous droits réservés.

En se basant sur ces homologies avec les GNAT, il avait été prédit que le site catalytique de l'enzyme résidait dans sa partie C-terminale. Or, des délétions des exons 6 et 7 ont permis de montrer que l'activité glucosaminidase de l'enzyme réside dans sa région N-terminale (Toleman *et al.*, 2004) (**Figure 32)**. Récemment, deux résidus d'acide aspartique indispensable à l'activité *O*-GlcNAcase de l'enzyme ont été caractérisés chez l'homme (Asp174 et Asp175, Cetinbas *et al.*, 2006), chez la souris (Asp175 et Asp177, Toleman *et al.*, 2006a) et chez *Clostridium perfringens* (Rao *et al.*, 2006).

Toleman *et al.* ont montré que l'enzyme possède, en plus de son activité glucosaminidase, une activité HAT (Histone Acétyl Transférase) *in vitro* et que la mutation de certains résidus abolit cette activité permettant ainsi de localiser le domaine HAT dans la partie C-terminale de l'enzyme (Toleman *et al.*, 2004) **(Figure 32)**. Ce domaine HAT adopterait une structure en doigt de Zinc (Toleman *et al.*, 2006b).

La *O*-GlcNAcase serait donc une enzyme bi-fonctionnelle. Il a d'ailleurs été proposé de la renommer NCOAT pour *« Nuclear and Cytoplasmic O-GlcNAcase and Acetyl Transferase »* (Toleman *et al.*, 2004). Néanmoins, aucune activité HAT *in vivo* n'a été prouvée à ce jour.

δ.Régulation de l'activité de la O-GlcNAcase.

De manière intriguante, la *O*-GlcNAcase peut être clivée par la caspase 3 (Wells *et al.*, 2002a). Ce clivage génère un fragment C-terminal de 65 kDa qui possède toujours une activité *O*-GlcNAcase et HAT (Wells *et al.*, 2002a ; Toleman *et al.*, 2004), d'ailleurs ces deux fragments restent associés après coupure par la caspase-3 (Butkinaree *et al.*, 2008). La localisation du site de clivage par la caspase-3 après l'Asp413 a révélé qu'il s'agissait d'un site non canonique (Butkinaree *et al.*, 2008). La signification biologique de ce clivage n'est toujours pas comprise mais suggère un rôle possible de la *O*-GlcNAcase dans l'apoptose par déglycosylation de protéines essentielles à la mort cellulaire programmée.

Les phénomènes d'épissages alternatifs pourraient également contribuer à la régulation de l'activité enzymatique. En effet, le variant d'épissage identifié par Comtesse et ses collaborateurs ne possède pas le domaine HAT (Comtesse *et al.*, 2001) tandis que ceux identifiés chez le rat possèdent une activité HAT *in vitro* mais pas d'activité hexosaminidase (Toleman *et al.*, 2004) **(Figure 32).**

Enfin, tout comme l'OGT, la *O*-GlcNAcase est elle-même *O*-GlcNAc (Lazarus *et al.*, 2006). De nombreux partenaires de l'enzyme ont été mis évidence (Gao *et al.*, 2001) tels que

© 2009 Tous droits réservés.

les protéines de choc thermique Hsp110 et Hsc70, la culline ou encore la calcineurine. Le rôle des PTM et des partenaires dans l'activité et/ou la localisation subcellulaire de l'enzyme ne sont, malgré tout, pas connus.

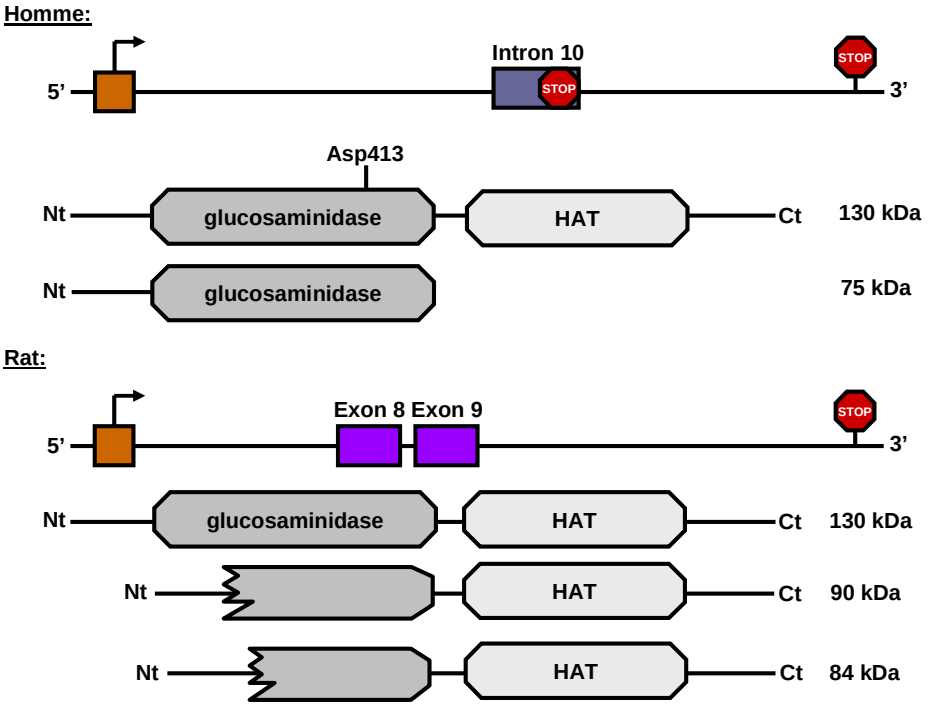


Figure 32 : les différents isoformes de la *O*-GlcNAcase.
Chez l'homme, la non excision de l'intron 10 dévoile un codon STOP à l'origine d'une forme tronquée de 75 kDa ne possédant plus le domaine HAT. L'Asp413 est la cible d'un clivage par la caspase 3. Chez le rat, l'excision de l'exon 8 ou des exons 8 et 9 simultanément génère une *O*-GlcNAcase de 90 et 84 kDa, respectivement, tronquée au niveau du domaine glucosaminidase

ε.Les inhibiteurs de la O-GlcNAcase.

Jusqu'en 2006, deux inhibiteurs de la *O*-GlcNAcase étaient principalement connus et utilisés *in vivo* : la streptozotocine (Roos *et al.*, 1998) et le PUGNAc pour O-(2-acétamido-2-déoxy-D-glucopyranosylidène) amino-N-phénylcarbamate (Dong et Hart, 1994 ; Haltiwanger, 1998). Depuis deux ans, de nombreuses études concernant le développement de nouvelles molécules inhibitrices sont publiées : beaucoup d'entre-elles sont des dérivés du PUGNAc (Kim *et al.*, 2006b ; Stubbs *et al.*, 2006). On peut également citer la GlcNAc-thiazoline et ses dérivés (Knapp *et al.*, 2007), la GlcNAcstatine (Dorfmueller *et al.*, 2006) ou encore l'α-GlcNAc-thiosulfonate (Kim *et al.*, 2007). Malheureusement, l'efficacité de ces molécules n'a pas, pour la plupart d'entre elles, encore été validée *in vivo*. Récemment, une nouvelle molécule appelée Thiamet-G a été synthétisée et utilisée avec succès *in vivo* (Yuzwa *et al.*,

© 2009 Tous droits réservés.

2008). Cet inhibiteur très sélectif de la *O*-GlcNAcase est capable de traverser la barrière hémato-encéphalique et de provoquer une diminution de la phosphorylation de Tau. Beaucoup d'espoirs reposent sur cette molécule de nouvelle génération qui pourrait à plus ou moins long terme déboucher sur la conception de médicaments visant à ralentir la progression de la maladie d'Alzheimer.

3) La voie de biosynthèses des hexosamines : source de l'UDP-GlcNAc.

Comme il a été mentionné auparavant, le nucléotide-sucre donneur pour l'addition de *O*-GlcNAc est l'uridine 5'-diphospho-N-acétylglucosamine ou UDP-GlcNAc. La synthèse de cet UDP-GlcNAc est assurée par la voie de biosynthèse des hexosamines ou HBP (*« Hexosamine Biosynthetic Pathway »*) à partir du glucose extracellulaire **(Figure 33)**. Cette voie est hautement régulée puisqu'elle est très sensible aux fluctuations de concentrations en glucose et constitue donc un niveau supplémentaire de régulation des processus de *O*-GlcNAc/dé-*O*-GlcNAc.

On estime que 2 à 5% du glucose intracellulaire est dirigé à travers cette voie de biosynthèse (Zhivkov *et al.*, 1975). C'est pourquoi, la culture des cellules en milieu hyperglucosé est une technique couramment employée pour augmenter artificiellement les niveaux de *O*-GlcNAc (Han *et al.*, 2000 ; Walgren *et al.*, 2003 ; Guinez *et al.*, 2006).

Une fois entré dans la cellule grâce à des transporteurs spécifiques GLUT, le glucose est immédiatement phosphorylé par la glucokinase ou l'hexokinase pour former du glucose-6-phosphate (G6P). Ce G6P pourra soit participer à la synthèse du glycogène, soit entrer dans la voie des pentoses phosphates, soit être épimérisé en fructose-6-phosphate (F6P) par la phosphoglucose isomérase. Ce F6P sera dirigé vers la glycolyse ou vers la voie HBP. Dans ce cas, le F6P devient le substrat de la glutamine : fructose-6-phosphate amido transférase (GFAT) enzyme clé et limitante de la voie HBP. La GFAT utilise la glutamine pour convertir le F6P en glucosamine-6-phosphate ($GlcNH_26P$). Deux inhibiteurs de la GFAT sont couramment utilisés pour diminuer les niveaux de *O*-GlcNAc : l'azasérine et le DON (6-diazo-5-oxo-norleucine). La régulation de l'activité de cette enzyme est complexe et n'est pas totalement comprise. La GFAT est inhibée par l'UDP-GlcNAc (Kornfeld, 1967) et potentiellement par la $GlcNH_26P$ (Broschat *et al.*, 2002), ce qui constitue une boucle auto-inhibitrice de l'enzyme. Deux isoformes de la GFAT présentant 75% d'homologie sont retrouvées chez les mammifères : la GFAT1 et la GFAT2. La sérine 205 de ces deux isoformes peut être phosphorylée par la PKA (Protéine Kinase dépendante de l'AMP

© 2009 Tous droits réservés.

cyclique). De manière intriguante, cette phosphorylation est inhibitrice pour la GFAT1 (Chang *et al.*, 2000) alors qu'elle est activatrice pour la GFAT2 (Hu *et al.*, 2004) ce qui suggère que les deux isoenzymes seraient exprimées toutes deux dans les mêmes tissus en même temps avec une proportion différente, ce qui impliquerait une synthèse minimale d'UDP-GlcNAc quelque-soit l'état d'activation de PKA. Récemment, il a été montré que la GFAT1 était phosphorylée *in vitro* sur la sérine 243 par l'AMPK (*« 5'AMP activated Protein Kinase »*) et la CaMKII (*« Calcium/calmodulin dependent protein Kinase type II »*) ce qui provoquait une augmentation de son activité enzymatique (Li *et al.*, 2007).

Une autre enzyme importante de la voie HBP est l'acétyltransférase Emeg32, une enzyme associée à la membrane plasmique (alors que la GFAT est cytoplasmique) (Boehmelt *et al.*, 2000a). Cette enzyme utilise l'acétyl-coenzyme A (acétylCoA) pour convertir la $GlcNH_2$6P en N-acétylglucosamine-6-phosphate (GlcNAc6P) qui sera rapidement métabolisée en N-acétylglucosamine-1-phosphate (GlcNAc1P) puis en UDP-GlcNAc. Des études de « Knock-Out » de Emeg32 ont montré que celle-ci était indispensable pour le maintien correct des niveaux d'UDP-GlcNAc dans la cellule (Boehmelt *et al.*, 2000b).

Il est également possible de générer de l'UDP-GlcNAc à partir de la glucosamine qui court-circuite l'action de la GFAT : la glucosamine est convertie directement en GlcN6P qui pourra subir l'action de Emeg32. C'est pourquoi la glucosamine est aussi très employée pour augmenter les niveaux de *O*-GlcNAc cellulaire (Guinez *et al.*, 2006, Champattanachai *et al.*, 2007).

De nombreuses études ont permis de mettre en évidence des relations étroites entre dérégulation de la voie HBP, la *O*-GlcNAc et la résistance à l'insuline caractéristique du diabète de type II et seront discutées dans la partie « dérégulation des mécanismes de *O*-GlcNAc et pathologies ».

© 2009 Tous droits réservés.

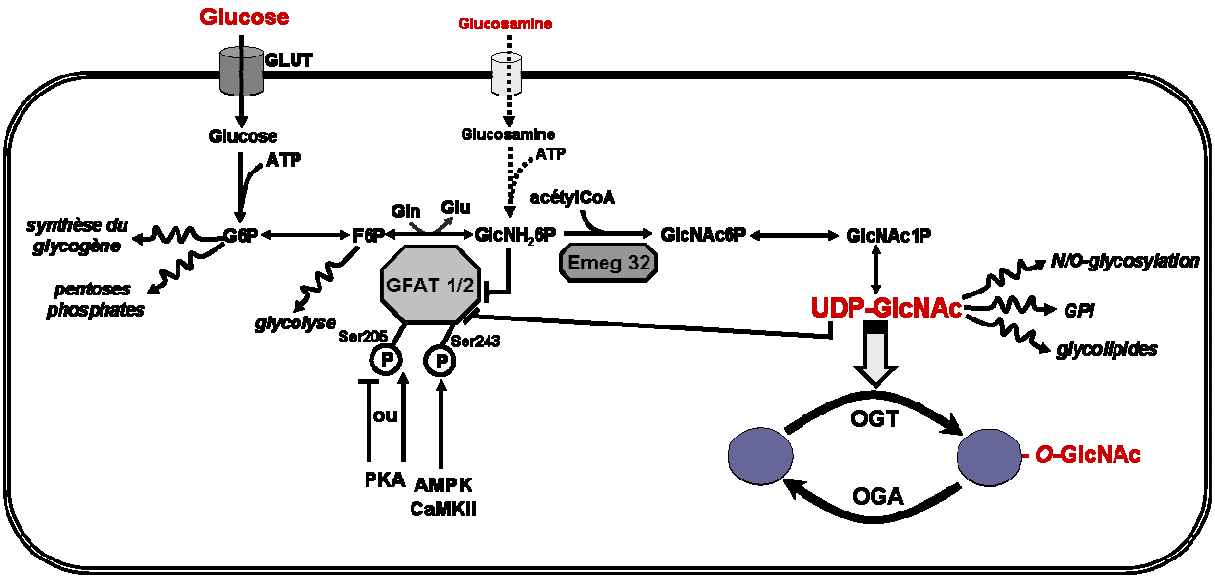


Figure 33 : l'UDP-GlcNAc est synthétisé *via* la voie de biosynthèse des hexosamines (HBP) à partir du glucose intracellulaire.
Après sa pénétration dans la cellule, le glucose est phosphorylé en G6P. Ce G6P pourra soit entrer dans la voie de biosynthèse du glycogène, soit dans la voie des pentoses phosphates ou encore être dirigé dans la voie HBP où il sera isomérisé en F6P. Ce F6P entrera alors dans la glycolyse ou sera le substrat de la GFAT. L'UDP-GlcNAc représente également un carrefour pour différentes voies métaboliques puisqu'il pourra servir de substrat à l'OGT mais aussi aux enzymes de la *N*- et *O*-glycosylation, de la synthèse des ancres GPI et des glycolipides.

III. Fonctions associées à la *O*-GlcNAc.

Depuis sa découverte, l'intérêt porté à la *O*-GlcNAc ne cesse d'augmenter comme en témoigne l'évolution du nombre de publications sur le sujet sur la période 1987-2007 (**Figure 34** ; à noter que pour la période janvier 2008- Août 2008, 58 articles sont à rajouter). A l'heure actuelle, plus de 600 protéines *O*-GlcNAc ont été identifiées. Ces protéines appartiennent à différentes classes incluant notamment des facteurs de transcription, des kinases, des enzymes métaboliques ou encore des protéines du cytosquelette **(Tableau III)**. Elles interviennent dans de nombreux processus physiologiques suggérant une fonction possible de la *O*-GlcNAc à tous les niveaux de régulation de la vie cellulaire. A ce jour, les rôles joués par la *O*-GlcNAc ne sont pas entièrement déchiffrés mais néanmoins, de nombreuses études prouvent que la *O*-GlcNAcylation des protéines peut être impliquée dans i) la régulation de leur phosphorylation, ii) leur interaction avec des partenaires, iii) leur localisation subcellulaire, iv) leur dégradation. A ce titre, la *O*-GlcNAc prend une part active à la régulation de nombreux processus cellulaires comme la transcription, la réponse au stress, le développement ou encore le cycle cellulaire.

© 2009 Tous droits réservés.

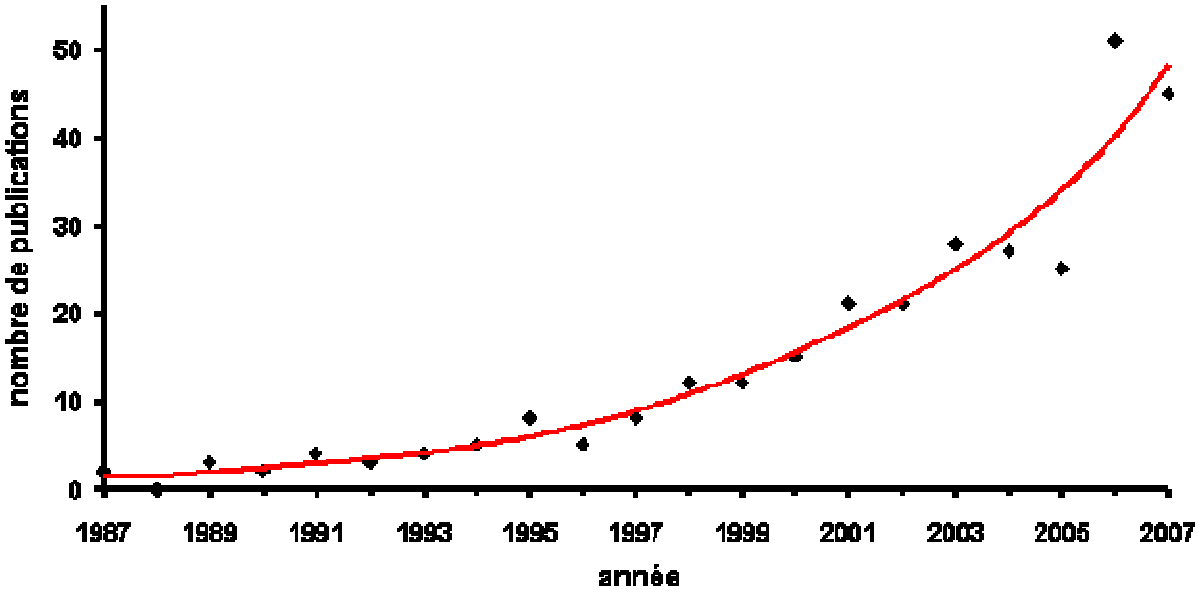


Figure 34 : évolution du nombre de publications sur la *O*-N-acétylglucosaminylation pour la période 1987-2007 (source : PubMed, mot clé : *O*-GlcNAc)

© 2009 Tous droits réservés.

Tableau III : liste non exhaustive de protéines *O*-GlcNAc identifiées.

PROTEINES	REFERENCES
Enzymes	
Enzymes métaboliques	
alcool deshydrogénase	Sprung *et al.*, 2005
Aldéhyde réductase	Sprung *et al.*, 2005
eNOS	Du *et al.*, 2001; Parker et al., 2003
Enolase	Wells *et al.*, 2002b; Cieniewski-Bernard et al., 2004
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Wells *et al.*, 2002b; Cieniewski-Bernard et al., 2004
Glycogen synthase	Parker *et al.*, 2003
Phosphoglycerate kinase	Wells *et al.*, 2002b
Pyruvate kinase	Wells *et al.*, 2002b
UDP-glucose purophosphorylase	Wells *et al.*, 2002b
Thymidylate synthase	Sprung *et al.*, 2005
Triose phosphate isomerase	Cieniewski-Bernard *et al.*, 2004
Enzymes de la O-GlcNAc	
OGA	Lazarus *et al.*, 2006
OGT	Kreppel *et al.*, 1997
Kinases et phosphatases	
Akt/PKB	Park *et al.*, 2005; Gandy *et al .*, 2006
CK II	Lubas et Hanover, 2000
GSK3β	Lubas et Hanover, 2000
PI3 kinase	Federici *et al.*, 2002
Protéine S/T phosphatase CG10417	Sprung *et al.*, 2005
IRS1/2	Patti *et al.*, 1999
Tyrosine kinase Yes	Lazarus *et al.*, 2006
Tyrosine phosphatase nucléaire p65	Meikrantz *et al.*, 1991
Enzymes de détoxification	
Catalase	Sprung *et al.*, 2005
Superoxyde dismutase « lente »	Sprung *et al.*, 2005
Thioredoxine peroxydase 1	Sprung *et al.*, 2005
Autres enzymes	
ARN poymerase II	Kelly *et al.*, 1993
CRMP-2	Khidekel *et al.*, 2007
Gluthatione S transferase	Sprung *et al.*, 2005
Prolyl oligopeptidase	Sprung *et al.*, 2005
Tyrosine 3-monooxygénase	Bork *et al.*, 2008
Topoisomérase I	Noach *et al.*, 2007

PROTEINES	REFERENCES
Protéines de structure et du cytosquelette	
Actine alpha	Gurcel *et al.*, 2008
Ankyrine G	Zhang et Bennett 1996
AP3 et 180	Yao et Coleman, 1998; Murphy *et al.*, 1994
Bande 4.1	Inaba et Maede, 1989
Bassoon	Khidekel *et al.*, 2007
Cofiline	Wells *et al.*, 2002b
Cytokératines 8, 13, 18	Chou *et al.*, 1992; King et Hounsell, 1989
Dynéine	Wells *et al.*, 2002b
E-cadhérine	Zhu *et al.*, 2001
MAP 1, 2 et 4	Ding et Vandré, 1996
Myosine	Pol-rodriguez *et al.*, 2001
Neurofilaments H,M et L	Dong *et al.*, 1996
Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein	Khidekel *et al.*, 2007
Piccolo	Wells *et al.*, 2002b
SH3p8	Khidekel *et al.*, 2007
Synapsine 1	Cole et Hart, 1999
Synucleine bêta	Cole et Hart, 2001
Taline	Hagmann *et al*, 1992
Tau	Arnold *et al*, 1996
Tubuline alpha	Walgren *et al.*, 2003
Tubuline beta 2	Gurcel et al., 2008
Vimentine	Wang *et al.*, 2007
Chaperonnes/protéines de stress	
Alpha crystalline (chaîne B)	Roquemore *et al.*, 1992
Chaperonin containing TCP1 subunit 2	Gurcel et al., 2008
Hsc70	Lefebvre *et al.*, 2001
Hsp60	Kim *et al.*, 2006
Hsp70	Walgren *et al.*, 2003
Hsp83	Sprung *et al.*, 2005
Hsp90	Wells *et al.*, 2002b
TCP-1 theta	Donadio *et al.*, 2008
Protéines du pore nucléaire	
Nup153, 214, 358	Favreau *et al.*, 1996
Nup180	Sukegawa et Blobel, 1993
Nup54, 155	Wells *et al.*, 2002b
p62	Lubas *et al.*, 1995

© 2009 Tous droits réservés.
http://doc.univ-lille1.fr

Tableau III (suite).

PROTEINES	REFERENCES
Facteurs de transcription	
Facteurs de transcription	
Beta-caténine	Zhu *et al.*, 2001
CREB	Lamarre-Vincent *et al.*, 2003
Elf1	Juang *et al.*, 2002
Facteur de transcription humain C1	Wells *et al.*, 2002b
Neuro-D1	Andrali *et al.*, 2007
NF-κB	James *et al.*, 2002
Pax-6	Lefebvre *et al.*, 2002
PDX1	Gao *et al.*, 2003
Plakoglobine	Hatsell *et al.*, 2003
Récepteurs des oestrogènes α/β	Cheng *et al.*, 2000
RunX2	Kim *et al.*, 2007
Sp1	Jackson *et al.*, 1988
STAT5	Gewinner *et al.*, 2004
SRF	Reason *et al.*, 1992
YY1	Hiromura *et al.*, 2003
Oncogènes	
c-Fos	Reason *et al.*, 1992
c-Jun	Tai *et al.*, 2004
c-Myc	Chou *et al.*, 1995a, 1995b
Ets-related protein isoform 7	Donadio *et al.*, 2008
v-ErbA	Privalsky, 1990
Suppresseurs de tumeurs	
HIC1	Lefebvre *et al.*, 2004
FoxO1	Kuo *et al.*, 2008; Housley *et al.*, 2008
P53	Shaw *et al* ., 1996
Protéines liant l'ARN/traduction	
eIF4	Sprung *et al.*, 2005; Wells *et al.*, 2002b
EF1, 2	Sprung *et al.*, 2005; Wells *et al.*, 2002b
hnRNP C1, C2	Wang *et al.*, 2007
p67eIF2	Datta *et al.*, 2003
Protéines ribosomales L8, L17, L21, S2, S8	Gurcel *et al.*, 2008
Protéine du ribosome 40S S24	Wells *et al.*, 2002b
RNA binding motif protein	Khidekel *et al.*, 2004
Ribonucleoprotéine K	Gurcel *et al.*, 2008

PROTEINES	REFERENCES
Protéines virales	
Antigène « grand T » du SV40	Medina *et al.*, 1998
GP41 du baculovirus	Whitford et Faulkner, 1992
Phosphoprotéine basique du CMV humain	Benko *et al.*, 1988
Protéine capsidaire du Plum Pox virus	Chen *et al.*, 2005
Protéines NS26 de rotavirus	Gonzalez *et al.*, 1991
Ubiquitination et protéasome	
Protéine C2 d'interaction au protéasome	Wells *et al.*, 2002b
Ubiquitin activating enzyme	Sprung *et al.*, 2005
Sous-unité alpha 4 du protéasome	Sprung *et al.*, 2005
Sous-unité alpha 6 du protéasome	Sprung *et al.*, 2005
Sous-unité bêta 5 du protéasome	Gurcel et al., 2008
UCH-L1	Cole et Hart, 2001
Protéines non classées	
14-3-3 zeta et theta	Gurcel *et al.*, 2008
Ataxine-10	Andrali *et al.*, 2005; März *et al.*, 2006
Calréticuline	Sprung *et al.*, 2005
flagelline	Schirm *et al.*, 2004
GLUT1	Buse *et al.*, 2002
HCF1	Khidekel *et al.*, 2004;
Inhibiteur de la phosphatase 2A	Wells *et al.*, 2002b
Interleukin enhancer binding factor 2	Wang *et al.*, 2007
Nucléophosmine	Wells *et al.*, 2002b
GRIF1	Iyer et Hart, 2003
OIP106	Iyer et Hart, 2003
Ran	Wells *et al.*, 2002b
Régucalcine	Sprung *et al.*, 2005

© 2009 Tous droits réservés.
http://doc.univ-lille1.fr

1) *O*-GlcNAc et phosphorylation : une relation complexe.

L'identification des sites de *O*-GlcNAcylation sur certaines protéines a permis d'établir un lien étroit entre *O*-GlcNAc et phosphorylation. En effet, pour un certain nombre d'entre-elles, il a été montré que *O*-GlcNAc et phosphorylation pouvaient alterner sur un même résidu. Ces observations ont conduit à élaborer la théorie du « YinYang » qui stipule que la *O*-GlcNAc et la phosphorylation entrent en compétition pour les mêmes résidus de Ser/Thr modulant ainsi la fonction de la protéine **(Figure 35A)**. C'est le cas de la Ser16 de la sous unité β du récepteur aux oestrogènes dont la modification influence l'activité et le « turnover » de la protéine (Cheng *et al.*, 2000). Les Sérines 111 et 112 de l'antigène « grand T » du virus SV40 peuvent subir alternativement les deux types de PTM (Medina *et al.*, 1998). Dans des modèles de rats diabétiques, il a été montré que la *O*-GlcNAcylation de la Sérine 1117 de l'oxyde nitrique synthétase endothéliale (eNOS) augmentait tandis que sa phosphorylation diminuait provoquant une inactivation de l'enzyme (Du *et al.*, 2001 ; Federici *et al.*, 2002 ; Musicki *et al.*, 2005).

Plusieurs études sont venues renforcer la théorie du « YinYang » : une diminution des niveaux de *O*-GlcNAc a été observée dans des cellules traitées par des inhibiteurs de phosphatases (Lefebvre *et al.*, 1999, Griffith *et al.*, 1999). De plus, Wells *et al.* ont démontré une association entre l'OGT et la phosphatase PP1 (Wells *et al.*, 2004). Lorsqu'il est purifié, ce complexe OGT/PP1bêta/gamma est capable d'engendrer une déphosphorylation suivie d'une *O*-GlcNAcylation de phospho-peptides substrats.

D'autres études ont montré que la relation entre la phosphorylation et la *O*-GlcNAc ne se limitait pas seulement à ce « YinYang » sur le même résidu mais qu'elle pouvait être plus complexe : les deux PTM peuvent entrer en compétition sur des résidus de Ser/Thr adjacents ou distants, la PTM du premier résidu influençant la modification du deuxième **(Figure 35B)**. C'est le cas par exemple de la synapsine I dont les sites de *O*-GlcNAc flanquent ceux de la phosphorylation dans le domaine d'interaction protéine-protéine (Cole et Hart, 1999) et la protéine p53 (Yang *et al.*, 2006) dont la *O*-GlcNAcylation de la sérine 149 diminue la phosphorylation de la thréonine 155.

Il peut exister une relation encore plus complexe dans laquelle la compétition peut se faire à la fois, pour une même protéine, sur des mêmes résidus et sur des résidus distants **(Figure 35C)**. On peut citer l'exemple du domaine carboxyterminal (CTD) de l'ARN polymérase II qui est intensivement *O*-GlcNAcylé et phosphorylé (Kelly *et al.*, 1993 ; Comer et Hart 2001) et de c-myc (Chou *et al.*, 1995, Kamemura *et al.*, 2002). Le principal site de *O*-

© 2009 Tous droits réservés.

GlcNAcylation de l'oncoprotéine c-myc est localisé sur la thréonine 58, un résidu situé dans le domaine de transactivation et fréquemment muté dans les lymphomes (Chou *et al.*, 1995). Dans cette étude, les auteurs ont montré que l'inhibition de la glycogène synthétase kinase 3 (GSK3) provoquait une diminution de la phosphorylation de la Thr58 concomitante à une augmentation de sa *O*-GlcNAc. De plus, une mutation de la Sérine 62 (phosphorylable par la kinase Erk) a été corrélée à une augmentation de la *O*-GlcNAcylation de la thréonine 58 (Kamemura *et al.*, 2002).

Récemment, Wang *et al.* ont observé que l'inhibition de la glycogène synthétase kinase 3β (GSK3β) dans des cellules COS7 provoquait une augmentation de la *O*-GlcNAcylation de certaines protéines dont la vimentine pour laquelle un site de *O*-GlcNAc a été localisé sur la Ser55 (Wang *et al.*, 2007). Cette sérine n'est pas phosphorylée mais la *O*-GlcNAc pourrait réguler la phosphorylation de la Ser56 et jouer un rôle dans la polymérisation de la protéine. De manière surprenante, les auteurs ont également observé une diminution de la *O*-GlcNAc pour d'autres protéines ce qui suggère que les deux modifications ne sont pas toujours antagonistes mais peuvent être synergiques ajoutant un niveau supplémentaire de complexité qui reste à clarifier **(Figure 35D)**.

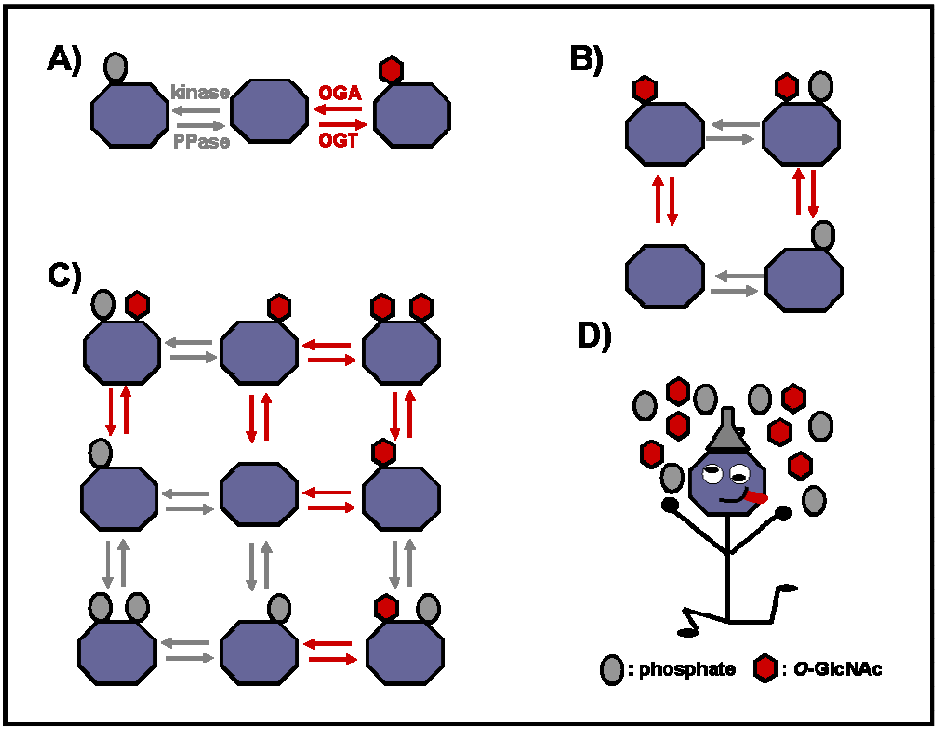


Figure 35 : complexité de la relation *O*-GlcNAc/phosphorylation.
A) compétition sur un même résidu, Théorie du « YinYang » **B)** compétition ou co-existence sur des résidus adjacents. **C)** présence des 2 types de relation (A + B) sur la même protéine. **D)** accroissement de la complexité avec le nombre de sites pouvant être modifiés ainsi qu'une synergie d'action des deux PTM.

© 2009 Tous droits réservés.

2) Modulation des interactions protéine-protéine par la *O*-GlcNAc.

Si l'on considère la différence de charge existant entre un groupement phosphate (anionique) et le résidu de GlcNAc (neutre), il est aisé de penser qu'une protéine selon la PTM portée adoptera une conformation différente et interagira avec des partenaires différents. Le facteur de transcription Sp1 possède un domaine de transactivation de type *« glutamine rich »*. Ce domaine est important pour l'association entre Sp1 et TAF110 (*« TATA- binding-protein associated factor110 »*) et holo-Sp1. Roos *et al.* ont montré que le domaine de transactivation de Sp1 est *O*-GlcNAc et par des expériences de mutagénèse dirigée les auteurs ont prouvé que la *O*-GlcNAc empêche l'association de Sp1 avec ces deux partenaires (Roos *et al.*, 1997). D'autres facteurs de transcription semblent être régulés de la même façon : la *O*-GlcNAcylation de CREB (*« C-AMP Responsive Element-Binding protein »*) abolit son interaction avec $TAF_{II}130$ (Lamarre-Vincent *et al.*, 2003), la forme glycosylée de YY1 (YinYang-1) n'interagit plus avec la protéine du rétinoblastome (pRb) (Hiromura *et al.*, 2003). A l'inverse, seule la forme glycosylée de STAT5 (*« signal transducer and activator of transcription 5 »*) se lie à CBP (*« CREB-binding protein »*) (Gewinner *et al.*, 2004). Le résidu de *O*-GlcNAc porté par une protéine peut être reconnu spécifiquement par certaines autres protéines. L'existence d'une telle activité de type lectinique a été mis en évidence chez la famille des protéines de choc thermique de 70 kDa : Hsc70 (Lefebvre *et al.*, 2001) et Hsp70 (Guinez *et al.*, 2004). L'activité lectinique d'Hsp70 varie selon l'état nutritionnel de la cellule (Guinez *et al.*, 2006) et peut être induit par différents stress cellulaires, l'inhibition du protéasome ou encore le mauvais repliement protéique (Guinez *et al.*, 2007).

3) Influence de la *O*-GlcNAc sur la localisation subcellulaire des protéines

Plusieurs observations ont conduit à émettre l'hypothèse selon laquelle la *O*-GlcNAc joue un rôle dans la localisation nucléaire des protéines soit en constituant un nouveau signal de localisation nucléaire (autre que la séquence NLS d'adressage au noyau) soit en permettant une rétention nucléaire de la protéine. Cependant, les mécanismes exacts ne sont pas connus et restent controversés.

Des premières études ont mis en évidence que plusieurs nucléoporines, protéines associées au complexe du pore nucléaire et indispensables au transport nucléaire, sont *O*-GlcNAcylées (Hanover *et al.*, 1987 ; Holt *et al.*, 1987 ; Snow *et al.*, 1987 ; Park *et al.*, 1987)

© 2009 Tous droits réservés.

et que la WGA (*« Wheat Germ Agglutinin »*, lectine reconnaissant les résidus de *O*-GlcNAc) provoque une inhibition du transport nucléaire en liant les résidus de *O*-GlcNAc des nucléoporines (Finlay *et al.*, 1987). Cependant, cette inhibition de transport par la WGA a été attribuée par la suite à un encombrement stérique provoqué par la lectine plutôt qu'à un effet réellement imputée à la *O*-GlcNAc même (Miller et Hanover, 1994).

D'autres études ont montré, notamment pour certains facteurs de transcription, que la forme nucléaire est préférentiellement *O*-GlcNAc. C'est le cas pour c-myc (Kamemura *et al.*, 2002), Stat5A (Gewinner *et al.*, 2004 ; Nanashima *et al.*, 2005), Pax-6 (Lefebvre *et al.*, 2002), Elf-1 (Juang *et al.*, 2002), Sp1 (Dauphinée *et al.*, 2005 ; Majumdar *et al.*, 2006) et Neuro-D1 (Andrali *et al.*, 2007). De plus, des expériences de modulations des niveaux de *O*-GlcNAc intracellulaires ont conforté le rôle de la *O*-GlcNAc dans la localisation nucléaire. Dans des cellules neuronales, l'acide okadaïque, un inhibiteur de phosphatases provoque une hyperphosphorylation de tau associée à une diminution de sa *O*-GlcNAc et de sa localisation nucléaire (Lefebvre *et al.*, 2003). Le « knock-down » de l'OGT par la technique de l'ARN interférent (RNAi) dans des cellules de lymphome entraîne une relocalisation de Sp1 dans le cytosol (Dauphinée *et al.*, 2005). Dans des cellules de souris MIN6, une translocation nucléaire de NeuroD1 a été observée suite à un traitement des cellules par le glucose ou après inhibition de la *O*-GlcNAcase par le PUGNAc tandis que le « knock-down » de l'OGT par RNAi empêche cette translocation (Andrali *et al.*, 2007). Gandy *et al.* ont montré que la serine/thréonine kinase Akt1 est *O*-GlcNAc dans des cellules de neuroblastome et que le PUGNAc provoque une accumulation nucléaire de l'enzyme (Gandy *et al.*, 2006). Cependant, le « knock-out » de l'OGT chez *C. elegans* ne semble pas affecter le transport nucléaire (Hanover *et al.*, 2005). Enfin, il existe des exemples où la *O*-GlcNAc favorise la forme cytosolique de certaines protéines, c'est le cas de la β-caténine (Sayat *et al.*, 2008)

4) La *O*-GlcNAc, protectrice de la dégradation protéasomale ?

La protéolyse est un processus essentiel pour la fonction et la viabilité des cellules. Le principal mécanisme de dégradation des protéines est assuré par le système de l'ubiquitine-protéasome (UPS, *« Ubiquitin-Proteasome-System »*) **(Figure 36)**. L'UPS assure la dégradation des protéines mal conformées, oxydées, mutées ou endommagées et joue un rôle clé dans le contrôle des niveaux intracellulaires de nombreuses protéines impliquées notamment dans le cycle cellulaire (les cyclines), la transcription, l'apoptose ou la réponse immunitaire. L'un des mécanismes permettant d'adresser une protéine vers la dégradation

© 2009 Tous droits réservés.

protéasomale repose sur la présence d'une séquence spécifique appelée PEST, région riche en résidus de Pro (P), Glu (E), Ser (S) et Thr (T), activée le plus souvent par phosphorylation. D'autres séquences également activables par phosphorylation, comme la boîte de destruction (D-box, *« destruction box »*) ou la KEN-box, dirigent les protéines vers cette voie de dégradation. Les protéines ainsi étiquetées pour la dégradation sont alors modifiées par une chaine de polyubiquitine *via* un processus enzymatique en trois étapes impliquant successivement une enzyme d'activation de l'ubiquitine (E1), une enzyme de conjugaison de l'ubiquitine (E2) puis une ubiquitine ligase (E3) qui transfert le résidu d'ubiquitine activé sur la protéine cible. La protéine cible alors polyubiquitinylée se dirige vers le protéasome 26S où elle perdra sa conformation puis sera dégradée en peptides de 3 à 22 acides aminés.

La *O*-GlcNAc altère la dégradation des protéines à deux niveaux : en augmentant la demi-vie des protéines et en inhibant l'activité du protéasome **(Figure 36)**. Une régulation de la voie de l'ubiquitinylation par la *O*-GlcNAc vient également d'être mise en évidence.

a) La O-*GlcNAc augmente la demi-vie des protéines.*

Le facteur de transcription Sp1 sous sa forme hypoglycosylé (suite à une carence en sérum) est rapidement dégradé par le protéasome. En revanche, le traitement des cellules au glucose ou à la glucosamine induit une hyperglycosylation de Sp1 associée à une protection de la protéine contre la dégradation (Han et Kudlow, 1997). Récemment, une autre étude a démontré dans des fibroblastes humains, qu'un traitement à la nicotinamide induisait une diminution de la *O*-GlcNAc de Sp1 et une augmentation de sa dégradation (Lee *et al.*, 2008).

Une régulation de la demi-vie du récepteur aux oestrogènes bêta murin (mERβ) par la balance phospho/*O*-GlcNAc a été suggérée. En effet, le mERβ peut être alternativement *O*-GlcNAcylé ou phosphorylé sur la Ser16, résidu localisé dans une séquence PEST (Cheng *et al.*, 2000). La mutation de cette sérine en acide glutamique, qui mime une forme constitutivement phosphorylée, est plus vite dégradée alors qu'un autre mutant de cette sérine non phosphorylable possède une durée de vie plus longue (Cheng et Hart, 2001).

La plakoglobine est *O*-GlcNAcylé sur la Thr14, résidu proche de sa D-box dont la phosphorylation induit la dégradation. De la même manière que pour le récepteur aux oestrogènes, la mutation de la Thr14 en un résidu non phosphorylable conduit à une forme plus stable (Hatsell *et al.*, 2003).

© 2009 Tous droits réservés.

Il a également été montré que la *O*-GlcNAc de p53 sur la Ser149 diminue la phosphorylation de la Thr55 par le COP9 signalosome provoquant ainsi une diminution de l'ubiquitinylation de la protéine (Yang *et al.*, 2006).

b) Le protéasome est lui même O-*GlcNAc.*

Sümegi *et al.* ont démontré que le protéasome 26S de drosophile est *O*-GlcNAc à la fois dans sa partie catalytique 20S (9 protéines sur 14 sont *O*-GlcNAc) et sa partie régulatrice 19S (5 protéines sur 19 sont *O*-GlcNAc) (Sümegi *et al.*, 2003). Ces résultats ont été confirmés chez les mammifères (Zhang *et al.*, 2003). Dans cette étude, les auteurs ont pu mettre en évidence une corrélation entre *O*-GlcNAc et activité du protéasome : 1) *in vitro*, la *O*-GlcNAcylation du protéasome diminue la dégradation en affectant l'activité ATPasique de la sous-unité 19S en particulier l'ATPase Rpt2 et en inhibant l'activité peptidase de la sous-unité 20S de lapin ; 2) le « knock-down » de l'OGT par RNAi entraîne une augmentation de l'activité du protéasome dans des cellules NRK alors que 3) la *O*-GlcNAcase active le protéasome dans des extraits nucléaires de ces cellules.

*c) Relation Ubiquitine/*O-*GlcNAc.*

Ce point a fait l'objet d'une publication, jointe en annexe : Guinez C, Mir AM, **Dehennaut V**, Cacan R, Harduin-Lepers A, Michalski JC, Lefebvre T. (2008). « Protein ubiquitination is modulated by O-GlcNAc glycosylation » *FASEB J.* 22(8):2901-11

Dans cette étude, notre équipe a démontré que l'augmentation des niveaux de *O*-GlcNAc dans des cellules HeLa et HepG2 (par un traitement à la glucosamine ou au PUGNAc) est associé à une augmentation de l'ubiquitinylation tandis qu'une diminution de la *O*-GlcNAc (par la déprivation des cellules en glucose, traitement à la forskoline ou RNAi sur l'OGT) provoque une diminution concomitante de l'ubiquitine. Nous avons également démontré qu'E1 était *O*-GlcNAc. Ces résultats suggèrent que la *O*-GlcNAc, dans certaines conditions, pourrait favoriser la dégradation protéique par déclenchement de la voie de l'ubiquitine-protéasome, *via* notamment la glycosylation de E1.

© 2009 Tous droits réservés.

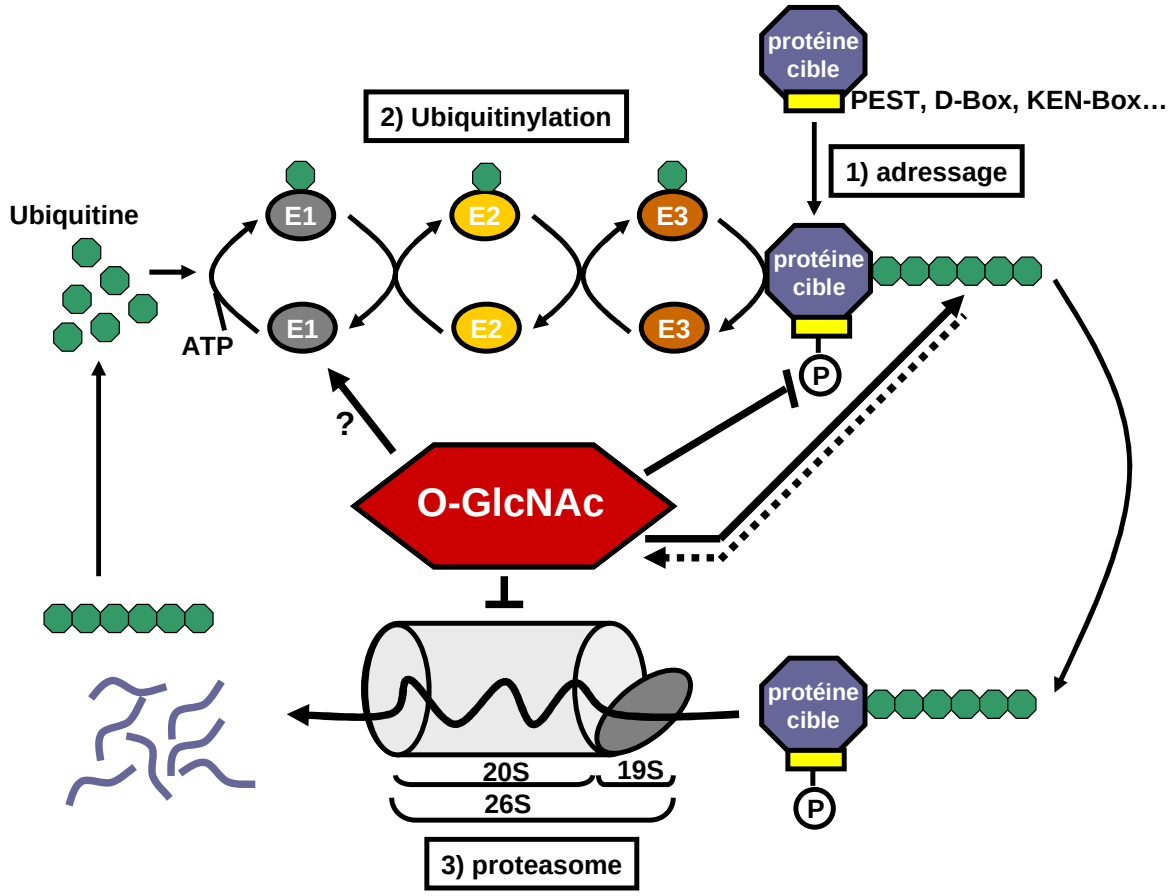


Figure 36 : régulation du système Ubiquitine-Protéasome par la *O*-GlcNAc.
La *O*-GlcNAc régule la dégradation des protéines à différents niveaux : 1°/ Elle peut empêcher la phosphorylation des protéines sur des séquences particulières d'adressage au protéasome (rectangle jaune). 2°/ La *O*-GlcNAcylation des sous-unités 20S et 19S du protéasome est inhibitrice. 3°/ La *O*-GlcNAc régulerait la voie de l'ubiquitinylation et *vice versa* peut-être *via* la *O*-GlcNAcylation de E1, l'enzyme d'activation de l'ubiquitine.

5) Régulation de la transcription par la *O*-GlcNAc.

L'ARN polymérase II ainsi que de nombreux facteurs de transcription sont *O*-GlcNAc **(Tableau III).** Comme nous l'avons précédemment mentionné, pour beaucoup d'entre eux, la *O*-GlcNAc est associée à une modification des interactions avec leurs partenaires, à une relocalisation nucléaire de la protéine et peut également altérer leur dégradation. Ainsi la *O*-GlcNAc peut réguler (positivement ou négativement) l'activité transcriptionnelle de manière plus ou moins directe et à plusieurs niveaux, le tout dépendant du promoteur impliqué et des partenaires associés.

Prenons le cas du facteur de transcription Sp1 qui reste à ce jour la protéine pour laquelle les rôles de la *O*-GlcNAc ont été les plus étudiés. Sp1 est impliqué dans la régulation de la transcription de nombreux gènes domestiques mais est également activé au cours de divers processus comme le cycle cellulaire, l'apoptose, la différentiation ou la réponse

© 2009 Tous droits réservés.

immunitaire et possède donc de nombreux gènes cibles. Sa glycosylation a de multiples effets sur son activité transcriptionnelle. La *O*-GlcNAc va avoir des effets différents selon la localisation du site modifié, le type cellulaire considéré, le gène cible impliqué. Ces fonctions sont résumées dans le **Tableau IV.**

Tableau IV : influence de la *O*-GlcNAc sur l'activité transcriptionnelle de Sp1.

Conditions experimentales	Effet de la *O*-GlcNAc	Références
La O-GlcNAc favorise l'activité transcriptionnelle de Sp1		
Système de transcription *in vitro* (Sp1 purifié)	Forme glycosylée 3 à 5 fois plus active que la forme non glycosylée	Jackson et Tijan, 1988
Cellules NRK (rein de rat) Déprivation en glucose	Sp1 hypoglycosylé plus susceptible à la dégradation protéasomale	Han et Kudlow, 1997
Cellules hépatiques, stimulation à l'insuline	*O*-GlcNAc nécessaire à la translocation de Sp1 dans le noyau pour la transcription du gène de la calmoduline	Majumdar *et al.*, 2006 Majumdar *et al.*, 2003
Mutant de phosphorylation (Ser59) transfecté en cellules COS7 (mime le cas de cellules interphasiques)	corrélé à une augmentation de *O*-GlcNAc sur d'autres résidus et à une association à la chromatine	Vicart *et al.*, 2006
Cellules mésangiales Perturbation des niveaux de *O*-GlcNAc	Sp1-*O*-GlcNAc active la transcription du gène PAI-1 (« *plasminogen activator inhibitor 1* »)	Goldberg *et al.*, 2006
La O-GlcNAc réprime l'activité transcriptionnelle de Sp1		
in vitro sur peptide (domaine de transactivation)	Peptide-*O*-GlcNAc n'interagit plus avec TAF110	Roos *et al.*, 1997
Cellules HeLa: mutation du site de glycosylation du domaine de transactivation	Transcription plus accrue	
Sp1 chimérique (domaine de transactivation) *in vitro* et *in vivo*	*O*-GlcNAc bloque l'activité transcriptionnelle	Yang *et al.*, 2001
cellules HepG2, surexpression OGT	Inhibe l'activité transcriptionnelle de Sp1 endogène	
Cellules COS7, transfection OGT/mSin3A	Diminution de l'activité transcriptionnelle de Sp1	Yang *et al.*, 2002
Cellules de cancer du sein, « knock-down » de la glutaminase (voie HBP)	Diminution du ratio Sp1-*O*-GlcNAc/Sp1 total associé à une augmentation de la transcritpion	Donadio *et al.*, 2008

Le domaine carboxyterminal (CTD) de l'ARN polymérase II est constitué de 52 répétitions en tandem de la séquence consensus Y-S-P-T-S-P-S. Ce domaine devient intensivement phosphorylé lors de la transition entre initiation de la transcription et élongation. Ce domaine contient également de nombreux résidus de *O*-GlcNAc (Kelly *et al.*, 1993) et les deux PTM s'excluent mutuellement (Comer et Hart, 2001). Il semblerait que la

© 2009 Tous droits réservés.

O-GlcNAc permettrait de garder l'enzyme en phase d'initiation.La déglycosylation suivie d'une phosphorylation permettrait ensuite le passage en phase d'élongation. Cette hypothèse est renforcée par le fait que l'OGT peut former un complexe avec le co-répresseur transcriptionnel mSin3A. Ce complexe recrute alors les histones déacétylases (HDAC) au niveau des promoteurs (Yang *et al.*, 2002). Ce complexe réprimerait donc la transcription d'une part par déacétylation des histones (provoquant ainsi une condensation de la chromatine) et d'autre part par *O*-GlcNAcylation de l'ARN polymérase II et des facteurs de transcription. La *O*-GlcNAcase, à l'inverse, pourrait donc favoriser la transcription dans le sens où elle viendrait contrecarrer l'effet de l'OGT mais aussi, *via* son activité histone acétyltransférase (HAT) (Toleman *et al.*, 2004), permettrait une décondensation de la chromatine. D'ailleurs, il a été décrit que l'OGT et la *O*-GlcNAcase pouvaient faire partie d'un complexe unique appelé le *O*-GlcNAczyme (Whisenhunt *et al.*, 2006).

6) Rôle de la *O*-GlcNAc dans la réponse au stress.

a) La O-GlcNAc, un senseur du stress cellulaire.

Une des premières réponses de la cellule face au stress (nutritionnel, osmotique, alcoolique, oxydatif, thermique) consiste en une modulation rapide des niveaux de *O*-GlcNAc favorisant la survie cellulaire. Selon le type de stress et le type cellulaire considéré, il a été observé, soit une augmentation de la *O*-GlcNAc, soit une diminution (Zachara *et al.*, 2004 ; Sohn *et al.*, 2004 ; Guinez *et al.*, 2004, 2006, 2007) suggérant de multiples rôles de la *O*-GlcNAc dans la résistance au stress. Par exemple, dans des cellules COS7, CHO ou Hep3b, le stress thermique provoque une augmentation des niveaux de *O*-GlcNAc (Zachara *et al.*, 2004) alors qu'il est associé à une diminution de la glycosylation dans des cellules HeLa ou HepG2 (Guinez *et al.*, 2007). La déprivation des cellules en glucose augmente les niveaux de *O*-GlcNAc dans les cellules HeLa alors qu'elle la diminue dans les cellules HepG2 (Guinez *et al.*, 2006, 2007).

La diminution des niveaux de *O*-GlcNAc par inhibition de l'OGT (« knock-out » ou RNAi) ou par blocage de la voie HBP sensibilise la cellule au stress (Zachara *et al.*, 2004 ; Sohn *et al.*, 2004). A l'inverse, l'augmentation des niveaux de *O*-GlcNAc par surexpression de l'OGT ou inhibition de la *O*-GlcNAcase rend les cellules plus thermo-résistantes (Zachara *et al.*, 2004). Dans cette étude, les auteurs ont également démontré une induction de l'expression et une augmentation de la stabilité des protéines de choc thermiques Hsp40 et

© 2009 Tous droits réservés.

Hsp70. Suite à un stress, de nombreuses protéines adoptent une mauvaise conformation (potentiellement toxique pour la cellule) et exposent alors des segments hydrophobes à la surface aboutissant à une agrégation des protéines qui peut conduire à la mort cellulaire. Les protéines de choc thermique agissent dans ces conditions comme des chaperons moléculaires aidant à la remise en conformation des protéines. Si cette tentative échoue, les Hsp dirigent la protéine vers la dégradation protéasomale. Guinez *et al.* ont montré que de nombreux types de stress étaient à l'origine d'une augmentation de l'activité lectinique d'Hsp70 envers les résidus de *O*-GlcNAc (Guinez *et al.*, 2004, 2006, 2007) et que cette activité était particulièrement forte après traitement des cellules par des analogues d'acides aminés (provoquant une mauvaise conformation des protéines) ou suite à l'inhibition du protéasome (Guinez *et al.*, 2007). Ces études tendent à démontrer que, lors d'un stress, les protéines mal conformées seraient glycosylées, ainsi reconnues par Hsp70 qui pourrait dès lors jouer son rôle de chaperon moléculaire.

b) la O-*GlcNAc, un puissant cardioprotecteur.*

Depuis deux ans, une série de travaux a démontré un rôle majeur de la *O*-GlcNAc dans la capacité du système cardiovasculaire à faire face à divers traumatismes comme l'ischémie-reperfusion (I/R), le traumatisme hémorragique (TH) ou la destruction de l'endothélium des vaisseaux sanguins.

α. cas de l'ischémie-reperfusion (I/R).

L'ischémie correspond à une diminution de l'apport sanguin dans les organes provoquant une baisse d'oxygénation des tissus et des apports en nutriments. La reperfusion constitue le retour du sang vers les organes ischémiques. Lorsque la circulation reprend, plutôt qu'une restauration des fonctions normales, il peut se produire une réaction inflammatoire et un stress oxydatif à l'origine de l'apoptose des cellules. Il a été montré sur des cœurs isolés de rat, qu'un prétraitement à la glutamine ou à la glucosamine avant l'induction d'une I/R induisait une augmentation des niveaux de *O*-GlcNAc associée à un meilleur recouvrement des fonctions cardiaques (Liu *et al.*, 2006 ; Liu *et al.*, 2007a ; Fülop *et al.*, 2007). A l'inverse, un prétraitement à l'alloxane ou à l'azaserine (inhibiteur de la GFAT) entraîne une diminution de la *O*-GlcNAc et réverse la protection (Liu *et al.*, 2006 ; Liu *et al.*, 2007a). Dans ces modèles, la protection apportée par la *O*-GlcNAc régulerait la phosphorylation de la kinase

© 2009 Tous droits réservés.

p38MAPK normalement induite suite à l'ischémie (Fülop *et al.*, 2007). Liu *et al.* ont également testé les bénéfices d'un traitement à la glucosamine ou au PUGNAc, pendant la reperfusion (Liu *et al.*, 2007b). Dans ces conditions, la *O*-GlcNAc ainsi que le recouvrement des fonctions cardiaques augmentent. Dans cette étude, les auteurs ont observé une diminution du taux de troponine, une diminution de la protéolyse par la calpaïne de l'alpha-fodrine et de la calmoduline kinase II (CaMKII) suggérant que la *O*-GlcNAc agirait *via* une inhibition de la réponse au stress contrôlée par le calcium. Des résultats similaires ont été obtenus sur des myocytes ventriculaires de rats néonataux. Le prétraitement des cellules au glucose, à la glucosamine ou au PUGNAc provoquent une augmentation de la *O*-GlcNAc et de la viabilité cellulaire corrélée à une diminution de l'apoptose et de l'activation de la calcineurine tandis que l'alloxane exacerbe les effets de l'I/R (Champattanachai *et al.*, 2007). La surexpression de l'OGT dans ces myocytes diminue le traumatisme de l'I/R fournissant une preuve directe du rôle de la *O*-GlcNAc dans la cardioprotection (Champattanachai *et al.*, 2008). Dans cette étude l'élévation du taux de *O*-GlcNAc a été corrélée à une diminution de la perte du cytochrome C, de la perte du potentiel mitochondrial et une augmentation du facteur anti-apoptotique Bcl-2 suggérant un contrôle de l'apoptose par la glycosylation.

β. Cas du traumatisme hémorragique (TH).

Les effets bénéfiques de la *O*-GlcNAc ont été testés chez le rat après induction d'un traumatisme hémorragique (comme par exemple le retrait de 55% du volume sanguin) suivi ou non d'un replacement de fluide. L'administration de glucosamine ou de PUGNAc pendant le replacement de fluide améliore le recouvrement des fonctions cardiaques mais aussi la reperfusion d'autres organes comme le cerveau, le foie et les reins dans lesquels le niveau de *O*-GlcNAc augmente (Yang *et al.*, 2006 ; Zou *et al.*, 2007). L'augmentation des niveaux de *O*-GlcNAc dans ces études est corrélé à une diminution de l'expression des cytokines inflammatoires IL-6 et TNFα. Les mêmes effets bénéfiques de la glucosamine sur les niveaux de *O*-GlcNAc et la survie ont été observés lors de TH non suivi de replacement de fluide (Nöt *et al.*, 2007).

© 2009 Tous droits réservés.

χ. Cas de la destruction de l'endothélium.

Chez le rat, un traumatisme de l'artère carotide induit rapidement une diminution des niveaux de *O*-GlcNAc ainsi qu'une augmentation de facteurs pro-inflammatoires (Xing *et al.*, 2008). L'injection par intraveineuse de glucosamine ou de PUGNAc avant le traumatisme provoque une augmentation des niveaux de *O*-GlcNAc et diminue la réponse inflammatoire.

7) *O*-GlcNAc et développement.

Le « knock-out » de l'OGT chez la souris est létal pour l'embryon et les cellules souches embryonnaires (Shafi *et al.*, 2000). De même, des techniques de « knock-out » conditionnel de l'OGT ont également provoqué la mort de l'embryon 4 à 5 jours après l'implantation (O'Donnel *et al.*, 2004). Ces études prouvent le rôle essentiel des phénomènes de *O*-GlcNAcylation au cours du développement embryonnaire. Le rôle vital de la *O*-GlcNAc a également été suggéré chez la souris par des études d'invalidation de gène codant des enzymes de la voie HBP, fournisseur de l'UDP-GlcNAc. Le « knock-out » de Emeg32 entraîne un retard de développement des embryons suivis de leur mort 7,5 jours post-fécondation (Boehmelt *et al.*, 2000b). Dans cette étude, les auteurs ont montré que les niveaux de *O*-GlcNAc étaient fortement diminués dans des fibroblastes embryonnaires Emeg32$^{-/-}$ alors que la *N*-Glycosylation était normale. Le « knock-out » de la phosphoglucomutase 3 (Pgm3) qui assure l'interconversion entre la GlcNAc6P et la GlcNAc1P **(Figure 33)** provoque une diminution des niveaux d'UDP-GlcNAc et la mort des embryons avant l'implantation (Greig *et al.*, 2007). Les souris pour lesquelles la Pgm3 est présente à des niveaux plus faibles sont stériles et présentent de graves défauts d'hématopoïèse qui ont été corrélés à une diminution des niveaux de *O*-GlcNAc dans les cellules sanguines. En revanche, de manière intrigante, le « knock-out » de l'OGT et de la *O*-GlcNAcase chez *C. elegans*, ne semble pas affecter les processus de développement (Hanover *et al.*, 2005; Forsythe *et al.*, 2006) mais dans ces études l'allèle considéré comme nul pour l'OGT code une OGT tronquée uniquement dans son domaine « linker » et donc potentiellement active même si les auteurs affirment qu'un tel ARNm aberrant ne serait pas traduit.

Chez le poisson zèbre *Danio rerio*, six variants d'épissage de la zOGT ont été retrouvés (var1-6). Ces variants sont régulés d'un point de vue transcriptionnel au cours de l'embryogenèse précoce notamment lors de la mise en place des mouvements

© 2009 Tous droits réservés.

morphogénétiques (Sohn et Do, 2005). En effet, var 1 et 2 disparaissent à ce stade alors que l'expression de var 3 et 4 augmente.

8) *O*-GlcNAc et cycle cellulaire.

Une implication de la *O*-GlcNAc dans la régulation du cycle cellulaire a d'abord été suggérée au cours de l'activation de lymphocytes T ou de cellules-T hybrides par des facteurs mitogènes (Kearse et Hart, 1991b). Les auteurs ont observé une augmentation rapide et transitoire de la *O*-GlcNAc pour plusieurs protéines nucléaires et une diminution pour certaines protéines cytosoliques.

L'activité du facteur de transcription Sp1 est régulée de manière cycle-dépendante essentiellement par des mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation. Par exemple, en phase G1, la phosphorylation de Sp1 stimule la transcription de la dihydrofolate réductase (Grinstein *et al.*, 2002) et sa phosphorylation en phase G2 par le complexe cdk2/cyclinA stimule la transcription de la phosphocholine-cytidyltransférase (CTP) α (Banchio *et al.*, 2006). Dans différents types cellulaires incluant des lymphocytes T primaires humains, des firoblastes (lignée NIH-3T3) ainsi que plusieurs lignées de cellules tumorales mammaires et pancréatiques, il a été montré que durant l'interphase des cellules (G1/S/G2), Sp1 est la cible d'une déphosphorylation par la phosphatase PP2A tandis qu'une phosphorylation de la protéine associée à une diminution de sa fixation à l'ADN se produit dans des cellules mitotiques (Vicart *et al.*, 2006 ; Lacroix *et al.*, 2002). Les auteurs ont pu identifier la Ser59 comme étant la cible de PP2A et de manière intrigante, ils ont prouvé que l'état de phosphorylation de ce résidu contrôle l'état de phosphorylation et de *O*-GlcNAc d'autres résidus. Ces résidus pourraient être localisés dans le domaine de fixation à l'ADN pour empêcher la fixation de Sp1 sur la chromatine condensée au cours de la mitose (Vicart *et al.*, 2006).

L'hypothèse d'une implication de la *O*-GlcNAc dans la division cellulaire a été renforcée par plusieurs travaux démontrant qu'une perturbation du bon déroulement du cycle était associé à un changement de *O*-GlcNAcylation et *vice versa* que la perturbation de la dynamique de la *O*-GlcNAc influence la progression du cycle.

Dans une lignée de cellules coliques humaines (cellules HT29), l'arrêt du cycle cellulaire à la transition G2/M provoquée par la colcémide ou par des agents déstabilisateurs des microtubules comme le nocodazole ou l'acide okadaïque entraîne une augmentation de la *O*-GlcNAcylation des cytokératines K8 et K18 (Haltiwanger et Philipsberg, 1997 ; Chou et

© 2009 Tous droits réservés.

Omary 1994, 1993). Cette glycosylation diminue si le blocage est levé et elle n'est pas provoquée suite à la synchronisation des cellules en phase S par l'aphidicholine (Chou et Omary 1994, 1993).

Chez le Xénope, la substitution (« capping ») des résidus de *O*-GlcNAc par la micro-injection de galactosyltransférase (modifiant les résidus de *O*-GlcNAc en N-acétyllactosamine pouvant ainsi perturber l'hydrolyse du résidu de *O*-GlcNAc ou les interactions protéine-protéine) inhibe l'entrée en phase M des ovocytes (Fang et Miller, 2001). *In vitro*, ce « capping » empêche la formation des asters et également la transition de la phase M vers la phase S attestée par l'absence d'une décondensation de la chromatine et de reformation de l'enveloppe nucléaire.

Il a été démontré que la glucosamine-6-phosphate acétyltransférase Emeg32 **(Figure 33)**, s'accumule à la transition G2/M et peut être co-purifiée dans des cellules d'insectes avec p97/VCP, une AAA-ATPase impliquée dans la reformation de l'appareil de Golgi à partir des amas mitotiques golgiens (Boehmelt *et al.*, 2000a ; Rabouille *et al.*, 1995). L'invalidation de Emeg32 dans des fibroblastes embryonnaires de souris conduit à une diminution des niveaux d'UDP-GlcNAc et de *O*-GlcNAc associés à une diminution de la prolifération cellulaire (Boehmelt *et al.*, 2000b). Cette chute de prolifération n'est pas due à une augmentation de l'apoptose des cellules et peut être prévenue par une réintroduction de l'enzyme dans les cellules ou par un traitement des cellules invalidées à la glucosamine.

L'invalidation de l'OGT dans ce même type cellulaire entraîne une baisse du taux de prolifération concomitante à une augmentation de l'expression de p27, un inhibiteur du cycle cellulaire (O'Donnell *et al.*, 2004).

Récemment, une étude détaillée de la relation entre *O*-GlcNAcylation et cycle cellulaire a été réalisée dans des cellules HeLa et des pré-adipocytes 3T3-L1 (Slawson *et al.*, 2005). Les auteurs ont utilisé le PUGNAc pour inhiber la *O*-GlcNAcase. Ils ont alors observé une progression plus lente des cellules dans le cycle plus particulièrement prononcée à la phase S et à la transition G2/M. A l'inverse, l'inhibition de la GFAT par le DON (6-diazo-5-oxonorleucine) provoque une augmentation des niveaux de *O*-GlcNAc et une progression des cellules plus rapide en phase S et G2/M alors que la phase G1 est retardée. Etonnamment, l'induction d'une augmentation des niveaux de *O*-GlcNAc semble provoquer une augmentation de l'expression de la *O*-GlcNAcase. Inversement, l'expression de l'OGT est plus élevée dans les cellules traitées au DON. Il semblerait donc que la cellule cherche à rétablir un certain équilibre de glycosylation indispensable au bon déroulement du cycle. La surexpression de l'OGT ou de la *O*-GlcNAcase provoque le même effet à savoir un retard

© 2009 Tous droits réservés.

dans la sortie de phase M. Cette observation renforce l'existence d'un tel état d'équilibre et suggère que sa perturbation dans un sens ou dans l'autre est délétère et active les points de contrôle du cycle. Cependant, les mécanismes activés selon que l'on surexprime l'une ou l'autre de ces enzymes semblent être différents. La surexpression de la *O*-GlcNAcase retarde l'apparition des phosphorylations mitotiques et l'expression des cyclines. Au contraire, la surexpression de l'OGT prolonge l'expression des cyclines et ces cellules présentent de graves défauts de cytokinèse entraînant l'apparition d'aneuploïdies. Au cours de la cytokinèse, les auteurs ont observé par microscopie confocale, une très forte concentration de l'OGT au niveau du « midbody ». Cette zone assurant l'individualisation des deux cellules filles consiste en un assemblage de plus de 500 protéines différentes (Skop *et al.*, 2004) où se chevauchent les microtubules émanant des deux pôles du fuseau. On peut donc penser que les niveaux de *O*-GlcNAc de certaines protéines du « midbody » sont essentiels à une cytokinèse correcte. De plus, la même équipe a très récemment mis en évidence l'existence d'un complexe transitoire entre OGT, *O*-GlcNAcase, la kinase Aurora A et la phosphatase PP1 au cours de la phase M (Slawson *et al.*, 2008). Ce complexe s'associerait au midbody et serait à l'origine d'une alternance entre phosphorylation et *O*-GlcNAcylation de la vimentine, une protéine des filaments intermédiaires.

IV. Dérégulation des mécanismes de *O*-GlcNAc et pathologies.

Comme nous venons de le voir, la *O*-GlcNAc intervient à tous les niveaux de la vie cellulaire. Il est donc aisé de penser que des dérégulations des mécanismes de *O*-GlcNAcylation puissent être impliquées dans l'étiologie de certaines pathologies. De nombreuses études tendent à démontrer une telle implication de la glycosylation dans la résistance à l'insuline associée au diabète de type II, les maladies neurodégénératives et le cancer.

1) *O*-GlcNAc, résistance à l'insuline et diabète de type II.

Bien qu'une mauvaise hygiène de vie (sédentarité, mauvaises habitudes alimentaires…) favorisant le surpoids et l'obésité semblent être des facteurs de prédispositions au diabète de type II dont la caractéristique majeure est l'hyperglycémie chronique, le développement de cette maladie reste mal compris.

© 2009 Tous droits réservés.

Produite par le pancréas **(Figure 37A)**, l'insuline a pour mission de réguler le taux de glucose circulant, en favorisant son entrée dans les cellules ainsi que sa conversion en glycogène **(Figure 37B)**. Le diabète de type II résulte en partie du phénomène dit de « résistance à l'insuline » retrouvé dans les cellules béta pancréatiques, le foie, les adipocytes et les muscles squelettiques. Cette résistance à l'insuline se traduit par une inhibition du transport du glucose à l'intérieur des cellules provoquant donc une hyperglycémie et une inhibition de la synthèse du glycogène dans le muscle squelettique, le tissu adipeux et le foie. Dans les stades précoces de la maladie, cette hyperglycémie hyper-stimule le pancréas, qui augmente la sécrétion d'insuline pour maintenir des taux normaux de glucose sanguin. Cependant, au bout d'un certain nombre d'années d'évolution, le pancréas s'épuise provoquant une hyperglycémie chronique. Cette hyperglycémie chronique accentue les phénomènes de perturbation de sécrétion et d'action de l'insuline : on parle alors résistance à l'insuline.

La résistance à l'insuline couplée à la toxicité du glucose est également responsable de complications diabétiques telles que les problèmes cardio-vasculaires, les rétinopathies, les néphropathies ou encore les troubles érectiles.

De nombreuses études ont permis d'établir que la voie HBP représentait le lien entre hyperglycémie et mise en place de la résistance à l'insuline, définissant cette voie comme un senseur nutritionnel. Plusieurs travaux tendent également à démontrer que les variations de flux au travers de la voie HBP se traduisent par des variations des niveaux de *O*-GlcNAc et plus particulièrement des protéines impliquées dans la voie de signalisation de l'insuline.

© 2009 Tous droits réservés.

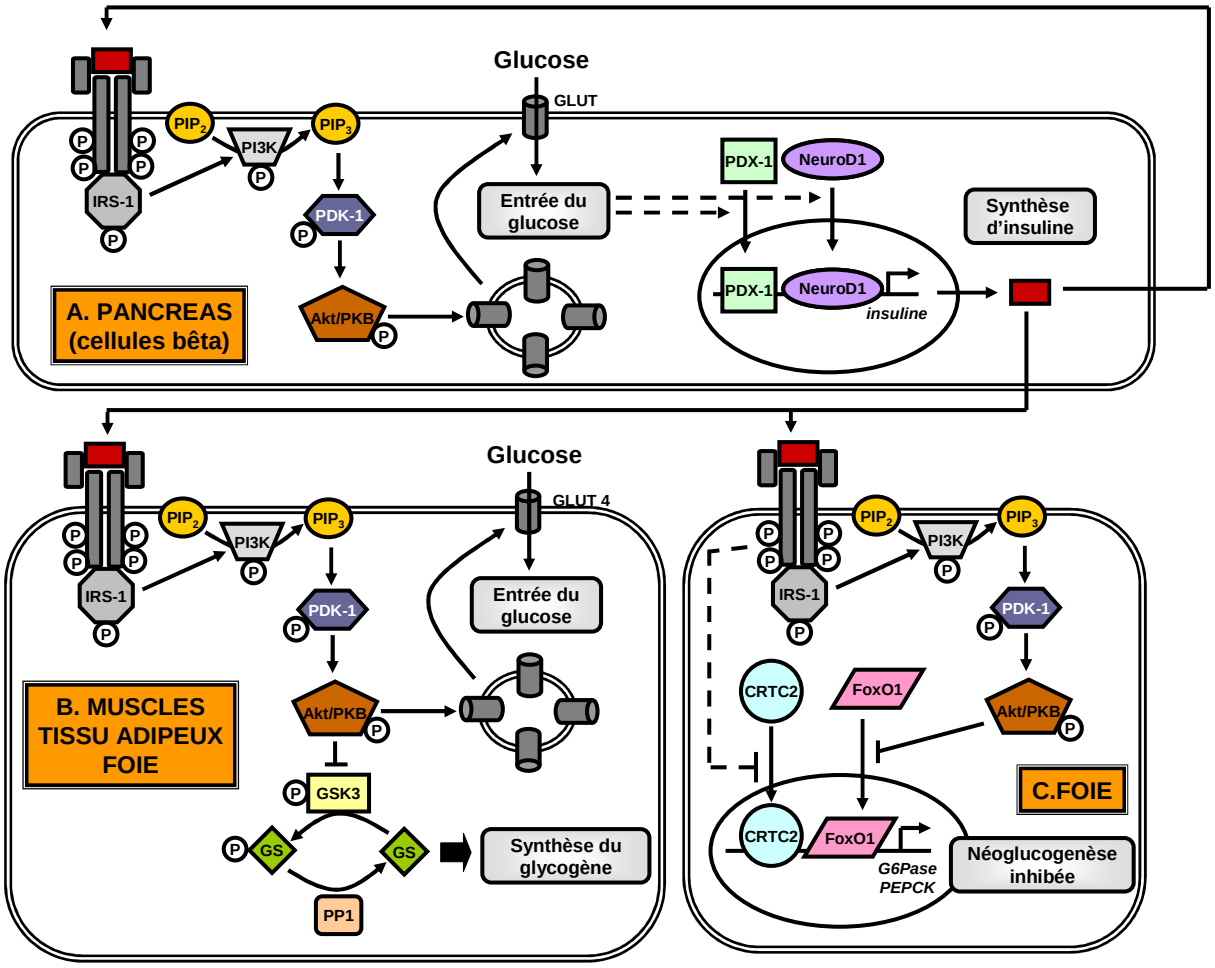


Figure 37 : régulation de la concentration en glucose sanguin par l'insuline.
A. l'augmentation de la concentration en glucose dans le sang stimule la synthèse et la sécrétion de l'insuline dans les îlots pancréatiques. La fixation de l'insuline sur son récepteur provoque son autophosphorylation et le recrutement de la protéine IRS-1 (*« insulin receptor substrate 1 »*). IRS-1 active la PI3K (*« phosphatidylinositol 3 kinase »*) qui transforme le PIP_2 (phosphatidylinositol 4, 5 biphosphate) en PIP_3 (phosphatidylinositol 3, 4, 5 triphosphate). La PDK-1 (*« phosphatidylinositol dependent kinase »*) est alors activée et phosphoryle la protéine kinase B encore appelée Akt. L'activation d'Akt permet la translocation des transporteurs du glucose GLUT4 à la membrane plasmique ce qui favorise donc l'entrée du glucose dans la cellule. Cette augmentation de glucose intracellulaire va provoquer la synthèse d'insuline. **B.** Dans les muscles, le tissu adipeux et le foie, l'activation d'Akt permet également l'entrée du glucose dans la cellule. De plus, une autre cible d'Akt est la GSK3 (*« glycogen synthase kinase 3 »*) qu'elle inhibe favorisant ainsi l'activité de la glycogène synthètase (GS) et donc le stockage du glucose sous forme de glycogène. **C.** Dans le foie, la voie de signalisation de l'insuline inhibe également la néoglucogenèse notamment par séquestration cytoplasmique du facteur de transcription FoxO1 et du co-activateur CRTC2 qui ne peuvent donc pas assurer la transcription des gènes de la Glucose-6-phosphatse (G6Pase) et de la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPKC).
La résistance à l'insuline se caractérise par une incapacité de l'insuline à déclencher sa voie de signalisation et conduit à une hyperglycémie chronique caractéristique du diabète de type II. L'intervention de la voie HBP et de la *O*-GlcNAc dans la mise en place de ces phénomènes est discutée dans le texte.

a) Voie HBP et résistance à l'insuline.

La première preuve d'une implication de la voie HBP dans la résistance à l'insuline a été apportée en 1991 par Marshall et ses collaborateurs. Ces auteurs ont montré que la mise en place de la résistance à l'insuline nécessite trois composants : l'insuline, le glucose et la

© 2009 Tous droits réservés.

glutamine (un des substrats de la GFAT) puisque si l'un de ces composants est absent, aucune résistance à l'insuline n'est observée (Marshall *et al.*, 1991). Dans cette étude, les auteurs ont observé une diminution du transport du glucose dans des adipocytes cultivés en milieu hyperglucosé qui pouvait être restauré en présence de DON un inhibiteur de la GFAT.

Puis, d'autres études ont montré que la glucosamine (qui outrepasse l'action de la GFAT) provoque également une résistance à l'insuline *ex vivo* dans des adipocytes (Marshall *et al.*, 1991 ; Heart *et al.*, 2000) et dans des cellules musculaires squelettiques (Robinson *et al.*, 1993 ; Baron *et al.*, 1995). Dans ces deux types cellulaires, la résistance à l'insuline a pu être corrélée à une diminution de la translocation des transporteurs au glucose GLUT4 de l'intérieur de la cellule vers la surface cellulaire (Baron *et al.*, 1995 ; Heart *et al.*, 2000). *In vivo*, la résistance à l'insuline provoquée par infusion de glucosamine a été corrélée à une augmentation des niveaux d'UDP-GlcNAc dans le foie et les muscles (Rossetti *et al.*, 1995).

La preuve irréfutable de l'implication de la voie HBP dans la résistance à l'insuline fut apportée par une série de travaux démontrant une hyperinsulinémie chez des souris surexprimant la GFAT spécifiquement dans les muscles squelettiques et le tissu adipeux (Hebert *et al.*, 1996), dans les cellules bêta-pancréatiques (Tang *et al.*, 2000) ou dans le foie (Veerababu *et al.*, 2000).

b) Dérégulations des mécanismes de O-*GlcNAc et résistance à l'insuline.*

Très rapidement, il est apparu que la *O*-GlcNAc est au cœur de la mise en place de la résistance à l'insuline engendrée par une augmentation du flux au travers de la voie HBP puisque l'OGT est très sensible aux variations d'UDP-GlcNAc (Kreppel et Hart, 1999). Récemment, une augmentation de l'expression de l'OGT et de la *O*-GlcNAc a été observée dans les îlots pancréatiques de rats diabétiques (Akimoto *et al.*, 2007) confirmant cette hypothèse. De plus, de nombreux travaux ont démontré que la modulation des niveaux de *O*-GlcNAc entraîne l'apparition de résistance à l'insuline. La surexpression de l'OGT spécifiquement dans le muscle et le tissu adipeux ou dans le foie provoque une résistance à l'insuline (McClain *et al.*, 2002 ; Yang *et al.*, 2008). Chez *C.elegans* l'invalidation de l'OGT perturbe la formation de la larve Dauer par un mécanisme impliquant Daf-2, un homologue du récepteur à l'insuline (Hanover *et al.*, 2005) et l'invalidation de la *O*-GlcNAcase est responsable d'un phénotype similaire au diabète de type II humain (Forsythe *et al.*, 2006). L'inhibition de la *O*-GlcNAcase par le PUGNAc induit une résistance à l'insuline dans des

© 2009 Tous droits réservés.

adipocytes (Vosseller *et al.*, 2002) et diminue la sécrétion de l'insuline dans les ilots pancréatiques (Akimoto *et al.*, 2007).

c) O-GlcNAc et voie de signalisation de l'insuline.

Plusieurs protéines intervenant dans la synthèse de l'insuline et dans la voie de signalisation de celle-ci sont modifiées par la *O*-GlcNAc. NeuroD1 et PDX-1 sont deux facteurs de transcription contrôlant la synthèse de l'insuline dans les cellules bêta pancréatiques **(Figure 37A)**. Dans des conditions de glucose élevé, il a été montré que NeuroD1 interagit avec l'OGT et que sa forme glycosylée est nucléaire alors que dans des conditions hypoglucosées, NeuroD1 s'associe à la *O*-GlcNAcase (Andrali *et al.*, 2007). De même, une augmentation de la *O*-GlcNAcylation de PDX-1 associée à une translocation nucléaire et une synthèse d'insuline a été observé lors d'une exposition à des concentrations élévées en glucose (Gao *et al.*, 2003).

Une telle augmentation de *O*-GlcNAc dans des conditions de milieu hyperglucosé a été observée sur la protéine IRS-1 (dans sa parite C-terminale) qui s'associe au récepteur de l'insuline (Ball *et al.*, 2006). Dans des adipocytes primaires de rat, l'inhibition de la *O*-GlcNAcase induit également une augmentation de la *O*-GlcNAc de IRS-1 mais aussi de la protéine kinase Akt2 concomitante à une diminution de la phosphorylation de ces deux protéines et à une diminution du transport des récepteurs GLUT4 à la surface cellulaire (Park *et al.*, 2005). La *O*-GlcNAcylation d'IRS-1 et d'Akt se produit suite à une stimulation à l'insuline, grâce au recrutement de l'OGT à la membrane plasmique par le biais du phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate (PIP_3) et est responsable d'une atténuation de la transduction du signal (Yang *et al.*, 2008).

Enfin, la *O*-GlcNAcylation de la glycogène synthétase empêche son activation par l'insuline (Parker *et al.*, 2003 ; 2004).

d) O-GlcNAc, néoglucogenèse et toxicité du glucose.

Dans des conditions normales, l'insuline inhibe la néoglucogenèse hépatique en faveur de la glycogènogenèse **(Figure 37C)**. Des travaux menés sur FoxO1 et CRTC2, deux protéines impliquées dans la régulation de la gluconéogenèse ont montré que la *O*-GlcNAc pouvait intervenir dans le phénomène de toxicité du glucose. Il a été montré que la *O*-GlcNAcylation de FoxO1 augmentait lors du diabète (Housley *et al.*, 2008). Dans cette étude, les auteurs ont

© 2009 Tous droits réservés.

également prouvé que la Thr317 de FoxO1 est modifiée par la *O*-GlcNAc en réponse au glucose et qu'elle favorise alors, de manière paradoxale, la transcription de gènes impliqués dans la néoglucogenèse comme la phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) et la glucose-6-phosphatase. La transcription de ces deux gènes est également sous le contrôle de TORC2 encore appelé CRTC2 pour *« cAMP CREB responsive co-activator »*. De la même façon, Dentin et ses collaborateurs ont montré que CRTC2 est *O*-GlcNAc sur la Ser70 et la Ser171 dans des conditions hyperglycémiques et que sa glycosylation provoque sa relocalisation nucléaire et la transcription de ses gènes cibles (Dentin *et al.*, 2008).

e) O-GlcNAc et complications associées au diabète.

La *O*-GlcNAc serait également impliquée dans les complications associées au diabète. La surexpression de l'OGT dans des cardiomyocytes provoque une augmentation des niveaux de *O*-GlcNAc et une dérégulation des flux calciques (*via* une diminution de l'expression et de l'activité de SERCA2a une ATPase du réticulum sarcoplasmique dépendante du calcium) associée aux cardiomyopathies diabétiques (Clark *et al.*, 2003). Ce phénotype peut être inversé par expression ectopique de la *O*-GlcNAcase et la surexpression de cette dernière dans le cœur de rat diabétique améliore la signalisation calcique (Hu *et al.*, 2005).

Dans des conditions normales, l'insuline régule l'activité de l'oxyde nitrique synthétase des cellules endothéliales (eNOS) (Zeng *et al.*, 2000). Lors d'hyperglycémie, il a été montré que la fonction de eNOS était perturbée notamment par la *O*-GlcNAc d'autres protéines (Federici *et al.*, 2002). De plus, eNOS est elle même *O*-GlcNAc et sa glycosylation empêche son activation par Akt (Du *et al.*, 2001). La glycosylation de eNOS et a été impliquée dans des problèmes d'érections associées au diabète (Musicki *et al.*, 2005).

2) *O*-GlcNAc et maladies neurodégénératives.

Ce point a fait l'objet d'une revue, jointe en annexe : Lefebvre T, Guinez C, **Dehennaut V**, Beseme-Dekeyser O, Morelle W, Michalski JC. « Does O-GlcNAc play a role in neurodegenerative diseases? » (2005) *Expert Rev Proteomics.* 2, 265-75.

Plusieurs indices suggèrent que la *O*-GlcNAc exerce un rôle dans le développement des neuropathologies. L'OGT et la *O*-GlcNAcase sont particulièrement exprimées dans le cerveau surtout dans les neurones de l'hippocampe et les cellules de Purkinjé (Liu *et al.*, 2004 ;

© 2009 Tous droits réservés.

Akimoto *et al.*, 2003). En outre, les loci du gène de l'OGT et de la *O*-GlcNAcase sont tous deux associés à des maladies neurodégénératives (Shafi *et al.*, 2000 ; Nolte et Muller, 2002 ; Nolte *et al.*, 2003 ; Heckel *et al.*, 1998 ; Gao *et al.*, 2001 ; Myers *et al.*, Science 2000). L'importance de la *O*-GlcNAc dans les neuropathologies a d'abord été pointée lors d'autopsies de cerveaux humains de patients atteints de la maladie d'Alzheimer chez lesquels il a été mis en évidence une diminution des niveaux de *O*-GlcNAc par rapport à des cerveaux de personnes âgées non malades (Yao et Coleman 1998b ; Liu *et al.*, 2004).

Parmi les quelques 600 protéines *O*-GlcNAc identifiées, 80% d'entre elles sont cérébrales et pour la majorité ont un rôle dans le développement des maladies neurodégénératives. Parmi celles-ci nous pouvons citer CRMP-2, la β-synucléine, l'ubiquitine carboxyl hydrolase (UCH) -1 (Cole et Hart, 2001), la synapsine I (Cole et Hart 1999), la synaptopodine, Bassoon (Khidekel *et al.*, 2004) ou encore l'ataxine-10 qui s'associe avec l'OGT dans le cerveau (März *et al.*, 2006). Cependant, la fonction de la glycosylation de ces protéines n'est pas connue. AP-3, une protéine importante pour l'assemblage des vésicules synaptiques est également *O*-GlcNAc (Murphy *et al.*, 1994) et il a été observé une diminution de sa forme glycosylée dans des cerveaux de patients Alzheimer (Yao et Coleman, 1998b).

Une des caractéristiques principales des neuropathies est la formation d'agrégats protéiques constitués de protéines mal conformées. Dans la maladie d'Alzheimer, ces agrégats sont appelés « plaques séniles » et sont majoritairement composés du peptide β-amyloïde. Le peptide β-amyloïde est issu du clivage d'un précurseur, la protéine APP qui est *O*-GlcNAc (Griffith *et al.*, 1995). La protéine Tau (*« Tubulin associated unit »*) contrôle l'assemblage, la stabilité et l'orientation des microtubules axonaux. Dans des conditions pathologiques, Tau est hyperphosphorylée ce qui provoque son agrégation. Il a été montré que Tau peut être modifiée par la *O*-GlcNAc sur plus de 12 sites (Arnold *et al.*, 1996) et il semble que la balance phosphorylation/*O*-GlcNAc soit au cœur de la régulation de sa fonction. Dans une lignée cellulaire de neuroblastome, l'acide okadaïque (un inhibiteur de phosphatases) provoque une hyperphosphorylation de Tau concomitante à une diminution de sa glycosylation et de son transport nucléaire (Lefebvre *et al.*, 2003). La surexpression de l'OGT provoque une diminution de la phosphorylation de Tau (Robertson *et al.*, 2004) alors que chez la souris l'invalidation de l'OGT provoque son hyperphosphorylation similaire à celle observée dans des cas d'Alzheimer (O'Donnell *et al.*, 2004). Même si les sites concernées par cette balance phosphorylation/*O*-GlcNAc ont pu être identifiées (Liu *et al.*, 2004), les rôles

© 2009 Tous droits réservés.

exacts de la *O*-GlcNAcylation de Tau ainsi que les mécanismes par lesquels la *O*-GlcNAc participent à l'étiologie des neuropathologies restent largement incompris.

Une autre caractéristique principale des neuropathologies est un dysfonctionnement du système Ubiquitine-protéasome (UPS) ce qui contribue d'ailleurs à l'agrégation protéique. Etant donné l'implication de la *O*-GlcNAc dans la régulation de l'UPS tel que nous l'avons décrit dans le paragraphe II.4), il est donc fort probable que des dérégulations des mécanismes de *O*-GlcNAc soient associées au dysfonctionnement de l'UPS.

Il a été observé, chez des patients Alzheimer, une diminution de l'entrée du glucose dans les cellules ainsi que des changements dans son métabolisme qui semblent empirer au fur et à mesure de la progression de la maladie (Alexander *et al.*, 2002). On peut donc penser que cette diminution du glucose intracellulaire puisse se répercuter par une chute du flux au travers de la voie HBP qui provoquerait alors une perturbation de la *O*-GlcNAc responsable de la pathologie. Une telle hypothèse a pu être soutenue par des études sur des modèles animaux de souris ou de rats à jeun qui mime la diminution du glucose observé dans la maladie d'Alzheimer (Li *et al.*, 2006; Deng *et al.*, 2008). Dans la première étude, il a été montré une diminution de la *O*-GlcNAcylation de Tau et une augmentation de sa phosphorylation corrélée à une diminution de l'entrée du glucose dans le cerveau (Li *et al.*, 2006). Dans la deuxième étude, les auteurs ont mis en évidence une diminution de la *O*-GlcNAc de la protéine du neurofilament M (NF-M) concomitante à une augmentation de sa phosphorylation et ont confirmé ce résultat directement sur des cerveaux Alzheimer (Deng *et al.*, 2008). Dans le même sens, Cheung et Hart ont montré que la déprivation en glucose de cellules de neuroblastome provoque l'augmentation de la *O*-GlcNAc du neurofilament H associée à une augmentation de sa solubilité et donc de son déssassemblage (Cheung et Hart, 2008).

3) *O*-GlcNAc et cancer.

Un certain nombre de données plaident en faveur de l'implication de la *O*-GlcNAc dans la régulation du cycle cellulaire (cf paragraphe II.8). Les processus de cancérisation résultent majoritairement de pertes de contrôle du cycle cellulaire aboutissant à une prolifération cellulaire anarchique et à l'accumulation de mutations géniques. On peut penser que des dérégulations des mécanismes de *O*-GlcNAc peuvent contribuer à la tumorisation même si peu de choses sont réellement connues. Ainsi, une augmentation de l'activité de la O-GlcNAcase corrélée à une diminution du taux de O-GlcNAc a été observée dans des tumeurs

© 2009 Tous droits réservés.

primaires du sein en comparaison avec du tissu mammaire sein adjacent (Slawson *et al.*, 2001).

De plus, nous avons également détaillé l'importance de la *O*-GlcNAc dans la régulation des processus de transcription (voir paragraphe II.5). Or, plusieurs facteurs de transcriptions oncogènes et supresseurs de tumeurs sont *O*-GlcNAc **(Tableau III)**.

c-Myc peut être phosphorylé ou O-GlcNAc sur le résidu de Thr58, résidu appartenant au domaine de transactivation de la protéine et fréquemment muté dans les lymphomes où cette mutation est corrélée à une forte tumorigénicité (Chou *et al.*, 1995a ; 1995b). Par ailleurs, dans des cellules HL60, c-Myc est préférentiellement phosphorylé dans les cellules proliférantes alors que la déprivation en sérum, provoquant un arrêt de prolifération, entraîne une augmentation de la forme O-glycosylée de l'oncoprotéine (Kamemura *et al.*, 2002).

HIC-1 (Hypermethylated In Cancer 1) possède trois sites majeurs de *O*-GlcNAcylation qui ne semblent pas intervenir dans sa fixation à l'ADN mais qui pourraient contribuer à la dimérisation de la protéine (Lefebvre *et al.*, 2004).

p53, le principal élément régulateur des points de contrôle du cycle cellulaire muté dans 50% des cancers, est également O-GlcNAc. Contrairement à HIC-1, la glycosylation de p53 contribue à sa fixation à l'ADN (Shaw *et al.*, 1996) et en réponse à des dommages à l'ADN causés par la doxorubicine (drogue anticancéreuse, intercalant de l'ADN et inhibiteur de la topoisomérase II), la *O*-GlcNAc favorise la stabilité de p53 et donc son activité (Yang *et al.*, 2006). La topoisomérase I, cible également de nombreuses drogues anticancéreuses et est elle même *O*-GlcNAc. Sa glycosylation est corrélée à une diminution de son activité (Noach *et al.*, 2007).

Dans le foie, la *O*-GlcNAc de FoxO1 favorise la transcription de ses gènes cibles impliqués dans la néoglucogenèse (Housley *et al.*, 2008). Cependant, FoxO1 agit également en tant que suppresseur de tumeur en régulant la transcription de gènes impliqués dans l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire. La phosphorylation de FoxO1 sur la Ser249 par cdk1 (qui est souvent surexprimée en cas de cancer) inhibe l'activité de FoxO1 dans des cellules cancéreuses prostatiques (Liu *et al.*, 2008). Même si la glycosylation de FoxO1 n'a pas encore été impliquée dans son activité anti-tumorale, on peut penser qu'elle pourrait influer sur sa phosphorylation et donc sur son activité.

Enfin, dans une lignée cellulaire cancéreuse mammaire, le « knock-down » de la glutaminase a pu engendrer une chute de 80% de l'activité de la GFAT ainsi qu'une diminution de la *O*-GlcNAc de certaines protéines dont l'OGT, Sp1 ou l'ATPase du

© 2009 Tous droits réservés.

protéasome Rpt2, le tout corrélé à une diminution de 50% du taux de prolifération ainsi qu'à un phénotype plus différencié (Donadio *et al.*, 2008).

La meilleure compréhension de l'implication de la *O*-GlcNAc dans la régulation de la progression normale du cycle cellulaire notamment l'identification des cibles de cette glycosylation pourrait donc permettre de mieux comprendre pourquoi et comment ces processus sont défaillants dans les cellules tumorales et peut être à long terme constituer une cible thérapeutique.

© 2009 Tous droits réservés.

Travaux personnels

© 2009 Tous droits réservés.

http://doc.univ-lille1.fr

PARTIE I

Régulation de la reprise méiotique ovocytaire par la O-GlcNAc

© 2009 Tous droits réservés.

http://doc.univ-lille1.fr

I. Contexte de l'étude.

Avant mon arrivée en « Master 2 Recherche »en septembre 2004, les Pr. Tony Lefebvre, Jean-Pierre Vilain et Jean-François Bodart avaient débuté une collaboration visant à étudier les éventuelles variations de *O*-GlcNAc survenant au cours de la reprise méiotique (transition G2/M) de l'ovocyte de Xénope. En effet, à cette époque, seules quelques études suggéraient que la *O*-GlcNAc jouait un rôle de premier plan dans le déroulement du cycle cellulaire tandis que l'hypothèse de la relation d'antagonisme entre phosphorylation et *O*-GlcNAc était d'ores et déjà bien acceptée. Or, il était connu depuis longtemps que la reprise méiotique ovocytaire s'accompagnait d'une forte augmentation du niveau global de phosphorylation attribuée par la suite à l'activation de nombreuses kinases tels que cdc2, Plx1, PI3K, Plkk1, p39mos, MEK, Erk2, p90Rsk…. De ce fait, l'hypothèse d'une diminution des niveaux de *O*-GlcNAc lors de la transition G2/M a été émise mais nos deux équipes ont démontré avec surprise une augmentation concomitante des niveaux de *O*-GlcNAc et de phosphorylation au cours de ce processus, suggérant une relation plus complexe entre ces deux PTM qu'un simple antagonisme (Lefebvre *et al.*, 2004).

Le sujet qui m'a alors été proposé a été de comprendre la signification biologique de cette augmentation de *O*-GlcNAc au cours de la reprise méiotique.

II. Résultats.

1) L'augmentation du niveau de *O*-GlcNAc est essentielle à la transition G2/M de l'ovocyte de Xénope.

La stratégie utilisée pour étudier l'importance de la *O*-GlcNAc au cours de la reprise méiotique a été de moduler les niveaux de *O*-GlcNAc dans l'ovocyte et de tester l'effet de ces variations sur le déclenchement et la cinétique de la reprise méiotique. Pour cela, nous disposions de plusieurs outils permettant d'inhiber ou de surexprimer l'OGT et la *O*-GlcNAcase dans l'ovocyte. Certains de ces outils, une forme recombinante de l'OGT et un dérivé de benzoxazolinone (XI, inhibiteur de l'OGT), ont pu être obtenus grâce à des collaborations établies respectivement avec l'équipe du Dr. Guy Lippens (UMR-CNRS 8576) et celle du Dr. Suzanne Walker (Harvard Medical School, Boston) (**Figure 38**). Nous avons

© 2009 Tous droits réservés.

également testé l'effet d'une inhibition de la GFAT, l'enzyme clé de la voie de biosynthèse des hexosamines fournissant l'UDP-GlcNAc.

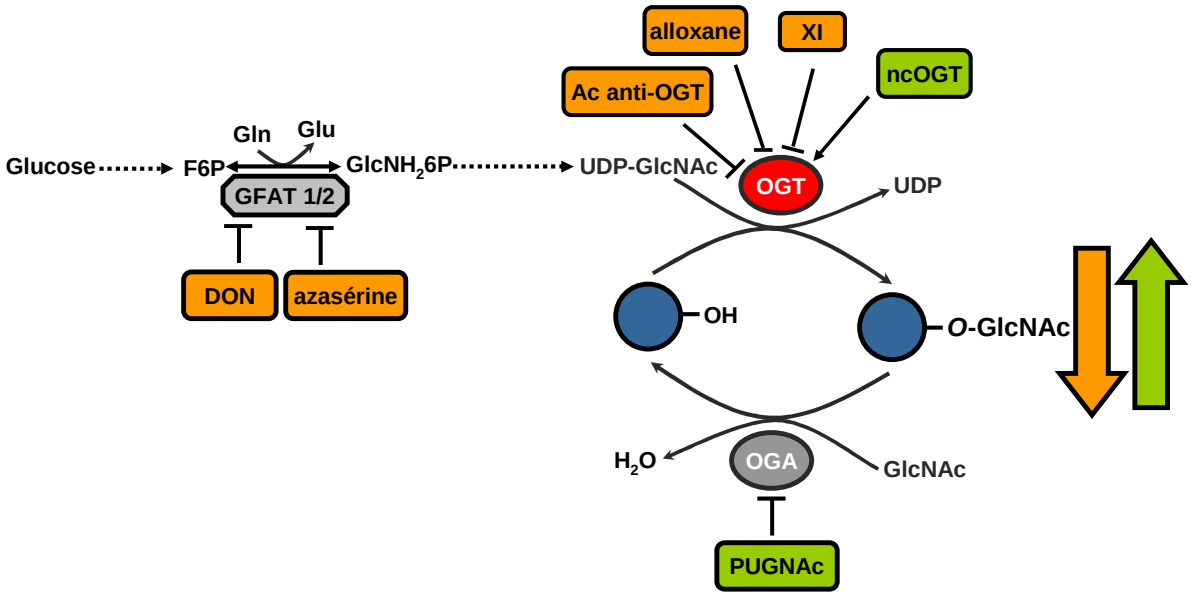


Figure 38 : stratégie utilisée pour moduler les niveaux de *O*-GlcNAc dans l'ovocyte de Xénope.
Pour diminuer les niveaux de *O*-GlcNAc (flèche orange), nous avons inhibé l'OGT par des inhibiteurs pharmacologiques, l'alloxane et un dérivé de benzoxazolinone (XI, collaboration Dr. S. Walker) ou par injection dans l'ovocyte d'anticorps (Ac) anti-OGT. L'inhibition de la GFAT a été réalisée par incubation des ovocytes en présence d'azasérine et de DON. A l'inverse, une augmentation des niveaux de *O*-GlcNAc dans l'ovocyte (flèche verte) a été provoquée par injection de la ncOGT (collaboration Dr. G.Lippens) ou par inhibition de la *O*-GlcNAcase par le PUGNAc.

L'ensemble de ces travaux a fait l'objet des deux publications suivantes :

- **PUBLICATION 1 :**

  Dehennaut V, Lefebvre T, Sellier C, Leroy Yves, Gross B, Walker S, Cacan R, Michalski J-C, Vilain J-P and Bodart J-F. (2007). « *O*-linked N-acetylglucosaminyltransferase inhibition prevents G2/M transition in Xenopus laevis oocytes ». *J. Biol. Chem.* 282(17):12527-36.

- **PUBLICATION 2:**

  Dehennaut V, Hanoulle X, Bodart J-F, Vilain J-P, Michalski J-C, Landrieu I, Lippens G and Lefebvre T. (2008). « Microinjection of recombinant O-GlcNAc transferase potentiates Xenopus oocytes M-phase entry ». *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 369(2):539-46.

Dans ces deux études, nous avons démontré, d'une part que l'inhibition de l'OGT par l'alloxane ou le XI empêchait la reprise méiotique stimulée par la progestérone : la voie

© 2009 Tous droits réservés.

MAPK-Erk2 et le MPF restent inactifs et la VG reste intacte démontrant ainsi le caractère essentiel de cette PTM dans les évènements biochimiques et morphologiques de la transition G2/M (**Figure 39**). D'autre part, nous avons également démontré que cette glycosylation influençait la cinétique de la reprise méiotique. En effet, l'augmentation des niveaux de *O*-GlcNAc, par surexpression de la ncOGT ou inhibition de la *O*-GlcNAcase, accélère la reprise méiotique (l'activation du MPF et de la voie MAPK-Erk2) alors qu'une diminution partielle des niveaux de cette glycosylation par « neutralisation » de l'OGT retarde ce processus. Ces résultats suggèrent l'existence d'une régulation temporelle fine des processus de *O*-GlcNAcylation au cours de la transition G2/M nécessaire dès les évènements précoces de la reprise méiotique en amont de l'activation du MPF et de la voie MAPK-Erk2. De plus, l'incubation des ovocytes en présence d'alloxane prévient également la reprise méiotique stimulée par injection de MPF actif ce qui suggère également un rôle de cette glycosylation dans l'établissement et/ou le maintien de la boucle d'auto-amplification du MPF.

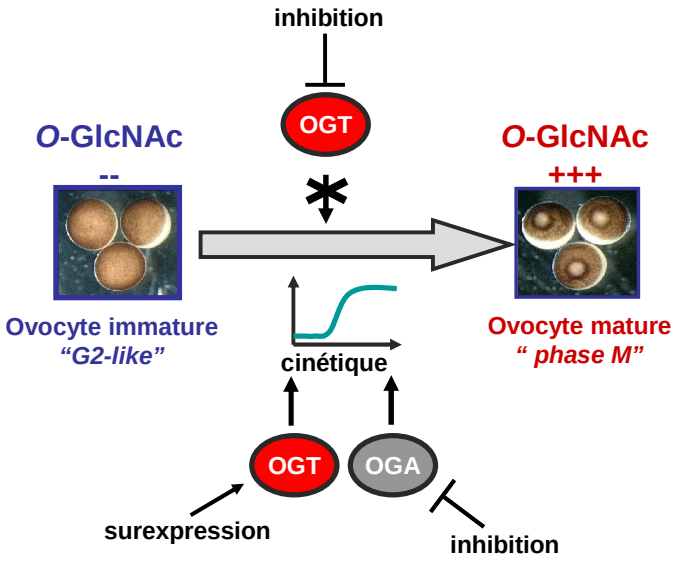


Figure 39 : la *O*-GlcNAc est essentielle à la reprise méiotique ovocytaire.
La reprise méiotique de l'ovocyte de Xénope s'accompagne d'une augmentation de *O*-GlcNAc. Cette augmentation est essentielle à ce processus puisque sa prévention empêche l'entrée en phase M alors que sa potentialisation accélère l'entrée et la progression des ovocytes dans le cycle méiotique.

Néanmoins, l'injection de la ncOGT ne permet pas de déclencher la reprise méiotique en absence de stimulation hormonale ce qui démontre que l'augmentation de *O*-GlcNAc est nécessaire mais pas suffisante à la transition G2/M de l'ovocyte et suggère que l'OGT est activée en réponse à la progestérone par des mécanismes inconnus. Nous avons démontré que l'injection de la sOGT, forme tronquée de l'enzyme dans sa partie N-terminale mais catalytiquement active *in vitro*, n'avait aucune influence sur la reprise méiotique soulignant l'importance des domaines TPR de l'OGT dans la régulation des interactions avec ses

© 2009 Tous droits réservés.

partenaires et donc de son activité catalytique vis à vis de ces protéines cibles. Ces résultats suggèrent que l'activation de l'OGT au cours de la reprise méiotique serait régulée par son association avec certains partenaires.

Nous avons observé que l'inhibition de la GFAT ne perturbait en aucun cas la reprise méiotique et que les niveaux d'UDP-GlcNAc étaient identiques dans l'ovocyte immature, mature et en présence des inhibiteurs de GFAT. Ces résultats démontrent que la modification des protéines par la *O*-GlcNAc au cours de la reprise méiotique fait intervenir un stock d'UDP-GlcNAc pré-existant dans l'ovocyte immature.

© 2009 Tous droits réservés.

2) Identification de protéines cibles de l'OGT lors de la transition G2/M de l'ovocyte de Xénope.

Pour mieux comprendre le rôle primordial de la *O*-GlcNAc dans la reprise méiotique, la suite logique de ce travail a consisté en l'identification des protéines dont le niveau de *O*-GlcNAc augmente lors de ce processus dans le but d'identifier des protéines régulatrices du cycle cellulaire.

La stratégie ici employée a consisté dans un premier temps à enrichir les protéines *O*-GlcNAc des ovocytes matures par différentes techniques puis, dans un deuxième temps de les identifier soit par approche « ciblée » soit « en aveugle » par des techniques de protéomique (**Figure 40**). Les analyses de protéomique ont été réalisées en collaboration avec le Dr. Adeline Page (centre commun de mesure de spectrométrie de masse, USTL).

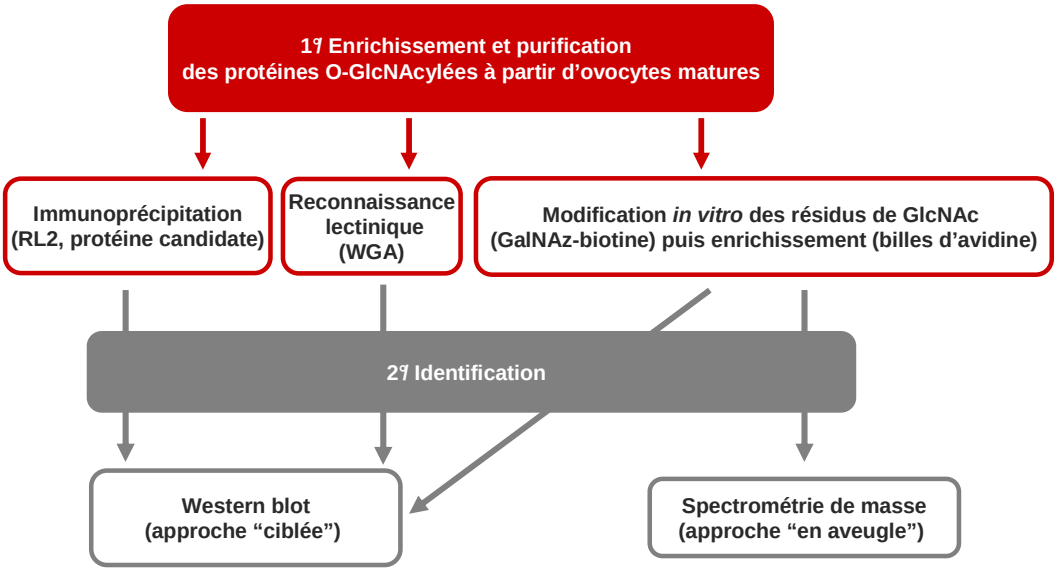


Figure 40 : stratégies utilisées pour enrichir et identifier les protéines *O*-GlcNAcylées dans l'ovocyte mature de Xénope.
Les protéines *O*-GlcNAcylées ont été enrichies soit par immunoprécipitation, soit par affinité lectinique avec la WGA ou par une technique de marquage *in vitro* consistant à transférer un résidu de GalNAz sur le résidu de *O*-GlcNAc puis à greffer une biotine-alcyne sur le résidu de GlcNAc-GalNAz suivi d'un enrichissement sur billes d'avidine. Les protéines enrichies par les techniques classiques ont été analysées par approche « ciblée », c'est à dire par Western blot anti-protéine candidate alors que la technique de marquage et d'enrichissement GalNAz/Biotine/avidine a été combinée essentiellement avec des analyses en spectrométrie de masse.

Ces travaux ont fait l'objet de la publication suivante:

- **PUBLICATION 3 :**

© 2009 Tous droits réservés.

Dehennaut V, Slomianny MC, Page A, Vercoutter-Edouart AS, Jessus C, Michalski JC, Vilain JP, Bodart JF, Lefebvre T. (2008) « Identification of structural and functional *O*-linked N-Acetylglucosamine-bearing proteins in Xenopus laevis oocyte ». *Mol. Cell. Proteomics.* Epub ahead of print.

L'enrichissement des protéines *O*-GlcNAcylées par des techniques classiquement utilisées, c'est à dire par immunoprécipitation avec un anticorps anti-*O*-GlcNAc ou par reconnaissance lectinique se sont avérées peu efficaces en vue de l'identification des protéines par spectrométrie de masse. En effet, l'ovocyte de Xénope exprime peu de protéines *O*-GlcNAcylées en comparaison avec des cellules somatiques telles que les cellules HeLa ou COS7 et ces approches expérimentales ne nous permettaient pas d'enrichir suffisamment de matériel nécessaire pour l'analyse protéomique. En revanche, avec ces techniques « classiques » d'enrichissement nous avons démontré par Western Blot que l'alpha-tubuline, la bêta-actine et la MAPK Erk2 étaient *O*-GlcNAcylées au cours de la reprise méiotique.

La technique de marquage GalNAz/biotine suivie de l'enrichissement sur billes d'avidine s'est avérée plus efficace en terme de quantité de matériel purifié, ce qui nous a permis d'identifier par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) 24 protéines *O*-GlcNAcylées dont 17 identifiées pour la première fois (**Figure 41**) parmi lesquelles nous avons retrouvé l'actine et la tubuline, mais aussi des enzymes métaboliques dont des enzymes de la glycolyse, des protéines de la machinerie de traduction mais aussi d'autres protéines comme le PCNA (*« Proliferating Cell Nuclear Antigen »*) ou encore la phosphatase PP2A. Pour ces deux dernières protéines, leur *O*-GlcNAcylation a également été confirmée par Western blot. Grâce à cette méthode, nous avons également identifié un site majeur de *O*-GlcNAcylation de la β-actine situé dans une région entre les acides aminés 318 et 324 de la protéine dont l'impact reste à déterminer.

Par ailleurs dans cette étude, nous avons également pu mettre en évidence, par microscopie en immunofluorescence, une co-localisation de l'OGT et de la *O*-GlcNAc sur le fuseau de division méiotique et les chromosomes métaphasiques. Ce dernier résultat nous a conduit à émettre l'hypothèse d'une *O*-GlcNAcylation des histones. Nous avons vérifié cette hypothèse en préparant des extraits d'histones à partir de cellules HeLa suivi d'une analyse en Western Blot avec des anticorps anti-*O*-GlcNAc (RL2 et CTD110.6) et avons démontré que, dans nos conditions expérimentales, les histones n'étaient pas *O*-GlcNAcylées. La signification biologique de la glycosylation des chromosomes restent donc à déterminer.

© 2009 Tous droits réservés.

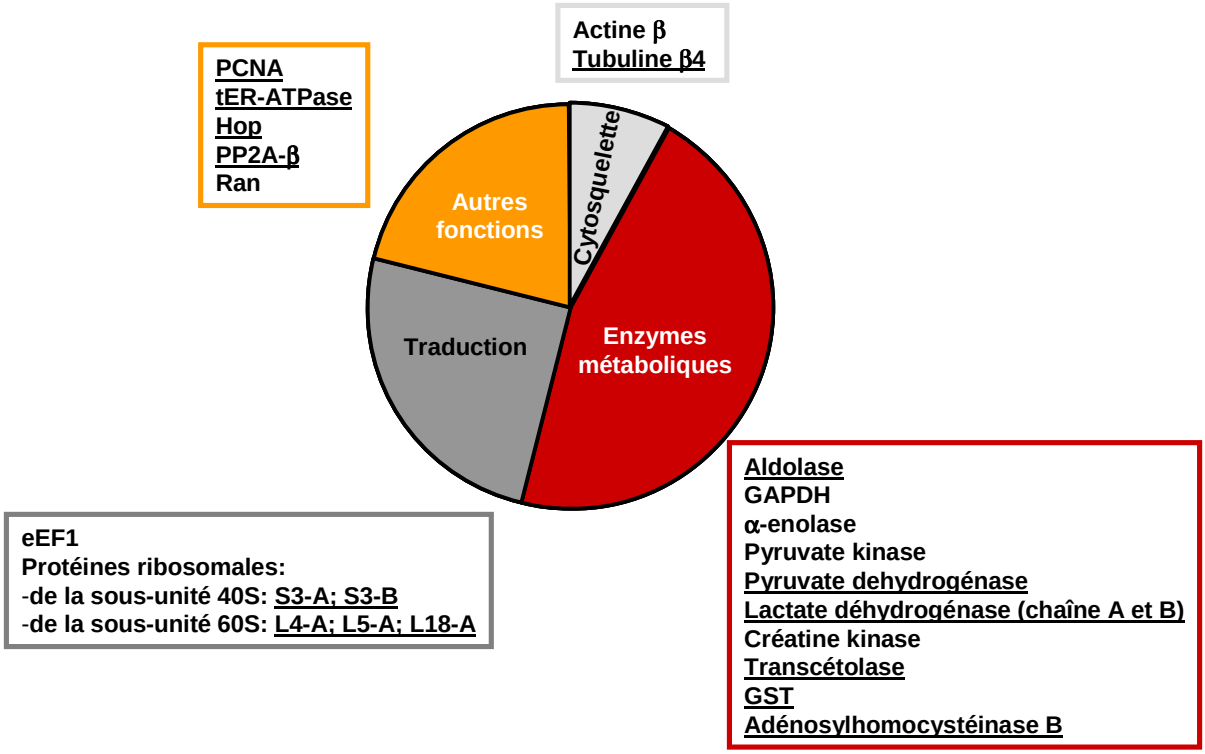


Figure 41: protéines *O*-GlcNAcylées identifiées dans l'ovocyte mature de Xénope par approche protéomique.
Les protéines *O*-GlcNAcylées identifiées ont été réparties en 4 groupes : enzymes métaboliques (46%), traduction (25%), cytosquelette (8%), et autres fonctions (21%). Les protéines identifiées comme étant *O*-GlcNAcylées pour la première fois dans cette étude sont soulignées.

© 2009 Tous droits réservés.

III. Discussion et conclusion.

L'ensemble de nos travaux démontrent que l'augmentation de *O*-GlcNAc est essentielle à la reprise méiotique ovocytaire puisque l'inhibition de l'OGT prévient la transition G2/M alors que sa surexpression accélère ce processus. De plus, nous avons identifié plusieurs protéines de classes fonctionnelles différentes dont la glycosylation augmente lors de la transition G2/M suggèrant que la modification par la *O*-GlcNAc peut intervenir à différents niveaux de régulation de la reprise méiotique.

En effet, la *O*-GlcNAcylation de PP2A pourrait influer sur l'activité de cette phosphatase dont l'inhibition semble être requise pour l'activation du MPF (Rime *et al.*, 1995 ; Karaiskou *et al.*, 1999, Maton *et al.*, 2005, **Figure 22**).

De même, la MAPK Erk2 est *O*-GlcNAcylée. Comme nous l'avons détaillé dans la section des Généralités, la voie p39Mos/MEK/Erk2 participe à l'activation du MPF lors de la reprise méiotique, au maintien de son activité nécessaire à la suppression de la phase S entre les deux divisions de méiose mais est aussi cruciale pour la formation d'un fuseau de division bipolaire. La glycosylation de cette kinase pourrait intervenir dans son activation lors de la transition G2/M, sa stabilité ou encore son association avec ses protéines cibles dont p90Rsk.

Récemment, l'existence d'un complexe entre l'OGT et la MAPK p38 a été mise en évidence (Cheung *et al.*, 2008) suggérant que les deux enzymes pourraient agir en synergie sur les mêmes protéines. L'OGT et PP1 α et γ sont également capables de s'assembler en un complexe fonctionnel (Wells *et al.*, 2004). De plus, une régulation de la *O*-GlcNAcylation/phosphorylation de la vimentine au cours de la phase M par un complexe OGT/*O*-GlcNAcase/Aurora A/PP1 a été très récemment démontré (Slawson *et al.*, 2008). Il serait donc intéressant de déterminer si l'OGT est capable de se complexer à Erk2 et/ou à PP2A et ainsi de réguler la phosphorylation/déphosphorylation de certaines protéines au cours de la reprise méiotique.

L'identification de la tubuline suggère quant à elle une possible implication de la *O*-GlcNAc dans l'assemblage du fuseau de division à partir du MTOC-TMA mais aussi sur sa stabilité. L'identification de la petite GTPase Ran qui, comme nous l'avons vu dans la partie II des généralités, joue un rôle important dans l'assemblage du fuseau de division (**Figure 13**) renforce cette hypothèse. La glycosylation de l'actine pourrait également être impliquée dans

© 2009 Tous droits réservés.

l'ancrage correct du fuseau de division au cortex de l'ovocyte et donc dans l'extrusion du globule polaire.

Dans l'ovocyte de Xénope, l'inhibition du trafic Golgien par la brefeldine A déclenche indirectement l'activation du MPF en absence de stimulation hormonale (Mulner-Lorillon *et al.*, 1995). La *O*-GlcNAcylation de la tER ATPase, une protéine essentielle à la fragmentation de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique au cours de la mitose (pour revue, voir Uchiyama et Kondo, 2005) suggère une intervention de la *O*-GlcNAc dans cet arrêt du trafic vésiculaire nécessaire à la division et la fragmentation subséquente des organites intracellulaires indispensable pour leur répartition dans les deux cellules-filles.

La glycosylation des protéines de la machinerie de traduction pourrait également intervenir dans la multimérisation des protéines ribosomales et l'assemblage d'un complexe fonctionnel (le ribosome) pour permettre la traduction de certains ARNm nécessaire à la reprise méiotique comme p39Mos, la cycline B ou encore Ringo même si un tel rôle de la *O*-GlcNAc dans la régulation de la traduction n'a jamais été mis en évidence.

Enfin, nous avons révélé la *O*-GlcNAcylation de plusieurs enzymes de la glycolyse : l'aldolase, la GAPDH, l'énolase et la pyruvate kinase. Or, il est admis que la glycolyse n'est pas active dans l'ovocyte de Xénope, cette voie métabolique ne démarrant qu'au cours de l'embryogenèse à la gastrulation (Dworkin et Dworkin-Rastl, 1989, 1991). Nous proposons que la *O*-GlcNAcylation de ces enzymes contribue à leur inactivation permettant ainsi de diriger le glucose vers la voie de biosynthèse des hexosamines pour produire l'UDP-GlcNAc (**Figure 42**).

En conclusion, nos travaux dévoilent un niveau supplémentaire de régulation de la transition G2/M du cycle cellulaire ovocytaire même si des études complémentaires restent à réaliser. Particulièrement, la détermination des sites de *O*-GlcNAcylation pour chacune des protéines identifiées permettrait de tester les différentes hypothèses précédemment énoncées. En effet, la connaissance de ces sites, et donc de(s) la région(s) protéique(s) ainsi modifiée(s), permettrait d'appréhender l'impact fonctionnel de la *O*-GlcNAc sur la protéine concernée. Cette localisation fine des sites de glycosylation nous indiquerait s'ils ont été préalablement répertoriés comme sites de phosphorylation et si tel est le cas cela présagerait d'une relation plus ou moins complexe entre ces PTM : si le même acide aminé hydroxylé peut être substitué par l'une ou l'autre PTM, il s'agira alors d'une relation antagoniste stricte, s'il s'agit d'acides aminés adjacents, une relation plus complexe entre les deux PTM devra être envisagée puisque ces modifications pourraient à la fois s'excluent mutuellement ou au contraire la première pourrait favoriser la présence de la seconde (**Figure 35**).

© 2009 Tous droits réservés.

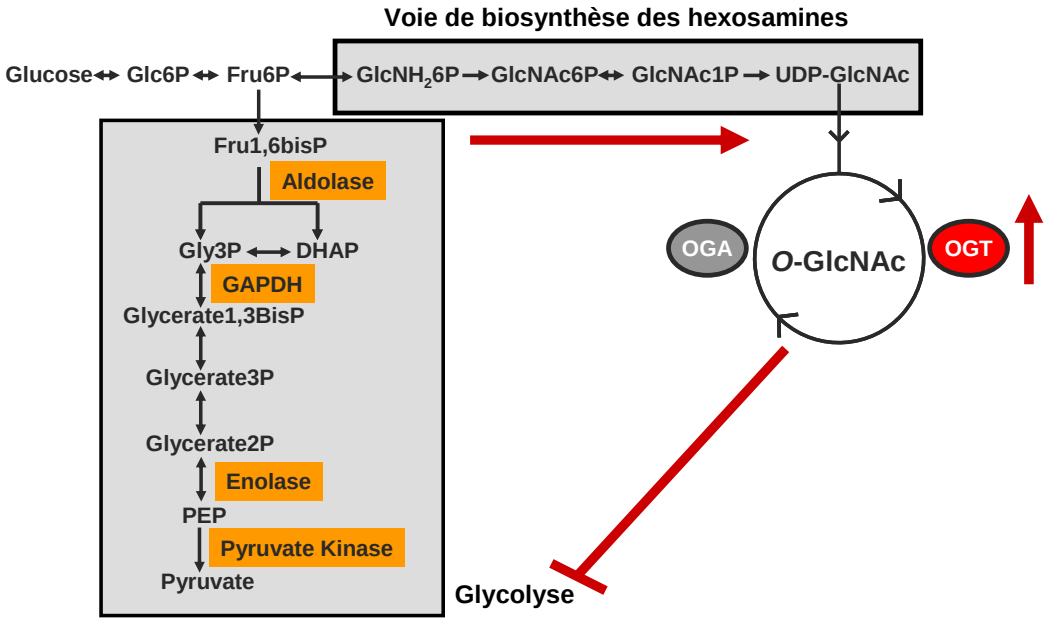


Figure 42 : Hypothèse d'une régulation de la glycolyse par la *O*-GlcNAc.
La modification de certaines enzymes de la glycolyse par la *O*-GlcNAc, aldolase, GAPDH, énolase pyruvate kinase permettrait de diriger le glucose vers la production d'UDP-GlcNAc (voie de biosynthèse des hexosamines) entrainant ainsi une augmentation des processus de *O*-GlcNAcylation et un maintien de l'inhibition de la glycolyse.

© 2009 Tous droits réservés.

PUBLICATION 1

© 2009 Tous droits réservés.

http://doc.univ-lille1.fr

Thèse de Vanessa Dehennaut, Lille 1, 2008

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 282, NO. 17, pp. 12527–12536, April 27, 2007
© 2007 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Printed in the U.S.A.

O-Linked *N*-Acetylglucosaminyltransferase Inhibition Prevents G_2/M Transition in *Xenopus laevis* Oocytes*

Received for publication, January 16, 2007, and in revised form, February 26, 2007 Published, JBC Papers in Press, February 28, 2007, DOI 10.1074/jbc.M700444200

Vanessa Dehennaut[‡§1], Tony Lefebvre[§], Chantal Sellier[‡], Yves Leroy[§], Benjamin Gross[¶], Suzanne Walker[¶], René Cacan[§], Jean-Claude Michalski[§], Jean-Pierre Vilain[‡], and Jean-François Bodart[‡2]

From the [‡]Laboratoire de Régulation des Signaux de Division, EA 4020, Université des Sciences et Technologies de Lille, SN3, IFR147, 59655 Villeneuve d'Ascq, France, the [§]Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR 8576 du CNRS, IFR147, Bâtiment C9, Cité Scientifique, 59655 Villeneuve d'Ascq, France, and the [¶]Department of Microbiology and Molecular Genetics, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115

Full-grown *Xenopus* oocytes are arrested at the prophase of the first meiotic division in a G_2-like state. Progesterone triggers meiotic resumption also called the G_2/M transition. This event is characterized by germinal vesicle breakdown (GVBD) and by a burst in phosphorylation level that reflects activation of M-phase-promoting factor (MPF) and MAPK pathways. Besides phosphorylation and ubiquitin pathways, increasing evidence has suggested that the cytosolic and nucleus-specific *O*-GlcNAc glycosylation also contributes to cell cycle regulation. To investigate the relationship between *O*-GlcNAc and cell cycle, *Xenopus* oocyte, in which most of the M-phase regulators have been discovered, was used. Alloxan, an *O*-GlcNAc transferase inhibitor, blocked G_2/M transition in a concentration-dependent manner. Alloxan prevented GVBD and both MPF and MAPK activations, either triggered by progesterone or by egg cytoplasm injection. The addition of detoxifying enzymes (SOD and catalase) did not rescue GVBD, indicating that the alloxan effect did not occur through reactive oxygen species production. These results were strengthened by the use of a benzoxazolinone derivative (XI), a new *O*-GlcNAc transferase inhibitor. Conversely, injection of *O*-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene)amino-*N*-phenylcarbamate, an *O*-GlcNAcase inhibitor, accelerated the maturation process. Glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase inhibitors, azaserine and 6-diazo-5-oxonorleucine, failed to prevent GVBD. Such a strategy appeared to be inefficient; indeed, UDP-GlcNAc assays in mature and immature oocytes revealed a constant pool of the nucleotide sugar. Finally, we observed that cyclin B2, the MPF regulatory subunit, was associated with an unknown *O*-GlcNAc partner. The present work underlines a crucial role for *O*-GlcNAc in G_2/M transition and strongly suggests that its function is required for cell cycle regulation.

Immature vertebrates oocytes, arrested at prophase I of meiosis, can resume their cell cycle, also called maturation, in response to hormonal stimulation (1, 2). Studies in amphibian *Xenopus laevis* oocyte have greatly contributed to the knowledge of the biochemical activities of the key regulatory molecules involved in these processes (3).

Meiosis entry, analogous to G_2/M transition, is promoted by a cytoplasmic factor called MPF.[3] MPF, made up of a catalytic subunit, Cdk1 (cyclin-dependent kinase 1) (also called Cdc2 (cell division cycle 2)), and a regulatory subunit, cyclin B, has been demonstrated to be the universal regulator of mitosis and meiosis entry. Activation of this cyclin-Cdk complex is controlled by phosphorylation and proteolysis (for reviews, see Refs. 4 and 5). Association between the regulatory subunit and Cdk1 requires phosphorylation of Cdk1 on residue Thr^{161} by Cdk-activating kinase (6). Then, to be catalytically active, Cdk1 is dephosphorylated on Thr^{14} and Tyr^{15} residues by Cdc25, a dual specific phosphatase (6, 7). Simultaneously to Cdk1 dephosphorylation, cyclin B is phosphorylated (8). *Xenopus* immature oocytes, which are synchronized at the diplotene stage of first meiosis, contain large amounts of inactive MPF, or pre-MPF (4, 5). Inhibition of pre-MPF is provided by Myt1 that phosphorylates Cdk1 on Thr^{14} and Tyr^{15} and then inactivates the complex. Pre-MPF can be directly activated by Cdc25 injection (9) or through an autoamplification loop. The latter loop involves the ability of MPF to phosphorylate and activate Cdc25 (10, 11) and does not depend upon protein synthesis (12).

Simultaneously to MPF activation, extracellular signal-regulated kinase-like $Xp42^{mpk1}$ is phosphorylated and activated (13). $Xp42^{mpk1}$ belongs to the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway that is turned on by Mos oncoprotein synthesis in response to progesterone stimulation (14). Once activated, $Xp42^{mpk1}$ phosphorylates and activates ribosomal S6 kinase ($p90^{rsk}$), which negatively regulates Myt1 (15). Activation of the Mos-$Xp42^{mpk1}$ pathway has been shown not to be required for MPF activation but for timely M-phase entry when oocytes are stimulated either by progesterone or insulin (16–18). Nevertheless, this pathway has been shown to be

* This work was supported in part by the "Centre National de la Recherche Scientifique," the "Association pour la Recherche contre le Cancer," and the "Université des Sciences et Technologie de Lille I." The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "*advertisement*" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[1] Recipient of a fellowship from the "Ministère de la Recherche et de l'Enseignement."

[2] To whom all correspondence should be addressed. Tel.: 32-0436847; Fax: 32-0434038; E-mail: jean-françois.bodart@univ-lille1.fr.

[3] The abbreviations used are: MPF, M-phase-promoting factor; *O*-GlcNAc, *O*-linked *N*-acetylglucosamine; PTM, post-translational modification; DON, 6-diazo-5-oxonorleucine; GFAT, glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase; GVBD, germinal vesicle breakdown; MAPK, mitogen-activated protein kinase; OGT, *O*-linked *N*-acetylglucosaminyltransferase; *O*-GlcNAcase, *O*-linked *N*-acetylglucosaminidase; PUGNAc, *O*-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene)amino-*N*-phenylcarbamate; ROS, reactive oxygen species; SOD, superoxide dismutase; WGA, wheat germ agglutinin; MOPS, 4-morpholinepropanesulfonic acid; ALX, alloxan.

© 2009 Tous droits réservés.
http://doc.univ-lille1.fr
Downloaded from www.jbc.org at CNRS on May 2, 2007

Thèse de Vanessa Dehennaut, Lille 1, 2008

responsible for S-Phase suppression between meiosis I and meiosis II, for metaphase II arrest, and for spindle morphogenesis (17, 19–21).

Mitogenic signals orchestrate a regulatory network of proteins mainly through post-translational modifications (PTMs). Although phosphorylation is the molecular mechanism associated with the regulation of cell cycle, it is clearly not the only post-translational mechanism involved in cell cycle progression. Recent observations have suggested that the cytosolic and nucleus-specific *O*-linked N-acetylglucosaminylation (*O*-GlcNAc) could be involved in cell cycle progression (22–24). *O*-GlcNAc is a highly dynamic PTM whose versatility is regulated by two enzymes (25): the *O*-GlcNAc transferase (OGT) that catalyzes the transfer of the GlcNAc moiety from UDP-GlcNAc and *O*-GlcNAcase that hydrolyzes the GlcNAc residue. Although the functions played by this single PTM remain to be determined, several studies tend to demonstrate that *O*-GlcNAc is tightly linked to cell cycle regulation. Microinjection of bovine galactosyltransferase inhibited *Xenopus* oocytes M-phase entry and blocked S- to M-phase transition (26). Slawson *et al.* (27) showed that perturbation of *Xenopus* oocyte *O*-GlcNAc levels, either by glucosamine or *O*-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene)amino-*N*-phenylcarbamate (PUGNAc) treatments, modified maturation kinetics. We previously reported that the G_2- to M-phase transition was accompanied with a noticeable increase in *O*-GlcNAc glycosylation (22). Last, PUGNAc was used to inhibit *O*-GlcNAcase on somatic cultured cells; such treated cells progressed through the cell cycle more slowly than untreated cells (24). This delay was more pronounced during the S-phase progression and at the G_2/M boundary. By contrast, inhibition of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase (GFAT) with 6-diazo-5-oxonorleucine (DON), resulting in low *O*-GlcNAc level, shortened S-phase, and G_2/M progression. In return, GFAT inhibition delayed G_1 progression in comparison with controls or PUGNAc-treated cells. Taken together, these data demonstrate that *O*-GlcNAc dynamic is a key regulatory PTM in cell cycle progression. The present study pointed out a role for *O*-GlcNAc glycosylation as a key regulator mechanism for progression from G_2 arrest to M-phase in *Xenopus* oocyte, through the regulation of both MPF and MAPK pathways.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals, Chemicals, and Bioreagents—Adult *Xenopus* females come from the University of Rennes I (France). Tricaine methane sulfonate was purchased from Sandoz (Levallois-Perret, France). Collagenase A was purchased from Roche Applied Science. Progesterone, picroindigocarmine, alloxan, uracil, azaserine, DON, catalase, superoxide dismutase (SOD), WGA-agarose beads, monoclonal anti-p34^{cdc2} antibody, and Dowex 50WX2-400 were purchased from Sigma. PUGNAc was a kind gift from Prof. Jérôme Lemoine (UMR/CNRS 5579, Villeurbanne, France). Benzoxazolinone derivative (XI) was synthesized in Suzanne Walker's laboratory (28). Mouse monoclonal anti-*O*-GlcNAc (RL-2) was purchased from Affinity Bioreagents (Golden, CO); polyclonal anti-β-catenin (H-102), monoclonal anti-Erk2 (D-2), and rabbit polyclonal anti-p90^{rsk} (C21) were from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA); monoclonal anti-Hsp/Hsc70 (SPA-820) was from Stressgen (Victoria, Canada); rabbit anti-phospho-Tyr^{15}-Cdc2 and anti-phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) were from Cell Signaling Technology (Danvers, MA); and rabbit polyclonal anti-cyclin B2 (JG103) was a gift from Dr. J. Gannon (ICRF, South Mimms, UK). Anti-mouse, anti-rabbit horseradish peroxidase-labeled secondary antibodies and enhanced chemiluminescence were purchased from GE Healthcare (Saclay, France).

Handling of Oocytes—After anesthetizing *Xenopus* females by immersion in 1 g/liter MS222 solution (tricaine methane sulfonate), ovarian lobes were surgically removed and placed in ND96 medium (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 5 mM HEPES-NaOH, pH 7.5). Fully grown stage VI oocytes were isolated, and follicle cells were partially removed by 1 mg/ml collagenase A treatment for 30 min followed by a manual microdissection. Oocytes were stored at 14 °C in ND96 medium until experiments.

Stimulation and Analysis of G_2/M Transition (Meiotic Resumption) in Xenopus Oocytes—Meiotic resumption was induced by incubating oocytes in ND96 medium containing 10 μM progesterone or by cytoplasm microinjection. Briefly, cytoplasm of matured oocytes was collected and microinjected in immature oocytes (50 nl/oocyte) using a positive displacement digital micropipette (Nichiryo, Tokyo, Japan). GVBD was scored by the appearance of a white spot at the animal pole of the oocyte and confirmed by hemisection of oocyte after heat fixation (100 °C, 5 min). Alternatively, oocytes were fixed overnight in Smith's fixative, dehydrated, and embedded in paraffin for cytological studies. 7-μm sections were stained with nuclear red for the detection of nuclei and chromosomes, whereas picroindigocarmine was used to reveal cytoplasmic structures (21).

Oocyte Treatments—Before stimulation of meiotic resumption, oocytes (15–20 oocytes/condition) were incubated overnight with alloxan concentrations ranging from 1 to 5 mM, 5 mM uracil, 500 μM Me_2SO-solubilized benzoxazolinone derivative, 40–80 units of catalase, 150 units of SOD, or 0.1–5 mM hydrogen peroxide. For GFAT inhibition experiments, 100 μM DON or 20 μM azaserine were directly injected into oocytes before progesterone treatment. For *O*-GlcNAcase inhibition, PUGNAc (concentrations ranging from 100 to 400 μM) was also microinjected in immature oocytes before meiotic resumption stimulation. 5–10 oocytes were taken at the end of the experiment respecting the white spot ratio, and stored at −20 °C until further biochemical analysis.

Enrichment of O-GlcNAc-bearing Proteins with WGA Immobilized on Agarose Beads—These experiments were performed in two conditions as previously described (29): in smooth conditions, which allows the recovery of all *O*-GlcNAc-modified proteins and their associated partners, and in more stringent conditions in which all protein-to-protein interactions are broken.

WGA Enrichment in Smooth Conditions—Batches of 20 immature or matured oocytes were taken and lysed in 200 μl of homogenization buffer (60 mM β-glycerophosphate, 15 mM paranitrophenylphosphate, 25 mM MOPS, 15 mM EGTA, 15 mM $MgCl_2$, 2 mM dithiothreitol, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM NaF, and protease inhibitors, pH 7.2). After centrifugation

Downloaded from www.jbc.org at CNRS on May 2, 2007

© 2009 Tous droits réservés.
http://doc.univ-lille1.fr

Thèse de Vanessa Dehennaut, Lille 1, 2008

at 20,000 × *g*, supernatants were collected and diluted with phosphate-buffered saline. Samples were then incubated for 90 min at 4 °C with 50 μl of WGA-agarose beads. Proteins bound to WGA-beads were collected by centrifugation, washed four times with phosphate-buffered saline, resuspended in 50 μl of Laemmli buffer, and boiled for 10 min.

WGA Enrichment in Stringent Conditions—Briefly, batches of 20 immature or mature oocytes were lysed in 200 μl of homogenization buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.5% Triton X-100, and protease inhibitors). After centrifugation at 20,000 × *g*, supernatants were collected, and 800 μl of homogenization buffer was added. Then samples were incubated with WGA-agarose beads, and WGA-bound proteins were collected, washed four times in 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.4% sodium deoxycholate, 0.3% SDS, 0.2% Nonidet P-40, and resuspended in Laemmli buffer.

SDS-PAGE and Western Blotting—Proteins (the equivalent of one oocyte was loaded per lane) were run on a 10% SDS-PAGE for *O*-GlcNAc, phospho-p42/44 MAPK, Hsp/Hsc70, and β-catenin immunodetection. 17.5% modified SDS-PAGE (18, 30) was also run for phospho-Tyr^{15}-Cdc2, Erk2, cyclin B2, and p90^{rsk} immunodetection, since it allows a better discrimination between active and inactive forms of these proteins, and electroblotted onto a nitrocellulose sheet. Although the quantity of proteins remains rather constant in *Xenopus* oocyte, equal loading and transfer efficiency were checked using Ponceau red staining. Blots were saturated in 5% (w/v) milk in Tris-buffered saline-Tween (15 mM Tris, 140 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween) for 45 min. Primary antibodies were incubated overnight at 4 °C. Mouse monoclonal anti-*O*-GlcNAc (RL-2), mouse monoclonal anti-Erk2 (D-2), mouse monoclonal anti-Hsc/Hsp70 (SPA-820), rabbit polyclonal anti-phospho-p42/44 MAPK, rabbit polyclonal anti-β-catenin (H102), rabbit polyclonal anti-cyclin B2, and rabbit polyclonal anti-p90^{rsk} were used at a dilution of 1:1,000. Rabbit polyclonal anti-phospho-Tyr^{15}-Cdc2 antibodies were used at a dilution of 1:750. Then nitrocellulose membranes were washed three times for 10 min in Tris-buffered saline-Tween and incubated with either an anti-mouse horseradish peroxidase-labeled secondary antibody or an anti-rabbit horseradish peroxidase-labeled secondary antibody at a dilution of 1:10,000 for β-catenin, Erk2, and phospho-p42/44 MAPK detection, at a dilution of 1:5,000 for cyclin B2, p90^{rsk}, and phospho-Tyr^{15}-Cdc2 detection. Finally, three washes of 10 min each were performed with Tris-buffered saline-Tween, and the detection was carried out with enhanced chemiluminescence.

Measurement of UDP-GlcNAc Pools by High Performance Anion Exchange Chromatography—Ten oocytes were lysed in 1 ml of hypotonic buffer (10 mM Tris/HCl, 10 mM NaCl, 15 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM $MgCl_2$, and proteases inhibitors, pH 7.2). 50 μl of 1 M HCl were then added to the lysate, and the mixture was passed through a 1.5-ml Dowex 50WX2-400 column. The column was washed with 10 ml of bipermuted water. The unbound fraction and washes were collected on ice and adjusted to pH 8.0 with 500 μl of 1 M Tris/HCl. 250 μl of the diluted fraction was injected using a ProPAC-PA1 column (4 × 250 mm) on a Dionex (Jouy en Josas, France) high performance liquid chromatography system. The elution was achieved as follows: Tris/HCl (20 mM, pH 9.2) (solution A) for 1 min; elution gradient for 29 min with 85% A and 15% NaCl at 2 M (solution B); plateau of 5 min in the same conditions; 10-min elution gradient until 100% B was reached; plateau at 100% B for 5 min. The column was then re-equilibrated in 100% A. The flow rate was 1 ml/min. Detection was performed using a Spectroflow 757 UV spectrophotometer (Kratos-Analytical, Shimadzu, Champs sur Marne, France) at a wavelength of 256 nm.

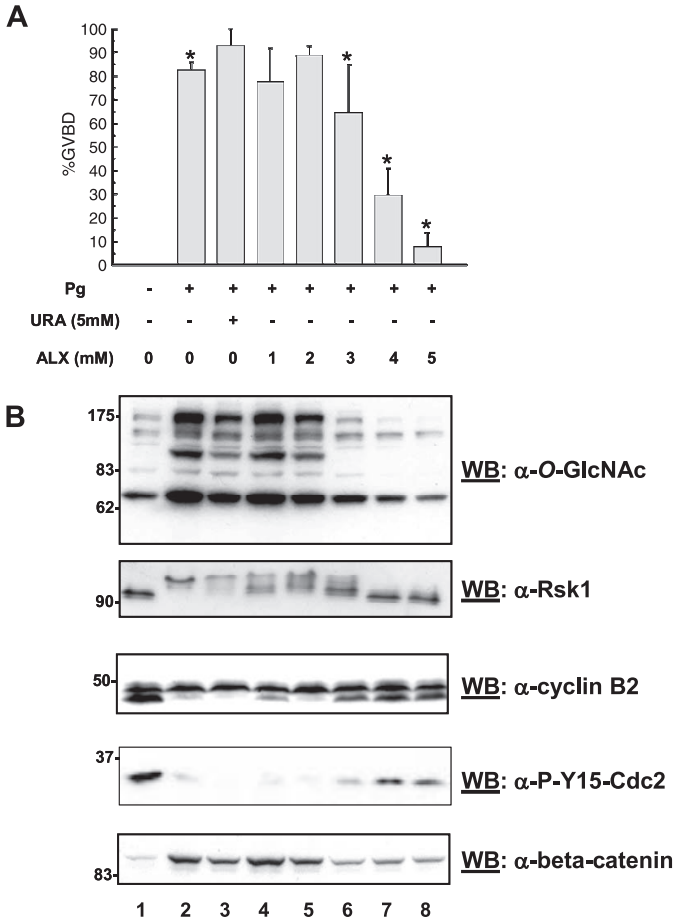


FIGURE 1. **Meiotic progression is prevented by alloxan, an OGT inhibitor, in *Xenopus* oocyte.** Immature oocytes were treated with increasing amounts of alloxan (*lanes 4–8*). M-phase entry was then induced by progesterone treatment. *A*, GVBD was assessed using white spot observation. The *histogram* shows the average GVBD values ± S.D. Results are from three or four (*asterisks*) independent experiments. *B*, oocytes were homogenized in lysis buffer, and Western blot analyses were performed using a panel of antibodies. *O*-GlcNAc content of oocytes was tested using an anti-*O*-GlcNAc-directed antibody (RL-2). Activation of Rsk, Cdc2, and cyclin B2 was assessed as described under "Experimental Procedures." β-Catenin accumulation was also analyzed. *Lane 1*, immature controls; *lane 2*, mature controls; *lane 3*, oocytes treated with 5 mM uracil. Protein mass markers (kDa) are indicated to the *left*. *WB*, Western blot; *URA*, uracil; *Pg*, progesterone.

RESULTS

The OGT Inhibitor Alloxan Blocks O-GlcNAc Increase and Progesterone-induced G_2/M Transition—In a previous report, we demonstrated that *Xenopus* oocyte meiotic resumption was accompanied with a burst in *O*-GlcNAc content (22). In order to understand the biological significance of this glycosylation increase, we inhibited OGT using the uracil analogue alloxan (ALX) (31). Recently, alloxan has been successfully used for its OGT-inhibitory effect, in isolated neonatal ventricular car-

Downloaded from www.jbc.org at CNRS on May 2, 2007

© 2009 Tous droits réservés.
http://doc.univ-lille1.fr

Thèse de Vanessa Dehennaut, Lille 1, 2008

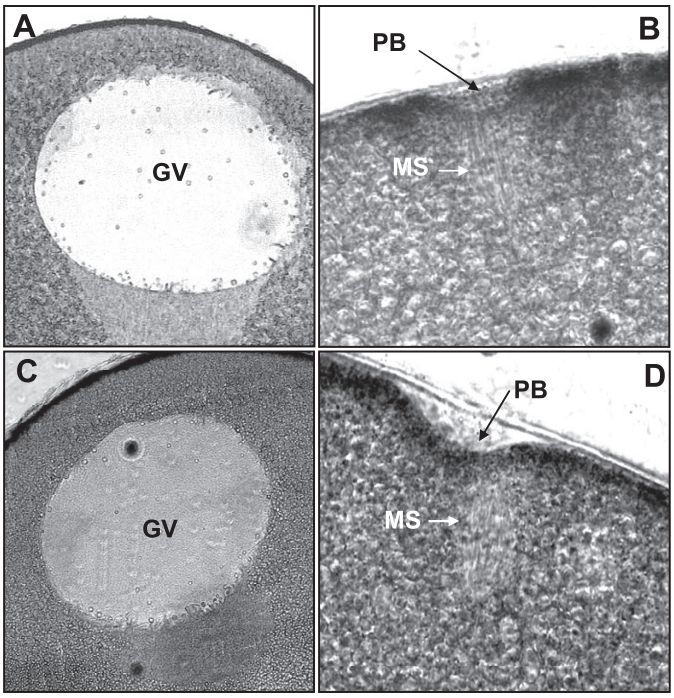


FIGURE 2. **Alloxan prevents GVBD.** Oocytes were fixed, dehydrated, and embedded in paraffin. Sections (7 μm) were stained with nuclear red for detecting nuclei and chromosomes, whereas picroindigocarmine was used to reveal cytoplasmic structures. *A*, immature oocyte showing an intact germinal vesicle (*GV*). *B*, progesterone-treated oocyte (mature oocyte) with a typical metaphase spindle (*MS*) and the first polar body (*PB*). *C*, alloxan-treated oocyte showing an immature profile. *D*, uracil-treated oocyte showing a mature profile.

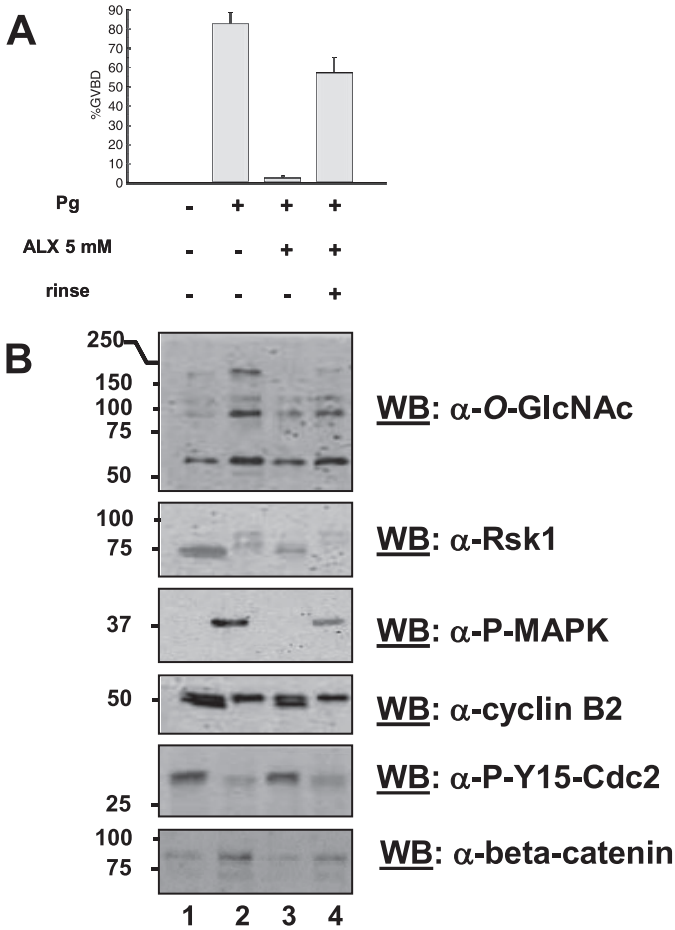


FIGURE 3. **Alloxan is not toxic, and its effect can be reversed.** Immature oocytes were first incubated overnight with 5 mM ALX, and then meiotic resumption was stimulated (*Pg*). 16 h after progesterone addition, alloxan-containing medium was removed (rinse), and oocytes were incubated in alloxan-free medium containing progesterone. *A*, GVBD was assessed using white spot observation. The *histogram* shows the average GVBD values ± S.D. Results are from four independent experiments. *B*, oocytes were homogenized in lysis buffer, and Western blot analyses were performed. *O*-GlcNAc content of oocytes; activation of Rsk, MAPK, and cyclin B2; Cdc2, and β-catenin accumulation were assessed as described under "Experimental Procedures." Protein mass markers (kDa) are indicated to the *left*. *WB*, Western blot; *Pg*, progesterone.

diomyocytes (32), in intact rat heart (33), and in C2C12 myoblasts (34). Oocytes were incubated with progesterone to trigger G_2/M transition, together with increasing amounts of alloxan, and a dose-dependent inhibition of GVBD was observed (Fig. 1*A*). Used as a negative control, uracil had no effect on meiosis resumption induced by hormonal stimulation (*third lane*). A significant inhibitory effect of alloxan was observed for concentrations ranging from 3 to 5 mM, whereas lower doses (1 and 2 mM) had no or little effect on G_2/M transition. Prevention of M-phase by alloxan appeared to be correlated with an *O*-GlcNAc level reduction: *O*-GlcNAc progressively decreased from 3 to 5 mM alloxan-treated oocytes to finally reach an *O*-GlcNAc pattern similar to that of immature oocytes (G_2-phase). At the biochemical level, oocytes treated with these alloxan concentrations did not exhibit the typical pattern of M-phase-entered oocytes (Fig. 1*B*, *lanes 6–8*). Rsk, whose phosphorylation directly depends upon MAPK activity, remained unphosphorylated, in contrast to phosphorylated forms that shift in electrophoretic mobility in metaphase II-arrested control oocytes; Cyclin B2 remained unphosphorylated (proven by the presence of a doublet of isoforms), and Cdc2 phosphorylation on Tyr^{15} confirmed that MPF heterodimer was under an inactive form in these oocytes (compare *lanes 1*, *2*, and *8*). Accumulation of β-catenin was also examined as a marker of the meiotic process. β-Catenin accumulates during G_2/M transition due to inhibition of GSK3β (glycogen synthase kinase 3β) that phosphorylates β-catenin on a PEST sequence, leading to its degradation by the proteasome system (35). In a previous work, we reported that β-catenin *O*-GlcNAc content was enhanced after progesterone stimulation (22). As expected, β-catenin was easily detected in oocytes incubated solely with progesterone or with low concentrations of alloxan (1 and 2 mM). Expression of β-catenin was dramatically reduced when alloxan was used at higher concentrations (Fig. 1*B*, *bottom*).

At the cytological level, high concentrations of alloxan prevented meiotic spindle formation, as proved by the presence of an intact germinal vesicle envelope (Fig. 2*C*). Meiotic spindles detected were similar in oocytes treated with uracil (Fig. 2*D*) to those examined in control mature oocytes (Fig. 2*B*).

To check for the nontoxicity and reversibility of alloxan effect, oocytes that were incubated with 5 mM ALX were rinsed after overnight treatment and were allowed to reach the G_2/M transition in alloxan-free ND96 medium containing progesterone (Fig. 3); in these conditions, more than half of the rinsed oocytes exhibited GVBD (57 ± 8.1%) (Fig. 3*A*), and removal of alloxan allowed activation of both MAPK and MPF pathways,

Downloaded from www.jbc.org at CNRS on May 2, 2007

© 2009 Tous droits réservés.
http://doc.univ-lille1.fr

Thèse de Vanessa Dehennaut, Lille 1, 2008

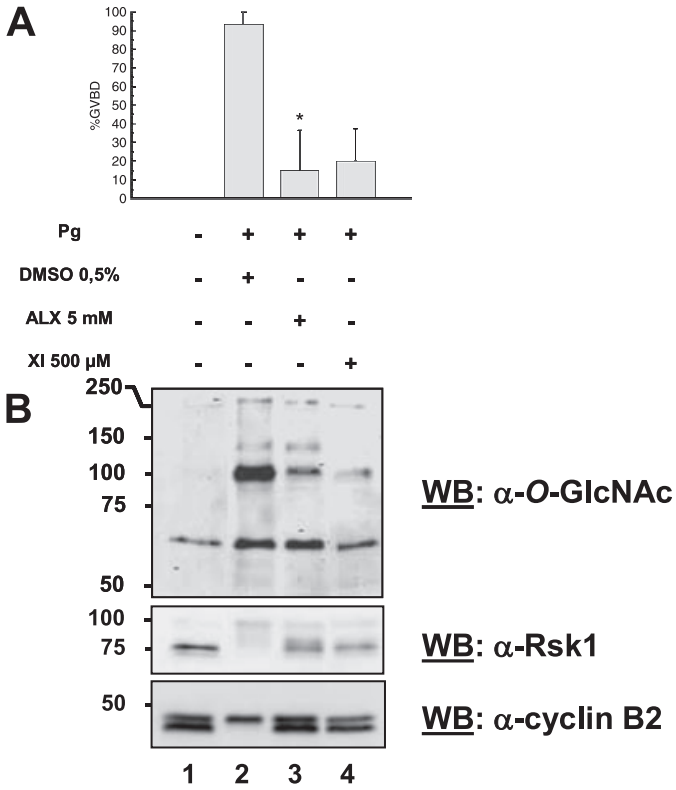


FIGURE 4. **OGT inhibitor benzoxazolinone derivative (XI) prevents meiotic resumption.** Immature oocytes were treated with either 500 μM benzoxazolinone derivative (*XI*) or 5 mM ALX or used as a vehicle control with 0.5% Me_2SO. M-phase entry was then induced by progesterone treatment. *A*, GVBD was assessed based on white spot observation. The *histogram* shows the average GVBD values ± S.D. Results are from three or four (*asterisks*) independent experiments. *B*, oocytes were homogenized in lysis buffer, and Western blot analyses were performed. *O*-GlcNAc content of oocytes and activation of Rsk and cyclin B2 were assessed as described under "Experimental Procedures." Protein mass markers (kDa) are indicated to the *left*. *WB*, Western blot; *Pg*, progesterone; *DMSO*, dimethylsulfoxide.

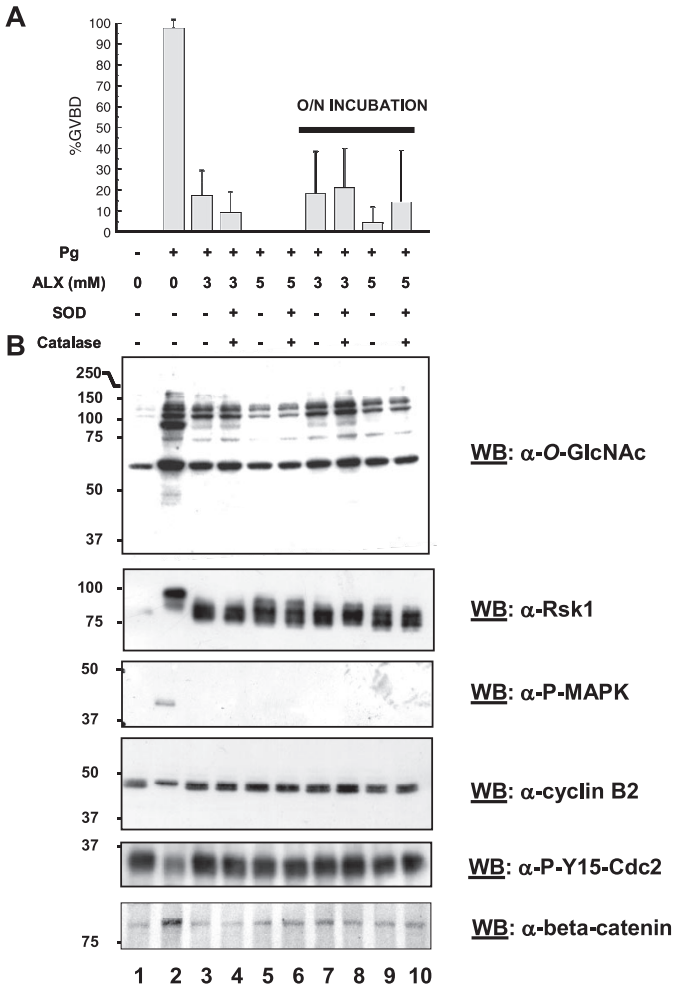


FIGURE 5. **Incubation of antioxidant enzymes does not reverse alloxan effect.** Immature oocytes were treated with different concentrations of alloxan (*lanes 3–10*). To counteract the potentially alloxan-mediated ROS generation, alloxan-treated oocytes were incubated with SOD and catalase either for 1 h prior to progesterone incubation (*lanes 4* and *6*) or overnight (*O/N*) prior to progesterone incubation (*lanes 8* and *10*). *Lanes 1* and *2* correspond to immature and mature controls, respectively. *A*, GVBD was assessed using white spot observation. The *histogram* shows the average GVBD values ± S.D. Results are from four independent experiments. *B*, oocytes were homogenized in lysis buffer, and Western blot analyses were performed. *O*-GlcNAc content of oocytes; activation of Rsk, Cdc2, and cyclin B2; and β-catenin accumulation were assessed as described under "Experimental Procedures." Protein mass markers (kDa) are indicated to the *left*. *WB*, Western blot; *Pg*, progesterone.

accumulation of β-catenin, and increase in *O*-GlcNAc level (Fig. 3*B*, compare *lanes 3* and *4*).

Since alloxan could interfere with any enzyme using uridine and exert unrelated effects, a benzoxazolinone derivative (XI), another OGT inhibitor (referred to as compound number 5 in Ref. 28), has been tested for its ability to block M-phase entry. Prior to hormonal stimulation, oocytes were incubated with 5 mM alloxan (Fig. 4, *lane 3*) or 500 μM benzoxazolinone derivative (*lane 4*) or without any inhibitor (*lane 2*). As for alloxan, the benzoxazolinone derivative blocked G_2/M transition; MPF and MAPK pathways were not activated, and the *O*-GlcNAc level did not increase after stimulation with progesterone.

M-phase Entry Inhibition Induced by Alloxan Does Not Depend upon Reactive Oxygen Species Formation—Free radicals have been reported to presumably control cell cycle (*e.g.* through Cdc25 regulation) (36). When in solution, alloxan is in equilibrium with its reduction product, dialuric acid, which generates superoxide radicals (O_2^-) through a redox cycle (for a review, see Ref. 37). These superoxide radicals are used by SOD to generate hydrogen peroxide (H_2O_2). Within cells, hydrogen peroxide molecules sustain the Fenton reaction in the presence of Fe^{2+} ions and are then splinted into two hydroxyl radicals ($OH^{\bullet}$).

To counteract potentially alloxan-mediated reactive oxygen species (ROS) generation, alloxan-treated oocytes were incubated with SOD and catalase (which produces H_2O and ½ O_2 from H_2O_2) either 1 h prior to the progesterone addition (Fig. 5, *lanes 4* and *6*) or overnight prior to progesterone addition (Fig. 5, *lanes 8* and *10*). In these conditions, the presence of the two detoxifying enzymes did not prevent the action of alloxan at concentrations ranging from 3 to 5 mM: 1) GVBD did not occur following progesterone stimulation (Fig. 5*A*); 2) *O*-GlcNAc levels did not increase; and 3) Rsk, p42 MAPK, and cyclin B2 phosphorylation patterns, as well as the β-catenin accumulation profile, were typical of oocytes arrested in G_2 (Fig. 5*B*).

Finally, oocytes were also incubated in increasing concentrations of hydrogen peroxide (H_2O_2; concentrations ranging from 0.1 to 5 mM). Although losing their pigmentation for 3, 4,

Downloaded from www.jbc.org at CNRS on May 2, 2007

© 2009 Tous droits réservés.
http://doc.univ-lille1.fr

Thèse de Vanessa Dehennaut, Lille 1, 2008

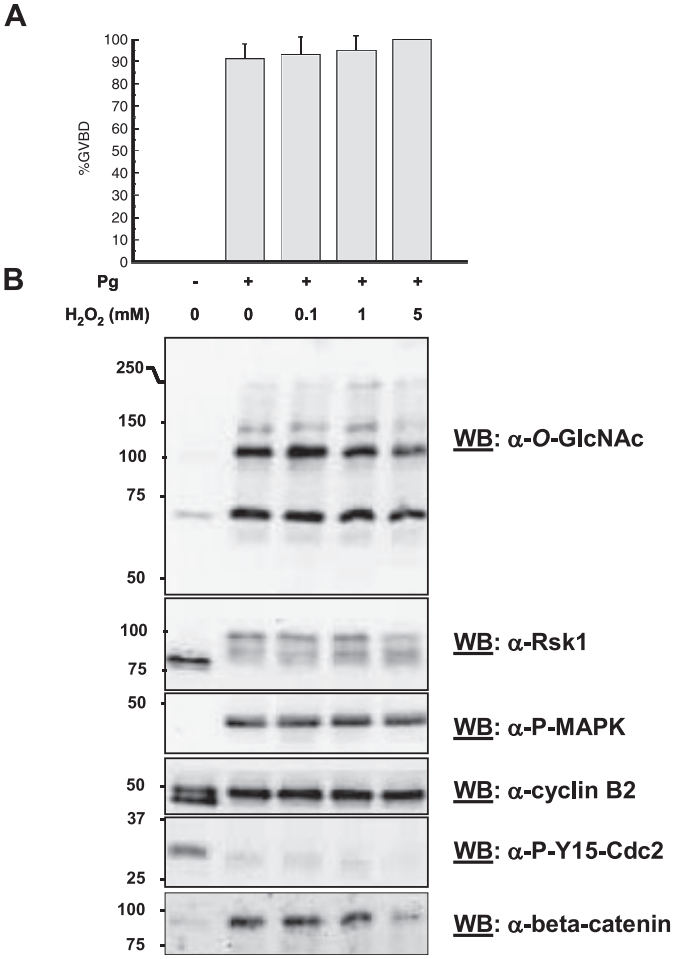


FIGURE 6. **Hydrogen peroxide does not prevent *Xenopus* oocyte meiotic resumption.** Immature oocytes were incubated with increasing amounts of hydrogen peroxide (H_2O_2) overnight before progesterone treatment. *A*, GVBD was assessed using white spot observation. The histogram shows the average GVBD values ± S.D. Results are from four independent experiments. *B*, oocytes were homogenized in lysis buffer, and Western blot analyses were performed. *O*-GlcNAc content of oocytes; activation of Rsk, Cdc2, and cyclin B2; and β-catenin accumulation were assessed as described under "Experimental Procedures." Protein mass markers (kDa) are indicated to the *left*. *WB*, Western blot; *Pg*, progesterone.

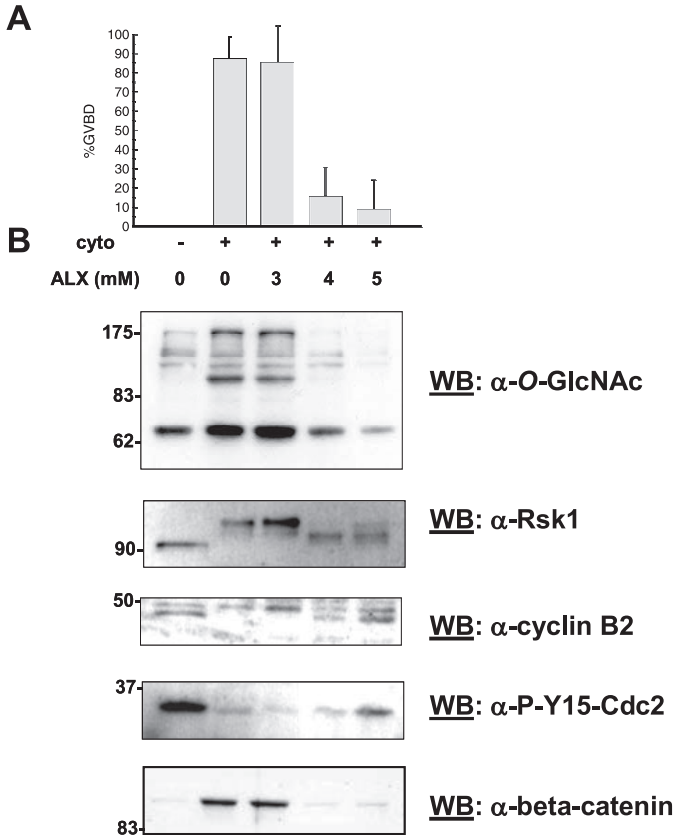


FIGURE 7. **Alloxan-mediated OGT inhibition also prevents cytoplasm-induced meiotic resumption.** Immature oocytes were incubated with ALX overnight before stimulation of meiotic resumption. Meiotic resumption was induced by injection of mature oocyte cytoplasm into immature oocyte. *A*, GVBD was assessed using white spot observation. The histogram shows the average GVBD values ± S.D. Results are from three independent experiments. *B*, oocytes were homogenized in lysis buffer, and Western blot analyses were performed. *O*-GlcNAc content of oocytes; activation of Rsk, Cdc2, and cyclin B2; and β-catenin accumulation were assessed as described under "Experimental Procedures." Protein mass markers (kDa) are indicated to the *left*. *WB*, Western blot; *cyto*, injected cytoplasm.

and 5 mM H_2O_2, oocytes nevertheless underwent GVBD, as shown by hemisection along the animal-vegetal axis after heat fixation (Fig. 6*A*; data not shown). Thus, G_2/M progression was not impaired by H_2O_2. Staining with anti-*O*-GlcNAc, anti-Rsk1, anti-phospho-MAPK, anti-cyclin B2, anti-phospho-Tyr^{15}-Cdc2, and anti-β-catenin showed that oocyte incubation with hydrogen peroxide did not prevent progesterone-induced G_2/M transition (Fig. 6*B*).

Alloxan Blocks O-GlcNAc Glycosylation and G_2/M Transition Induced by Egg Cytoplasm Injection—G_2/M transition induced by progesterone depends upon protein synthesis. However, when metaphase II-arrested oocyte (or egg) cytoplasm is injected into immature recipient oocytes, it triggers G_2/M transition through the MPF autoamplification loop, independently of protein synthesis (12). In comparison with progesterone-treated oocytes, cytoplasm-injected oocytes exhibited no decrease in *O*-GlcNAc content following 3 mM alloxan incubation (Fig. 7*B*, *top*). They also exhibited a typical pattern of phosphorylation/dephosphorylation and β-catenin accumulation similar to those of M-phase oocytes (Fig. 7*B*): 1) cdc2 Tyr^{15} was dephosphorylated; 2) Rsk and cyclin B2 were phosphorylated; and 3) β-catenin was accumulated in identical proportion to the cytoplasm-injected control oocyte alone. Complete inhibition for GVBD and activation of both MPF and MAPK pathways were obtained for 4 and 5 mM concentration (Fig. 7, *A* and *B*). Alloxan similarly blocks GVBD, MAPK, and MPF pathways activations in progesterone-treated oocytes and in cytoplasm-injected oocytes. It must be noted that compared with the first experiment in which progesterone was directly added to trigger maturation, the alloxan concentration needed to inhibit M-phase entry was higher (4 mM for egg cytoplasm injection *versus* 3 mM for hormonal stimulation).

O-GlcNAcase Inhibition Accelerates Xenopus Oocyte M-phase Entry—Because two OGT inhibitors were tested and prevented *Xenopus* oocyte M-phase entry (Figs. 1, 2, 4, and 7), we then checked the effect of *O*-GlcNAcase inhibition on the maturation process.

To this end, increasing amounts of PUGNAc, an inhibitor of *O*-GlcNAcase (38), were microinjected in *Xenopus* oocytes prior to hormonal stimulation (Fig. 8). PUGNAc caused a slight acceleration in maturation kinetics ($p < 0.05$ for 400 μM PUGNAc);

Downloaded from www.jbc.org at CNRS on May 2, 2007

© 2009 Tous droits réservés.
http://doc.univ-lille1.fr

Thèse de Vanessa Dehennaut, Lille 1, 2008

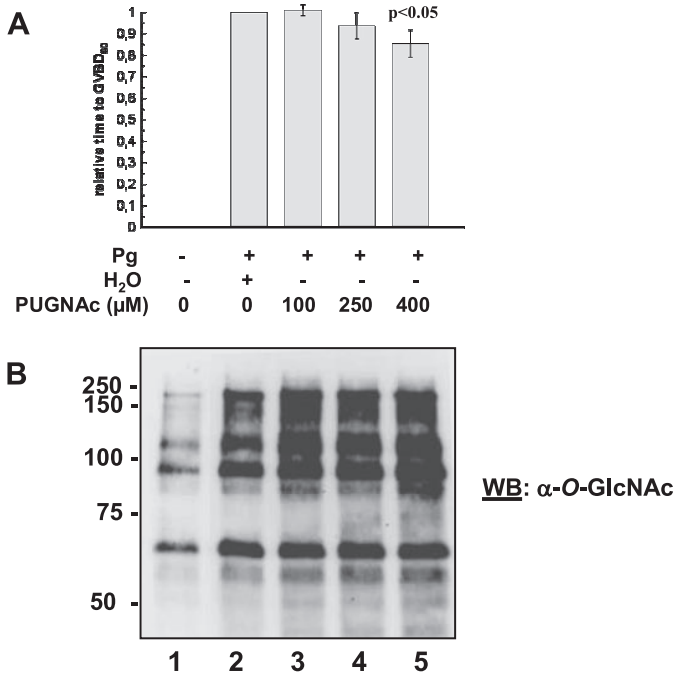


FIGURE 8. ***O*-GlcNAcase inhibitor PUGNAc causes an acceleration in GVBD kinetics.** Increasing amounts of PUGNAc were injected into immature oocytes. We also injected water as a control. Oocyte recovery was permitted overnight before progesterone treatment. *A*, for each condition, maturation kinetic was performed, and $GVBD_{50}$ was calculated. The histogram represents the average values ± S.D. of the relative time to $GVBD_{50}$ for PUGNAc-treated oocytes compared with water-injected controls (considered as 1 for normalization). Results are from three independent experiments. *B*, oocytes were homogenized in lysis buffer, and Western blot analyses were performed. *O*-GlcNAc was assessed as described under "Experimental Procedures." Protein mass markers (kDa) are indicated to the *left*. *WB*, Western blot; *Pg*, progesterone.

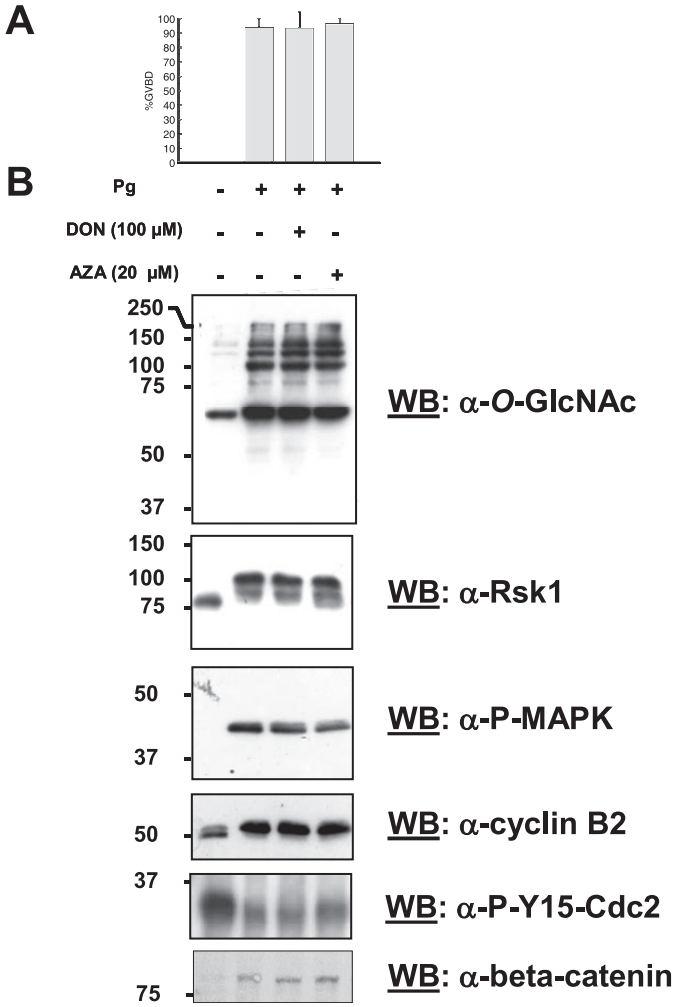


FIGURE 9. **GFAT inhibition does not prevent progesterone-induced meiotic resumption.** Immature oocytes were injected with GFAT inhibitors, DON or azaserine (*AZA*), overnight before stimulation of meiotic resumption. Control oocytes were water-injected. *A*, GVBD was assessed using white spot observation. The *histogram* shows the average GVBD values ± S.D. Results are from six independent experiments. *B*, oocytes were homogenized in lysis buffer, and Western blot analyses were performed. *O*-GlcNAc content of oocytes; activation of Rsk, Cdc2, and cyclin B2; and β-catenin accumulation were assessed as described under "Experimental Procedures." Protein mass markers (kDa) are indicated to the *left*. *WB*, Western blot; *Pg*, progesterone.

indeed, the time requested for 50% of oocytes to undergo GVBD ($GVBD_{50}$) was reached earlier in PUGNAc-injected oocytes than in water-injected controls (Fig. 8*A*), and *O*-GlcNAc levels were enhanced compared with injection of water (Fig. 8*B*, compare *lanes 3*, *4*, and *5* with *lane 2*). These data reinforced those obtained with alloxan and benzoxazolinone derivative. Altogether, these results demonstrated that the *O*-GlcNAc level interfered with *Xenopus* oocyte M-phase entry.

GFAT Inhibition Fails to Prevent M-phase Entry in Xenopus Oocytes—In somatic cells, the UDP-GlcNAc pool directly depends upon glucose concentration (39). UDP-GlcNAc is generated through the hexosamine biosynthetic pathway. The hexosamine biosynthetic pathway is finely regulated by the key enzyme, GFAT. Inhibition of GFAT leads to a decrease in the UDP-GlcNAc pool and consequently to a decrease in *O*-GlcNAc glycosylation. In somatic cells, such an effect may be obtained using DON and azaserine, which are well known GFAT inhibitors. Both were used in an attempt to prevent G_2/M transition induced by progesterone in *Xenopus* oocytes. When injected in immature oocytes prior to progesterone treatment, DON and azaserine have no effect on hormonal stimulation-induced M-phase entry (Fig. 9*A*). This lack of effect of GFAT inhibitors was previously observed by Slawson *et al.* (27), who used DON to tentatively modify the GVBD rate. In our experiments, no delay in GVBD kinetics was observed between azaserine or DON-injected oocytes compared with the control ones (water-injected). $GVBD_{50}$ was similar to control, whatever the conditions used to inhibit GFAT (data not shown). GVBD percentages in oocytes injected either with azaserine or DON exhibited no significant differences from control oocytes (Fig. 9*A*). At a biochemical level, cyclin B2, Rsk, and MAPK were not phosphorylated in immature G_2-blocked oocytes (Fig. 9*B*). Upon stimulation by progesterone, cyclin B2, MAPK, and Rsk were phosphorylated, and changes in electrophoretic mobility were observed for cyclin B2 and Rsk (Fig. 9*B*). In oocytes injected with either azaserine or DON, we observed the typical mature oocyte pattern of phosphorylation and β-catenin accumulation (Fig. 9*B*).

GFAT Inhibition Does Not Significantly Impair O-GlcNAc and UDP-GlcNAc Contents in Xenopus Oocytes—Strikingly, neither azaserine nor DON prevented the progesterone-induced *O*-GlcNAc level increase that goes with M-phase entry (Fig. 9). Increasing concentrations of azaserine (20, 60, and 100

Downloaded from www.jbc.org at CNRS on May 2, 2007

© 2009 Tous droits réservés.
http://doc.univ-lille1.fr

Thèse de Vanessa Dehennaut, Lille 1, 2008

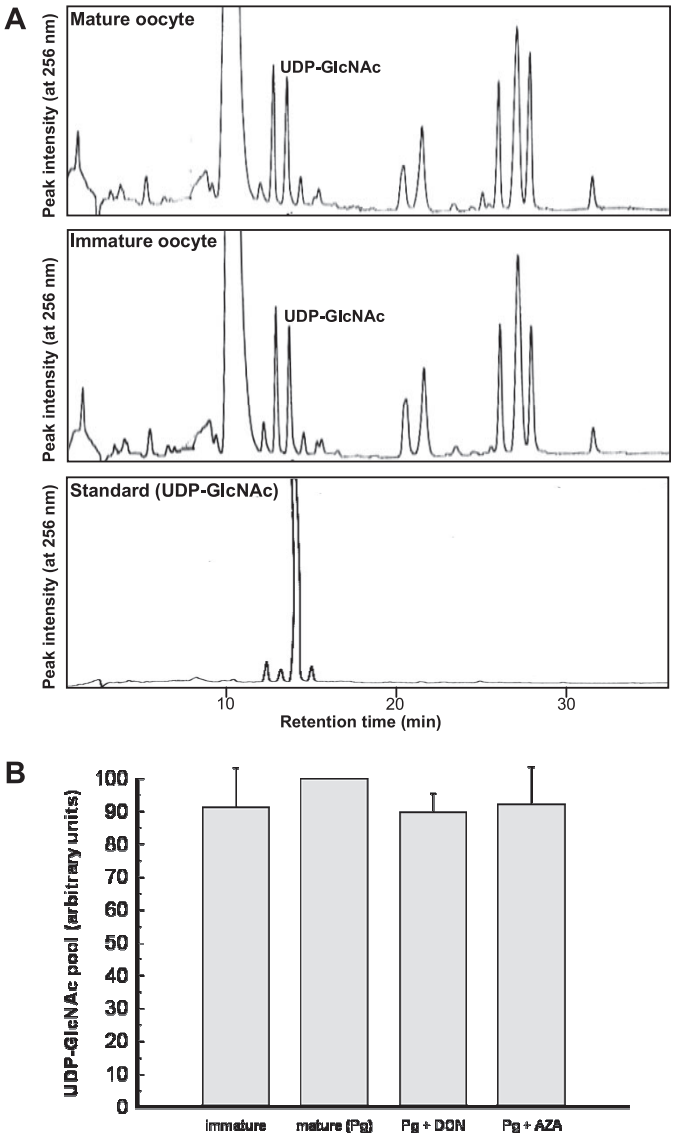


FIGURE 10. ***Xenopus* oocyte UDP-GlcNAc pools are not perturbed by GFAT inhibition.** Since GFAT inhibition did not block meiotic resumption, contrary to OGT inhibition, UDP-GlcNAc pools of mature, of immature, and of DON- or azaserine-treated oocytes were assayed using high performance anion exchange chromatography. *A*, profiles obtained for mature and immature oocytes. The UDP-GlcNAc standard profile is shown at the *bottom*. *B*, percentage of UDP-GlcNAc pools obtained for the different conditions compared with the mature oocytes (arbitrarily assigned as 100%). Results are from four independent experiments.

μM) and DON (100, 300, and 500 μM) were tested, but no effect on G_2/M transition or *O*-GlcNAc levels was observed (data not shown). To understand these results in apparent contrast with our previous observations, the UDP-GlcNAc pool of each condition was assayed using high performance anion exchange chromatography (Fig. 10); no significant changes in the UDP-GlcNAc pools were observed between the different conditions, even in the presence of the GFAT inhibitors. These latter observations suggest that during G_2/M transition, oocytes run for *O*-GlcNAc on an existing UDP-GlcNAc pool and did not require UDP-GlcNAc synthesis for the *O*-glycosylation processes.

Cyclin B2 Is Associated with an O-GlcNAc Partner—Since MPF is the universal key regulator of M-phase entry, we examined the putative glycosylation of cyclin B2 during oocyte maturation (Fig. 11). *Xenopus* oocytes extracts were enriched on WGA-beads using two different conditions (29); enrichments were performed in smooth conditions (Fig. 11*A*) to preserve protein/protein interactions and in stringent conditions to dissociate complexes (Fig. 11*B*). Bound proteins were separated by SDS-PAGE and blotted using an anti-cyclin B2 antibody. Hsc/Hsp70 were used as a positive control, since several papers related their *O*-GlcNAc modification (reviewed in Ref. 40). Heat-shock proteins interact with many intracellular proteins, explaining why such high quantities of Hsc/Hsp70 were obtained in smooth conditions.

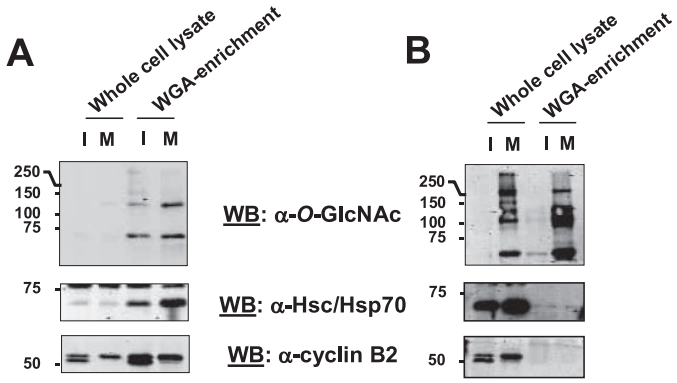


FIGURE 11. **Cyclin B2 interacts with an *O*-GlcNAc partner.** Batches of twenty immature (*I*) and mature (*M*) oocytes were lysed in homogenization buffer, and enrichments of *O*-GlcNAc proteins on WGA-agarose beads were performed in smooth conditions (*A*) to permit the recovery of all *O*-GlcNAc proteins and their associated partners or in stringent conditions (*B*) as described under "Experimental Procedures." Bound proteins were separated by SDS-PAGE and electrotransferred onto a nitrocellulose sheet. Western blot analyses were performed using anti-Hsc/Hsp70 and anti-cyclin B2 antibodies. Control of enrichment on WGA-beads was performed using the anti-*O*-GlcNAc antibody. Protein mass markers (kDa) are indicated to the *left*. *WB*, Western blot.

In smooth conditions, we observed that the two isoforms of cyclin B2 (*i.e.* the active and the inactive forms) were associated with an unknown *O*-GlcNAc partner in immature and mature oocytes. However, in drastic conditions, staining of enriched-*O*-GlcNAc proteins with the anti-cyclin B2 antibody revealed that cyclin B2 was not itself *O*-GlcNAc-modified, since SDS does not preserve binding of cyclin B2 to WGA-beads. As a control experiment, treatment of oocyte lysates with peptide *N*-glycosidase F was performed in order to avoid the eventual presence of *N*-linked oligosaccharides (data not shown).

DISCUSSION

M-phase entry is a particularly delicate step, preparing cells for division, which requires highly organized spatio-temporal events. These events are mainly driven by post-translational modifications modulating protein expression or activities or promoting protein degradation. Among these modifications, phosphorylation and ubiquitination have been extensively studied. The highly dynamic and ubiquitous PTM *O*-GlcNAc has been proposed to play a role in cell cycle protein function, thus presumably regulating cell cycle progression (24) and checkpoints. Consistent with previous observations in *X. laevis* oocytes, which reported an overall increase in *O*-GlcNAc modification

Downloaded from www.jbc.org at CNRS on May 2, 2007

© 2009 Tous droits réservés.
http://doc.univ-lille1.fr

Thèse de Vanessa Dehennaut, Lille 1, 2008

during G_2/M transition (22), we show here that *O*-GlcNAc is clearly requested for M-phase entry during meiosis in *Xenopus* oocytes.

O-GlcNAc is the most widespread glycosylation type found within the cytosolic and nuclear compartments of eukaryotic cells, and it differs from other glycosylation types by its high dynamism. Moreover, *O*-GlcNAc can compete with phosphorylation either at the same or at an adjacent site. Despite the intensive study and interest devoted to *O*-GlcNAc, many functions ruled by this glycosylation remain to be elucidated. Taking into account the most recent observations, which have pointed out the active role played by *O*-GlcNAc in the regulation of cell cycle (22, 24, 27), we explored the effects of preventing the *O*-GlcNAc dynamism on cell cycle progression by inhibition of OGT and *O*-GlcNAcase, expecting disruption of its progression. We took advantage of the *Xenopus* oocyte model, where G_2/M transition may be triggered either by hormonal stimulation or by cytoplasm injection; in our hands, both were blocked when the OGT inhibitor alloxan was added in the medium.

Historically, alloxan has been used to induce experimental diabetes in animals (for a review, see Ref. 37). The mechanism by which diabetes is mimicked in animals relates to the production of ROS, such as hydroxyl radicals. Hydroxyl radicals are highly toxic for cells, especially for pancreatic beta cells, and, in conjunction with an increased flux of calcium, they lead to beta cell death and consequently to an inhibition of insulin secretion, generating diabetes. We tested the hypothesis that ROS released under alloxan treatment could affect G_2/M transition in *Xenopus* oocytes. Indeed, ROS-mediated signal transduction pathways are involved in phosphorylation events by activating protein-tyrosine kinases and protein-serine/threonine kinases through a process known as "receptor transactivation." For instance, ROS inhibits Erk1/2, c-Jun N-terminal kinase, and p38 MAPK activations induced by angiotensin II and platelet-derived growth factor in fibroblast (41), but ROS could alternatively sustain MAPK activity through the inhibition of MAPK phosphatases, which inactivates MAPK. ROS have been described as potent inhibitors of phosphotyrosine phosphatases, like Cdc25C (42). Thus, evidence has accumulated that ROS interfere with cell cycle progression (36, 43). First, and unexpectedly, increasing concentrations of H_2O_2 had no effects on G_2/M transition induced by hormonal stimulation; MPF and MAPK were detected in their active forms, whereas β-catenin accumulated normally in H_2O_2-treated oocytes (Fig. 6). Second, we counteracted potential ROS production via the alloxan-dialuric acid redox cycle by the addition of SOD and catalase, two detoxifying enzymes (Fig. 5). Whatever the conditions we used (*i.e.* increasing the two enzyme amounts or modulating the time period post-progesterone addition), SOD and catalase did not suppress the alloxan-mediated block of G_2/M transition. Because both SOD and catalase failed to impair alloxan effects and due to the lack of effect of a high concentration of H_2O_2 on meiosis progression, it can be assumed that alloxan does not act on the G_2/M transition through ROS generation. To address a potential effect of alloxan on an enzyme other than OGT, which could use uridine as a substrate, we used a derivative of benzoxazolinone, an OGT inhibitor that was recently identified (28). Since it is not a substrate for OGT, the benzoxazolinone derivative should exhibit a better selectivity. Therefore, the benzoxazolinone derivative appears to be a useful tool to probe hypo-*O*-GlcNAc glycosylation. Indeed, we observed that it decreased *O*-GlcNAc to a greater extent than alloxan, at one-tenth the concentration. In the presence of benzoxazolinone derivative (XI), reduction of *O*-GlcNAc levels also impaired meiotic progression as well as the activation of both MPF and MAPK pathways. This leads us to the conclusion that *O*-GlcNAc modification is necessary for M-phase entry in *Xenopus* oocytes. *O*-GlcNAcase inhibition also reinforced these observations, since PUGNAc had opposite effects compared with those of alloxan and the benzoxazolinone derivative, since this chemical compound accelerated GVBD.

Inhibition of *Xenopus* oocyte G_2/M transition (stimulated by either progesterone or cytoplasm injection) by alloxan was correlated to a drop in the *O*-GlcNAc level. Although the decrease in the *O*-GlcNAc content prevented MPF and MAPK activations, as well as β-catenin accumulation, these effects appeared to be reversible and nontoxic for oocytes, since removal of alloxan from the medium allowed oocytes still to undergo and complete G_2/M transition in the presence of progesterone. In contrast to hormonal stimulation, cytoplasm injection drove M-phase entry independently of protein synthesis (12). It must be emphasized that the alloxan concentration required was higher to inhibit egg cytoplasm *versus* progesterone-induced GVBD (4 *versus* 3 mM, respectively). One might argue that mechanisms of protein synthesis induced by hormonal stimulation, which play a crucial role in meiotic resumption, are highly sensitive to *O*-GlcNAc modifications in *Xenopus* oocytes. In these conditions, the decrease in *O*-GlcNAc content also led to the absence of GBVD, MPF, and MAPK activations. This last observation demonstrates that *O*-GlcNAc modification is required for the activation of the MPF autoamplification loop.

An alternative strategy to decrease *O*-GlcNAc content is to target the enzyme responsible for UDP-GlcNAc synthesis, GFAT. Intriguingly, and has previously observed (27), azaserine and DON, which are both inhibitors of GFAT, had no effects on progesterone-induced GVBD and activation of both MPF and MAPK. Such inefficiency to affect the *O*-GlcNAc level might be related to an absence of GFAT activity in M-phase-entered oocytes. This hypothesis has been reinforced by UDP-GlcNAc pool assays; there was no difference in the UDP-GlcNAc content between immature and mature oocytes. Thus, the use of GFAT inhibitors appears not to be a relevant strategy to decrease *O*-GlcNAc content and to study its role in *Xenopus* oocytes. In addition to these observations, it has long been known that carbon metabolism in *Xenopus* oocytes is mainly directed to glycogen synthesis rather than to glycolysis (44). From these considerations, it can be assumed that in *Xenopus* oocytes, glucose tends to be stored rather than being directed toward the hexosamine biosynthetic pathway. Because early cleavages in *Xenopus* embryos rely on the use of amino acids as its main source of carbon, glycolysis starts only at the onset of gastrulation (45). Taken together, these observations lead to the conclusion that oocytes glycosylate their proteins on an existing UDP-GlcNAc pool in a process that does not need UDP-GlcNAc production. Thus, *Xenopus*

Downloaded from www.jbc.org at CNRS on May 2, 2007

© 2009 Tous droits réservés.
http://doc.univ-lille1.fr

Thèse de Vanessa Dehennaut, Lille 1, 2008

oocytes offer a unique opportunity to uncouple inhibition of *O*-GlcNAc and GFAT *in vivo*.

Further targets and function of *O*-GlcNAc modification remain to be determined during the cell cycle. Although the involvement of *O*-GlcNAc at the G_2/M transition (27) and at the metaphase/anaphase transition may be suspected from the observations of Slawson *et al.* (24, 27), we report for the first time here a crucial role for OGT, the *O*-GlcNAc key enzyme, in M-phase entry, and association of cyclin B2 with an unidentified *O*-GlcNAc partner might account for unsuspected levels of regulation. If post-translational modifications, such as phosphorylation, have been described for cyclin B isoforms during G_2/M progression, their functions remain unclear except for cyclin B1. The latter can be phosphorylated by MAPK and polokinase, regulating MPF nuclear export but not enzymatic activity of the heterodimer complex (46). In our hands, cyclin B2 appeared to be in association with an *O*-GlcNAc-modified partner throughout G_2- and M-phases, because interaction was not associated within the active or inactive states of the cyclin B2-Cdk1 complex. Nevertheless, it may be hypothesized that *O*-GlcNAc is involved in the association between cyclin B2 and Cdc2 to form the heterodimer MPF or to play a role in the interactions between MPF and its downstream effectors. It should be also noted that *O*-GlcNAc level immediately increases after hormonal stimulation (2 h post-progesterone; data not shown), indicating that *O*-GlcNAc is necessary for the early steps of the G_2/M transition. Because MAPK activity or cyclin B synthesis is not essential for M-phase entry in *Xenopus* oocytes (17, 18, 21, 47), mechanisms sensitive to *O*-GlcNAc variation, which are essential for G_2/M transition, remain to be elucidated.

As a valuable tool for studying *O*-GlcNAc function in the cell cycle, OGT inhibitors have opened a narrow field of investigation for deciphering the role of *O*-GlcNAc modification at the G_2/M transition. Further efforts are required to seek modification of *O*-GlcNAc content on the key regulators of the cell cycle.

Acknowledgments—We thank Arlette Lescuyer for technical assistance during this work. We are indebted to Dr. Gannon for the generous gift of anti-cyclin B2 antibodies (JG103) and Prof. Jérôme Lemoine for providing PUGNAc. We thank Dr. Anne Harduin-Lepers for English grammatical corrections.

REFERENCES

1. Masui, Y. (1967) *J. Exp. Zool.* **166,** 365–375
2. Smith, L. D., Ecker, R. E., and Subtelny, S. (1968) *Dev. Biol.* **17,** 627–643
3. Schmitt, A., and Nebreda, A. R. (2002) *J. Cell Sci.* **115,** 2457–2459
4. Nurse, P., Masui, Y., and Hartwell, L. (1998) *Nat. Med.* **4,** 1103–1106
5. Masui, Y. (2001) *Differentiation* **69,** 1–17
6. Kumagai, A., and Dunphy, W. G. (1991) *Cell* **64,** 903–914
7. Lorca, T., Labbe, J. C., Devault, A., Fesquet, D., Capony, J. P., Cavadore, J. C., Le Bouffant, F., and Doree, M. (1992) *EMBO J.* **11,** 2381–2390
8. Gautier, J., and Maller, J. L. (1991) *EMBO J.* **10,** 177–182
9. Rime, H., Huchon, D., De Smedt, V., Thibier, C. Galaktionov, K., Jessus, C., and Ozon, R. (1994) *Biol. Cell* **82,** 11–22
10. Hoffmann, I., Clarke, P. R., Marcote, M. J., Karsenti, E., and Draetta, G. (1993) *EMBO J.* **12,** 53–63
11. Strausfeld, U., Fernandez, A., Capony, J. P., Girard, F., Lautredou, N., Derancourt, J., Labbe, J. C., and Lamb, N. J. (1994) *J. Biol. Chem.* **269,** 5989–6000
12. Wasserman, W. J., and Masui, Y. (1975) *Exp. Cell Res.* **91,** 381–388
13. Ferrell, J. E., Jr., Wu, M., Gerhart, J. C., and Martin, G. S. (1991) *Mol. Cell. Biol.* **11,** 1965–1971
14. Sagata, M., Oskarsson, M., Copeland, T., Brumbaugh, J., and Vande Woude, G. F. (1988) *Nature* **335,** 519–525
15. Palmer, A., Gavin, A. C., and Nebreda, A. R. (1998) *EMBO J.* **17,** 5037–5047
16. Fischer, D. L., Brassac, T., Galas, S., and Doree, M. (1999) *Development* **126,** 4537–4546
17. Dupre, A., Suziedelis, K., Valuckaite, R., de Gunzburg, J., Ozon, R., Jessus, C., and Haccart, O. (2002) *Oncogene* **21,** 6425–6433
18. Baert, F., Bodart, J. F., Bocquet-Muchembled, B., Lescuyer-Rousseau, A., and Vilain, J. P. (2003) *J. Biol. Chem.* **278,** 49714–49720
19. Abrieu, A., Magnaghi-Jaulin, L., Kahana, J. A., Peter, M., Castro, A., Vigneron, S., Lorca, T., Cleveland, D. W., and Labbe, J. C. (2001) *Cell* **106,** 83–93
20. Bodart, J. F., Gutierrez, D. V., Nebreda, A. R., Buckner, B. D., Reseau, J. R., and Duesbery, N. S. (2002) *Dev. Biol.* **245,** 348–361
21. Bodart, J. F., Baert, F. Y., Sellier, C., Duesbery, N. S., Flament, S., and Vilain, J. P. (2005) *Dev. Biol.* **283,** 373–383
22. Lefebvre, T., Baert, F., Bodart, J. F., Flament, S., Michalski, J. C., and Vilain, J. P. (2004) *J. Cell. Biochem.* **93,** 999–1010
23. Slawson, C., Housley, M. P., and Hart, G. W. (2006) *J. Cell. Biochem.* **97,** 71–83
24. Slawson, C., Zachara, N. E., Vosseler, K., Cheung, W. D., Lane, M. D., and Hart, G. W. (2005) *J. Biol. Chem.* **280,** 32944–32956
25. Iyer, S. P., and Hart, G. W. (2003) *Biochemistry* **42,** 2493–2499
26. Fang, B., and Miller, M. W. (2001) *Exp. Cell Res.* **263,** 243–253
27. Slawson, C., Shafii, S., Amburgey, J., and Potter, R. (2002) *Biochim. Biophys. Acta* **1573,** 121–129
28. Gross, B. J., Kraybill, B. C., and Walker, S. (2005) *J. Am. Chem. Soc.* **127,** 14588–14589
29. Zhu, W., Leber, B., and Andrews, D. W. (2001) *EMBO J.* **20,** 5999–6007
30. Chesnel, F., Bonnec, G., Tardivel, A., and Boujard, D. (1997) *Dev. Biol.* **188,** 122–133
31. Konrad, R. J., Zhang, F., Hale, J. E., Knierman, M. D., Becker, G. W., and Kudlow, J. E. (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293,** 207–212
32. Kim, Y. H., Song, M., O. H., Y. S., Heo, K., Choi, J. W., Park, J. M., Kim, S. H., Lim, S., Kwon, H. M., Ryu, S. H., and Suh, P. G. (2006) *J. Cell. Physiol.* **207,** 689–696
33. Champattanachai, V., Marchase, R. B., and Chatham, J. C. (2007) *Am. J. Physiol.* **292,** C178–C187
34. Liu, J., Pang., Y., Chang, T., Bounelis, P., Chatham, J. C., and Marchase, R. B. (2006) *J. Mol. Cell. Cardiol.* **40,** 303–312
35. Wu, G., and He, X. (2006) *Biochemistry* **45,** 5319–5323
36. Rudolph, J. (2005) *Antioxid. Redox. Signal.* **7,** 761–767
37. Szkudelski, T. (2001) *Physiol. Res.* **50,** 536–546
38. Haltiwanger, R. S., Grove, K., and Philipsberg, J. A. (1998) *J. Biol. Chem.* **273,** 3611–3617
39. Wells, L., Vosseler, K., and Hart, G. W. (2003) *Cell. Mol. Life Sci.* **60,** 222–228
40. Zachara, N. E., and Hart, G. W. (2004) *Biochim. Biophys. Acta* **1673,** 13–28
41. Lander, H. M., Ogiste, J. S., Pearce, S. F., Levi, R., and Novogrodsky, A. (1995) *J. Biol. Chem.* **270,** 7017–7020
42. Savitsky, P. A., and Finkel, T. (2002) *J. Biol. Chem.* **277,** 20535–20540
43. Cakir, Y., and Ballinger, S. W. (2005) *Antioxid. Redox. Signal.* **7,** 726–740
44. Dworkin, M. B., and Dworkin-Rastl, E. (1989) *Dev. Biol.* **132,** 512–523
45. Dworkin, M. B., and Dworkin-Rastl, E. (1992) *Mol. Reprod. Dev.* **32,** 354–362
46. Walsh, S., Margolis, S. S., and Kornbluth, S. (2003) *Mol. Cancer Res.* **1,** 280–289
47. Hochegger, H., Klotzbutcher, A., Kirk, J., Howell, M., le Guellec, K., Fletcher, K., Duncan, T., Sohail, M., and Hunt, T. (2001) *Development* **128,** 3795–3807

Downloaded from www.jbc.org at CNRS on May 2, 2007

© 2009 Tous droits réservés.
http://doc.univ-lille1.fr

PUBLICATION 2

© 2009 Tous droits réservés.

http://doc.univ-lille1.fr

Thèse de Vanessa Dehennaut, Lille 1, 2008

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
Biochemical and Biophysical Research Communications 369 (2008) 539–546
BBRC
www.elsevier.com/locate/ybbrc

Microinjection of recombinant *O*-GlcNAc transferase potentiates *Xenopus* oocytes M-phase entry

Vanessa Dehennaut [a,b], Xavier Hanoulle [a], Jean-François Bodart [b], Jean-Pierre Vilain [b], Jean-Claude Michalski [a], Isabelle Landrieu [a], Guy Lippens [a], Tony Lefebvre [a,*]

[a] *UMR-CNRS 8576, UGSF, USTL, IFR 147, 59655 Villeneuve d'Ascq, France*
[b] *EA 4020, Laboratoire de Régulation des Signaux de Division, USTL, IFR147, Villeneuve d'Ascq, France*

Received 12 February 2008
Available online 25 February 2008

Abstract

In order to understand the importance of the cytosolic and nuclear-specific *O*-linked *N*-acetylglucosaminylation (*O*-GlcNAc) on cell cycle regulation, we recently reported that inhibition of *O*-GlcNAc transferase (OGT) delayed or blocked *Xenopus laevis* oocyte germinal vesicle breakdown (GVBD). Here, we show that increased levels of the long OGT isoform (ncOGT) accelerate *X. laevis* oocyte GVBD. A N-terminally truncated isoform (sOGT) with a similar *in vitro* catalytic activity towards a synthetic CKII-derived peptide had no effect, illustrating the important role played by the N-terminal tetratrico-peptide repeats. ncOGT microinjection in the oocytes increases both the speed and extent of *O*-GlcNAc addition, leads to a quicker activation of the MPF and MAPK pathways and finally results in a faster GVBD. Microinjection of anti-OGT antibodies leads to a delay of the GVBD kinetics. Our results hence demonstrate that OGT is a key molecule for the timely progression of the cell cycle.
© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: OGT; *O*-GlcNAc; *Xenopus laevis*; Oocyte; Cell cycle

O-GlcNAc is a dynamic post-translational modification (PTM) abundantly found in metazoans (for review see [1]). *O*-GlcNAc addition and removal are, respectively, catalyzed by two enzymes, the *O*-GlcNAc transferase (OGT) and the *O*-GlcNAcase. Although three different OGT isoforms have been described [2], their number remains largely inferior to the number of kinases that promote the phosphate moiety addition on Ser, Thr or Tyr hydroxyl functions. Study of *O*-GlcNAc began in the middle of the eighties, leading to a total of over 400 *O*-GlcNAc-bearing proteins presently identified. Nevertheless, despite the yin–yang model describing the reciprocal nature of *O*-GlcNAc addition and phosphorylation, the exact functions performed by *O*-GlcNAc remain elusive.

An involvement of this modification in cell cycle progression was suggested two decades ago [3] and was recently further detailed [4]. Different chemical inhibitors of both molecular players—alloxan [5] and a benzoxazolinone derivative [6] for OGT and PUGNAc [7] for *O*-GlcNAcase—have been described. Incubation of *Xenopus laevis* oocytes with them allowed to establish a direct link between *O*-GlcNAc and cell cycle control [8]. These studies demonstrated that OGT was involved in oocyte maturation and that it affects activation of both p42MAPK and MPF (Cdk1-CyclinB) pathways induced by hormonal stimulation. In *Xenopus* oocytes or egg extracts it was also shown that microinjection of a galactosyltransferase and the resulting elongation of GlcNAc residues with galactose, inhibited M-phase entry and blocked S to M-phase transition [9]. Altogether, these results strongly suggest the pivotal role of the *O*-GlcNAc modification in the control of cell cycle progression.

* Corresponding author. Fax: +33 3 20 43 65 55.
E-mail address: tony.lefebvre@univ-lille1.fr (T. Lefebvre).

0006-291X/$ - see front matter © 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.bbrc.2008.02.063

© 2009 Tous droits réservés.
http://doc.univ-lille1.fr

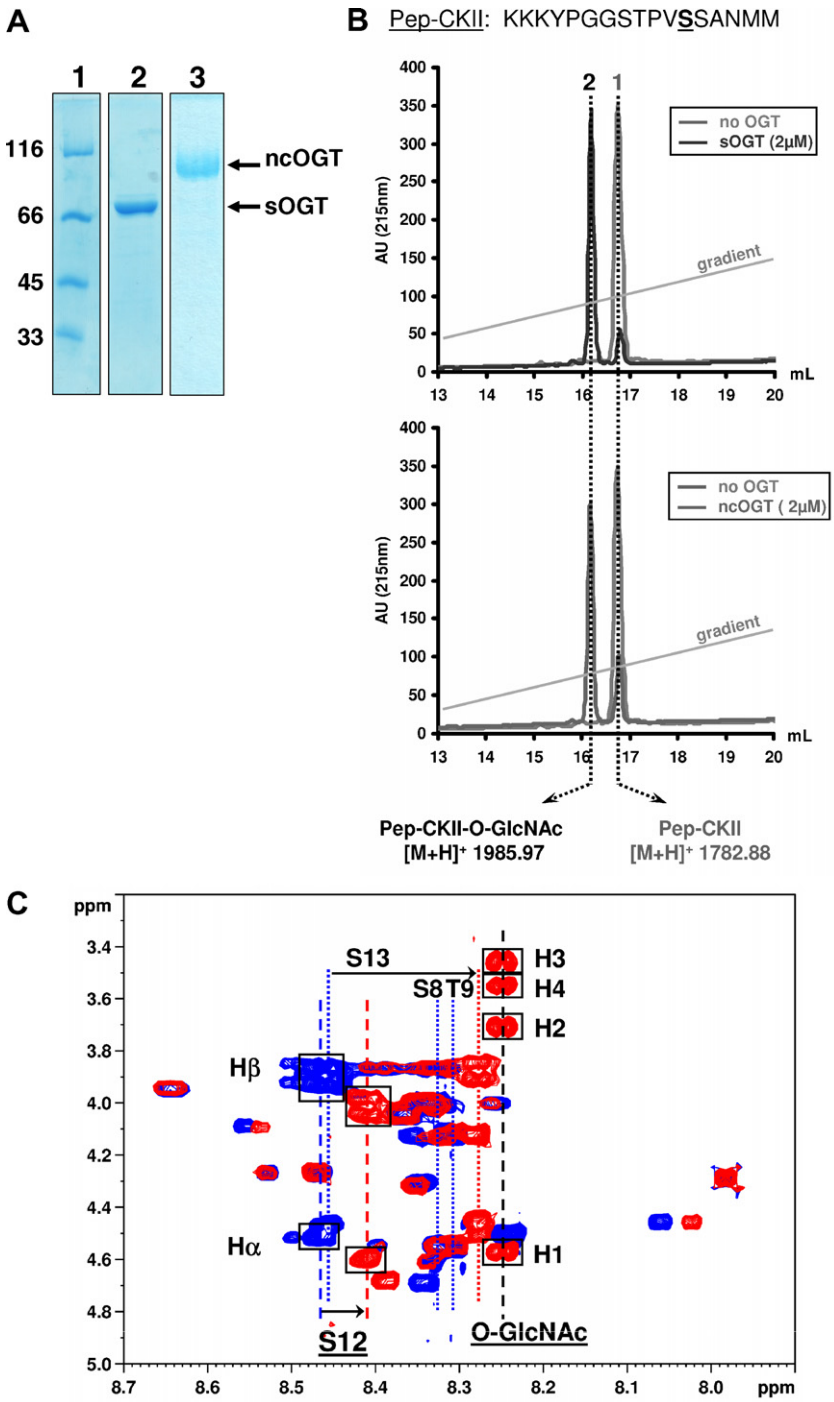


Fig. 1. sOGT and ncOGT production and control of activity. (A) Purification of recombinant human sOGT and ncOGT. SDS–PAGE analysis of the purified sOGT and ncOGT: mass markers (lane 1, in kDa), sOGT (lane 2), and ncOGT (lane 3). (B) *In vitro* activity of recombinant OGT on a peptide substrate. Activity of sOGT (upper chromatograms) and ncOGT (lower chromatograms) were assessed on a peptide derived from the casein kinase II (Pep-CKII). Serine corresponding to the modification site is shown in bold and is underlined. Chromatograms corresponding to the reaction without OGT (grey) and with recombinant OGTs (black) were overlaid. Peaks 1 and 2 were analyzed by mass spectrometry. Peak 1 corresponds to the non-modified Pep-CKII and peak 2 to the peptide carrying the *O*-GlcNAc group. (C) Characterisation of the *O*-GlcNAc modification on Pep-CKII by NMR spectroscopy. H_N/H_α–H_β region of the proton TOCSY spectrum of the non-modified pep-CKII (blue) and the recombinant OGT *in vitro* modified-peptide (red). The H_N, H_α, and H_β protons of S12 undergo chemical shift changes following *O*-GlcNAc modification. The spin system from the *O*-GlcNAc moiety is visible at 8.248 ppm (H_N from the *N*-acetyl group). Peaks (in red) from the *O*-GlcNAc-S12 residue are boxed. (For interpretation of the references in colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

addition to the Ser12 hydroxyl was nearly complete, as demonstrated by the comparative RP-HPLC profiles for the unmodified and the glycosylated peptide and subsequent mass spectrometry analyses (Fig. 1B). NMR

© 2009 Tous droits réservés.

Thèse de Vanessa Dehennaut, Lille 1, 2008

spectroscopy allowed us to ascertain the specificity of the enzyme, as we could establish that only this particular Ser was modified by *O*-GlcNAc. Although the amide proton of both the Ser12 and Ser13 shifted upon addition of the *O*-GlcNAc moiety on the Ser12 hydroxyl function, only for Ser12 we detected Hα and Hβ chemical shift changes (Fig. 1C). Chemical shift changes for the side chain carbons were even more discriminative, as only those of the Ser12 side chain changed in the ^{1}H, ^{13}C HSQC spectrum (Fig. 1, Supplemental data).

Whereas we first obtained these results with ncOGT, the results with the smaller sOGT isoform were nearly identical (Fig. 1B). This demonstrates that the catalytic activity towards a small peptide substrate does not require the N-terminal TPR, but is solely carried by the C-terminal catalytic domain. Despite the presence of two other Ser and one Thr residues in the same peptide, both isoforms of the OGT enzyme display an absolute specificity towards Ser12 of this peptide.

Unlike sOGT, ncOGT is active when microinjected into oocyte

sOGT and ncOGT were microinjected within an identical volume of 50 nL. Two hours post-injection, oocyte GVBD was triggered by overnight incubation with progesterone. Oocytes were subsequently lysed and analyzed by western blots for the presence of *O*-GlcNAc and cell cycle markers (Fig. 2). Activation of the p42MAPK and MPF pathways was examined using an anti-Erk2 and an anti-cyclinB2 antibody, respectively. The discrimination between active/non active Erk2 and between active/non active cyclinB2 is based on the doublet pattern of both proteins: the non-phosphorylated lower migrating one is the inactive form, whereas the upper band is the active phosphorylated form. When we analyzed the non injected or buffer microinjected oocytes, we readily detected the longer OGT isoform by the DM17 anti-OGT antibody, whereas the sOGT isoform was hardly detectable. Microinjection of the latter evidently lead to its detection as two bands migrating at 70 kDa. However, despite its *in vitro* activity, sOGT had no effect on the overall *O*-GlcNAc level after progesterone stimulation, when compared to buffer-injected oocytes. In contrast, ncOGT injection significantly increased *O*-GlcNAc levels compared to sOGT and buffer. Independently of the microinjected substance, p42MAPK and MPF pathways were both activated upon progesterone stimulation. However, accumulation of β-catenin was more pronounced in ncOGT-injected oocytes (Fig. 2). The anti-*O*-GlcNAc Western blot displays a band at a molecular weight corresponding to β-catenin (Fig. 2), with an identical pattern as that revealed by the anti-β-catenin antibody. This observation strongly suggests that a major fraction of the detected β-catenin is *O*-GlcNAc modified, reinforcing

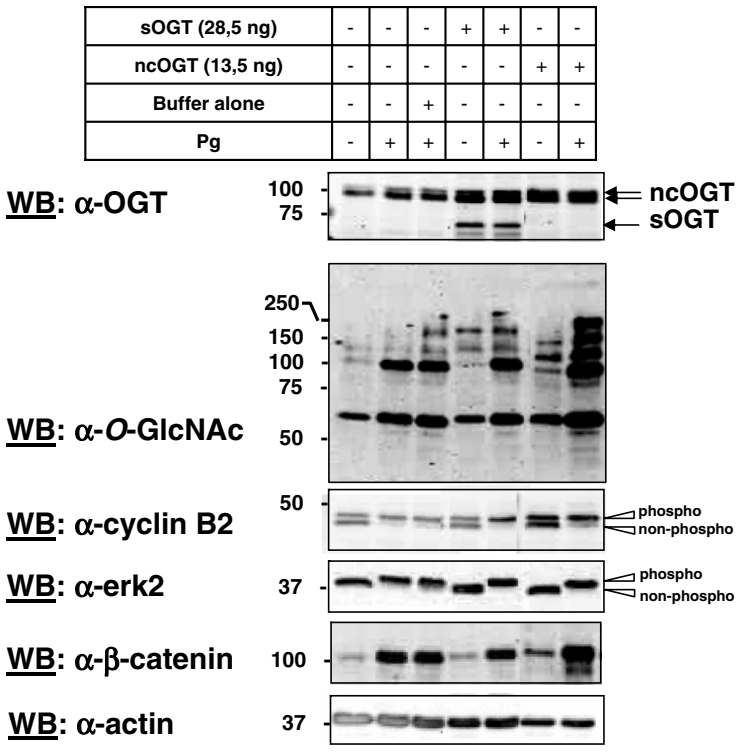


Fig. 2. sOGT has no activity on oocyte meiotic resumption contrary to ncOGT. The short form (sOGT) and the long form (ncOGT) of *O*-GlcNAc transferase were microinjected into immature oocytes prior to progesterone incubation. Meiotic resumption process was pursued overnight and oocytes were analyzed for *O*-GlcNAc, cyclinB2, Erk2, β-catenin, and actin contents by Western blot. Arrows heads at the right of the figure indicate the phosphorylated (phospho) and non-phosphorylated (non-phospho) forms of cyclinB2 and Erk2. Molecular weights are indicated at the left (kDa). Pg, progesterone; WB, Western blot.

© 2009 Tous droits réservés. http://doc.univ-lille1.fr

Thèse de Vanessa Dehennaut, Lille 1, 2008

the role of this PTM in protein stability. This strengthens the antagonism between GSK-3β and OGT, the latter blocking the action of the former on target proteins.

Microinjection of ncOGT potentiates oocyte GVBD kinetics, and activates more rapidly both p42MAPK and MPF pathways

ncOGT or buffer alone was injected into immature oocytes. Two hours after microinjection, oocytes were stimulated with progesterone and time course experiments were performed by harvesting oocytes at different time-points and analyzing their status as previously described. For each experiment, the time requested for 50% of oocytes to undergo GVBD ($GVBD_{50}$, a convenient indicator of GVBD kinetic variation) was determined (Fig. 3A). We consistently compared the maturation kinetics for the same batch of oocytes microinjected with buffer or with ncOGT. For each time-point, *O*-GlcNAc content and p42MAPK and MPF pathways activation were assessed by Western blotting (Fig. 3B). Fig. 3A shows that oocytes matured more rapidly when microinjected with ncOGT. In a typical experiment, buffer-injected oocytes reached $GVBD_{50}$ 210 min after progesterone stimulation, while ncOGT-

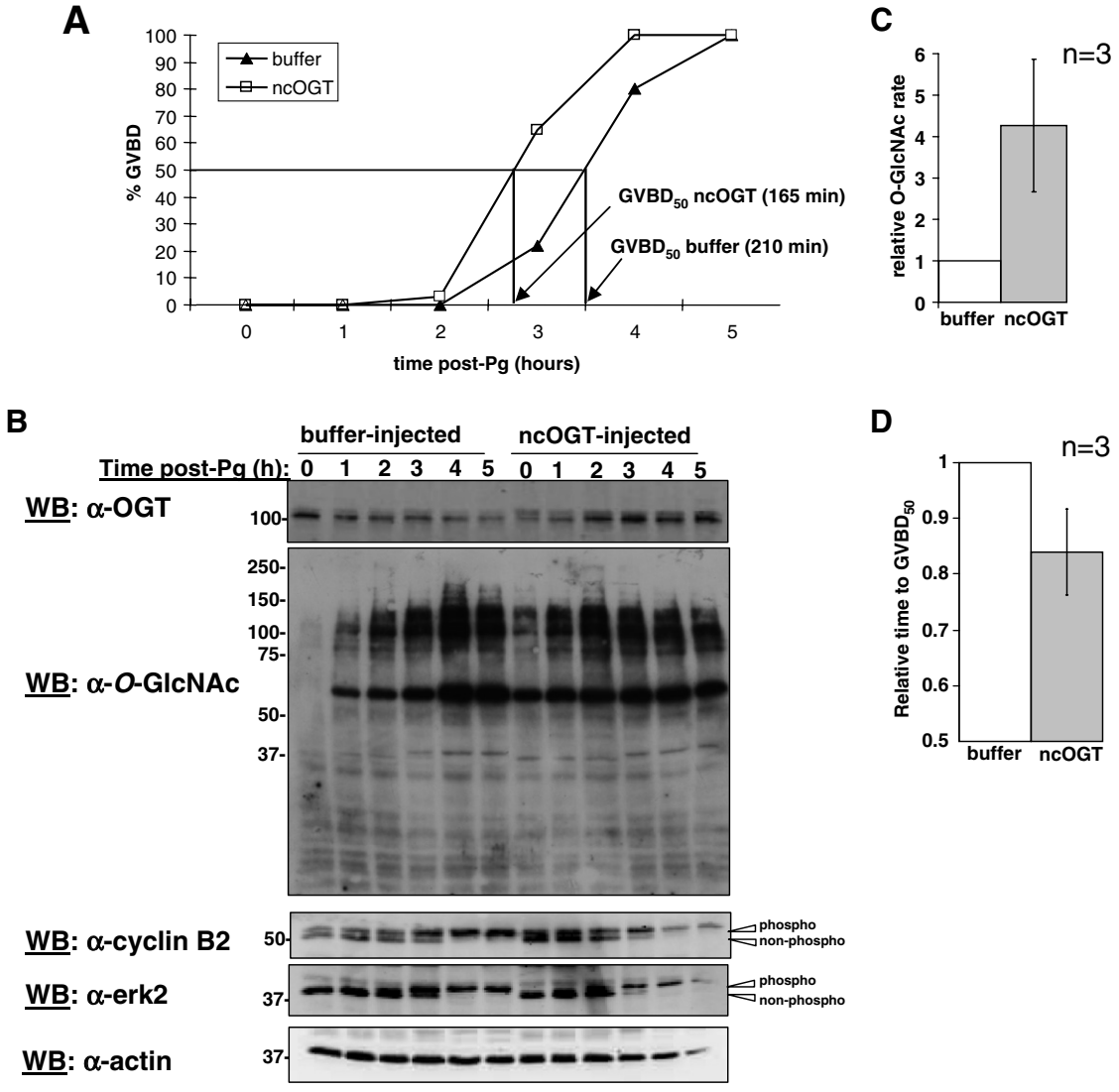


Fig. 3. ncOGT accelerates progesterone-induced oocytes GVBD. ncOGT was microinjected into immature oocytes before stimulation of meiotic resumption by progesterone. Oocytes were then observed every hour and white spots corresponding to matured oocytes were counted. Oocytes were picked up respecting the white spot ratio for biochemical analyses. (A) GVBD profiles of ncOGT-injected oocytes (open squares) *versus* buffer-injected ones (black triangles). (B) Whole crude extracts were analyzed by Western blot according to their OGT, *O*-GlcNAc, cyclinB2, Erk2, and actin contents. Arrows heads at the right of the figure indicate the phosphorylated (phospho) and non-phosphorylated (non-phospho) forms of cyclinB2 and Erk2. Molecular weights are indicated at the left (kDa). (C) Histogram showing the *O*-GlcNAc level obtained by densitometric analyses of Western blots of ncOGT-injected immature oocytes *versus* buffer-injected ones. Buffer was considered as the control and its value was arbitrary assigned to 1. (D) $GVBD_{50}$ of three independent experiments were used to calculate the mean value and standard deviations. Values were represented in a histogram. Since the absolute time varied significantly from one experiment to another, depending on the individual animal and on the time of the year when oocytes were removed, $GVBD_{50}$ of controls (injection of buffer) were arbitrary set at a value of 1. $GVBD_{50}$, 50% of GVBD; WB, Western blot.

© 2009 Tous droits réservés. http://doc.univ-lille1.fr

Thèse de Vanessa Dehennaut, Lille 1, 2008

injection accelerated this time-point to only 165 min after GVBD release. Interestingly, microinjection of the ncOGT leads to a quick increase in *O*-GlcNAc levels, even before the GVBD process promoted by progesterone has set in. Indeed, when we compare the first time-point for both conditions, where none of the oocytes has undergone GVBD, *O*-GlcNAc levels are superior upon ncOGT injection. This observation is in agreement with the significant enzymatic activity that we observed for the OGT in our *in vitro* assays. With the exception of PKA, that very efficiently phosphorylates its consensus sequence [10], OGT largely exceeds enzymatic efficiencies of many other kinases such as GSK-3β or CDK1/CycA (A. Leroy, I.L., and G. L., unpublished observations). Biochemical analyses indicate that in ncOGT-injected oocytes, p42MAPK, and MPF pathways were equally more rapidly activated (Fig. 3B; compare Erk2 and CyclinB2 phosphorylation states at time 3 h post-progesterone stimulation for the two conditions) in comparison with buffer-injected oocytes. When we summarize these results obtained in three independent experiments, we observed, before progesterone stimulation (corresponding to time 0), a 4.27 ± 1.59-fold increase in *O*-GlcNAc content in ncOGT-injected oocytes compared to control buffer-injected ones (Fig. 3C) and a correspond-

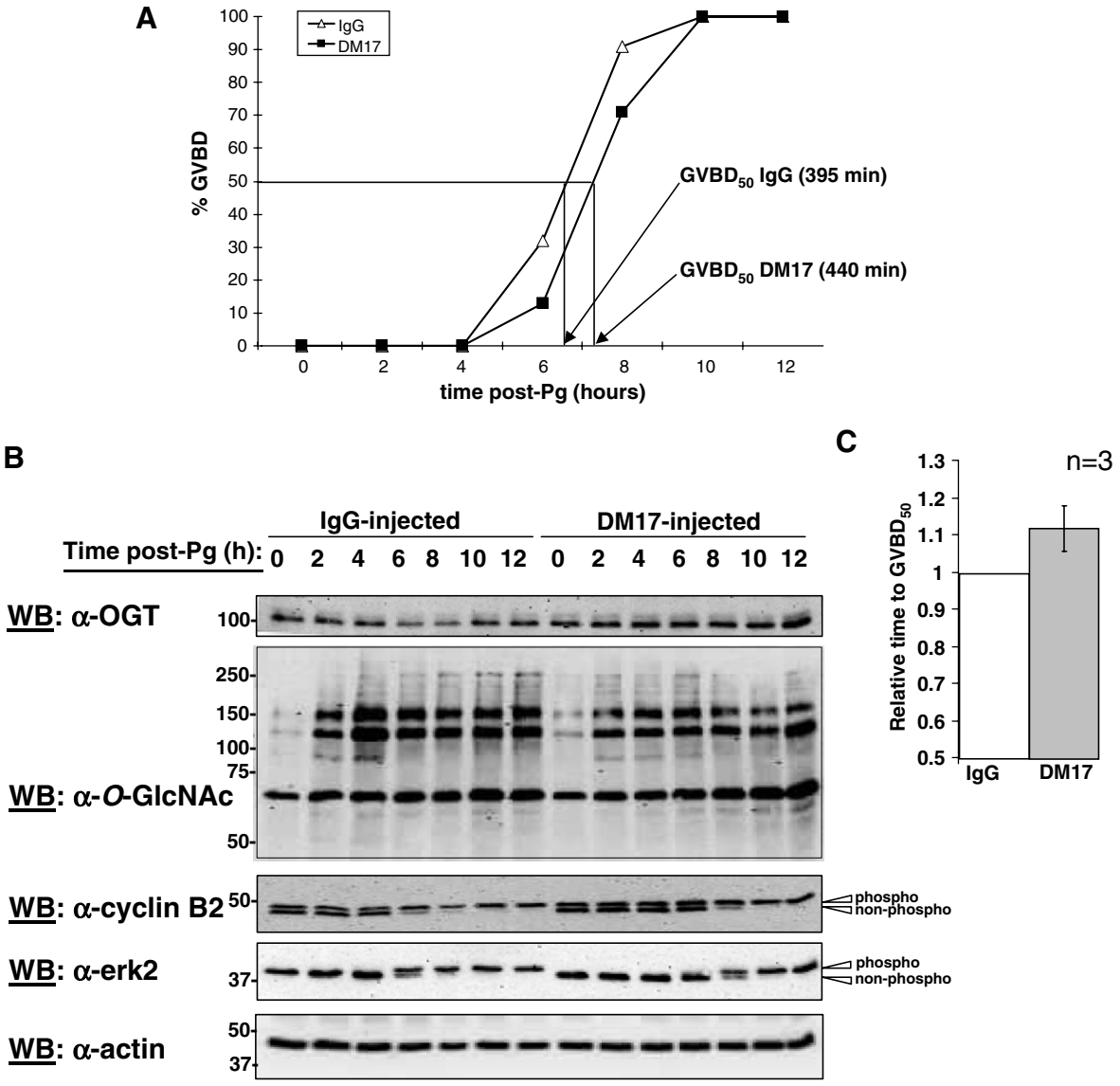


Fig. 4. Partially neutralization of OGT with specific-directed antibodies delayed GVBD. Anti-OGT antibody (DM17) was microinjected into oocytes in order to partially block endogenous *Xenopus laevis* OGT. After hormonal stimulation, every two hours oocytes were observed in order to count white spots. Oocytes were picked up respecting the white spot ratio in view of their biochemical analysis. (A) GVBD profiles of anti-OGT-injected oocytes (black squares) *versus* rabbit IgG-injected oocytes (open triangles). (B) Whole crude extracts were analyzed by Western blots according to their OGT, *O*-GlcNAc, cyclinB2, Erk2 and actin contents. Arrows heads at the right indicate the phosphorylated (phospho) and non-phosphorylated (non-phospho) forms of cyclinB2 and Erk2. Molecular weights are indicated at the left (kDa). (C) $GVBD_{50}$ of three independent experiments were used to calculate the mean value and standard deviations. Values were represented in a histogram. $GVBD_{50}$ of controls (injection of IgG) were arbitrary set at a value of 1. $GVBD_{50}$, 50% of GVBD; WB, Western blot.

© 2009 Tous droits réservés. http://doc.univ-lille1.fr

Thèse de Vanessa Dehennaut, Lille 1, 2008

In the present report, we further exploit the possibility to microinject recombinant proteins into oocytes to detail the relationship between cell cycle and *O*-GlcNAc. Microinjection of the OGT long isoform into immature oocytes was found to accelerate progesterone-induced GVBD kinetics. This effect critically depends on the presence of the full-length N-terminal TPRs, as a shorter isoform devoid of these repeats had no significant effect. OGT neutralization through the use of anti-OGT antibodies corroborated these observations, since a concomitant decrease in OGT activity was found to delay the GVBD/M-phase entry.

Materials and methods

Expression and purification of sOGT and ncOGT. Plasmids for the recombinant production of human sOGT and ncOGT in *Escherichia coli* were obtained from the laboratory of S. Walker (Harvard Medical School). The expression and the first step of purification were done as previously described [6]. Following the Ni^{2+}-NTA IMAC purification, recombinant enzymes were purified by gel filtration chromatography using a Superdex200 prep grade column equilibrated in 20 mM KH_2PO_4/K_2HPO_4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.5. Fractions from the size exclusion chromatography were selected based on SDS–PAGE analysis, pooled, supplemented with 0.5 mM Tris(hydroxypropyl)phosphine (THP) and stored at −80 °C. Starting from 1.5 L cultures and following the purification scheme described above we obtained 12 mg of pure sOGT and 4.9 mg of ncOGT (Fig. 1A).

In vitro activity of sOGT and ncOGT. The enzymatic activity of the recombinant sOGT and ncOGT was assessed on a peptide substrate (Pep-CKII: KKKYPGGSTPVSSANMM) derived from Casein kinase-II which is a known natural substrate for OGT [6]. The reaction mixtures contained 200 μM Pep-CKII, 500 μM UDP-GlcNAc, 12.5 mM $MgCl_2$ in buffer 50 mM KH_2PO_4/K_2HPO_4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM THP, pH 7.5. The assays were done in a final volume of 50 μL, with 2 μM of either sOGT or ncOGT for 45 min at 37 °C. The reactions were stopped with TFA and stored at −80 °C until analyzed.

The reaction mixtures were analyzed by RP-HPLC on a μRPC C2/C18 ST 4.6/100 column (GE Healthcare) with a TFA-acetonitrile system buffer then by mass spectrometry on a MALDI-TOF (Applied Biosystem, Voyager DE Pro). The addition of *O*-GlcNAc induces a different behaviour of the Pep-CKII on the reverse phase column. Indeed, the modified peptide elutes earlier (16.15 mL) compared to the non-modified one (16.80 mL), enabling a rapid quantification of the degree of modification on the peptide substrate. The *in vitro* enzymatic addition of *O*-GlcNAc on the peptide Pep-CKII was almost quantitative with both sOGT and ncOGT (Fig. 1B). MALDI-TOF analyses of the RP-HPLC peaks confirmed that the modification corresponds to the addition of a single *O*-GlcNAc residue per peptide. The modified peptide was further analyzed by NMR spectroscopy. Spectra were recorded on 200 μM samples in buffer 100 mM NaH_2PO_4/Na_2HPO_4, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 6.1, on a Bruker Avance 600 MHz spectrometer equipped with a cryogenic triple resonance probe head, at 25 °C (Bruker, Karslruhe, Germany). The proton chemical shifts were referenced using the methyl signal of TMSP (sodium 3-trimethyl-silyl-[2,2,3,3-d.4]propionate) at 0 ppm. The spectra were processed with the Bruker TOPSPIN software package.

Handling of oocytes. After anesthetizing *Xenopus* females (purchased from the University of Rennes I, France) by immersion in 1 g L^{-1} MS222 solution (tricaine methane sulfonate; Sandoz), ovarian lobes were surgically removed and placed in ND96 medium (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 5 mM Hepes–NaOH, pH 7.5). Fully grown stage VI oocytes were isolated and follicle cells were partially removed by 1 mg mL^{-1} collagenase A (Roche Applied Science) treatment for 30 min followed by a manual microdissection. Oocytes were stored at 14 °C in ND96 medium until experiments. Meiotic resumption was induced by incubating oocytes at 19 °C in ND96 medium containing 10 μM of progesterone (Sigma–Aldrich). GVBD which reflects oocyte entry into the maturation process was scored by the appearance of a white spot at the animal pole of the oocyte.

OGT microinjection. Immature oocytes were microinjected using a positive displacement digital micropipette (Nichiryo, Tokyo, Japan) either with 50 nL of injection-buffer alone (50 mM KH_2PO_4/K_2HPO_4 pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM THP), or with 50 nL of injection-buffer containing 0.57 mg mL^{-1} sOGT or 0.27 mg mL^{-1} ncOGT. Before stimulation of meiotic resumption, oocytes were kept in ND96 at 14 °C for 1–2 h to allow them to heal. For each time-point, 5–10 oocytes were taken respecting the white spot ratio and stored at −20 °C until further biochemical analysis.

Anti-OGT antibody microinjection. Immature oocytes were microinjected either with 40 nL of anti-OGT antibody (DM17; Sigma–Aldrich) or with 100 nL of rabbit control IgG (Santa Cruz Biotechnologies). Before stimulation of meiotic resumption, oocytes were kept in ND96 at 14 °C overnight. For each time-point, 5–10 oocytes were taken respecting the white spot ratio and stored at −20 °C until further biochemical analysis.

SDS–PAGE and western blotting. Proteins (the equivalent of one oocyte was loaded per lane) were run on a 17.5% modified SDS–PAGE [8]—this kind of gel allows a better discrimination between protein isoforms of phosphorylation- and electroblotted onto nitrocellulose sheet. Blots were saturated with 5% (w/v) non-fatty milk in TBS (Tris-buffered saline)-Tween (15 mM Tris, 140 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween, pH 7,5) for 45 min. Primary antibodies were incubated overnight at 4 °C. Mouse monoclonal anti-*O*-GlcNAc (RL-2; Affinity Bioreagents), mouse monoclonal anti-Erk2 (D-2; Santa Cruz Biotechnologies), rabbit polyclonal anti-β-catenin (H-102; Santa Cruz Biotechnologies), rabbit polyclonal anti-cyclin B2 (generously provided by Dr. John Gannon from the ICRF, South Mimms, UK) were used at a dilution of 1:1000. Rabbit polyclonal anti-actin (I-19; Santa Cruz Biotechnologies) antibody was used at a dilution of 1:10,000. Nitrocellulose membranes were washed in TBS-Tween and incubated with either an anti-mouse horseradish peroxidase-labeled secondary antibody or an anti-rabbit horseradish peroxidase-labeled secondary antibody (GE healthcare) at a dilution of 1:10,000. Finally, membranes washes were performed with TBS-Tween and the detection was carried out with enhanced chemiluminescence (GE Healthcare).

Results and discussion

Recombinant sOGT and ncOGT are both active on a casein kinase II-derived peptide

To date, three OGT isoforms have been described [2]: two nucleocytoplasmic forms, namely ncOGT (nucleocytoplasmic OGT) and sOGT (short OGT), and a mitochondrial form, mOGT (mitochondrial OGT). These three isoforms exhibit an identical catalytic domain localised in the second half of the protein but differ in the N-terminal part and more particularly in the number of tetratrico-peptide repeats (TPR) they contain. The TPR motif is a stretch of thirty four amino-acids that is found in numerous protein interacting domains: ncOGT possesses 12 TPR, sOGT only 2 and mOGT possesses 9 repeats in addition to a mitochondrial target sequence.

We recombinantly produced human sOGT and ncOGT in *E. coli*, and purified the resulting enzymes to purity, as assessed by SDS–PAGE (Fig. 1A). *In vitro* enzymatic activities for sOGT and ncOGT were tested using a CKII-derived peptide. After 45 min of incubation with a catalytic amount of enzyme (enzyme:substrate=1:100), *O*-GlcNAc

© 2009 Tous droits réservés. http://doc.univ-lille1.fr

Thèse de Vanessa Dehennaut, Lille 1, 2008

ing diminution of the relative time to reach $GVBD_{50}$ (Fig. 3D, 0.84 ± 0.08 for ncOGT-injected oocytes *versus* buffer-injected oocytes (considered as 1 for normalization)). In summary of this experiment, ncOGT microinjection increases *O*-GlcNAc level before progesterone stimulation, and leads subsequently to an acceleration of the GVBD process.

Neutralization of OGT with specific-directed antibodies delayed GVBD time

In order to complete our results shown in Fig. 3, and further underscore the previously obtained results with the OGT chemical inhibitors [8], we microinjected the polyclonal anti-OGT antibody (DM17) in immature oocytes before progesterone stimulation. A negative control was performed by microinjection of rabbit IgG. Time course experiments were realised as for microinjection of ncOGT. Contrary to ncOGT microinjection, anti-OGT microinjection delayed GVBD time span (Fig. 4A, $GVBD_{50}$ reached at 395 min for IgG-injected oocytes *versus* 420 min for anti-OGT injected ones) but only slightly decreases *O*-GlcNAc content (Fig. 4B). The latter result suggests that antibody injection only partially blocks the enzymatic activity of the OGT in the oocyte. Both p42MAPK and MPF pathway activations were delayed as attested by Erk2 and cyclinB2 staining (Fig. 4B, compare time 6 h for DM17 *versus* IgG). These observations demonstrate that DM17 partially blocks OGT activity, leading to an increase in $GVBD_{50}$. This experiment corroborates results described above and demonstrates that OGT is physically involved in *Xenopus* oocyte meiotic resumption.

Our work demonstrates the crucial implication of OGT in the *X. laevis* oocyte G2/M transition. Microinjection of the recombinant human ncOGT accelerates oocyte meiotic resumption, whereas partial OGT neutralization slows down this process. We showed that only the long isoform of OGT was active in oocytes, whereas the short form was not, despite a similar *in vitro* activity on a CKII-derived peptide for the two forms. This discrepancy can be explained by the strict *in vivo* requirement of a full-length N-terminal domain containing all TPR for substrate recognition and modification. Western blotting did not lead to a significant detection of the endogenous sOGT isoform (Fig. 2, compare lanes 1–3, 6, and 7 to lanes 4 and 5), so it remains to be seen whether and how sOGT would be active in the *Xenopus* oocyte. At the time of maturation, the microinjection of ncOGT significantly stabilizes β-catenin, a transcription factor whose activity is required for embryonic dorsalization [11]. It normally does not accumulate in immature oocytes, since its phosphorylation by GSK-3β leads to its ready degradation. Upon hormonal stimulation, GSK-3β inhibition leads to β-catenin dephosphorylation, allowing its accumulation. Inhibition of GSK-3β by lithium was previously shown to influence the *O*-GlcNAc content of different cellular proteins, with both increased and decreased contents of *O*-GlcNAc [12]. Our results show that microinjection of an active form of ncOGT leads to an increased pool of β-catenin after GVBD (Fig. 2). This pool must probably carry an *O*-GlcNAc modification, as witnessed by the identical band detected at the same molecular weight by the anti-*O*-GlcNAc antibody (Fig. 2), and thereby provides a link between OGT enzyme activity and β-catenin stability. The observation that immature oocytes possess high *O*-GlcNAc levels 2 h after microinjection with the ncOGT enzyme but before incubation with progesterone (time 0) is also interesting, as it might explain why this pool of oocytes would enter M-phase more rapidly. Without microinjection but after hormonal stimulation, *O*-GlcNAc levels were previously shown to rise rapidly [13], and inhibition of OGT abrogated or delayed meiotic resumption [8]. This suggests that the *O*-GlcNAc burst is essential for oocyte GVBD, and would correlate with the high *O*-GlcNAc levels mediated by microinjection of the active ncOGT enzyme rendering the oocytes more susceptible to progesterone stimulation. The present study thereby underscores the pivotal function of *O*-GlcNAc in meiotic resumption, and links it directly to the stability of cellular factors. Further identification of OGT oocyte targets should highlight the role of *O*-GlcNAc in the complex progression of the cell cycle G2/M transition.

Acknowledgments

We are grateful to Prof. S. Walker and Dr. B. Gross (Department of Microbiology and Molecular Genetics, Harvard Medical School, Boston) for the generous gift of sOGT and ncOGT vectors. We acknowledge financial support from the «Ministère de la Recherche et de l'Enseignement» and by the «Association de la Recherche contre le Cancer».

Appendix A. Supplementary data

^{1}H–^{13}C HSQC spectra of pep-CKII (in blue) and *in vitro* *O*-GlcNAc modified pep-CKII (in red). Spectra are centered on the C_{α}–C_{β} region of the peptides. Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bbrc.2008.02.063.

References

[1] G.W. Hart, M.P. Housley, C. Slawson, Cycling of *O*-linked beta-*N*-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins, Nature 446 (2007) 1017–1022.

[2] J.A. Hanover, S. Yu, W.B. Lubas, S.H. Shin, M. Ragano-Caracciola, J. Kochran, D.C. Love, Mitochondrial and nucleocytoplasmic isoforms of *O*-linked GlcNAc transferase encoded by a single mammalian gene, Arch. Biochem. Biophys. 409 (2003) 287–297.

[3] K.P. Kearse, G.W. Hart, Lymphocyte activation induces rapid changes in nuclear and cytoplasmic glycoproteins, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991) 1701–1705.

[4] C. Slawson, N.E. Zachara, K. Vosseler, W.D. Cheung, M.D. Lane, G.W. Hart, Perturbations in *O*-linked beta-*N*-acetylglucosamine protein modification cause severe defects in mitotic progression and cytokinesis, J. Biol. Chem. 280 (2005) 32944–32956.

© 2009 Tous droits réservés. http://doc.univ-lille1.fr

Thèse de Vanessa Dehennaut, Lille 1, 2008

[5] R.J. Konrad, F. Zhang, J.E. Hale, M.D. Knierman, G.W. Becker, J.E. Kudlow, Alloxan is an inhibitor of the enzyme *O*-linked *N*-acetylglucosamine transferase, Biochem. Biophys. Res. Commun. 293 (2002) 207–212.

[6] B.J. Gross, B.C. Kraybill, S. Walker, Discovery of *O*-GlcNAc transferase inhibitors, J. Am. Chem. Soc. 127 (2005) 14589–15588.

[7] R.S. Haltiwanger, K. Grove, G.A. Philipsberg, Modulation of *O*-linked *N*-acetylglucosamine levels on nuclear and cytoplasmic proteins in vivo using the peptide *O*-GlcNAc-beta-*N*-acetylglucosaminidase inhibitor *O*-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene)amino-*N*-phenylcarbamate, J. Biol. Chem. 273 (1998) 3611–3617.

[8] V. Dehennaut, T. Lefebvre, C. Sellier, Y. Leroy, B. Gross, S. Walker, R. Cacan, J.C. Michalski, J.P. Vilain, J.F. Bodart, *O*-linked *N*-acetylglucosaminyltransferase inhibition prevents G2/M transition in *Xenopus laevis* oocytes, J. Biol. Chem. 282 (2007) 12527–12536.

[9] B. Fang, M.W. Miller, Use of galactosyltransferase to assess the biological function of *O*-linked *N*-acetyl-D-glucosamine: a potential role for *O*-GlcNAc during cell division, Exp. Cell Res. 263 (2001) 243–253.

[10] I. Landrieu, L. Lacosse, A. Leroy, J.M. Wieruszeski, X. Trivelli, A. Sillen, N. Sibille, H. Schwalbe, K. Saxena, T. Langer, G. Lippens, NMR analysis of a Tau phosphorylation pattern, J. Am. Chem. Soc. 128 (2006) 3575–3583.

[11] J. Heasman, A. Crawford, K. Golstone, P. Garner-Hamrick, B. Gumbiner, P. McCrea, C. Kintner, C. Yoshida-Noro, C. Wilie, Overexpression of cadherins and underexpression of β-catenin inhibit dorsal mesoderm induction in early embryos, Cell 79 (1994) 701–803.

[12] Z. Wang, A. Pandey, G.W. Hart, Dynamic interplay between *O*-linked *N*-acetylglucosaminylation and glycogen synthase kinase-3-dependent phosphorylation, Mol. Cell. Proteomics 6 (2007) 1365–1379.

[13] T. Lefebvre, F. Baert, J.F. Bodart, S. Flament, J.C. Michalski, J.P. Vilain, Modulation of *O*-GlcNAc glycosylation during *Xenopus* oocyte maturation, J. Cell. Biochem. 93 (2004) 999–1010.

© 2009 Tous droits réservés. http://doc.univ-lille1.fr

PUBLICATION 3

© 2009 Tous droits réservés.

http://doc.univ-lille1.fr

Supplemental Material can be found at:
http://www.mcponline.org/cgi/content/full/M700494-MCP200/DC1

Identification of Structural and Functional *O*-Linked *N*-Acetylglucosamine-bearing Proteins in *Xenopus laevis* Oocyte*[S]

Vanessa Dehennaut‡§¶, Marie-Christine Slomianny‡‖, Adeline Page‖, Anne-Sophie Vercoutter-Edouart‡, Catherine Jessus‡‡, Jean-Claude Michalski‡, Jean-Pierre Vilain§, Jean-François Bodart§, and Tony Lefebvre‡§§**

O*-Linked *N*-acetylglucosaminylation (*O*-GlcNAcylation) (or *O*-linked *N*-acetylglucosamine (*O*-GlcNAc)) is an abundant and reversible glycosylation type found within the cytosolic and the nuclear compartments. We have described previously the sudden *O*-GlcNAcylation increase occurring during the *Xenopus laevis* oocyte G_2/M transition, and we have demonstrated that the inhibition of *O*-GlcNAc-transferase (OGT) blocked this process, showing that the *O*-GlcNAcylation dynamism interferes with the cell cycle progression. In this work, we identified proteins that are *O*-GlcNAc-modified during the G_2/M transition. Because of a low expression of *O*-GlcNAcylation in *Xenopus* oocyte, classical enrichment of *O*-GlcNAc-bearing proteins using *O*-GlcNAc-directed antibodies or wheat germ agglutinin lectin affinity were hard to apply, albeit these techniques allowed the identification of actin and erk2. Therefore, another strategy based on an *in vitro* enzymatic labeling of *O*-GlcNAc residues with azido-GalNAc followed by a chemical addition of a biotin alkyne probe and by enrichment of the tagged proteins on avidin beads was used. Bound proteins were analyzed by nano-LC-nano-ESI-MS/MS allowing for the identification of an average of 20 *X. laevis* oocyte *O*-GlcNAcylated proteins. In addition to actin and β-tubulin, we identified metabolic/functional proteins such as PP2A, proliferating cell nuclear antigen, transitional endoplasmic reticulum ATPase, aldolase, lactate dehydrogenase, and ribosomal proteins. This labeling allowed for the mapping of a major *O*-GlcNAcylation site within the 318–324 region of β-actin. Furthermore immunofluorescence microscopy enabled the direct visualization of *O*-GlcNAcylation and OGT on the meiotic spindle as well as the observation that chromosomally bound proteins were enriched in *O*-GlcNAc and OGT. The biological relevance of this post-translational modification both on microtubules and on chromosomes remains to be determined. However, the mapping of the *O*-GlcNAcylation sites will help to underline the function of this post-translational modification on each identified protein and will provide a better understanding of *O*-GlcNAcylation in the control of the cell cycle. *Molecular & Cellular Proteomics 7:2229–2245, 2008.

Cells divide according to a spatially and a temporally regulated process called the cell cycle. This intricate mechanism is usually divided into four phases, namely G_1 (Gap1), S (DNA replication), G_2 (Gap2), and M (mitosis/meiosis). To ensure successful completion of its division, each phase and each checkpoint (G_0/G_1, G_1/S, G_2/M, and metaphase/anaphase) are tightly controlled by several factors that work in concert. Cyclin-dependent kinases (cdks)[1] and their specific regulators cyclins are the best described regulators monitoring the cell cycle progression. A dysregulation of these cdks leads to an uncontrolled cell division ending up in tissue cancerization (for a review, see Ref. 1).

Xenopus laevis oocyte has been widely used as a model for studying the regulation of the cell cycle. The imposing size of this cell (1.3-mm diameter with a nucleus of 300 μm), a total protein quantity of 25 μg/oocyte, and its amenability for manipulation made this model powerful for the characterization and the identification of many key cell cycle components, such as the M phase-promoting factor (MPF) and the cytostatic factor (2, 3). During oogenesis, the oocyte accumulates nutrients and materials (mRNAs and enzymes) that will be

From the ‡UMR-CNRS 8576, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, §EA 4020, Laboratoire de Régulation des Signaux de Division, and **Centre Commun de Mesures de Spectrométrie de Masse, Université des Sciences et Technologies de Lille, IFR 147, 59655 Villeneuve d'Ascq, France and ‡‡UMR-CNRS 7622, Laboratoire de Biologie du Développement, Equipe Biologie de l'Ovocyte, Université Pierre et Marie Curie, 75252 Paris, France

Received, October 11, 2007, and in revised form, June 24, 2008
Published, MCP Papers in Press, July 9, 2008, DOI 10.1074/mcp.M700494-MCP200

[1] The abbreviations used are: cdk, cyclin-dependent kinase; erk, extracellular signal-regulated kinase; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MPF, M-phase promoting factor; *O*-GlcNAcylation, *O*-linked *N*-acetylglucosaminylation; PTM, post-translational modification; GalNAz, azido-GalNAc; UDP-GalNAz, uridine diphosphoazido-*N*-acetylgalactosamine; MSDB, Mass Spectrometry Protein Sequence Database; OGT, *O*-GlcNAc-transferase; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; TER, transitional endoplasmic reticulum; LH, luteinizing hormone; PUGNAc, *O*-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene)-amino-*N*-phenylcarbamate; IB, immunoprecipitation buffer; HRP, horseradish peroxidase; GalT1, β1,4-galactosyltransferase I; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; eIF, eukaryotic initiation factor.

© 2008 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.
This paper is available on line at http://www.mcponline.org

© 2009 Tous droits réservés.
http://doc.univ-lille1.fr

Downloaded from www.mcponline.org at CNRS on November 10, 2008

Thèse de Vanessa Dehennaut, Lille 1, 2008

necessary to carry out meiosis and for the further fertilization and embryogenesis. At the end of oogenesis, the oocyte is physiologically blocked in prophase of the first meiotic division in a G_2-like stage and is called immature oocyte. After progesterone stimulation (produced and secreted by follicular cells surrounding the oocyte in response to LH), the oocyte resumes meiosis in a G_2/M analogue transition phase; this process termed oocyte maturation is first accompanied by the germinal vesicle breakdown, the condensation of the chromosomes, and the spindle assembly (for a review, see Ref. 4). At the molecular level, the oocyte maturation is in part under the control of cdc25C and myt1, a dual specificity phosphatase and a dual specificity kinase, respectively, acting on cdk1 Thr-14 and Tyr-15. The phosphorylation status of both residues is critical for the activation of the MPF (cdk1-cyclin B) (5, 6). Concomitantly to the MPF, the mos-erk2 pathway, which is required for normal spindle formation (7), is also activated. At the end of maturation, the meiotic cell cycle is stopped in metaphase II in anticipation for fertilization.

We have shown recently that the *X. laevis* oocyte maturation was accompanied by an increase in *O*-GlcNAcylation (8) and that the inhibition of *O*-GlcNAc-transferase (OGT), the enzyme transferring the GlcNAc group to the target proteins, delayed or blocked this process (9) depending on the inhibitor concentration. *O*-GlcNAcylation is a particular PTM in that it possesses features different from other glycosylation types (for reviews, see Refs. 10–13). First, *O*-GlcNAcylation is the modification of serine and threonine residues by a single *N*-acetylglucosamine moiety that is neither elongated nor epimerized. Second, it is found within the cytosolic and the nuclear compartments, whereas the "classical" *N*- and *O*-glycosylation types are mainly confined into the lumen of organelles (endoplasmic reticulum, Golgi, and lysosome) and the secretory pathway, including membrane-bound proteins. Third, *O*-GlcNAcylation is highly dynamic like phosphorylation. These two PTMs can indeed compete at the same or a neighboring site. Although *O*-GlcNAcylation is abundantly widespread in eukaryotes and although more than 600 proteins bearing *O*-GlcNAc have been identified to date (for reviews, see Refs. 11–13), in most cases its exact function(s) remains to be elucidated. Nevertheless *O*-GlcNAcylation seems to be crucial for many cellular processes such as transcription, cell signaling, intracellular trafficking, development, and the cell cycle. Several studies support the functional importance of *O*-GlcNAcylation in the cell cycle progression (for a review, see Ref. 14). For instance, microinjection of bovine galactosyltransferase, an enzyme capping terminal GlcNAc residues, inhibited *Xenopus* oocyte M phase entry and blocked M to S phase transition (15). At the same time, Slawson *et al.* (16) showed that the perturbation of *Xenopus* oocyte *O*-GlcNAcylation levels either by glucosamine or PUGNAc treatment modified the maturation kinetics. Later PUGNAc was used to inhibit the *O*-GlcNAc-hydrolyzing enzyme *O*-*N*-acetylglucosaminidase in somatic cultured cells: PUGNAc-treated cells progressed more slowly through the cell cycle than the untreated cells (17). Therefore, it appears that *O*-GlcNAcylation, like many other PTMs, plays a determining role in the regulation of the cell cycle. For example, the impact of histone modifications by methylation, acetylation, and phosphorylation in the relaxation/condensation of chromatin during the G_2/M transition has been described intensively (for a review, see Ref. 18). The regulation of cyclin stability by ubiquitination and the regulation of MPF activity by phosphorylation are two other examples of the control of the cell cycle by PTMs. To better understand how *O*-GlcNAc levels can control the cell cycle, the identification of proteins for which *O*-GlcNAcylation content varies during this process appears to be essential. Because of a low *O*-GlcNAcylation expression in *Xenopus* oocyte in comparison with human somatic cells, the enrichment of *O*-GlcNAc-bearing proteins by classical approaches (based on immunoprecipitation or lectin affinity) was insufficient for the identification of *O*-GlcNAcylated proteins even if it previously allowed for the identification of *O*-GlcNAc-modified actin and erk2. Here we therefore opted for an *in vitro* modification of *O*-GlcNAc proteins with azido-GalNAc (GalNAz) followed by a chemical addition of a biotin probe. This strategy led to the identification of more than 20 proteins involved in cell architecture, metabolism, and protein translation and to the localization of an *O*-GlcNAcylated site within the 318–324 region of β-actin. Furthermore immunofluorescence microscopy studies showed that the meiotic spindle interacts with OGT, bears *O*-GlcNAc, and/or interacts with *O*-GlcNAcylated proteins and that condensed chromatin also interacts with OGT and is enriched in *O*-GlcNAcylated proteins. The latter observations further underline the importance of *O*-GlcNAcylation in cell division and in the progression of the cell cycle.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals, Chemicals, and Bioreagents

Adult *Xenopus* females came from the University of Rennes I (Rennes, France). Tricaine methane sulfonate was purchased from Sandoz (Levallois-Perret, France). Collagenase A and protease inhibitors were purchased from Roche Applied Science. Progesterone, agarose-coupled WGA beads, agarose-coupled avidin beads, peroxidase-labeled avidin, rabbit polyclonal anti-*O*-GlcNAc-transferase (DM17), and mouse monoclonal anti-β-tubulin (Tub2.1) were purchased from Sigma-Aldrich. Biotin alkyne, Click-it™ *O*-GlcNAc enzymatic labeling system, Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG, Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG, and Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG were purchased from Molecular Probes/Invitrogen. Mouse monoclonal anti-*O*-GlcNAc (RL2) was purchased from Affinity Bioreagents (Golden, CO). CTD110.6 was a kind gift from Prof. Gerald W. Hart's group (Johns Hopkins University, Baltimore, MD). Mouse monoclonal anti-erk2 (D-2), rabbit polyclonal anti-actin (I-19), mouse monoclonal anti-α-tubulin (B-5-1-2), and normal rabbit IgG control (sc-2027) were from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA). The guinea pig polyclonal antibody directed against the 35-kDa catalytic subunit of PP2A was described previously (19). Mouse monoclonal anti-PCNA was purchased from Dako (Glostrup, Denmark). Anti-mouse (IgG or IgM), anti-rabbit (IgG), and anti-guinea pig horseradish peroxidase-

Downloaded from www.mcponline.org at CNRS on November 10, 2008

© 2009 Tous droits réservés.

http://doc.univ-lille1.fr

labeled secondary antibodies and enhanced chemiluminescence reagents were purchased from GE Healthcare. Texas Red-coupled anti-mouse IgM was from Jackson ImmunoResearch Europe Ltd. (Suffolk, UK).

Handling of Oocytes

After anesthetizing *Xenopus* females by immersion in 1 g·liter^{-1} MS222 solution (tricaine methane sulfonate), ovarian lobes were surgically removed and placed in ND96 medium (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 5 mM HEPES-NaOH, pH 7.5). Fully grown stage VI oocytes were isolated, and follicle cells were partially removed by a collagenase treatment for 30 min (1 mg·ml^{-1} collagenase A) followed by a manual microdissection. Oocytes were stored at 14 °C in ND96 medium until experiments.

Stimulation and Analysis of G_2/M Transition (Meiotic Resumption) in Xenopus Oocytes

Meiotic resumption (M phase entry) was induced by incubating G_2-arrested oocytes in ND96 medium containing 10 μM progesterone. Progesterone is naturally synthesized and secreted by follicular cells (after stimulation by the hypophyseal gonadotropin LH) that are around the oocyte. Progesterone is then transformed into different metabolites that trigger meiotic resumption. Germinal vesicle breakdown achievement, a sign of M phase entry, was scored by the appearance of a white spot at the animal pole of the oocyte and checked by hemisection after heat fixation (3 min at 100 °C).

Immunoprecipitation Assays

Batches of 20 immature and matured oocytes and around $8 \cdot 10^6$ HeLa cells were lysed in 1 ml of immunoprecipitation buffer (IB; 10 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% (v/v) Triton X-100, 0.5% (w/v) sodium deoxycholate, 0.1% (w/v) SDS, protease inhibitors, pH 7.4). After centrifugation at 20,000 × *g*, supernatants were incubated overnight at 4 °C with either 10 μl of anti-*O*-GlcNAc (RL2), anti-actin antibodies, or control IgG. Then 50 μl of protein G (for RL2 immunoprecipitation) or protein A (for actin immunoprecipitations) were added to the samples that were newly placed for 1 h at 4 °C. Four washes were carried out in the following order: IB, IB supplemented with 0.5 M NaCl, IB/TNE (10 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4) (v/v), and finally TNE alone. Immunoprecipitates were resuspended in Laemmli buffer and boiled.

Enrichment of O-GlcNAc-bearing Proteins with WGA Immobilized on Agarose Beads

These experiments were performed in two conditions as described previously (8, 20): in non-denaturing conditions that permitted the recovery of all *O*-GlcNAcylated proteins and their associated partners and in more stringent conditions in which all protein-protein interactions were broken.

WGA Enrichment in Non-denaturing Conditions—Batches of 20 immature or matured oocytes were removed and lysed in 100 μl of homogenization buffer (60 mM β-glycerophosphate, 15 mM *para*-nitrophenyl phosphate, 25 mM MOPS, 15 mM EGTA, 15 mM $MgCl_2$, 2 mM DTT, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM NaF, proteases inhibitors, pH 7.2). After centrifugation at 20,000 × *g*, supernatants were collected and diluted with PBS (145 mM NaCl, 10 mM Na_2HPO_4, 10 mM NaH_2PO_4, pH 7.4). Then samples were incubated for 90 min at 4 °C with 50 μl of WGA-agarose beads. The bound proteins were collected by centrifugation, and the beads were washed four times with PBS, resuspended in 50 μl of Laemmli buffer, and boiled for 10 min.

WGA Enrichment in Stringent Conditions—Batches of 20 immature or matured oocytes were removed and lysed in 200 μl of homogenization buffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.5% (v/v) Triton X-100, proteases inhibitors, pH 7.5). After centrifugation at 20,000 × *g*, supernatants were collected, and 800 μl of homogenization buffer were added. Then samples were incubated with WGA-agarose beads, and WGA-bounds proteins were collected, washed four times with washing buffer (10 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 0.4% (w/v) sodium deoxycholate, 0.3% (w/v) SDS, 0.2% (v/v) Nonidet P-40, pH 7.5), resuspended in Laemmli buffer, and boiled.

Labeling of O-GlcNAc-bearing Proteins by GalNAz and Biotin Alkyne Enrichment on Avidin Beads

Batches of 10 immature or matured oocytes were lysed in 100 μl of homogenization buffer. 20 μg of bovine α-crystallin were used as a positive control. Labeling of *O*-GlcNAc-bearing proteins by GalNAz and biotin alkyne was done using the Click-it *O*-GlcNAc enzymatic labeling system and the Click-it glycoprotein detection kit (biotin alkyne) according to the manufacturer's instructions. After labeling, the proteins were precipitated using the methanol/chloroform kit protocol and resuspended in 50 μl of Tris/HCl, pH 8.0, containing 0.1% (w/v) SDS. 700 μl of enrichment buffer (1% (v/v) Triton X-100, 0.1% (w/v) SDS in PBS) were added to the sample before incubating with 50 μl of avidin-coupled beads (1 h at 4 °C). The avidin-bound proteins were collected, washed three times with the enrichment buffer, resuspended in Laemmli buffer, and boiled. For the immunoprecipitation of erk2, methanol/chloroform-precipitated proteins were resuspended in immunoprecipitation buffer and treated as described above.

SDS-PAGE and Western Blotting

Proteins (the equivalent of one oocyte was loaded per lane) were separated by 10% SDS-PAGE or by 17.5% modified SDS-PAGE (21, 22) for erk2 (this level of cross-linking allows a better discrimination between the active and the inactive forms of these proteins) and electroblotted onto nitrocellulose sheet. Although the quantity of proteins remains rather constant in the *Xenopus* oocyte, equal loading and transfer efficiency were checked using Ponceau red staining. Blots were saturated with 5% (w/v) nonfat milk in TBS-Tween (15 mM Tris, 140 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween) for 45 min or in 3% BSA in TBS-Tween for the avidin-HRP blotting. Primary antibodies were incubated overnight at 4 °C. Mouse monoclonal anti-*O*-GlcNAc (RL2), mouse monoclonal anti-erk2 (D-2), mouse monoclonal anti-α-tubulin, mouse monoclonal anti-PCNA, guinea pig polyclonal anti-PP2A, and rabbit polyclonal anti-actin were used at a dilution of 1:1000. Mouse monoclonal anti-*O*-GlcNAc CTD110.6 was used at a dilution of 1:4000. Then membranes were washed three times for 10 min in TBS-Tween and incubated with either an anti-mouse (IgG or IgM) horseradish peroxidase-labeled secondary antibody or an anti-rabbit IgG or an anti-guinea pig IgG horseradish peroxidase-labeled secondary antibody at a dilution of 1:10,000. The avidin-labeled peroxidase was used at a dilution of 1:15,000. Finally three washes of 10 min each were performed with TBS-Tween, and the detection was carried out with enhanced chemiluminescence on a ChemiGenius^2 bioimaging system (Syngene).

Protein Identification by Mass Spectrometry

After running 10% SDS-PAGE, proteins were silver-stained according to the protocol described previously (23). Protein bands of interest were trypsin-digested and analyzed as described by Slomianny *et al.* (24). Nano-LC-nano-ESI-MS/MS analyses were performed on an ion trap mass spectrometer (LCQ Deca XP$^+$, Thermo Electron, San Jose, CA) equipped with a nanoelectrospray ion source

Downloaded from www.mcponline.org at CNRS on November 10, 2008

© 2009 Tous droits réservés.

http://doc.univ-lille1.fr

coupled with a nano-high pressure liquid chromatography system (LC Packings Dionex, Amsterdam, The Netherlands).

1.4 μl of sample were injected into the mass spectrometer using a Famos autosampler (LC Packings Dionex). The digest was first desalted and then concentrated on a reserve phase precolumn of 0.3-mm inner diameter $\times$ 5 mm (Dionex) by solvent A (95% H_2O, 5% acetonitrile, 0.1% HCOOH) delivered by a Switchos pumping device (LC Packings Dionex) at a flow rate of 10 μl·min^{-1} for 3 min. Peptides were separated on a 15-cm $\times$ 75-μm-inner diameter, 3-μm C_{18} PepMap column (Dionex). The flow rate was set at 200 nl·min^{-1}. Peptides were eluted using a 5–70% linear gradient of solvent B (20% H_2O, 80% acetonitrile, 0.08% HCOOH) for 45 min.

Coated nanoelectrospray needles were obtained from New Objective (Woburn, MA). Spray voltage was set at 1.5 kV, and capillary temperature was set at 170 °C. The mass spectrometer was operated in positive ionization mode. Data acquisition was performed in a data-dependent mode consisting of alternately in a single run a full-scan MS over the range *m/z* 500–2000 and a full-scan MS/MS of the ion selected in an exclusion dynamic mode (the most intense ion is selected and excluded for further selection for a duration of 3 min). MS/MS data were acquired using a 2-*m/z* unit ion isolation window and a 35% relative collision energy. MS/MS .raw data files were transformed in .dta files with Bioworks 3.1 software (Thermo Electron). The .dta files generated were next merged with merge.bat software to be downloaded in Mascot software (version 2.2) to create a merge.txt file for database searches in Swiss-Prot 53.2 (updated June 26, 2007; 272,212 sequences and 99,940,143 residues) and MSDB (updated August 31, 2006; 3,239,079 sequences and 1,079,594,700 residues). Search parameters were the following: *X. laevis* for taxonomy, one missed cleavage allowed, carbamidomethylcysteine as fixed modification, 2 Da for peptide tolerance, and 0.8 Da for MS/MS tolerance. Results were scored using the probability-based Mowse (molecular weight search) score (protein score is $-10 \times \log(p)$ where p is the probability that the observed match is a random event). Individual scores greater than 31 in MSDB and 23 in Swiss-Prot were considered as significant ($p < 0.05$). When peptides matched to multiple members of a protein family with the same set of peptides, the same sequences, and the same scores (for proteins and for peptides), we reported the first listed protein with its corresponding accession number that was given by the database.

Localization of the O-GlcNAcylation Sites on β-Actin Using MALDI-TOF/TOF

MALDI-TOF/TOF spectra were obtained using an ULTRAFLEX III™ mass spectrometer (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany). The instrument was operated in a reflector-positive mode. Sample preparation was performed with the dried droplet method using a mixture of 0.5 μl of sample with 0.5 μl of matrix solution. The matrix solution was prepared from a saturated solution of α-cyano-4-hydroxycinnamic acid in H_2O, 50% acetonitrile. External mass calibration was performed using a commercially prepared standard mixture of eight peptides (Bruker Daltonics GmbH). For each MALDI analysis, spectra were acquired using the FlexControl™ acquisition software (Version 2.2, Bruker Daltonics GmbH).

Immunocytological Analysis

Immunocytological analyses were carried out as described elsewhere (7, 25).

Hemisection of Oocytes—All steps were done in 1.5-ml microcentrifuge tubes. The oocytes were fixed overnight in methanol at −20 °C. Samples were gradually rehydrated with PBS. After five rinses in PBS, the samples were incubated in PBS containing 0.1% (v/v) Tween 20 and 3% (w/v) BSA for 30 min followed by an overnight incubation at 4 °C with the primary antibodies in PBS, 0.1% (v/v) Tween 20, 3% (w/v) BSA (diluted 1:50 for the anti-β-tubulin (Tub2.1), anti-OGT (DM17), and anti-*O*-GlcNAc (CTD110.6 or RL2)). Samples were then rinsed five times with PBS and incubated for 1 h at 4 °C with the Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG, Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG, Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG, or Texas Red-labeled anti-mouse IgM secondary antibodies (1:100 in PBS, 0.1% (v/v) Tween 20, 3% (w/v) bovine serum albumin). After five rinses in PBS, samples were cut in half at the animal-vegetal equator. The vegetal half was discarded, and the animal half was transferred to a standard slide. The samples were dried and mounted in 80% glycerol, 20% PBS containing 1 μg·ml^{-1} Hoechst 33342. The oocytes were visualized using an Axioplan 2 imaging microscope (Zeiss) and an Axio Cam HRc camera (AxioVision).

7-μm Sections of Oocytes—The oocytes were fixed overnight in methanol at −20 °C. Methanol was then gradually replaced by butanol before embedding in paraffin. 7-μm sections were cut and transferred to a standard slide. Paraffin was removed with methylcyclohexane, and samples were gradually rehydrated in successive baths of alcohol ranging from 100 to 70% and finally water. After three rinses in PBS, indirect immunofluorescence analyses were carried out as described above.

RESULTS

Classical Techniques of O-GlcNAc-bearing Protein Enrichments Are Not Suitable for Large Scale Identification in Oocyte—We have reported previously that the *X. laevis* oocyte G_2/M transition was accompanied by an increase in *O*-GlcNAc glycosylation (8, 9). This glycosylation status change could be observed using either the anti-*O*-GlcNAc-specific RL2 or CTD110.6 antibodies (Fig. 1, *A* and *B*, respectively) and wheat germ agglutinin (Fig. 1*C*), a lectin that recognizes non-reducing terminal GlcNAc residues. These three tools are frequently used for the purification of *O*-GlcNAc-modified proteins with the intention of their identification (26, 27). Unfortunately this classical approach was not adequate to identify *O*-GlcNAcylated proteins in *X. laevis* oocyte. Indeed *Xenopus* oocytes express much lower amounts of *O*-GlcNAc than the typical somatic cell (HeLa) when compared for equal proteins quantities (Fig. 1*D*, *top panel* (*O*-GlcNAc staining) and *bottom panel* (tubulin staining); compare the expression of α-tubulin between immature oocytes, matured oocytes, and HeLa). Even working with high amounts of oocytes (several milligrams of total proteins), it was difficult to obtain sufficient quantities of *O*-GlcNAcylated proteins for their identification by the proteomics approach. The only way to reach this objective was to enrich *O*-GlcNAcylated proteins using anti-*O*-GlcNAc antibodies (or with WGA) and by staining the bound proteins with specific antibodies or by immunoprecipitating the protein of interest followed by its staining with an anti-*O*-GlcNAc antibody (Fig. 2, *A* and *B*). Following these directed/targeted approaches, anti-actin immunoprecipitations (Fig. 2*A*) and WGA bead enrichments (Fig. 2*B*) were performed on immature and matured *Xenopus* oocytes crude extracts, and bound proteins were analyzed by Western blot.

Using this strategy, we first identified actin, a major cytoskeleton protein (Fig. 2*A*) as an *O*-GlcNAc-bearing protein.

Downloaded from www.mcponline.org at CNRS on November 10, 2008

© 2009 Tous droits réservés.

http://doc.univ-lille1.fr

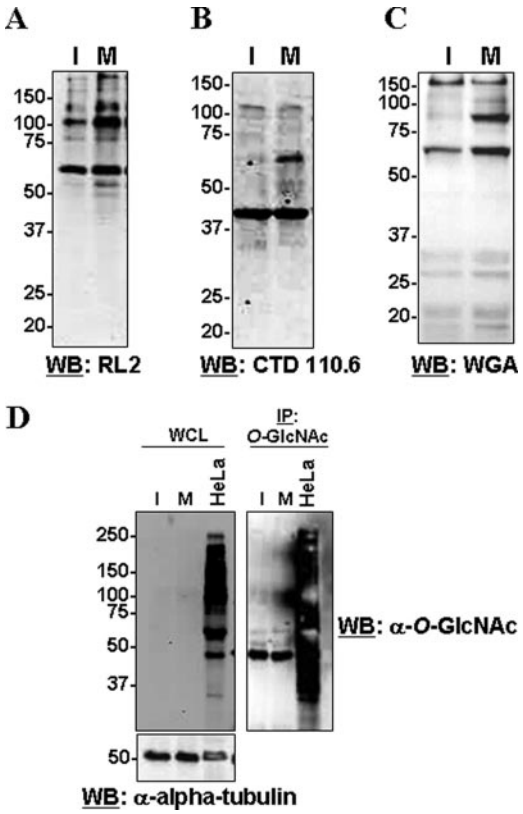


FIG. 1. **Matured *X. laevis* oocyte expresses low *O*-GlcNAc amounts limiting the identification of glycosylated proteins.** *A*, *B*, and *C*, progesterone stimulation induces an *O*-GlcNAcylation content increase in oocyte. Meiotic resumption was triggered by stimulating immature oocytes with progesterone (see the Introduction for more details). Progesterone is naturally produced and secreted by follicular cells surrounding the oocyte after their stimulation with the hypophyseal gonadotropin LH. M phase entry was scored as described under "Experimental Procedures." Immature (G_2-arrested) and matured (M phase-entered) oocytes were lysed in homogenization buffer. Proteins were separated by SDS-PAGE and electroblotted onto nitrocellulose, and *O*-GlcNAcylation was analyzed by Western blot using the anti-*O*-GlcNAc-directed antibodies RL2 (*A*) and CTD110.6 (*B*) or HRP-labeled WGA (*C*). *D*, *Xenopus* oocyte contains very low amounts of *O*-GlcNAc. Immature oocytes, matured oocytes, and HeLa cells were analyzed according to their *O*-GlcNAc content using the RL2 anti-*O*-GlcNAc antibody. This analysis was performed both on whole cell lysates (*left panel*) and on *O*-GlcNAc-enriched fractions (*right panel*). An anti-α-tubulin was used on the whole cell lysate to show the equal quantity of proteins loaded per lane. Protein mass markers are indicated at the *left* (kDa). *I*, immature oocytes; *M*, matured oocytes; *WB*, Western blot; *IP*, immunoprecipitation; *WCL*, whole cell lysate.

Using WGA enrichment in non-denaturing and harsh conditions, we demonstrated previously that Hsp/Hsc70 was *O*-GlcNAcylated and that cyclin B2 was associated with an *O*-GlcNAcylated partner (9). Following the same approach, we showed the *O*-GlcNAc modification of erk2 (Fig. 2*B*). At this stage, we concluded that the use of anti-*O*-GlcNAc antibodies or lectins was limited for the identification of *O*-GlcNAcylated proteins in *Xenopus* oocytes. For these

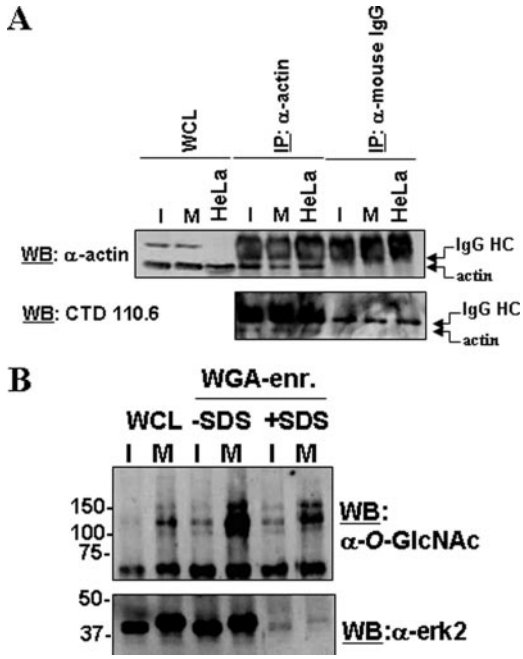


FIG. 2. **Actin and erk2 bear *O*-GlcNAc residues.** *A*, immature oocytes, matured oocytes, and HeLa cells were lysed in the immunoprecipitation buffer. Immunoprecipitation of actin was performed as described under "Experimental Procedures." After running, the immunoprecipitates were stained either with the anti-actin or the anti-*O*-GlcNAc antibodies. Controls of immunoprecipitation were carried out with normal rabbit IgG. *B*, immature and matured oocytes were lysed in the homogenization buffer, and the enrichments of the *O*-GlcNAc proteins on WGA-agarose (*WGA-enr.*) were performed either in non-denaturing conditions (−*SDS*) or in harsh conditions (+*SDS*) as described under "Experimental Procedures." Bound proteins were analyzed using the anti-*O*-GlcNAc and the anti-erk2 antibodies. Protein mass markers are indicated at the *left* (kDa). *I*, immature oocytes; *M*, matured oocytes; *WB*, Western blot; *WCL*, whole cell lysate; *IP*, immunoprecipitation; *IgG HC*, immunoglobulin heavy chain.

reasons we developed another approach based on an *in vitro* enzymatic labeling (Fig. 3).

Both Structural and Functional Proteins Have Higher O-GlcNAcylation Levels in Matured Oocyte—β1,4-Galactosyltransferase I (GalT1) catalyzes the transfer of galactose to non-reductive terminal GlcNAc residues. In the presence of α-lactalbumin, GalT1 is capable to elongate glucose to form lactose. GalT1 can also transfer GalNAc from UDP-GalNAc to form low amounts of GalNAc β1,4-GlcNAc. The study of these differences of activities led to the engineering of Y289L GalT1 (28) allowing this mutant galactosyltransferase to enlarge its specificity for synthetic donors such as UDP-Gal analogues like UDP-2-deoxy-2-propanonyl-Gal (29). The chemical labeling of 2-deoxy-2-propanonyl-Galβ1,4-GlcNAc proteins with biotin enables their detection with avidin-labeled peroxidase. UDP-GalNAz, another UDP-Gal derivative, is also a substrate for the Y289L GalT1 that can transfer GalNAz to *O*-GlcNAc residues. This enzymatic labeling is followed by the chemical addition of a biotin alkyne probe. Indeed in the presence of

Downloaded from www.mcponline.org at CNRS on November 10, 2008

© 2009 Tous droits réservés.

http://doc.univ-lille1.fr

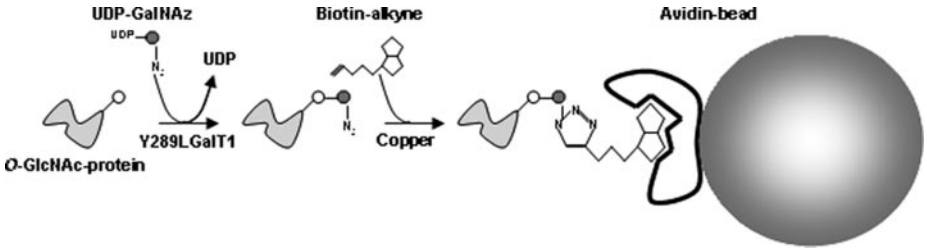


FIG. 3. **The UDP-GalNAz and biotin alkyne labeling procedure.** Labeling of the *O*-GlcNAc-bearing proteins by GalNAz and biotin alkyne was carried out using the Click-it *O*-GlcNAc enzymatic labeling system and the Click-it glycoprotein detection kit (Invitrogen) as described under "Experimental Procedures." Briefly mutant GalT1 (Y289L GalT1) transfers GalNAz from the synthetic donor UDP-GalNAz to target the *O*-GlcNAcylated proteins to form GalNAz β1,4-GlcNAc proteins. This enzymatic labeling is followed by the chemical addition of a biotin alkyne probe in the presence of Cu(I) to form a stable triazole derivative. Biotinylated GalNAz-*O*-GlcNAc proteins were then purified on avidin beads.

Cu(I), azides and alkynes react together to form stable triazole derivatives (cycloaddition) (30). In conjunction with β-elimination followed by a Michael addition with DTT, this labeling has enabled the identification of a major site of *O*-GlcNAc glycosylation (Ser-55) on the intermediate filament vimentin (31). Therefore, immature and matured oocytes were lysed in homogenization buffer, and *O*-GlcNAc residues were *in vitro* elongated by GalNAz and subsequently biotinylated with or without further enrichment on avidin beads as described in Fig. 3. Control experiments were performed in parallel on bovine α-crystallin that contains a single *O*-GlcNAc residue on Ser-162 (Fig. 4*A*). The proteins were separated by SDS-PAGE, electrotransferred, and stained with peroxidase-labeled avidin (Fig. 4*A*). For further identification of the biotin-labeled proteins (Fig. 4*A*), avidin-enriched biotinylated proteins were separated by SDS-PAGE and silver-stained (Fig. 4*B*). The bands were cut up and trypsin-digested. The peptides were extracted, desalted, and analyzed by nano-LC-nano-ESI-MS/MS (for details see "Experimental Procedures"). These mass spectrometry analyses allowed for the identification of 23 proteins that are listed in Table I according to their biological role, *i.e.* structural proteins, metabolic enzymes, translational proteins, and other functions. Several of these proteins were already identified as bearing *O*-GlcNAc residues, but none were described previously in *Xenopus* (see the "Discussion" for details).

To check that the proteins identified by the enzymatic/chemical approach bound specifically to avidin, control experiments were performed. In this respect, proteins from matured oocytes were labeled with GalNAz, but the labeling with the biotin alkyne was omitted. Labeled proteins were enriched on avidin-coupled beads, and the profile of the bound proteins was analyzed by a staining with the avidin-labeled peroxidase and compared with the profile of the double labeled proteins (Fig. 4*C*). The same experiment was also performed without any labeling (neither the enzymatic labeling nor the chemical labeling). Apart from proteins with molecular masses higher than 60 kDa (indicated by *NS* (nonspecific)) and that could correspond to natural biotinylated proteins such as acetyl-CoA carboxylase, none of the bands found in the avidin-enriched fraction was found in the control fractions (with no labeling or only labeled with GalNAz). Similar controls were performed on α-crystallin, which could be detected on the enriched fraction only when the double labeling was performed (Fig. 4*C*, *left part* of the *bottom panel*).

We also confirmed the *O*-GlcNAc modification of PCNA and PP2A, identified by the proteomics approach (Table I); actin, identified both by the proteomics approach and by immunoprecipitation (Table I and Fig. 2*A*); and erk2, visualized with the WGA bead enrichment (Fig. 2*B*): Fig. 4*D* reveals that these proteins can be detected on the avidin-enriched fraction by Western blot only in the double labeling conditions. To confirm the glycosylation of erk2, proteins were doubly labeled with GalNAz and biotin, and erk2 was subsequently immunoprecipitated. The *O*-GlcNAcylation of the bound erk2 was revealed by Western blot using avidin-peroxidase (Fig. 4*E*).

One MS/MS spectrum for actin and tubulin, two proteins implicated in cell shape and architecture, is presented in Fig. 5. The sequence localization of the identified peptides is indicated in the primary sequence of each protein.

A Major O-GlcNAcylation Site Maps in the Region 318–324 of β-Actin—As previously indicated, α-crystallin was used as a standard to validate the methodology of the GalNAz/biotin alkyne labeling procedure in our attempts to map *O*-GlcNAcylation sites. α-Crystallin (Swiss-Prot accession number P02470) possesses one site of *O*-GlcNAcylation on serine 162. The theoretical molecular mass of the modified peptide is 1641.84 Da after trypsin digestion and one missed cleavage: the sequence of the peptide is AIPVS^{162}REEKPSSAPSS. The MALDI-TOF/TOF spectrum of the α-crystallin peptide *m/z* 2617.268 (Fig. 6) showed a neutral loss of 975.310 Da between the precursor ion *m/z* 2617.268 and the y_{16} ion *m/z* 1641.958 corresponding to the modification with GlcNAc/GalNAz/biotin. This result confirmed the presence of the modified form of α-crystallin and allowed us to validate the biotin alkyne labeling procedure in the mapping of *O*-GlcNAcylation sites. A sample in which β-actin was identified was analyzed by LC-MALDI-TOF/TOF using similar experimental conditions. Two ions corresponding to peptides derived from the same sequence of the β-actin were detected in the MS spectra (Table II). MS/MS analysis of these ions was not performed because of the low signal intensity on the MS spectrum. Despite low expression of

© 2009 Tous droits réservés.

http://doc.univ-lille1.fr

Downloaded from www.mcponline.org at CNRS on November 10, 2008

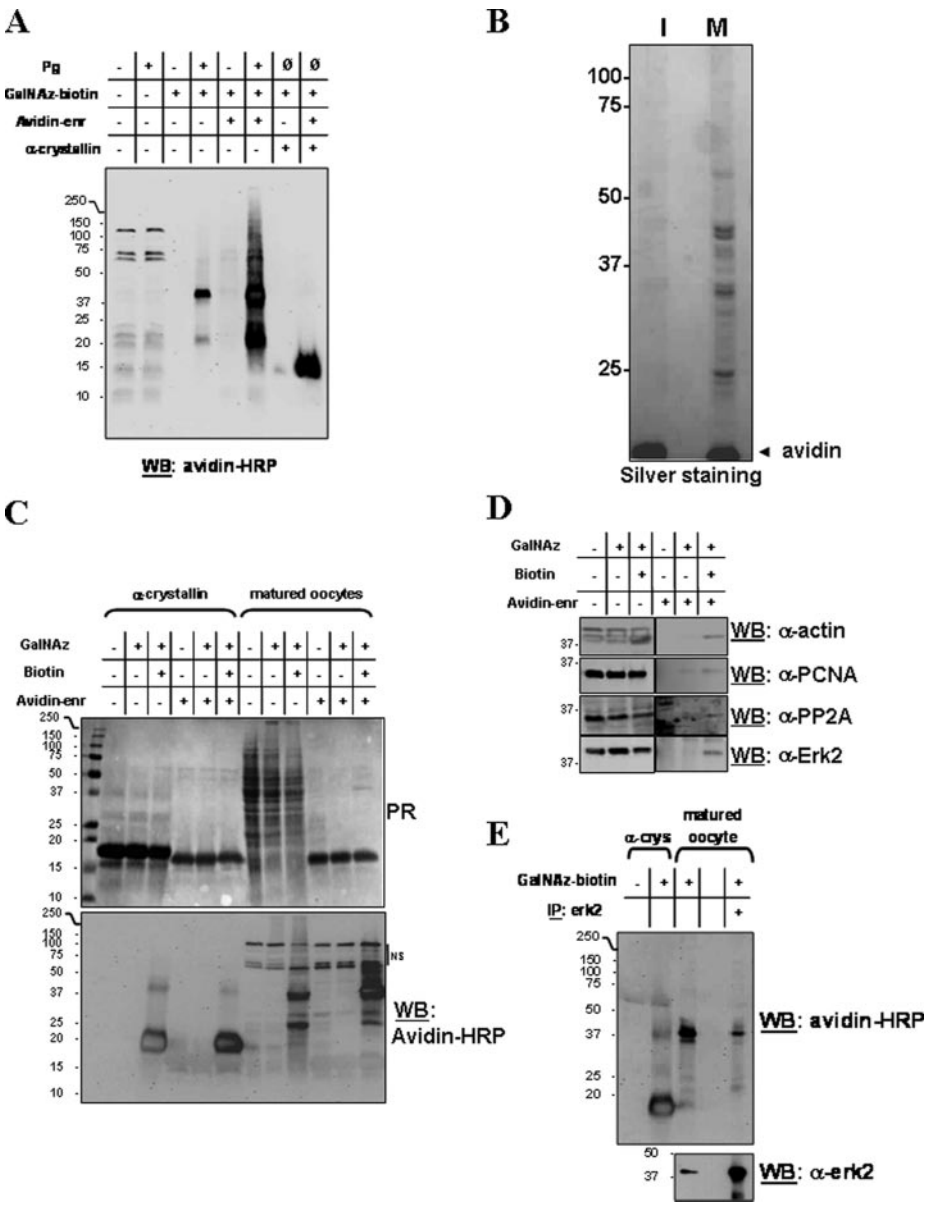


FIG. 4. **Labeling of the *Xenopus* oocyte *O*-GlcNAc-bearing proteins by GalNAz and biotin alkyne.** *A*, after labeling of the *Xenopus* oocytes (immature and matured) *O*-GlcNAcylated proteins and enrichment of the labeled proteins on avidin-coupled beads using the procedure described in Fig. 3, bound proteins were separated by SDS-PAGE, and Western blot analyses were performed using HRP-labeled avidin to test the efficiency of the labeling and of the enrichment procedures. α-Crystallin was used as a positive control. *B*, after enzymatic and chemical labeling, immature and matured oocyte *O*-GlcNAcylated proteins were enriched on avidin beads, separated by SDS-PAGE, and silver-stained. Each band was excised and subjected to trypsin digestion for further mass spectrometry analyses. *C*, controls of labeling and controls of the avidin bead enrichment were carried out on α-crystallin and on matured oocytes. The proteins were separated by SDS-PAGE, stained with Ponceau red (*PR*), and destained with TBS-Tween. The membrane was saturated with bovine serum albumin, and then a staining was performed with the avidin-labeled peroxidase. *D*, to directly bring to the fore the *O*-GlcNAcylation of three of the proteins found by the analyses of the mass spectrometry data, avidin-bound proteins were separated by SDS-PAGE and probed with anti-actin, anti-PCNA, and anti-PP2A antibodies. On the same figure, the staining of the avidin-bound proteins with the anti-erk2 antibodies is also shown. *E*, after labeling of the matured oocyte *O*-GlcNAcylated proteins, an immunoprecipitation was specifically performed with the anti-erk2 antibodies. The immunopurified erk2 was stained either with the avidin-labeled HRP or with the anti-erk2 antibodies. Protein mass markers are indicated at the *left* (kDa). *Pg*, progesterone; *I*, immature oocytes; *M*, matured oocytes; *avidin-enr*, avidin bead-enriched proteins; *WB*, Western blot; *IP*, immunoprecipitation; *crys*, crystallin; *NS*, nonspecific bands.

O-GlcNAcylation in the *Xenopus* oocyte, these analyses enabled the mapping of an *O*-GlcNAcylation site in a region of β-actin between amino acids 318 and 324.

The Meiotic Spindle is O-GlcNAc-modified and/or Is Associated with O-GlcNAc Proteins and Interacts with OGT—Because we identified β-tubulin as an *O*-GlcNAc-modified

© 2009 Tous droits réservés.

http://doc.univ-lille1.fr

Downloaded from www.mcponline.org at CNRS on November 10, 2008

Molecular & Cellular Proteomics ASBMB

TABLE I

X. laevis oocyte proteins identified by mass spectrometry using the GalNAz/biotin double labeling

The accession number, the bank used for the identification, the protein name, the apparent molecular mass found in SDS-PAGE, the theoretical molecular mass, the percentage of coverage, the Mascot score, and the number of peptides for each protein are reported. For each peptide, the charge state, the observed precursor *m/z* (Obs. *M*), the experimental (Exp. *M*) and theoretical (Cal. *M*) precursor neutral masses, the delta mass (Δ*M*), the number of missed cleavages, the peptide score value delivered by Mascot, and the peptide sequence are indicated. References in the last column of the table indicate the study relating the first description of the protein as bearing *O*-GlcNAc moieties.

Accession number	Bank name	Protein name	Apparent molecular mass	Theoritical molecular mass	Coverage	Mascot score	Number of peptides	Charge	Obs. *M*	Exp. *M* (molecular weight)	Cal. *M*	Δ*M*	Missed cleavages	Score, peptide	Sequence	Previous *O*-GlcNAc description
			Da	*Da*	%											
Cell shape and architecture																
TBB4_XENLA	Swiss-Prot	Tubulin β-4 chain	54,950	50,240	12	259	5	2	572.7	1143.39	1142.62	0.7688	0	55	K↓LAVNMVPFPR↓L	
								2	665.1	1328.18	1327.64	0.5449	0	53	R↓INVYYNEATGGK↓Y	
								2	801.81	1601.61	1600.81	0.7984	0	68	R↓AVLVDLEPGTMDSVR↓S	
								2	846.71	1691.41	1690.86	0.5564	0	76	R↓ALTVPELTQQMFDAK↓N	
								2	923.01	1844	1842.92	1.0828	1	92	R↓INVYYNEATGGKYVPR↓A	
ACTB_XENLA	Swiss-Prot	β-Actin	42,240	42,082	17	154	5	2	519.19	1036.38	1035.64	0.7399	1	21	K↓IKIIAPPER↓K	32
								2	567.19	1132.37	1131.51	0.8549	0	51	R↓GYSFTTTAER↓E	
								2	759.52	1517.04	1515.69	1.3477	0	52	K↓QEYDESGPSIVHR↓K	
								2	896.25	1790.5	1789.88	0.6171	0	60	K↓SYELPDGQVITIGNER↓F	
								2	977.83	1953.64	1953.06	0.5911	0	54	R↓VAPEEHPVLLTEAPLNPK↓A	
Metabolism																
O129758XENLA	MSDB	Aldolase	39,660	39,381	6	135	3	2	533.23	1064.45	1063.55	0.9033	0	56	R↓QLLFTADEK↓V	
								2	667.32	1332.63	1331.69	0.9403	0	66	K↓GILAADESTGSIAK↓R	
								2	745.54	1489.08	1487.79	1.2897	1	72	K↓GILAADESTGSIAKR↓L	
G3P_XENLA	Swiss-Prot	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	44,680	36,017	28	265	5	1	869.65	868.64	868.5	0.1473	0	22	K↓VIPELNGK↓I	26, 27
								1	1355.75	1354.74	1354.72	0.0271	0	35	R↓GAGQNIIPASTGAAK↓A	
								2	779.42	1556.83	1555.8	1.0343	0	88	R↓VPTPNVSWDLTCR↓L	
								2	844.75	1687.49	1686.93	0.5621	0	65	K↓LIINDQVITVFQER↓D	
								3	870.04	2607.12	2605.32	1.8032	0	59	K↓VINDNFGIVEGLMTTVHAFTATQK↓T	
ENOA_XENLA	Swiss-Prot	α-Enolase	51,400	47,930	2	48	1	2	572.49	1142.96	1142.6	0.3615	0	48	R↓IGAEVYHNLK↓N	26, 27
KPYK_XENLA	Swiss-Prot	Pyruvate kinase	62,330	57,489	12	184	6	1	856.68	855.68	855.51	0.1648	0	26	R↓APIISVTR↓N	26
								1	964.72	963.71	963.55	0.1608	0	19	R↓GIFPVLYR↓E	
								2	546.28	1090.55	1089.59	0.9632	1	16	R↓QLFEELRR↓V	
								2	614.77	1227.53	1226.65	0.8831	0	74	R↓LDIDSEPIVAR↓N	
								2	797.57	1593.13	1591.77	1.3624	0	70	R↓DPTEATAVGAVEASFK↓C	
								2	807.92	1613.83	1612.71	1.1194	0	60	R↓EAVHEAWAEDVDSR↓V	
Q5XGY5_XENLA	MSDB	Pyruvate dehydrogenase PdhE1β-2 protein	31,570	39,595	4	95	1	2	902.01	1802.02	1800.89	1.1304	0	95	R↓VFLLGEEVAQYDGAYK↓I	
LDHA_XENLA	Swiss-Prot	L-Lactate dehydrogenase A chain	31,420	36,925	8	83	2	2	602.57	1203.12	1202.62	0.5009	0	83	R↓IIGSGTNLDSAR↓F	
								2	857.92	1713.83	1712.91	0.9166	1	16	R↓IVWTGGVRQQEGESR↓L	
LDHB_XENLA	Swiss-Prot	L-Lactate dehydrogenase B chain	31,570	36,335	22	313	7	1	943.7	942.69	942.59	0.1073	0	28	K↓FIIPQWK↓Y	
								2	562.46	1122.91	1121.59	1.3202	0	60	K↓WDSAYEVIK↓L	
								2	567.21	1132.42	1131.59	0.8307	0	50	K↓SAETLWGIQK↓D	
								2	844.36	1686.71	1684.87	1.8367	0	63	K↓ELADELALVDILEDK↓L	
								3	606.29	1815.86	1813.97	1.8938	1	43	K↓LKGEVMDLQHGSLFLK↓T	
								2	919.86	1837.71	1836.92	0.7973	1	85	K↓TPTIVADKDYSVTANSR↓I	
								2	964.56	1927.11	1926.05	1.0615	1	65	K↓ELADELALVDILEDKLK↓G	

Downloaded from www.mcponline.org at CNRS on November 10, 2008

© 2009 Tous droits réservés.

Molecular & Cellular Proteomics ASBMB

TABLE I—*continued*

Accession number	Bank name	Protein name	Apparent molecular mass	Theoritical molecular mass	Coverage	Mascot score	Number of peptides	Charge	Obs. *M*	Exp. *M* (molecular weight)	Cal. *M*	Δ*M*	Missed cleavages	Score, peptide	Sequence	Previous *O*-GlcNAc description
Q8AVH2_XENLA	MSDB	Creatine kinase isozyme IV	39,660	42,442	11	101	3	2	617.57	1233.13	1231.6	1.5249	0	26	K↓DLFDPIIEDR↓H	27
								2	754.78	1507.54	1506.69	0.8524	0	82	K↓GGDDLDPNYVLSSR↓V	
								2	983.44	1964.88	1963.92	0.9591	0	44	R↓GTGGVDTAAVGGVFDV-SNADR↓L	
Q918J7_XENLA	MSDB	Transketolase	73,540	68,378	11	193	4	2	641.26	1280.51	1280.67	−0.1651	0	21	K↓ICPLVPTADAPK↓I	
								2	861.75	1721.49	1720.88	0.6161	0	86	R↓SGKPTELLDMFGISAR↓C	
								2	1057.9	2113.79	2113.17	0.6133	0	63	R↓VIDPFTIKPLDAATILSSGR↓A	
								2	1234.16	2466.32	2465.24	1.0803	1	60	R↓TSRPDTAVIYSPEEKF-EIGQAK↓V	
Q7SZ23_XENLA	MSDB	Glutathione *S*-transferase	24,220	25,546	34	138	6	1	962.67	961.66	961.53	0.1339	0	23	K↓NLQAFLTR↓F	
								2	501.66	1001.31	1000.44	0.8666	0	62	K↓FSCFLGDR↓S	
								2	675.6	1349.2	1347.68	1.5159	0	41	R↓ILDPTCLQNFK↓N	
								2	794.61	1587.22	1585.78	1.4361	0	54	R↓LLLEYTGTQYEEK↓L	
								2	938.57	1875.13	1873.98	1.1566	0	34	K↓LGLDFPNLPYLVDGDVK↓L	
								3	748.34	2242.01	2240.07	1.937	1	43	K↓LYVTGDAPNYDKSQ-WLNEK↓E	
SAHHA_XENLA	Swiss-Prot	Adenosylhomo-cysteinase B	48,350	48,172	24	298	8	2	511.01	1020	1019.54	0.4616	0	43	K↓TGVPVYAWK↓G	
								2	511.87	1021.73	1020.6	1.1255	0	40	R↓HIILLAEGR↓L	
								2	602.21	1202.41	1201.6	0.8061	0	44	K↓VADISLADWGR↓K	
								2	631.05	1260.09	1258.57	1.5167	1	50	K↓SKFDNLYGCR↓E	
								2	691.46	1380.9	1379.74	1.1682	1	70	K↓KLDEAVAAAHLDK↓L	
								2	825.23	648.44	1647.81	0.6364	0	69	K↓GISEETTTGVHNLYK↓M	
								2	915.78	1829.56	1828.95	0.61	0	63	K↓SSGTLQVPAINVNDSVTK↓S	
								3	789.91	2366.7	2365.19	1.5135	0	67	K↓DGKPLNMILDDGGDL-TNLVHTK↓Y	
Translation																
EF1A2_XENLA	Swiss-Prot	Elongation factor 1-α, oocyte form 3-1	51,400	50,433	7	71	2	2	513.59	1025.17	1024.6	0.5723	0	71	K↓IGGIGTVPVGR↓V	31
								3	840.09	2517.26	2516.35	0.9099	0	7	R↓VETGVLKPGMIVTF-APSNWTTEVK↓S	
RS31_XENLA	Swiss-Prot	40 S ribosomal protein S3-A	31,570	27,156	39	221	7	2	516.09	1030.17	1028.62	1.554	0	59	R↓TEIIILATR↓T	
								2	547.23	1092.44	1091.56	0.8851	0	51	K↓AELNEFLTR↓E	
								2	572.88	1143.74	1142.57	1.1688	0	32	K↓IMLPWDPSGK↓I	
								2	712.7	1423.38	1422.66	0.7271	0	59	R↓ELAEDGYSGVEVR↓V	
								2	787.52	1573.03	1571.75	1.284	0	65	R↓FGFPEGSVELYAEK↓V	
								2	958.66	1915.31	1913.96	1.3483	0	32	K↓AAKPDQPQPPAMPQPVATA	
								3	824.05	2469.13	2467.18	1.9528	0	55	K↓FVDGLMIHSGDPVNY-YVDTAVR↓H	
RS32_XENLA	Swiss-Prot	40 S ribosomal protein S3-B	31,570	27,132	40	185	6	2	547.23	1092.44	1091.56	0.8851	0	51	K↓AELNEFLTR↓E	
								2	572.88	1143.74	1142.57	1.1688	0	32	K↓IMLPWDPSGK↓I	
								2	712.7	1423.38	1422.66	0.7271	0	59	R↓ELAEDGYSGVEVR↓V	
								2	787.52	1573.03	1571.75	1.284	0	65	R↓FGFPEGSVELYAEK↓V	
								2	965.8	1929.6	1927.98	1.6193	0	30	K↓GAKPDQPQPPVMPQPVATA	
								3	824.05	2469.13	2467.18	1.9528	0	55	K↓FVDGLMIHSGDPVNYY-VDTAVR↓H	

© 2009 Tous droits réservés.

Downloaded from www.mcponline.org at CNRS on November 10, 2008

http://doc.univ-lille1.fr

Molecular & Cellular Proteomics ASBMB

TABLE I—*continued*

Accession number	Bank name	Protein name	Apparent molecular mass	Theoritical molecular mass	Coverage	Mascot score	Number of peptides	Charge	Obs. *M*	Exp. *M* (molecular weight)	Cal. *M*	Δ*M*	Missed cleavages	Score, peptide	Sequence	Previous *O*-GlcNAc description
RL4A_XENLA	Swiss-Prot	60 S ribosomal protein L4-A	44,680	45,192	19	149	5	2	634.3	1266.58	1265.64	0.9461	1	61	R↓KLDDLYGTWR↓K	
								2	635.19	1268.36	1267.75	0.6165	0	43	R↓NIPGITLLNVSK↓L	
								3	520.54	1558.61	1556.73	1.8783	0	29	K↓LAGHQTSAESWGTGR↓A	
								3	621.96	1862.86	1861.03	1.8318	0	33	R↓APIRPDIVNFVHTNLR↓K	
								2	969.33	1936.64	1936.01	0.6315	0	66	R↓YAVCSALAASALPALIMSK↓G	
RL5A_XENLA	Swiss-Prot	60 S ribosomal protein L5-A	33,910	34,181	7	57	1	2	670.41	1338.81	1337.69	1.1225	0	57	K↓GAVDGGLSIPHSTK↓R	
RL18A_XENLA	Swiss-Prot	60 S ribosomal protein L18-A	23,200	21,735	5	56	1	2	571.63	1141.26	1140.62	0.635	0	56	K↓GQNTVLLSGPR↓K	
Other function																
PCNA_XENLA	Swiss-Prot	Proliferating cell nuclear antigen	31,570	28,878	7	81	2	1	933.09	932.08	931.48	0.6052	0	31	R↓YLNFFTK↓A	
								2	634.18	1266.35	1265.62	0.7294	0	72	K↓FSASGELGTGNVK↓L	
TERA_XENLA	Swiss-Prot	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	88,830	89,760	11	183	6	1	1021.68	1020.68	1020.51	0.1676	0	42	K↓DVDVDFLAK↓M	
								2	526.81	1051.6	1050.51	1.091	0	65	K↓MDELQLFR↓G	
								2	587.24	1172.46	1171.66	0.807	0	32	R↓GILLYGPPGTGK↓T	
								2	771.26	1540.52	1539.79	0.7254	0	39	R↓LGDVISIQPCPDVK↓Y	
								2	790.32	1578.63	1577.78	0.8443	0	49	K↓AIANECQANFISK↓G	
								2	913.16	1824.32	1822.91	1.4128	0	57	R↓ELQELVQYPVEHPDK↓F	
Q7ZWU1_XENLA	MSDB	Stress-induced phosphoprotein (Hop)	73,540	62,506	2	73	1	2	709.19	1416.37	1415.76	0.6111	0	73	R↓VAYINPDLALEAK↓N	
JC4316	MSDB	Phosphoprotein phosphatase 2A-β catalytic chain	31,420	36,126	3	40	1	2	671.34	1340.67	1339.65	1.0152	0	40	K↓YSFLQFDPAPR↓R	
RAN_XENLA	MSDB	GTP-binding nuclear protein ran	26,100–24,220	24,554	4	55	2	2	608.07	1214.14	1213.59	0.5442	0	35	K↓NLQYYDISAK↓S	26
								2	648.4	1294.79	1293.59	1.1968	0	55	K↓FNVWDTAGQEK↓F	

© 2009 Tous droits réservés.

Downloaded from www.mcponline.org at CNRS on November 10, 2008

http://doc.univ-lille1.fr

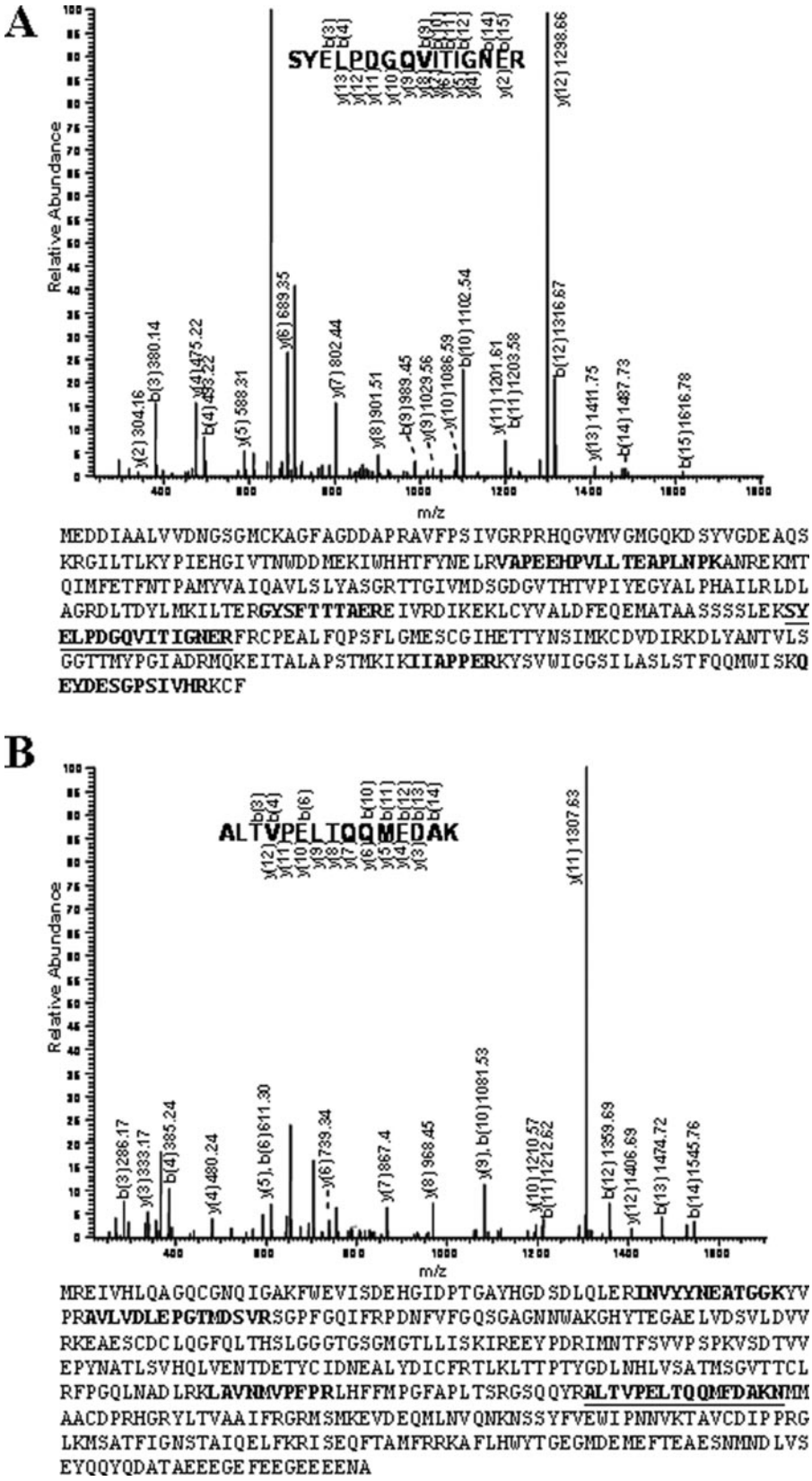


FIG. 5. **β-Actin and β-tubulin representative mass spectrometry spectra.** *A*, *top panel*, nano-LC-nano-ESI-MS/MS spectrum of the doubly charged ion *m/z* 896.25 showing one of the five sequences stemming from actin digestion; *bottom panel*, localization of the five sequences found for actin by nano-LC-nano-ESI-MS/MS are located in the actin primary structure (*bold characters*). The sequence described in the *top panel* spectrum is *underlined*. *B*, *top panel*, nano-LC-nano-ESI-MS/MS spectrum of the doubly charged ion *m/z* 846.71 showing one of the four sequences stemming from tubulin digestion; *bottom panel*, localization of the four sequences found for tubulin by nano-LC-nano-ESI-MS/MS are located in the tubulin primary structure (*bold characters*). The sequence described in the *top panel* spectrum is *underlined*.

Downloaded from www.mcponline.org at CNRS on November 10, 2008

© 2009 Tous droits réservés.

http://doc.univ-lille1.fr

Thèse de Vanessa Dehennaut, Lille 1, 2008

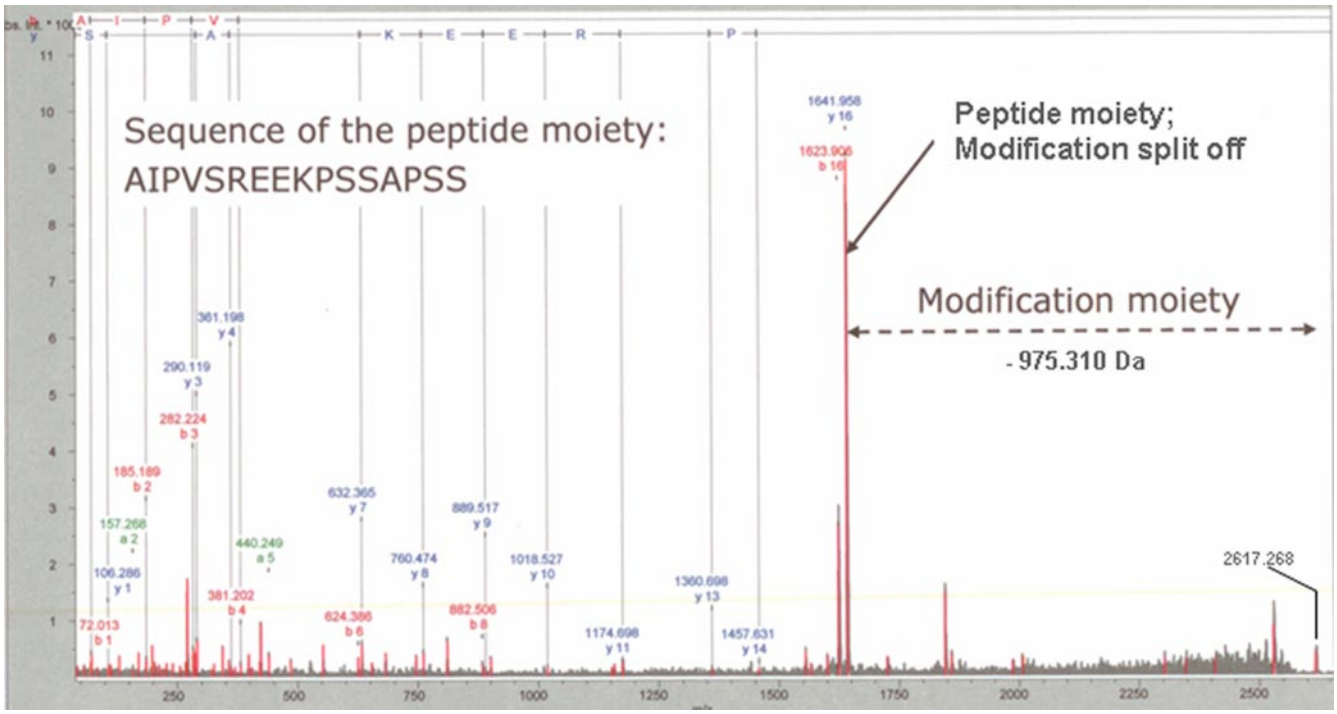


FIG. 6. **MALDI-TOF/TOF spectrum of α-crystallin modified peptide (*m/z* 2617.268 selected).** A neutral loss of 975.310 Da is observed between the precursor ion and the y_{16} ion. This loss corresponds to the modification of the peptide with GlcNAc/GalNAz/biotin. The peptide sequence of α-crystallin was confirmed by MS/MS (*left* of the figure).

TABLE II
Characteristics of the two β -actin modified peptides

The sequences corresponding to each tryptic peptide are indicated with the positions of the first and the last amino acids. M_{ox} indicates methionine oxidation, and * indicates the potential site of *O*-GlcNAcylation. For each peptide, the number of missed cleavages, the theoretical precursor ion *m/z* peptide, and the theoretical precursor ion of the peptide with biotin/GalNAz/*O*-GlcNAc labeling are presented.

Peptide	Missed cleavages	Theoretical precursor ion *m/z*	Theoretical precursor ion *m/z* with biotin/GalNAz/*O*-GlcNAc labeling
^{316}EITALAPST*M_{ox}K^{326}	0	1177.6133	2153.1733
^{313}MQKEITALAPST*MK^{326}	1	1548.8124	2524.3724

protein by proteomics approach and because tubulins are major components of the division spindle, we wanted to directly visualize the *O*-GlcNAcylation of the spindle.

For that purpose, the metaphase II meiotic spindles from hemisections and from 7-μm sections (Fig. 7, *A* and *B*, respectively) of the matured oocytes were observed using immunofluorescence microscopy. Pictures indeed showed a colocalization of tubulins and *O*-GlcNAc indicating that the meiotic spindle is highly glycosylated and/or that it is associated with *O*-GlcNAc-bearing proteins (Fig. 7*A*, *top panel*). The same observation was made with OGT (Fig. 7*A*, *bottom panel*, and *B*, *top panel*). Slawson *et al.* (17) showed previously that OGT was found on the mitotic spindle in somatic cells, but the present work is the first to report direct *O*-GlcNAcylation of the meiotic spindle. Another interesting point is that chromosomes were highly stained with both anti-*O*-GlcNAc and anti-OGT antibodies (Fig. 7*B*, *middle* and *bottom panels*), demonstrating that DNA, at least in its condensed form, is associated with *O*-GlcNAcylated proteins. This observation is reinforced by data presented in supplemental Fig. 1 showing mitotic COS7 cells: as the mitosis progressed, the chromosomes showed growing intensity of *O*-GlcNAc staining; this is particularly evident for the prophase/metaphase transition. Moreover the presence of *O*-GlcNAcylation and of the enzyme that catalyzes the sugar transfer on the meiotic spindle and on the chromosomes should have consequences on microtubule nucleation, elongation, spindle morphogenesis, and chromosomal condensation and/or segregation to allow the cell to divide.

DISCUSSION

The current data present the first analysis of the *Xenopus* oocyte *O*-GlcNAcome. Previous studies have shown that the maturation process, triggered by incubation with progesterone or by the injection of cytoplasm containing MPF, is accompanied by a global *O*-GlcNAcylation increase (8, 9). The

© 2009 Tous droits réservés.

http://doc.univ-lille1.fr

Downloaded from www.mcponline.org at CNRS on November 10, 2008

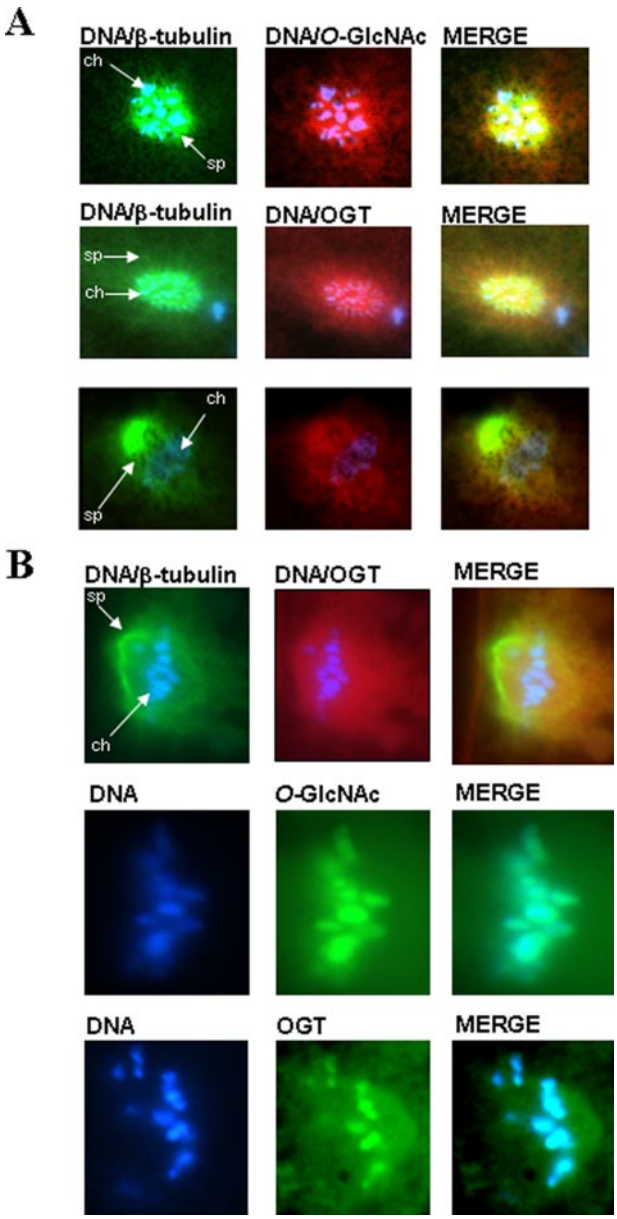


FIG. 7. **O-GlcNAc and OGT localized on the meiotic spindle and chromosomes in matured *X. laevis* oocyte.** *A*, metaphase II oocyte hemisections. Hemisections were performed as described under "Experimental Procedures." The microtubules (*sp*) were stained using anti-β-tubulin (Tub2.1), *O*-GlcNAc residues were stained using CTD110.6, OGT was stained using DM17, and the chromosomes (*ch*) were visualized using Hoechst staining. Merge pictures are shown at the *right* of the figure. *B*, metaphase II oocyte sections (7 μm). Matured oocytes were fixed, dehydrated, and embedded in paraffin. The sections (7 μm) were immunostained as described above. Merge pictures are shown at the *right* of the figure. Tubulin, OGT, and chromosomes were stained as described in *A* with the exception that OGT appears *green* at the *bottom* of the figure because we used Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG as the secondary antibody. *O*-GlcNAc residues were stained with RL2. *sp*, spindle; *ch*, chromosomes.

O-GlcNAcylation burst is essential for meiotic resumption because the inhibition of OGT prevents the M phase entry in G_2-arrested oocytes (9). Apart from β-catenin (8, 20) and Hsp/Hsc70 (33–35) for which glycosylation has been demonstrated previously in *X. laevis*, the nature of the proteins for which *O*-GlcNAcylation increased during the G_2/M transition was virtually unknown, and therefore the goal of this work was to identify them. This goal hit a sizable problem: whereas the *Xenopus* oocyte contains large amounts of proteins, it only expresses very low levels of *O*-GlcNAc in comparison with somatic cells (Fig. 1*D*) (for an equivalent quantity of proteins, the difference of *O*-GlcNAcylation content between the two cell types is estimated to be between 50- and 100-fold less for the oocyte than for the HeLa cells). A strategy consisting of actin immunoprecipitations followed by a staining of the immunoprecipitates with anti-*O*-GlcNAc antibodies allowed us to demonstrate that actin is *O*-GlcNAcylated (Fig. 2*A*). The enrichment of the *O*-GlcNAcylated proteins using WGA-immobilized beads also led to the identification of erk2 (Fig. 2*B*). Unfortunately anti-*O*-GlcNAc and WGA enrichments were inefficient for the identification of *O*-GlcNAcylated proteins in *Xenopus* oocyte by classical proteomics approaches. Here we tested the labeling of *O*-GlcNAc residues using UDP-GalNAz and a recombinant galactosyltransferase (Y289L Gal-T1). This technique, which was used recently (31), allowed for the identification of 23 proteins that are components of the cell or that are implicated in the cellular metabolism. These proteins listed in Table I are distributed in four distinct classes; several of them were described previously to be *O*-GlcNAcylated, but none were described before in *Xenopus*.

Actin and tubulins are structural proteins involved in cell architecture and the transport of many organelles and macromolecules, but they also play a crucial role in the control of the cell cycle. Both proteins were described previously as being *O*-GlcNAc-bearing proteins (31, 32, 34). In our study, the *O*-GlcNAcylation of actin was demonstrated by (i) the staining with CTD110.6, (ii) the labeling with GalNAz/biotin (followed by a staining with actin), and (iii) the proteomics procedure (nano-LC-nano-ESI-MS/MS). The actin filaments control many events during oocyte maturation, for example the cortical spindle anchorage (for a review, see Ref. 36). Tubulin (β form) was also retrieved in our list of *O*-GlcNAcylated proteins. Unfortunately because of the weak specificity and sensitivity of some antibodies raised against *X. laevis* proteins (especially in immunoprecipitation), we failed to convincingly show the direct modification of β-tubulin by probing immunoprecipitated β-tubulin with the anti-*O*-GlcNAc antibodies. Nevertheless the tubulin *O*-GlcNAc status was strengthened by the localization of *O*-GlcNAc and OGT on the meiotic spindle (Fig. 7, *A* and *B*, *top panel*). Such an observation of an interaction of OGT with the spindle was reported previously (17). These authors also described the interaction of OGT with the midbody, a cytoplasmic remnant bridging the two daughter cells at the end of cytokinesis. We observed a

Downloaded from www.mcponline.org at CNRS on November 10, 2008

© 2009 Tous droits réservés.
http://doc.univ-lille1.fr

similar phenomenon in mitotic HeLa cells (supplemental Fig. 2). However, the impact of *O*-GlcNAcylation on tubulin polymerization and spindle formation remains to be determined. Our results also showed that *O*-GlcNAc-bearing proteins and OGT itself were highly associated with condensed chromatin (Fig. 7*B*, *middle* and *bottom panels*, and supplemental Fig. 1). The description of an abundant distribution of *O*-GlcNAcylation on the chromatin-associated proteins was made for the first time almost 2 decades ago (37). Authors used FITC-labeled WGA and tritiated UDP-Gal radiolabeling to demonstrate the existence of *O*-GlcNAcylation on DNA-associated proteins. It is well known that a plethora of transcription factors like Sp1 and other transcriptional machinery components are intensively modified with *O*-GlcNAcylation (38). Enzymes involving in chromatin remodeling are also *O*-GlcNAcylated as it is the case for histone deacetylase 1 (39): interestingly OGT physically interacts with histone deacetylase (38). In contrast, although a yin/yang relationship between phosphorylation and *O*-GlcNAcylation on histone H3 has been proposed recently based on computer analyses (40), the direct evidence for *O*-glycosylation of histones has never been described. Personal attempts to show that such proteins were *O*-GlcNAcylated either by the use of histone-enriched fractions (supplemental Fig. 3) or by histone immunoprecipitation followed by an immunoblotting with an anti-*O*-GlcNAc antibody were unfruitful (data not shown). The supplemental Fig. 3 shows that the histones in HeLa cells do not bear any *O*-GlcNAc residues, whereas the nuclear fraction is extensively enriched in this PTM. The exact identification of the DNA-associated proteins that are modified by *O*-GlcNAcylation is one of our main challenges in the future years.

In addition to cytoskeletal proteins, we identified numerous *O*-GlcNAcylated functional proteins that can be classified in three different groups: metabolism, translation, and other functions. Among the nine enzymes involved in the cell metabolism, four play a direct role in glycolysis, namely aldolase, GAPDH, enolase, and pyruvate kinase, and two others, the β-chain 1 of the pyruvate dehydrogenase and the lactate dehydrogenase (chains A and B), both use pyruvate, the glycolysis end product, either to direct it to the citric acid cycle or to use it in anaerobic conditions (lactate dehydrogenase catalyzes the conversion of pyruvate to lactate). The pyruvate dehydrogenase β-chain 1 is the first component of the pyruvate dehydrogenase complex. It binds to the thiamine pyrophosphate to catalyze (i) the pyruvate decarboxylation and (ii) the reductive acetylation of lipoic acid. Although Guixe *et al.* (41) demonstrated the formation of ATP after injection of glucose 6-phosphate, fructose 6-phosphate, and fructose 1,6-bisphosphate and of lactate after injection of glucose, it is usually considered that glycolysis is not operational in full grown oocytes and that carbon metabolic flux is largely directed to glycogen synthesis (glycolysis only begins near gastrulation) (42, 43). The description of *O*-GlcNAcylation on glycolysis-participating enzymes is not new because it has been reported for different enzymes. Using an anti-*O*-GlcNAc antibody-containing column, Wells *et al.* (26) found that pyruvate kinase, phosphoglycerate kinase, enolase, and GAPDH were *O*-GlcNAcylated; Cieniewski-Bernard *et al.* (27) also found enolase and GAPDH to which they added the triosephosphate isomerase. Nevertheless we describe for the first time the *O*-GlcNAcylation of aldolase. The function of *O*-GlcNAcylation on these enzymes remains to be deciphered and understood. We hypothesize that *O*-GlcNAc could take part in the regulation of glycolysis. *O*-GlcNAc itself comes from glucose utilization through the hexosamine biosynthetic pathway (for a review, see Ref. 13). If *O*-GlcNAcylation exerts a negative control on the glycolysis-regulating enzymes we can suppose that when the glycolysis is inoperative the glucose flux, in addition to being directed to glycogen synthesis at the glucose 6-phosphate crossroad, could follow the hexosamine biosynthetic pathway (fructose 6-phosphate crossroad) to produce the OGT substrate UDP-GlcNAc. Three other metabolic enzymes, namely glutathione *S*-transferase, transketolase, and *S*-adenosylhomocysteinase, have been also identified as *O*-GlcNAcylated enzymes. *S*-Adenosylhomocysteinase is an enzyme that cleaves the *S*-adenosylhomocysteine into homocysteine, a reaction product and an inhibitor of all *S*-adenosylmethionine-dependent methylation reactions. This nuclear enzyme is confined in the cytoplasm during oocyte maturation and during the early stages of the development of embryo. Then it gradually reaccumulates in the nuclei during gastrulation (44) where it participates in mRNA transcription. Because *O*-GlcNAcylation is thought to have a role in the nuclear transport of numerous proteins (for a review, see Ref. 45) and that *O*-GlcNAcylation increases during the oocyte maturation process, we can suppose that this PTM mediates the *S*-adenosylhomocysteinase subcellular localization. To test this hypothesis, it would be interesting to look at the glycosylation status of *S*-adenosylhomocysteinase during gastrulation *i.e.* when the protein is localized in the nucleus.

Numerous *O*-GlcNAcylated proteins we found are involved in translational processes. Five are ribosomal proteins, and one is the translation elongation factor eEF1. Three other ribosomal proteins were described to bear *O*-GlcNAc residues: the 40 S ribosomal S24 protein (26, 31) and the ribosomal proteins S3 and P0 (31). Little is known about the impact of *O*-GlcNAcylation on translation in comparison with the transcriptional process for which the importance of this glycosylation has been reported intensively (for reviews, see Refs. 10–14 and 38). The only significant contribution of *O*-GlcNAcylation reported for translation is the modification of p67 and its association with the α-chain of eIF2 in the prevention of its phosphorylation by the eIF2 kinase (46). The *O*-GlcNAcylation of ribosomal proteins may be involved in the multimerization of these proteins and in their association with rRNAs to compose the ribosomal machinery. In regard to this idea, several groups have reported an implication of *O*-Glc-

© 2009 Tous droits réservés.

http://doc.univ-lille1.fr

Downloaded from www.mcponline.org at CNRS on November 10, 2008

NAcylation in the establishment and in the reinforcement of protein-to-protein interactions (47–49). The glycosylation of ribosomal proteins could contribute, through the formation and the stabilization of the ribosomes, to the activation of the translational machinery. In the oocyte, the transcriptional machinery is ineffective. During oogenesis, the oocyte accumulates a stock of maternal mRNAs. This stock is used to translate proteins necessary for maturation (for example, mRNA encoding mos; cyclins A1, B1, and B2; and cdk2) and also for early embryogenesis. Indeed the embryo starts to synthesize its own RNAs only at the midblastula transition. During meiotic resumption, the poly(A) tails of mRNAs are lengthened by about 100 adenyl groups. It has been demonstrated that the mRNA polyadenylation is an essential process that controls the mRNA translation (for reviews, see Refs. 50 and 51). In summary, if little is known about the regulation of translation by *O*-GlcNAcylation, we can hypothesize that *O*-GlcNAcylation may intervene at different levels (i) in the association of the different subunits constituting the ribosomal machinery, (ii) by activating/inactivating the crucial factors needed for translation, *i.e.* eIF, and (iii) indirectly by promoting the mRNA polyadenylation.

We also showed that the phosphoprotein phosphatase 2A-β is *O*-GlcNAcylated. PP2A has been shown to negatively regulate cdc2 in G_2-arrested *Xenopus* oocyte, and PP2A depletion is sufficient to activate cdc2 in cell-free extract demonstrating the importance of this protein in cell cycle regulation (52). This is the second time that a phosphatase has been described as bearing *O*-GlcNAc moieties; the first one was the nuclear tyrosine phosphatase p65 (53). Recently it has been shown that PP1 α and γ are in complex with OGT (54). It is therefore possible that PP2A is itself associated with OGT and that PP1 is also modified with *O*-GlcNAc residues. This hypothesis, if true, adds another dimension to the complex relationship that exists between phosphorylation and *O*-GlcNAcylation: OGT and protein phosphatases could be modified and regulated by these two PTMs, and the interaction between the two entities could tightly control the dephosphorylation and *O*-GlcNAcylation processes of targeted substrates.

A recent study reported the physical interaction of the C terminus of OGT with the MAPK p38 (55). Although the authors showed that p38 does not phosphorylate OGT and that in return OGT seems not to glycosylate the kinase, the association between the two enzymes enhances the recruitment of the OGT targets such as neurofilament H. Here we provide direct evidence of the *O*-GlcNAcylation of the MAPK p42 erk2. As mentioned previously in the Introduction, after hormonal stimulation with progesterone, two main pathways are activated, namely the p42 MAPK (mos-erk2) pathway (56) and the MPF pathway (5, 6). At this stage it is not known how the *O*-GlcNAcylation of erk2 can regulate its activity in the oocyte maturation process.

Another interesting *O*-GlcNAcylated protein identified in the study was the transitional endoplasmic reticulum ATPase (TER ATPase also known as ATPase associated with various cellular activities ATPase p97). This protein is essential for the Golgi and endoplasmic reticulum fragmentation occurring during mitosis and for the reassembly of these organelles after mitosis (for a review, see Ref. 57). A recent study describes that the cell membrane vesicular traffic is crucial for meiotic arrest (58). Golgi fragmentation blockade prevents cell division and stops the cell cycle at the G_2 stage. The TER ATPase is also involved in the formation of the nuclear envelope (59). The function of *O*-GlcNAc on TER ATPase activity and its impact on the Golgi, endoplasmic reticulum, and nuclear envelope fragmentation remain to be studied. We have also found that the small GTPase ran, which is implicated in the spindle assembly (60) and in the nuclear envelope reformation after division (61), was *O*-GlcNAcylated.

In conclusion, we identified several proteins belonging to four different functional groups. Although the function of *O*-GlcNAcylation has to be determined for each identified protein, our study shows that the *O*-GlcNAcylation impact in the cell cycle progression is not restricted only to key regulatory proteins like specific kinases such as erk2 or phosphatases such as PP2A. Indeed the increase in *O*-GlcNAc was found on structural proteins that could intervene in organelle displacement and fragmentation (TER ATPase and ran), in the establishment of the division spindle and its anchorage (tubulin, actin, and ran), or in the translation of mRNAs important for the maturation process (ribosomal proteins). So to highlight the role of *O*-GlcNAcylation in the cell cycle progression, it seems crucial to decipher the exact function of this PTM on each factor and especially on glycolysis enzymes.

Acknowledgments—We thank the "Université des Sciences et Technologies de Lille." We are grateful to Prof. Gerald W. Hart for providing us CTD110.6. We also thank Arlette Lescuyer for technical assistance. We thank the Bruker Daltonics Society for the MALDI-TOF/TOF analyses, and we are more particularly grateful to Pierre-Olivier Schmit and to Dr. Christian Rolando (headquarters of the UMR-CNRS 8009). We also thank Dr. Catherine Postic from the Cochin Institute for the final reading of the manuscript and for the grammatical corrections.

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

[S] The on-line version of this article (available at http://www.mcponline.org) contains supplemental material.

¶ Recipient of a fellowship from the "Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche."

‖ Both authors made equal contributions to this work and should be considered as second author.

§§ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 3-33-20-43-44-30; Fax: 3-33-20-43-65-55; E-mail: tony.lefebvre@univ-lille1.fr.

REFERENCES

1. Malumbres, M., and Barbacid, M. (2007) Cell cycle kinases in cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **17,** 60–65

© 2009 Tous droits réservés.
http://doc.univ-lille1.fr
Downloaded from www.mcponline.org at CNRS on November 10, 2008
ASBMB
Molecular & Cellular Proteomics

2. Masui, Y., and Markert, C. L. (1971) Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.* **177,** 129–145
3. Masui, Y. (2001) From oocytes maturation to the in vitro cell cycle: the history of discoveries of maturation-promoting factor (MPF) and cytostatic factor (CSF). *Differentiation* **69,** 1–17
4. Ferrel, J. E., Jr. (1999) Xenopus oocyte maturation: new lessons from a good egg. *BioEssays* **21,** 833–842
5. Norbury, C., Blow, J., and Nurse, P. (1991) Regulatory phosphorylation of the p34cdc2 protein kinase in vertebrates. *EMBO J.* **10,** 3321–3329
6. Jessus, C., and Ozon, R. (2004) How does *Xenopus* oocyte acquire its competence to undergo meiotic maturation ? *Biol. Cell* **96,** 187–192
7. Bodart, J. F., Baert, F. Y., Sellier, C., Duesbery, N. S., Flament, S., and Vilain, J. P. (2005) Differential roles of p39Mos-Xp42Mpk1 cascade proteins on Raf1 phosphorylation and spindle morphogenesis in *Xenopus* oocytes. *Dev. Biol.* **283,** 373–383
8. Lefebvre, T., Baert, F., Bodart, J. F., Flament, S., Michalski, J. C., and Vilain, J. P. (2004) Modulation of *O*-GlcNAc glycosylation during *Xenopus* oocyte maturation. *J. Cell. Biochem.* **93,** 999–1010
9. Dehennaut, V., Lefebvre, T., Sellier, C., Leroy, Y., Gross, B., Walker, S., Cacan, R., Michalski, J. C., Vilain, J. P., and Bodart, J. F. (2007) *O*-Linked N-acetylglucosaminyltransferase inhibition prevents G_2/M transition in *Xenopus* laevis oocytes. *J. Biol. Chem.* **282,** 12527–12536
10. Hart, G. W., Housley, M. P., and Slawson C. (2007) Cycling of *O*-linked β-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature* **446,** 1017–1022
11. Zachara, N. E., and Hart, G. W. (2006) Cell signaling, the essential role of *O*-GlcNAc! *Biochim. Biophys. Acta* **1761,** 599–617
12. Kudlow, J. E. (2006) Post-translational modification by *O*-GlcNAc: another way to change protein function. *J. Cell. Biochem.* **98,** 1062–1075
13. Love, D. C., and Hanover, J. A. (2005) The hexosamine signaling pathway: deciphering the "*O*-GlcNAc code". *Sci. STKE* **2005,** re13
14. Slawson, C., Housley, M. P., and Hart, G. W. (2006) *O*-GlcNAc cycling: how a single sugar post-translational modification is changing the way we think about signaling networks. *J. Cell. Biochem.* **97,** 71–83
15. Fang, B., and Miller, M. W. (2001) Use of galactosyltransferase to assess the biological function of *O*-linked N-acetyl-D-glucosamine: a potential role for *O*-GlcNAc during cell division. *Exp. Cell Res.* **263,** 243–253
16. Slawson, C., Shafii, S., Amburgey, J., and Potter, R. (2002) Characterization of the *O*-GlcNAc protein modification in *Xenopus laevis* oocyte during oogenesis and progesterone-stimulated maturation. *Biochim. Biophys. Acta* **1573,** 121–129
17. Slawson, C. Zachara, N. E., Vosseller, K., Cheung, W. D., Lane, M. D., and Hart, G. W. (2005) Perturbations in O-linked β-N-acetylglucosamine protein modification cause severe defects in mitotic progression and cytokinesis. *J. Biol. Chem.* **280,** 32944–32956
18. Berger, S. L. (2007) The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* **447,** 407–412
19. Bosch, M., Cayla, X., van Hoof, C., Hemmings, B. A., Ozon, R., Merlevede, W., and Goris, J. (1995) The PR55 and PR65 subunits of protein phosphatase 2A from *Xenopus* laevis. Molecular cloning and developmental regulation of expression. *Eur. J. Biochem.* **230,** 1037–1045
20. Zhu, W., Leber, B., and Andrews, D. W. (2001) Cytoplasmic *O*-glycosylation prevents cell surface transport of E-cadherin during apoptosis. *EMBO J.* **20,** 5999–6007
21. Baert, F., Bodart, J. F., Bocquet-Muchembled, B., Lescuyer-Rousseau, A., and Vilain, J. P. (2003) Xp42(Mpk1) activation is not required for germinal vesicle breakdown but for Raf complete phosphorylation in insulin-stimulated *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* **278,** 49714–49720
22. Chesnel, F., Bonnec, G., Tardivel, A., and Boujard, D. (1997) Comparative effects of insulin on the activation of the Raf/Mos-dependent MAP kinase cascade in vitellogenic versus postvitellogenic *Xenopus* oocytes. *Dev. Biol.* **188,** 122–133
23. Chevallet, M., Luche, S., and Rabilloud, T. (2006) Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nat. Protoc.* **1,** 1852–1858
24. Slomianny, M. C., Dupont, A., Bouanou, F., Beseme, O., Guihot, A. L., Amouyel, P., Michalski, J. C., and Pinet, F. (2006) Profiling of membrane proteins from human macrophages: comparison of two approaches. *Proteomics* **6,** 2365–2375
25. Bodart, J. F., Gutierrez, D. V., Nebreda, A. R., Buckner, B. D., Resau, J. R., and Duesbery, N. S. (2002) Characterization of MPF and MAPK activities during meiotic maturation of *Xenopus* tropicalis oocytes. *Dev. Biol.* **245,** 348–361
26. Wells, L., Vosseller, K., Cole, R. N., Cronshaw, J. M., Matunis, M. J., and Hart, G. W. (2002) Mapping sites of *O*-GlcNAc modification using affinity tags for serine and threonine post-translational modifications. *Mol. Cell. Proteomics* **1,** 791–804
27. Cieniewski-Bernard, C., Bastide, B., Lefebvre, T., Lemoine, J., Mounier, Y., and Michalski, J. C. (2003) Identification of *O*-linked N-acetylglucosamine proteins in rat skeletal muscle using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* **3,** 577–585
28. Ramakrishnan, B., and Qasba, P. K. (2002) Structure-based design of β1,4-galactosyltransferase I (β4Gal-T1) with equally efficient N-acetylgalactosaminyltransferase activity: point mutation broadens β4Gal-T1 donor specificity. *J. Biol. Chem.* **277,** 20833–20839
29. Khidekel, N., Arndt, S., Lamarre-Vincent, N., Lippert, A., Poulin-Kerstien, K. G., Ramakrishnan, B., Qasba, P. K., and Hsieh-Wilson, L. C. (2003) A chemoenzymatic approach toward the rapid and sensitive detection of *O*-GlcNAc posttranslational modifications. *J. Am. Chem. Soc.* **125,** 16162–16163
30. Wang, Q., Chan, T. R., Hilgraf, R., Fokin, V. V., Sharpless, K. B., and Finn, M. G. (2003) Bioconjugation by copper(I)-catalyzed azide-alkyne [3 + 2] cycloaddition. *J. Am. Chem. Soc.* **125,** 3192–3193
31. Wang, Z., Pandey, A., and Hart, G. W. (2007) Dynamic interplay between *O*-linked N-acetylglucosaminylation and glycogen synthase kinase-3-dependent phosphorylation. *Mol. Cell. Proteomics* **6,** 1365–1379
32. Hedou, J., Cieniewski-Bernard, C., Leroy, Y., Michalski, J. C., Mounier, Y., and Bastide, B. (2007) *O*-Linked N-acetylglucosaminylation is involved in the Ca^{2+} activation properties of rat skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **282,** 10360–10369
33. Lefebvre, T., Cieniewski, C., Lemoine, J., Guerardel, Y., Leroy, Y., Zanetta, J. P., and Michalski, J. C. (2001) Identification of N-acetyl-D-glucosamine-specific lectins from rat liver cytosolic and nuclear compartments as heat-shock proteins. *Biochem. J.* **360,** 179–188
34. Walgren, J. L., Vincent, T. S., Schey, K. L., and Buse, M. G. (2003) High glucose and insulin promote *O*-GlcNAc modification of proteins, including α-tubulin. *Am. J. Physiol.* **284,** E424–E434
35. Guinez, C., Lemoine, J., Michalski, J. C., and Lefebvre, T. (2004) 70-kDa-heat shock protein presents an adjustable lectinic activity towards *O*-linked N-acetylglucosamine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **319,** 21–26
36. Sun, Q. Y., and Schatten, H. (2006) Regulation of dynamic events by microfilaments during oocyte maturation and fertilization. *Reproduction* **131,** 193–205
37. Kelly, W. G., and Hart, G. W. (1989) Glycosylation of chromosomal proteins: localization of O-linked N-acetylglucosamine in Drosophila chromatin. *Cell* **57,** 243–251
38. Comer, F. I., and Hart, G. W. (1999) *O*-GlcNAc and the control of gene expression. *Biochim. Biophys. Acta* **1473,** 161–171
39. Yang, X., Zhang, F., and Kudlow, J. E. (2002) Recruitment of *O*-GlcNAc transferase to promoters by corepressor mSin3A: coupling protein *O*-GlcNAcylation to transcriptional repression. *Cell* **110,** 69–80
40. Kaleem, A., Hoessli, D. C., Ahmad, I., Walker-Nasir, E., Nasim, A., Shakoori, A. R., and Din, N. U. (2008) Immediate-early gene regulation by interplay between different post-translational modifications on human histone H3. *J. Cell. Biochem.* **103,** 835–851
41. Guixe, V., Preller, A., Kessi, E., Hofer, H. W., and Ureta, T. (1994) Glycolysis is operative in amphibian oocytes. *FEBS Lett.* **343,** 219–222
42. Dworkin, M. B., and Dworkin-Rastl, E. (1989) Metabolic regulation during early frog development: glycogenic flux in *Xenopus* oocytes, eggs, and embryos. *Dev. Biol.* **132,** 512–523
43. Dworkin, M. B., and Dworkin-Rastl, E. (1991) Carbon metabolism in early amphibian embryos. *Trends Biochem. Sci.* **16,** 229–234
44. Radomski, N., Barreto, G., Kaufmann, C., Yokoska, J., Mizumoto, K., and Dreyer, C. (2002) Interaction of S-adenosylhomocysteine hydrolase of *Xenopus* laevis with mRNA(guanine-7-)methyltransferase: implication on its nuclear compartmentalisation and on cap methylation of hnRNA. *Biochim. Biophys. Acta* **1590,** 93–102
45. Guinez, C., Morelle, W., Michalski, J. C., and Lefebvre, T. (2004) *O*-GlcNAc glycosylation: a signal for the nuclear transport of cytosolic proteins? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37,** 765–774
46. Datta, B., Ray, M. K., Chakrabarti, D., Wylie, D. E., and Gupta, N. K. (1989) Glycosylation of eukaryotic peptide chain initiation factor 2 (eIF-2)-asso-

Downloaded from www.mcponline.org at CNRS on November 10, 2008

© 2009 Tous droits réservés. http://doc.univ-lille1.fr

ciated 67-kDa polypeptide (p67) and its possible role in the inhibition of eIF-2 kinase-catalyzed phosphorylation of the eIF-2 α-subunit. *J. Biol. Chem.* **264,** 20620–20624
47. Roos, M. D., Su, K., Baker, J. R., and Kudlow, J. E. (1997) *O*-Glycosylation of an Sp1-derived peptide blocks known Sp1 protein interactions. *Mol. Cell. Biol.* **17,** 6472–6480
48. Hiromura, M., Choi, C. H., Sabourin, N. A., Jones, H., Bachvarov, D., and Usheva, A. (2003) YY1 is regulated by *O*-linked N-acetylglucosaminylation (*O*-GlcNAcylation). *J. Biol. Chem.* **278,** 14046–14052
49. Gewinner, C., Hart, G., Zachara, N., Cole, R., Beisenherz-Huss, C., and Groner, B. (2004) The coactivator of transcription CREB binding protein interacts preferentially with the glycosylated form of Stat5. *J. Biol. Chem.* **279,** 3563–3572
50. de Moor, C. H., and Richter, J. D. (2001) Translational control in vertebrate development. *Int. Rev. Cytol.* **203,** 567–608
51. Mendez, R., and Richter, J. D. (2001) Translational control by CPEB: a means to the end. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2,** 521–529
52. Maton, G., Lorca, T., Girault, J. A., Ozon, R., and Jessus, C. (2005) Differential regulation of Cdc2 and Aurora-A in Xenopus oocytes: a crucial role of phosphatase 2A. *J. Cell Sci.* **118,** 2485–2494
53. Meikrantz, W., Smith, D. M., Sladicka, M. M., and Schlegel, R. A. (1991) Nuclear localization of an *O*-glycosylated protein phosphotyrosine phosphatase from human cells. *J. Cell Sci.* **98,** 303–307
54. Wells, L., Kreppel, L. K., Comer, F. I., Wadzinski, B. E., and Hart, G. W. (2004) *O*-GlcNAc transferase is in a functional complex with protein phosphatase 1 catalytic subunits. *J. Biol. Chem.* **279,** 38466–38470
55. Cheung, W. D., and Hart, G. W. (2008) AMP-activated protein kinase and p38 MAPK activate *O*-GlcNAcylation of neuronal proteins during glucose deprivation. *J. Biol. Chem.* **283,** 13009–13020
56. Fabian, J. R., Morrison, D. K., and Daar, I. O. (1993) Requirement for Raf and MAP kinase function during the meiotic maturation of Xenopus oocytes. *J. Cell Biol.* **122,** 645–652
57. Uchiyama, K., and Kondo, H. (2005) p97/p47-Mediated biogenesis of Golgi and ER. *J. Biochem.* (*Tokyo*) **137,** 115–119
58. El-Jouni, W., Haun, S., Hodeify, R., Hosein Walker, A., and Machaca, K. (2007) Vesicular traffic at the cell membrane regulates oocyte meiotic arrest. *Development* **134,** 3307–3315
59. Hetzer, M., Meyer, H. H., Walther, T. C., Bilbao-Cortes, D., Warren, G., and Mattaj, I. W. (2001) Distinct AAA-ATPase p97 complexes function in discrete steps of nuclear assembly. *Nat. Cell Biol.* **3,** 1086–1091
60. Wilde, A., Lizarraga, S. B., Zhang, L., Wiese, C., Gliksman, N. R., Walczak, C. E., and Zheng, Y. (2001) Ran stimulates spindle assembly by altering microtubule dynamics and the balance of motor activities. *Nat. Cell Biol.* **3,** 221–227
61. Zhang, C., and Clarke, P. R. (2001) Roles of Ran-GTP and Ran-GDP in precursor vesicle recruitment and fusion during nuclear envelope assembly in a human cell-free system. *Curr. Biol.* **11,** 208–212

Downloaded from www.mcponline.org at CNRS on November 10, 2008

© 2009 Tous droits réservés.
http://doc.univ-lille1.fr

Supplementary data

Experimental procedures

Immunocytological analyses.

Cos7 and HeLa cells were grown on coverglasses for 24 h and washed twice with cold PBS. Cells were fixed in 3% paraformaldehyde in cold PBS for 15 min and washed with PBS. Excess of paraformaldehyde was destroyed with a solution of 50 mM ammonium chloride for 10 min. After washing with PBS, cells were permeabilised with 0.1% Triton-X100 for 5 min. Non-specific sites were blocked with goat serum. Coverglasses were then incubated either with anti-*O*-GlcNAc (RL2) or anti-OGT (DM17) or anti-beta-tubulin (Tub2.1) antibodies each at a dilution of 1:100 in a 10% (v/v) goat serum solution (in PBS) for 30 min. After three washes in PBS, FITC and Texas Red-labeled secondary antibodies (GE healthcare) were incubated on coverglasses (dilution 1:50). Nuclei were specifically stained with DAPI (Sigma-Aldrich). Cells were visualised using an Axioplan 2 imaging (Zeiss) and an Axio Cam HRc camera (AxioVision).

Supplementary data figure 1- *O*-GlcNAc is concentrated on chromosomes during the time course of mitosis in Cos7 cells.

O-GlcNAc modification was observed by indirect immunofluorescence using RL2 as described in the supplementary experimental procedures section. DNA was stained with DAPI.

Supplementary data figure 2- Localisation of OGT in HeLa cells.

OGT was observed by indirect immunofluorescence using DM17 antibody and microtubules were stained with Tub2.1 antibody. White arrow indicates the mid-body.

© 2009 Tous droits réservés.
http://doc.univ-lille1.fr

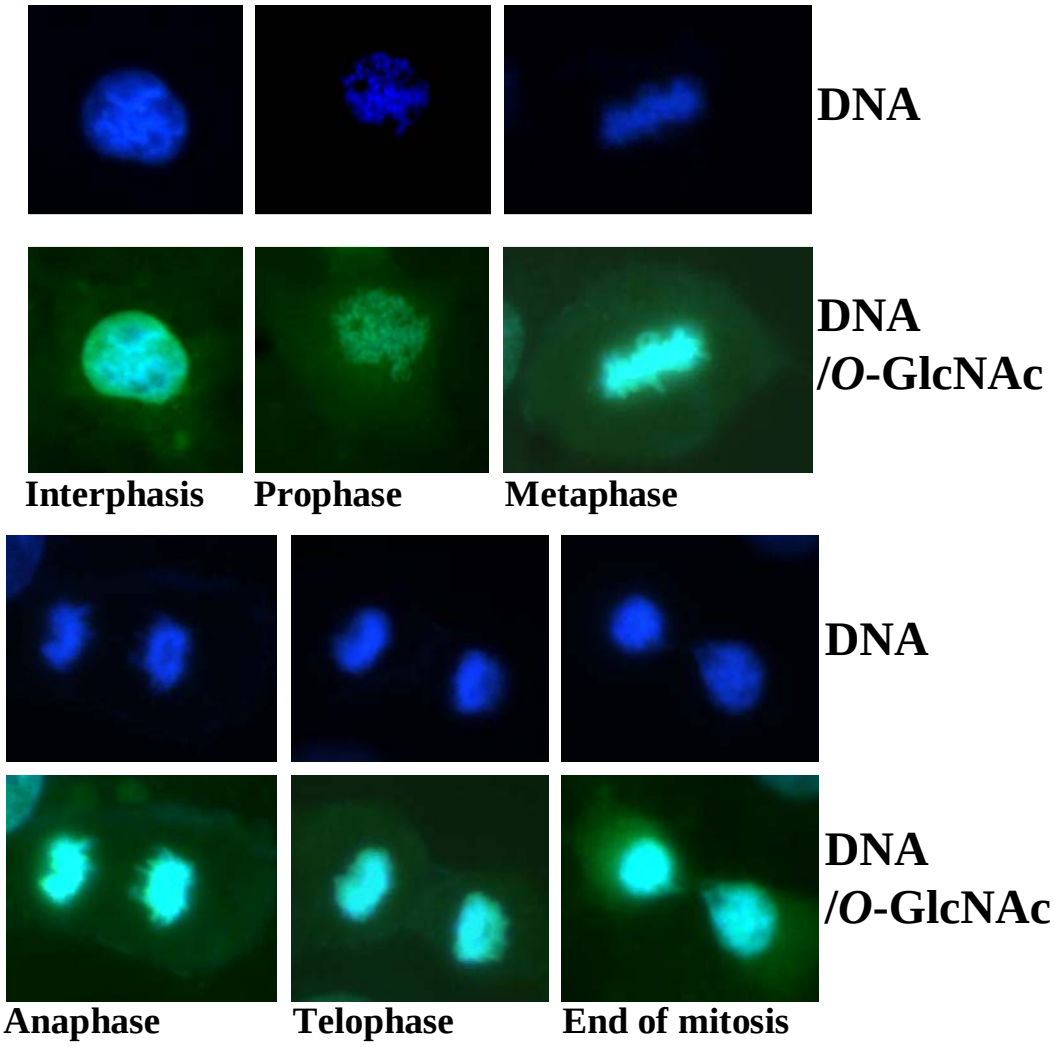
Supplementary data figure 3- Histones are not *O*-GlcNAc modified.

Nuclei and histones from non synchronised HeLa cells were prepared as described by Ryan and Annunziato (Ryan, C.A. and Annunziato, A.T. (1999) *Current Protocols in Molecular Biology* 304, 76-99). Proteins were separated by SDS-PAGE, electroblotted and analysed using anti-H2B and anti-*O*-GlcNAc directed antibodies (RL2 and CTD110.6). Ponceau red staining of the membrane is shown at the top.

Protein mass markers are indicated at the left (kDa).

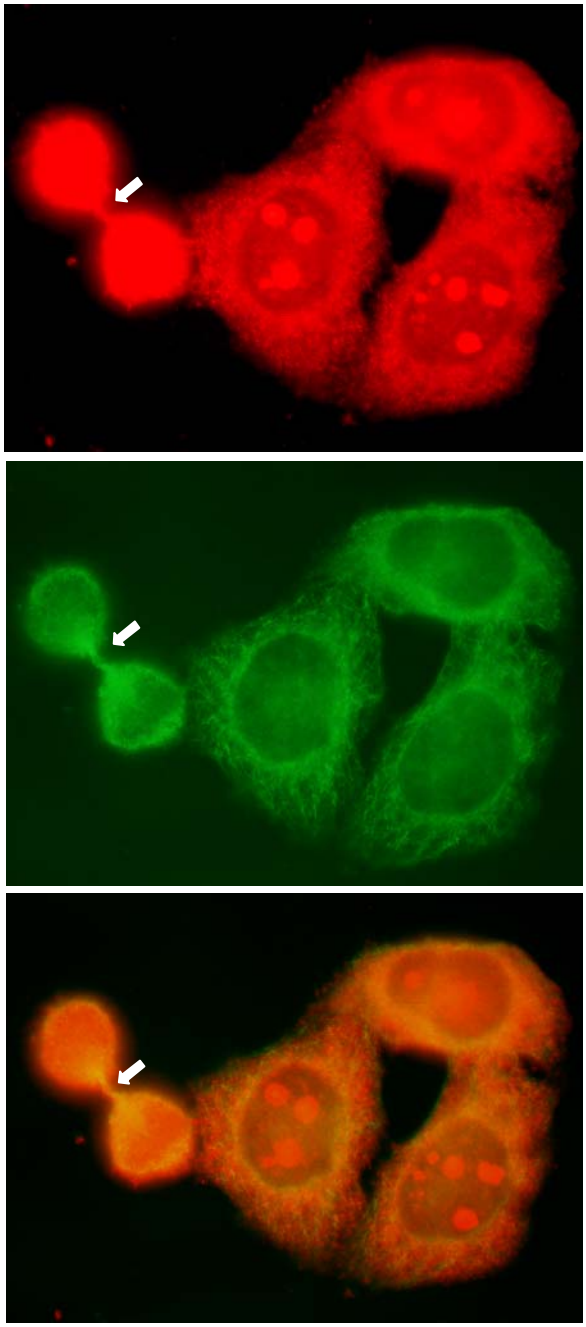
WCL, whole cell lysate ; ENF, extra nuclear fraction ; WB, western blot.

© 2009 Tous droits réservés.
http://doc.univ-lille1.fr



Dehennaut et al. Supplementary data Fig. 1

© 2009 Tous droits réservés.



OGT

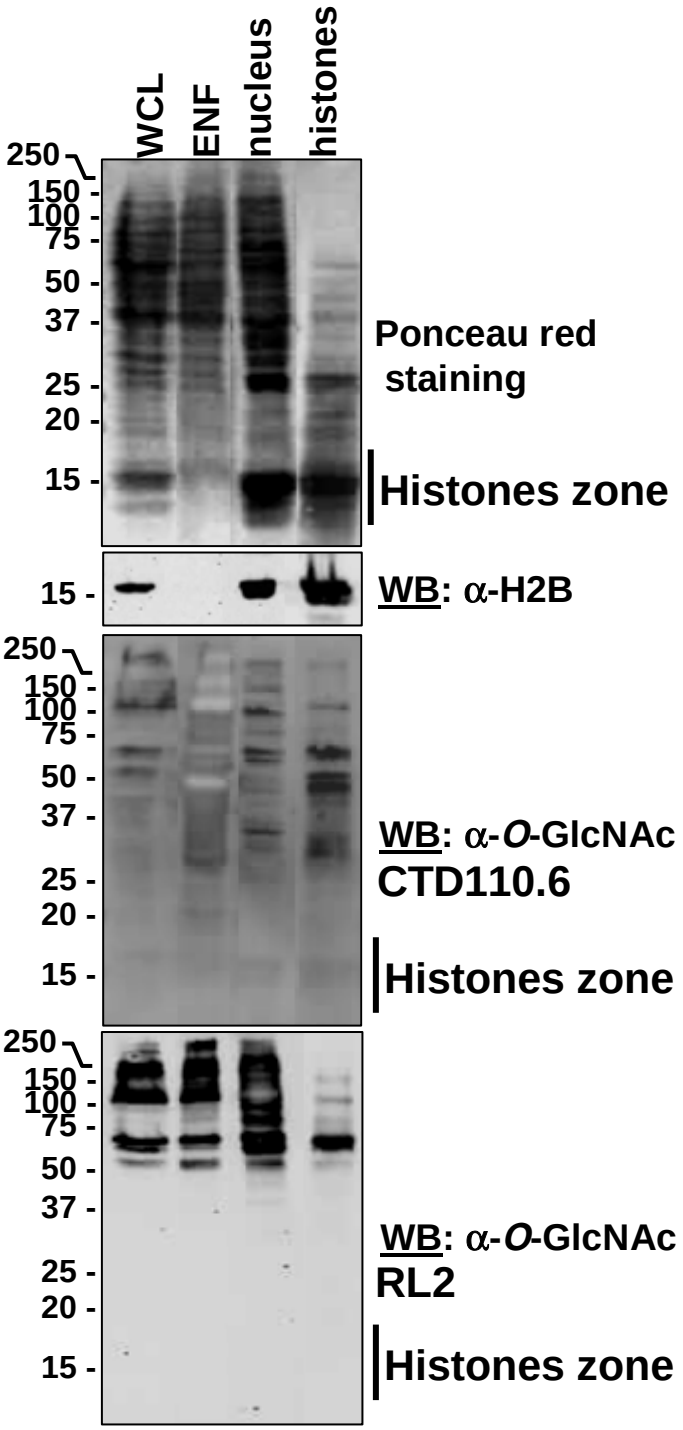
β-tubulin

β-tubulin
OGT

Dehennaut et al. Supplementary data Fig. 2

© 2009 Tous droits réservés.

http://doc.univ-lille1.fr



Dehennaut et al. Supplementary data Fig. 3

© 2009 Tous droits réservés.

PARTIE II

Dynamique de la O-GlcNAc de l'ovogenèse à l'embryogenèse chez Xenopus laevis

© 2009 Tous droits réservés.

http://doc.univ-lille1.fr

I. Contexte de l'étude.

Du nématode à l'homme, les processus de développement reposent sur les mêmes activités cellulaires fondamentales. Former un embryon puis un organisme autonome à partir d'une seule cellule-œuf nécessite que les cellules prolifèrent, communiquent, migrent, se différencient ou encore entrent en apoptose. Ces activités cellulaires sont coordonnées dans l'espace et le temps d'une façon extrêmement précise et sont sous le contrôle des gènes du développement (pour revue, voir Heasman, 2006).

Depuis plus d'un siècle, les amphibiens, et en particulier le Xénope, représentent un modèle de choix pour l'étude de ces activités cellulaires de par la facilité d'obtention d'embryons en très grand nombre et de par la rapidité de son développement.

Comme nous l'avons décrit dans la partie III des « Généralités », quelques travaux menés essentiellement chez la souris suggèrent une implication de la *O*-GlcNAc au cours du développement embryonnaire (cf paragraphe III.7)). Néanmoins, les rôles de cette PTM dans ce processus ne sont largement incompris. Au cours de ma dernière année de thèse, nous avons débuté l'étude de la *O*-GlcNAc de l'ovogenèse à l'embryogenèse précoce chez *Xenopus laevis*.

II. Introduction à l'embryogenèse chez *Xenopus laevis*.

Chez *Xenopus laevis*, comme chez tous les vertébrés, le développement embryonnaire se déroule en cinq étapes majeures : la fécondation, la segmentation, la gastrulation, la neurulation et l'organogenèse (**Figure 43**). Après la neurulation, le plan d'organisation primaire de l'embryon, commun à tous les Vertébrés, est réalisé. Il est caractérisé par la mise en place de trois axes (antéro-postérieur, dorso-ventral et médio-latéral) et de trois tissus embryonnaires (ectoderme, mésoderme et endoderme). Ce n'est qu'au cours de la phase d'organogenèse, par le jeu d'inductions, d'expression du génome zygotique et de différenciations que la différence phénotypique entre classes, ordres et espèces apparaît.

© 2009 Tous droits réservés.

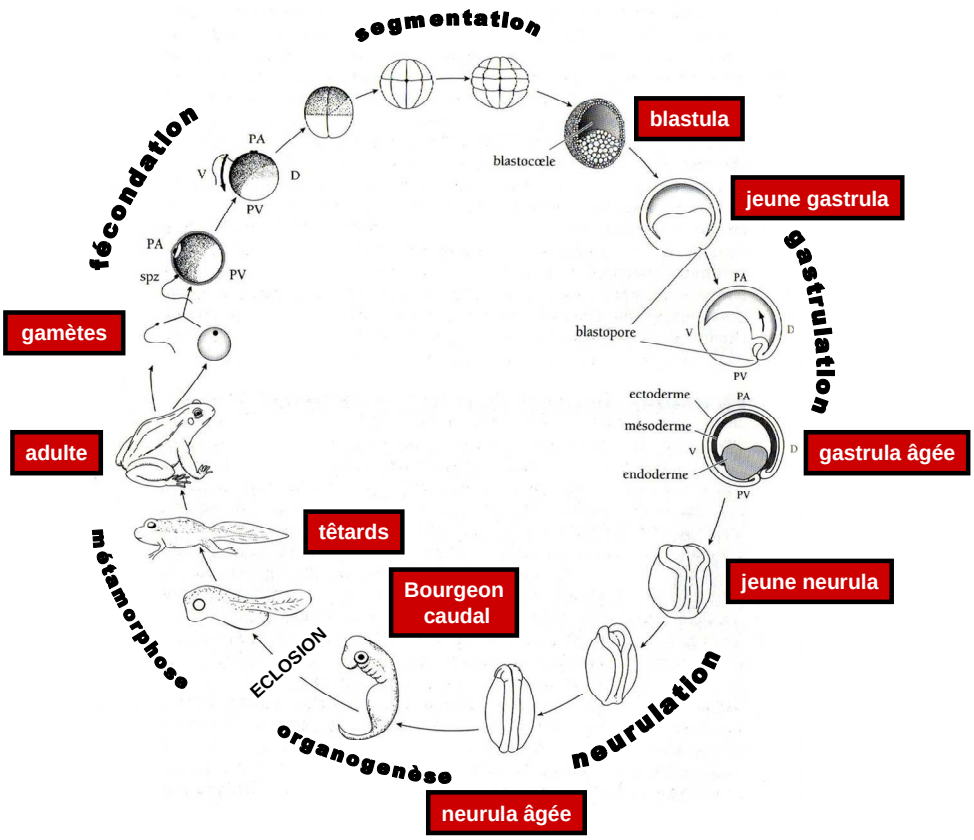


Figure 43 : représentation schématique du cycle de reproduction des amphibiens (d'après Darribère, 1997).
Le développement embryonnaire s'étend de la fécondation à l'organogenèse et permet de former un organisme multicellulaire organisé : le bourgeon caudal, à partir de la cellule-œuf. Après l'éclosion, commence le développement post-embryonnaire. La métamorphose des différents stades larvaires (ou têtards) permet d'obtenir l'amphibien adulte. PA, pôle animal ; PV, pôle végétatif ; V, ventral ; D, dorsal ; spz, spermatozoïde.

1) La fécondation.

La fécondation a lieu dans l'hémisphère animal de l'ovocyte mature et se caractérise tout d'abord par une fusion des membranes plasmiques du spermatozoïde et de l'ovocyte. Très rapidement après cette fusion, le potentiel de membrane de la cellule-œuf se modifie et représente une première barrière ionique à la polyspermie. La fécondation provoque également une libération massive de Ca^{2+}. Cette vague calcique, se propage rapidement à partir du point d'impact du spermatozoïde, et engendre l'exocytose des granules corticaux. Cette exocytose permet la formation de l'espace périvitellin, grâce auquel l'œuf s'oriente sous l'effet de la pesanteur en fonction du gradient vitellin, et de la membrane de fécondation, une barrière physique et définitive à la polyspermie. L'onde calcique joue également un rôle crucial dans l'activation de l'ovocyte. En effet, celle-ci conduit à l'activation de la CaMKII, nécessaire à la chute de l'activité CSF et donc à l'inactivation du MPF (pour revue, voir Sato *et al.*, 2006). Ainsi, la méiose peut s'achever et les deux pronucléi fusionnent.

© 2009 Tous droits réservés.

2) La segmentation.

La segmentation correspond à une phase de divisions cellulaire rapides qui fait passer l'œuf d'un état unicellulaire à un état pluricellulaire (environs 4000 cellules ou blastomères) hautement organisé : la blastula. Chez le Xénope, la segmentation est dite totale ou holoblastique car les divisions cellulaires affectent l'ensemble de la masse cytoplasmique ovocytaire de départ. Ces divisions se font selon des plans de clivage bien précis et sans augmentation de volume de l'embryon. En parallèle, une cavité se forme dans l'hémisphère animal : le blastocèle (**Figure 44**).

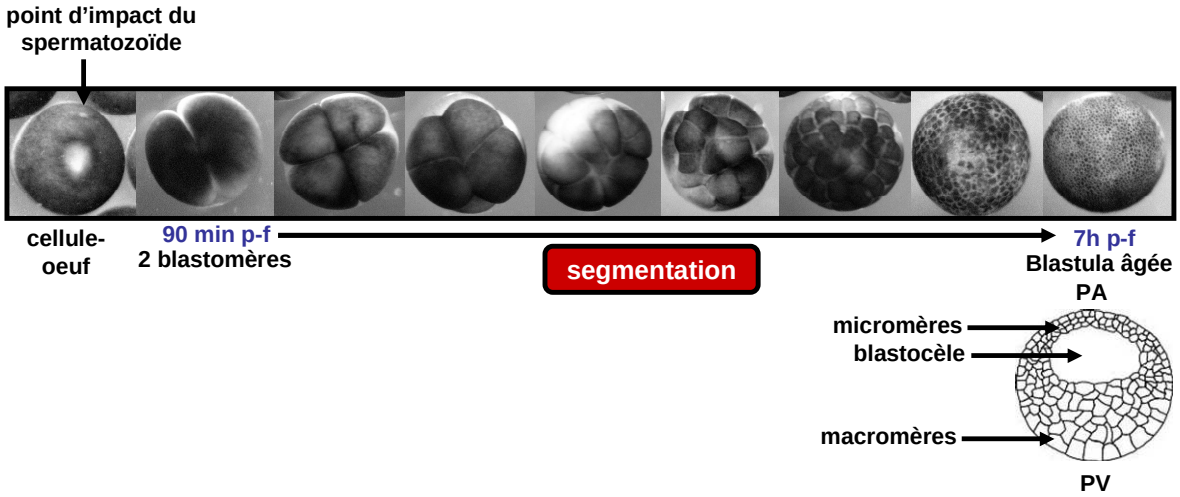


Figure 44 : la segmentation chez *Xenopus laevis.*
La segmentation se caractérise par une succession de divisions cellulaires aboutissant à la formation d'une blastula composée de plusieurs milliers de cellules de taille inégale (micromères et macromères) entourant la cavité du blastocèle. PA, pôle animal ; PV, pôle végétatif.

Le premier cycle de divisions cellulaires dure 90 minutes. Puis, se succède une série de divisions rapides (30 min) et synchrones caractérisées par l'absence de phase G1 et G2. Cette différence de durée entre le premier cycle et les suivants serait causée par une accumulation plus importante de cycline B lors de la première mitose (Chesnel *et al.*, 2005). Brutalement, au 12ème cycle de division, le rythme de division devient plus lent (50-100 min), du à une réapparition progressive des phases G1 et G2. A ce stade est également observé une désynchronisation des cellules : les blastomères végétatifs (ou macromères) caractérisés par leur grande taille se divisent plus lentement que les blastomères animaux (ou micromères) (pour revue, voir Masui et Wang, 1998). Cette transition abrupte est qualifiée de transition blastuléenne ou MBT (*« Mid Blastula Transition »*) et coïncide avec une période d'activation transcriptionnelle majeure des gènes zygotiques. L'augmentation progressive du temps de

© 2009 Tous droits réservés.

division cellulaire à partir de la MBT est due à la réapparition de la phosphorylation inhibitrice de la Tyr15 de cdc2. Cette rephosphorylation de la kinase est engendrée par l'activation, d'une part, de Chk1 qui dirige Cdc25A vers la dégradation (Shimuta *et al.*, 2002) et d'autre part, par une autophosphorylation activatrice de Wee1 (Murakami *et al.*, 2004) (**Figure 45**). A la fin de la segmentation, la prolifération cellulaire est fortement ralentie (4h/cycle) : cette décélération du cycle est nécessaire pour débuter la gastrulation.

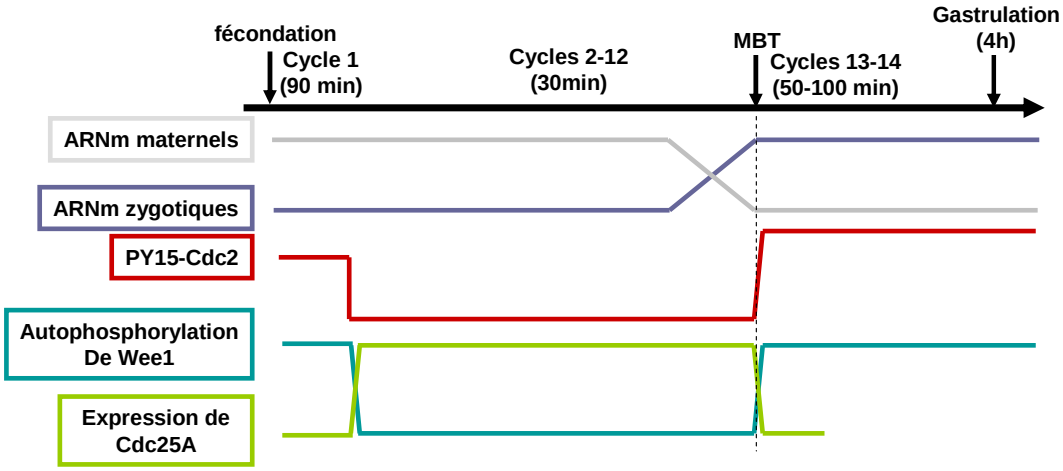


Figure 45 : variation de la durée du cycle cellulaire au cours de la segmentation chez *Xenopus laevis*.
La phosphorylation inhibitrice de Cdc2 sue la Tyr15 (PY15-Cdc2) est absente lors des cycles de divisions rapides (cycles 2-12). L'activation par autophosphorylation de Wee1 et la chute de l'expression de Cdc25A sont responsables de la réapparition de cette phosphorylation inhibitrice à partir de la transition blastuléenne (MBT). Dès lors, la durée du cycle s'allonge progressivement. La MBT se caractérise également par la mise en place de la transcription de gènes zygotiques au détriment de la traduction des ARNm maternels**.**

3) La gastrulation.

La gastrulation se caractérise par un ensemble de mouvements morphogénétiques aboutissant au positionnement des trois feuillets embryonnaires à l'origine de tous les tissus de l'adulte : l'ectoderme (à l'origine de la peau et du système nerveux), le mésoderme (fondateur des muscles, des os, du système circulatoire, des reins et des gonades) et l'endoderme (qui formera le tube digestif et ses annexes). Chez le Xénope quatre types principaux de mouvements cellulaires ont lieu lors de la gastrulation : l'épibolie, l'invagination, la convergence-extension et la migration (pour revue, voir Keller *et al.*, 2003) (**Figure 46**).

© 2009 Tous droits réservés.

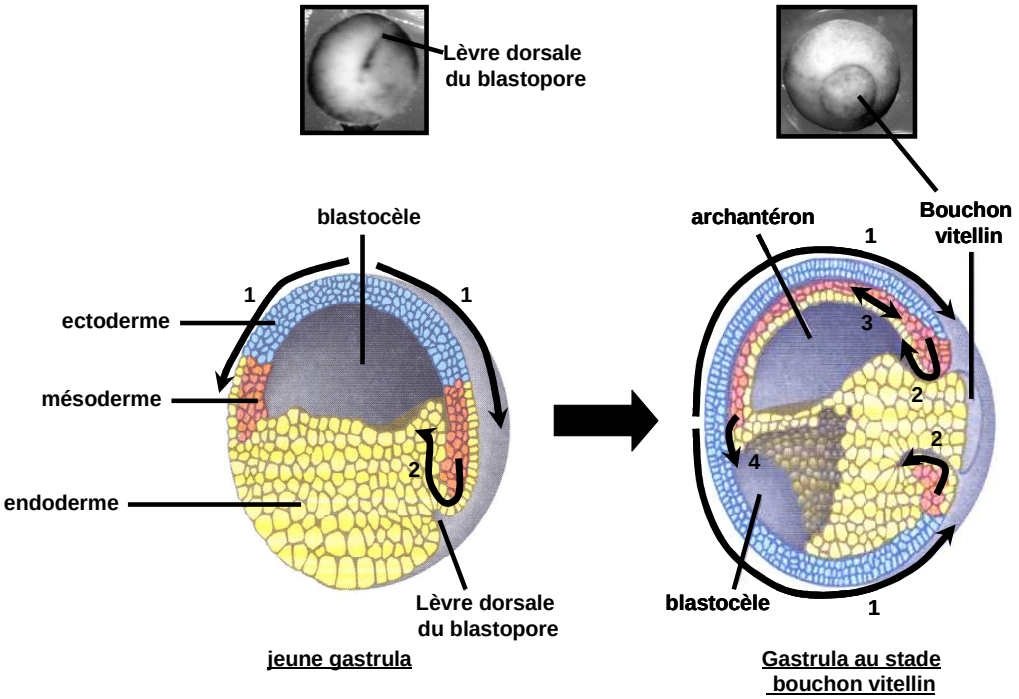


Figure 46 : la gastrulation chez *Xenopus laevis*.
Les mouvements d'épibolie **(1)** concernent les cellules fondatrices de l'ectoderme et se réalisent en surface de l'embryon. Ces cellules initialement situées au pôle animal de la blastula vont se diviser, s'aplatir et s'étendre pour recouvrir la totalité de la gastrula. Les cellules mésodermiques puis endodermiques vont pénétrer à l'intérieur de la gastrula. Cette invagination **(2)** débute dorsalement au niveau d'une région particulière, la lèvre dorsale du blastopore, et est liée à la formation de cellules spécialisées dites en bouteille dont la forme particulière est produite par la contraction du cytosquelette d'actine dans la région apicale et à l'élongation des microtubules dans la partie basale. L'invagination s'étend ensuite latéralement et ventralement au stade dit bouchon vitellin. Une fois invaginées, les cellules mésodermiques s'imbriquent les unes entres les autres par intercalation radiale (convergence,) ce qui permet la formation d'une assise cellulaire unique qui s'étend vers le pôle végétatif (extension) **(3)**. Ces cellules vont également migrer à l'intérieur du blastocèle **(3)**. Ces migrations cellulaires impliquent une reconnaissance entre la fibronectine de la matrice extracellulaire (produite par les micromères situés sur le toit du blastocèle) et des intégrines $\alpha 5\beta 1$ exprimées à la surface des cellules mésodermiques (Boucaut *et al.*, 1984 ; Davidson *et al.*, 2002). Au terme de la gastrulation, le blastocèle a pratiquement disparu laissant place à l'archantéron, l'intestin primitif.

4) La neurulation.

La gastrulation est suivie du processus de neurulation qui permet de former le tube neural dorsal. La région dorsale de l'ectoderme de la neurula âgée (ou neurectoderme) forme une plaque neurale délimitée par des épaississements latéraux appelés bourrelets neuraux. La plaque neurale épaissie se creuse ensuite en gouttière neurale, tandis que les bourrelets neuraux se soulèvent, se rapprochent et fusionnent, isolant ainsi un tube neural clos. Dans la partie antérieure de ce tube, apparaissent ensuite des renflements à l'origine des vésicules céphaliques. En arrière de ces vésicules, le tube neural présente une structure homogène et formera la moelle épinière (**Figure 47**).

© 2009 Tous droits réservés.

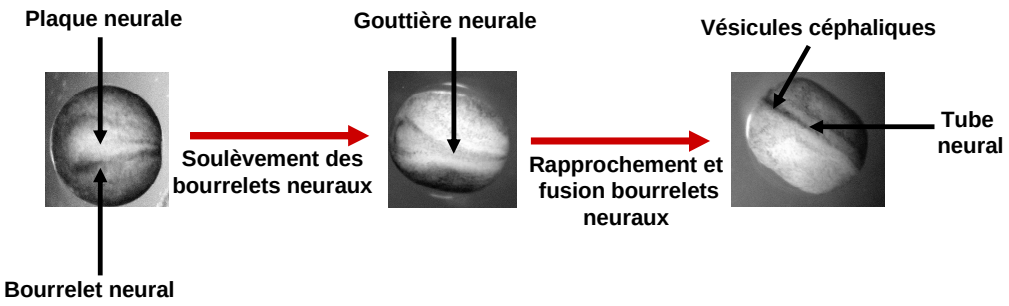


Figure 47 : la neurulation chez *Xenopus laevis*.
La différenciation du neurectoderme au cours de la neurulation permet la formation de vésicules céphaliques à l'origine du cerveau et du tube neural qui engendrera la moelle épinière.

5) L'organogenèse.

A partir du plan d'organisation primaire de l'embryon établi à la fin de la neurulation, les tissus et les organes prennent, au cours de la phase d'organogenèse, leur place définitive. Les différentes parties de l'embryon se différencient, intègrent et coordonnent leur fonctionnement pour réaliser un organisme autonome : le bourgeon caudal (**Figure 48**). De la fécondation à la formation de ce bourgeon caudal, il ne se sera écoulé que 24 heures.

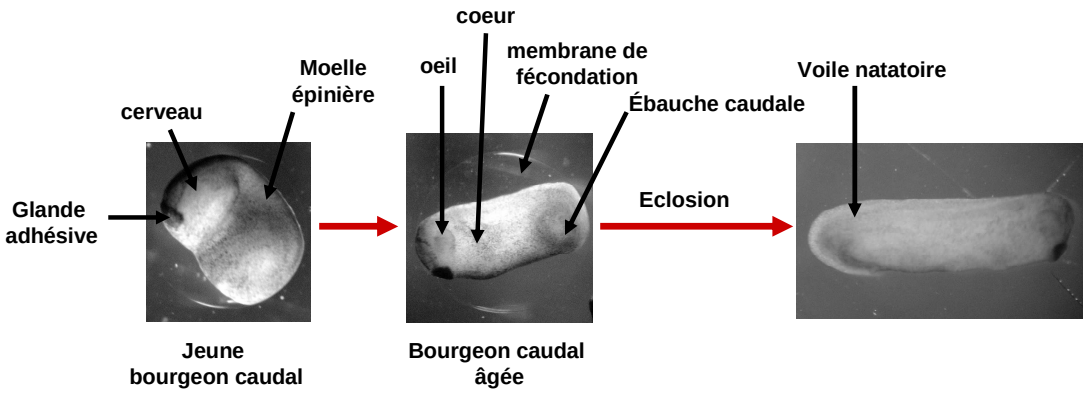


Figure 48 : le bourgeon caudal chez *Xenopus laevis*.
Le bourgeon caudal jeune (environ 24 heures) s'allonge et possède trois régions réparties antéropostérieurement: les régions céphalique, troncale et caudale. Sous l'épiderme, les ébauches d'organe font saillie, notamment les ébauches oculaire, branchiale, cardiaque et caudale. On distingue également la glande adhésive dans la région céphalique ventrale. Les emplacements du cerveau et de la moelle épinière sont également reconnaissables. Le bourgeon continue sa croissance. Au bout d'une trentaine d'heures, les premières contractions musculaires spontanées apparaissent. Au stade bourgeon caudal âgé (environ 40 heures), il est toujours entouré par ses enveloppes, gangue et membrane de fécondation. Après l'éclosion, le développement d'un voile natatoire permet à l''embryon de nager par saccades dans le milieu et se fixe momentanément par son organe adhésif sur le substrat environnant.

III. Résultats.

Pour aborder l'impact de la *O*-GlcNAc au cours de l'embryogenèse, nous nous sommes proposés d'étudier le dynamisme éventuel de cette modification au cours des différentes

© 2009 Tous droits réservés.

étapes de l'embryogenèse telles que nous venons de les décrire mais également lors de l'ovogenèse, processus que nous avons décrit dans la section « Généralités », partie II, paragraphe II. Ainsi, à chaque étape de l'ovogenèse et du développement précoce, nous avons analysé les variations : (1) des niveaux de *O*-GlcNAc, (2) de l'expression de l'OGT, (3) du stock d'UDP-GlcNAc.

Ces résultats ont fait l'objet de la publication suivante:

- **PUBLICATION 4 :**

  Dehennaut V, Lefebvre T, Leroy Y, Vilain JP, Michalski JC and Bodart JF. (2008) « Survey of O-GlcNAc level variations in Xenopus laevis from oogenesis to early development. » *Glycoconjugate J.* Epub ahead of print.

Dans cette étude, nous avons montré l'existence de fluctuations des niveaux de *O*-GlcNAc, d'OGT et d'UDP-GlcNAc au cours de l'ovogenèse et de l'embryogenèse chez le Xénope.

Plus particulièrement, alors que les niveaux de *O*-GlcNAc restent globalement élevés de l'ovogenèse jusqu'à l'éclosion de l'embryon, nous avons mis en évidence deux chutes abruptes et transitoires des niveaux de *O*-GlcNAc : la première au cours de l'ovogenèse, la seconde lors de la gastrulation.

En effet, dans les ovocytes de stade I jusqu'au stade V, les niveaux de *O*-GlcNAc sont élevés et constants alors que ce niveau chute brusquement dans l'ovocyte de stade VI immature. Par ailleurs, nous avons également montré que l'augmentation des niveaux de *O*-GlcNAc caractéristique de la reprise méiotique ovocytaire, se produit rapidement après la stimulation hormonale (40 minutes) sans augmentation de l'expression de l'OGT soulignant une régulation de l'activité de la transférase dès les évènements précoces de la reprise méiotique. A la transition ovocyte V-ovocyte VI, la diminution des niveaux de *O*-GlcNAc observée semble être corrélée à une diminution de l'expression de l'OGT plutôt qu'à une variation du « pool » d'UDP-GlcNAc.

Puisque l'augmentation des niveaux de *O*-GlcNAc est cruciale pour la reprise méiotique, nous avions émis l'hypothèse de l'existence d'une chute de cette glycosylation au cours de la sortie de phase M survenant lors de l'activation ovocytaire. Or, nous avons montré que les niveaux de *O*-GlcNAc restent élevés et constants au cours de ce processus. Ces

© 2009 Tous droits réservés.

niveaux restent également élevés au cours de la segmentation ce qui souligne encore l'importance de la *O*-GlcNAc au cours de la division cellulaire. Par contre, une diminution drastique des niveaux de *O*-GlcNAc, d'OGT et d'UDP-GlcNAc se produit lorsque les divisions cellulaires s'arrêtent pour laisser place aux mouvements morphogénétiques caractéristiques de la gastrulation. Le niveau de *O*-GlcNAc ne ré-augmente qu'à partir de la neurulation mais ceci se produit indépendamment de toute augmentation d'expression de l'OGT ou du « pool » d'UDP-GlcNAc.

© 2009 Tous droits réservés.

IV. Discussion et conclusion.

Nos travaux montrent que la dynamique de la *O*-GlcNAc varie de manière complexe au cours des différentes étapes du développement précoce incluant les divisions cellulaires de la segmentation où les niveaux de *O*-GlcNAc sont élevés, les mouvements morphogénétiques caractéristiques de la gastrulation qui s'accompagnent d'une chute de cette glycosylation qui ré-augmente lors de la différenciation du système nerveux de l'embryon. Ces résultats renforcent le rôle de régulateur du cycle cellulaire joué par la *O*-GlcNAc mais aussi suggèrent une participation de cette glycosylation dans la migration et la différenciation cellulaire. Dans ce sens, la *O*-GlcNAcylation de l'actine et de la tubuline que nous avons mis en évidence (Dehennaut *et al.*, Mol. Cell. Proteomics, 2008), pourrait jouer un rôle important dans la réorganisation du cytosquelette nécessaire à la formation des cellules en bouteille de la région blastoporale au cours de l'invagination du mésoderme. Une analyse fine de la localisation de la *O*-GlcNAc, de l'OGT mais aussi de la *O*-GlcNAcase par des techniques d'immunohistochimie permettrait de tester l'hypothèse d'une diminution de la *O*-GlcNAc dans ces cellules en bouteilles et/ou dans les cellules mésodermiques qui migrent vers la région blastoporale. Des stratégies basées sur la culture d'explants issus de la lèvre dorsale du blastopore permettraient de tester les effets de modulations des niveaux de *O*-GlcNAc sur la migration des cellules de la lèvre dorsale du blastopore. Nous testerons l'hypothèse selon laquelle des variations de *O*-GlcNAc peuvent interférer dans l'adhérence des cellules mésodermiques avec les composants de la matrice extracellulaire.

Par ailleurs, il est intéressant de noter que la chute de glycosylation et surtout d'UDP-GlcNAc observée à la gastrulation renforce notre hypothèse d'une régulation de la glycolyse (qui redémarre à ce moment) par la *O*-GlcNAc (**Figure 40**). En effet, l'orientation du glucose vers la glycolyse plutôt que vers la voie HBP lors de la gastrulation permettrait de produire une quantité suffisante d'ATP nécessaire aux mouvements cellulaires et plus particulièrement à la synthèse des microfilaments et au déplacement des moteurs protéiques. Ainsi, la chute d'UDP-GlcNAc favoriserait la déglycosylation et l'activation subséquente des enzymes glycolytiques et donc la synthèse d'ATP par un système auto-entretenu (**Figure 49**).

© 2009 Tous droits réservés.

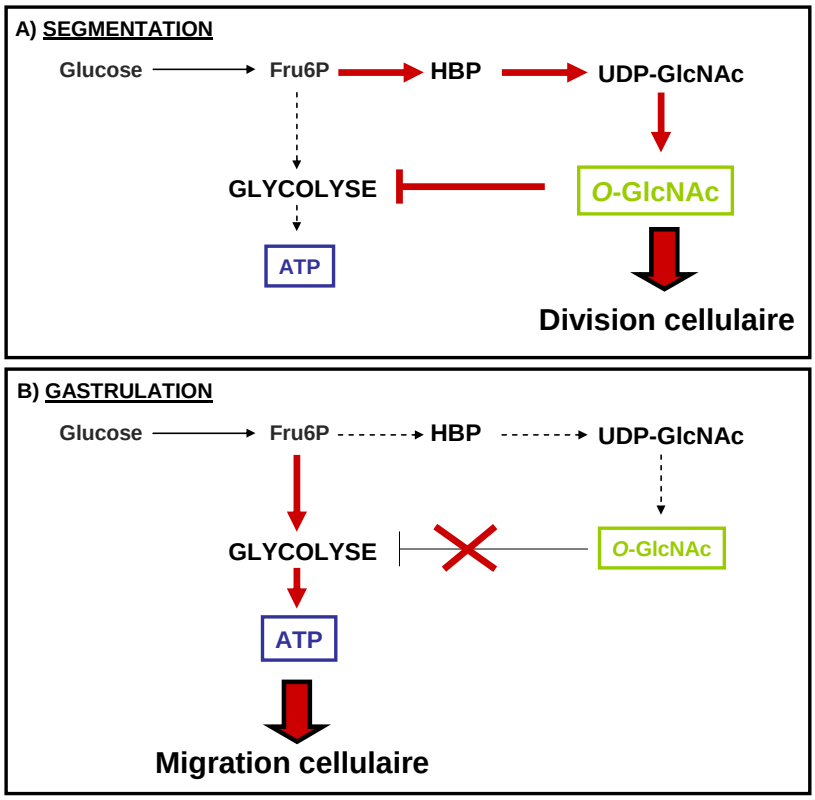


Figure 49 : régulation de la destinée du glucose par un « switch » glycolyse/HBP : division ou migration cellulaire ?
A) Pendant la segmentation, le glucose serait préférentiellement dirigé vers la voie HBP, permettant une synthèse accrue d'UDP-GlcNAc et une augmentation des niveaux de *O*-GlcNAc nécessaire à l'inhibition des enzymes de la glycolyse et à la division cellulaire.
B) A la gastrulation, une diminution des niveaux de *O*-GlcNAc permettrait entre-autres de lever l'inhibition des enzymes de la glycolyse, dirigeant ainsi le glucose dans cette voie qui fournira la quantité d'ATP nécessaire à la migration cellulaire.

Il semble désormais important d'explorer le rôle de la *O*-GlcNAc au cours des mitoses embryonnaires et de comprendre la signification biologique de la chute de *O*-GlcNAc observée à la gastrulation. Pour cela, une démarche similaire à celle observée pour l'étude de la *O*-GlcNAc au cours de la reprise méiotique peut être envisagée. La modulation des niveaux de *O*-GlcNAc dès la fécondation ou en fin de segmentation, par l'utilisation des outils présentés en figure 38, nous permettrait de comprendre l'impact de la glycosylation respectivement dans la division et la migration cellulaire. Notamment, l'inhibition de l'OGT dès la fécondation prévient-elle la segmentation ? La surexpression de l'OGT ou l'inhibition de la *O*-GlcNAcase (c'est à dire la prévention de la chute de *O*-GlcNAc) empêche t-elle la gastrulation, accélère t-elle les divisions cellulaires ? De même, cette prévention prolonge t-elle le nombre de divisions cellulaires dans la blastula ?

Nous envisageons également d'identifier les protéines dont le niveau de *O*-GlcNAc varie au cours des différentes étapes du développement par la méthodologie illustrée en figure

© 2009 Tous droits réservés.

40. Retrouvera t-on les enzymes de la glycolyse ou encore les intégrines connues pour moduler les interactions cellulaires ?

Enfin, comme nous l'avons décrit dans la section « Généralités », le cerveau est particulièrement enrichi en protéines *O*-GlcNAcylées et des dérégulations des mécanismes de *O*-GlcNAcylation contriburaient à l'étiologie de certains troubles neurodégénératifs (Cf « Généralités », partie III, paragraphe IV., 2)). Il serait donc intéressant de déterminer le patron d'expression tissulaire de la *O*-GlcNAc, de l'OGT et de la *O*-GlcNAcase au cours de la neurulation.

© 2009 Tous droits réservés.

PUBLICATION 4

© 2009 Tous droits réservés.

http://doc.univ-lille1.fr

Thèse de Vanessa Dehennaut, Lille 1, 2008

Glycoconj J
DOI 10.1007/s10719-008-9166-0

Survey of *O*-GlcNAc level variations in *Xenopus laevis* from oogenesis to early development

Vanessa Dehennaut · Tony Lefebvre · Yves Leroy · Jean-Pierre Vilain · Jean-Claude Michalski · Jean-François Bodart

Received: 10 April 2008 / Revised: 13 June 2008 / Accepted: 20 June 2008
© Springer Science + Business Media, LLC 2008

Abstract Little is known about the impact of *O*-linked-*N*-acetylglucosaminylation (*O*-GlcNAc) in gametes production and developmental processes. Here we investigated changes in *O*-GlcNAc, UDP-GlcNAc and *O*-GlcNAc transferase (OGT) levels in *Xenopus laevis* from oogenesis to embryo hatching. We showed that in comparison to stage VI, stages I–V oocytes expressed higher levels of *O*-GlcNAc correlating changes in OGT expression, but not in UDP-GlcNAc pools. Upon progesterone stimulation, an *O*-GlcNAc level burst occurred during meiotic resumption long before MPF and Mos-Erk2 pathways activations. Finally, we observed high levels of *O*-GlcNAc, UDP-GlcNAc and OGT during segmentation that decreased concomitantly at the onset of gastrulation. Nevertheless, no correlation between the glycosylation, the nucleotide-sugar and the glycosyltransferase was observed after neurulation. Our results show that *O*-GlcNAc is regulated throughout oogenesis and development within a complex pattern and suggest that dysfunctions in the dynamics of this glycosylation could lead to developmental abnormalities.

V. Dehennaut · T. Lefebvre (✉) · Y. Leroy · J.-C. Michalski
UMR-CNRS 8576,
Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle,
IFR 147, USTL,
59655 Villeneuve d'Ascq, France
e-mail: tony.lefebvre@univ-lille1.fr

V. Dehennaut · J.-P. Vilain · J.-F. Bodart
Laboratoire de Régulation des Signaux de Division,
EA4020, IFR 147, USTL,
59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

J.-F. Bodart
Institut de Recherches Interdisciplinaires CNRS-USR 3078,
groupe des nanosystèmes biologiques, USTL,
59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France

Keywords *O*-GlcNAc · OGT · *Xenopus laevis* · Oogenesis · Meiosis · Embryogenesis

Introduction

Cell division, differentiation and migration occurring from oogenesis to early development are intricate processes that are spatially and temporally finely controlled. These processes are orchestrated by many signals brought by post-translational modifications (PTM). Among these PTM, *O*-linked *N*-acetylglucosaminylation (*O*-GlcNAc) has been shown to be crucial in many aspects of the cellular life. Owing to the plethora of the *O*-GlcNAc-modified proteins, deciphering the role of this glycosylation in cell physiology remains a challenge.

O-GlcNAc is a dynamic PTM that can sometimes counteract phosphorylation on a same or on a neighbouring amino-acid. The reversibility of *O*-GlcNAc is managed only, by a pair of enzymes that are highly conserved from *Caenorhabditis elegans* to human. The *O*-GlcNAc transferase (OGT) modifies the target polypeptide chain by adding the *N*-acetylglucosamine group from UDP-GlcNAc [1, 2], while a *N*-acetylglucosaminidase, named *O*-GlcNAcase [3], removes the *O*-GlcNAc moiety. The sugar-nucleotide UDP-GlcNAc is generated through the hexosamine biosynthetic pathway (HBP), whose flux directly depends upon the availability of extracellular glucose. Numerous families of proteins are affected by *O*-GlcNAc, including transcription factors, chaperones, metabolic enzymes, kinases, phosphatases and architectural proteins. Accumulating literature led to consider this PTM as a modulator of a wide variety of cell signalling cascades [4]. Recently, it has been shown that the cellular *O*-GlcNAc content was dynamically modified during the mammalian and the

© 2009 Tous droits réservés.
http://doc.univ-lille1.fr

amphibian cell cycle [5, 6]. In these studies, the authors showed that OGT overexpression lead to multi-nucleation and cytokinesis defect [5] and that OGT activity is requested for G2-M transition in *Xenopus* oocytes [6]. From these different studies, the idea that *O*-GlcNAc could play a pivotal role in the control of cell division has emerged.

Beyond the description of the *O*-GlcNAc functionality during cell division, only a few observations have been so far gathered on the role of *O*-GlcNAc during oogenesis and development. The only data describing *O*-GlcNAc levels during the oogenesis process were obtained by Slawson *et al.* [7]. Stages-I and II oocytes were reported to express more *O*-GlcNAc than stages-III to VI and the decrease in *O*-GlcNAc modification was correlated with an increase in *O*-GlcNAcase activity. Strikingly, only a few studies dealing with *O*-GlcNAc and development have been reported. Knockouts of OGT have been successfully performed in *C. elegans* [8] and in mouse [9, 10]. Knockouts of murine OGT are lethal for embryos and stem cells [10] and preliminary studies on OGT conditional knockouts have induced an early death at day 4 or 5 post-implantation [9]. *C. elegans* ogt-1 and oga-1 knockouts, respectively for OGT and *O*-GlcNAcase, have offered advantageous opportunities to analyse the effects of *O*-GlcNAc content modifications in the insulin-like signalling cascade. Unfortunately, these models did not provide yet clues for a role of these enzymes during early embryogenesis [8, 11], since no differences in the nuclear accumulation of five embryonic temporally and spatially regulated transcription factors (HLH-1, HLH-2, ELT-2, SKN-1 and LIN-26) were observed between wild type, ogt-1 and oga-1 knockouts [8, 11]. On the contrary, it has been reported that the transcriptional variants of OGT found in zebrafish embryos varied at the onset of morphogenetic movements [12], supporting the idea that OGT is regulated during embryogenesis and that it is involved in developmental processes.

Due to their large size, their year-around availability and their ease of manipulation, embryos of *Xenopus* species have become a popular model for studying developmental biology in the last half-century [13]. In anticipation for fertilization, oocytes achieve two distinct biological processes termed oogenesis [14] and oocyte maturation, respectively [15]. During oogenesis and oocytes growth, nutrients and stock maternal mRNAs accumulate according to specific patterns. At the end of oogenesis, fully grown oocytes, or immature oocytes, are arrested in prophase of first meiotic division. Upon hormonal stimulation, oocytes resume meiosis: germinal vesicles break down (GVBD), chromosomes condense and a meiotic spindle is formed, which will enable gametes to proceed for genetic material segregation. Nevertheless, at the end of maturation oocytes are blocked in metaphase of second meiotic division in anticipation for fertilization. This maturation process is dynamically controlled by the M-Phase promoting factor (MPF, Cdk1-Cyclin B) and by the Mos-Erk2 pathways. Fertilization of *Xenopus* eggs initiates a series of rapid and synchronous cell divisions that, within 6 to 7 h, produce a 'sphere', which is called blastula, of approximately 4,000 cells with an internal cavity or blastocoel. Then, morphogenetic movements referred as gastrulation organize the future adult body plan. Thereafter, neurulation begins, which leads to the differentiation and regional organization of the nervous system of the embryo. Numerous studies have precisely described the synchronous cleavages of blastomeres prior to midblastula transition (MBT) [16], and the spatiotemporal patterns of cell division during gastrulation and neurulation [17].

Though OGT has been cloned in *Xenopus* species [*Xenopus* (*Silurana*) *tropicalis*] [18], the patterns of *O*-GlcNAc, OGT and UDP-GlcNAc have not been yet deciphered in amphibians during early embryogenesis. The aim of the present work is to provide a platform to study the *O*-GlcNAc levels in oogenesis, maturation and in the developmental processes like early cell cycles or morphogenetic movements.

Material and methods

Handling of oocytes

Adults *Xenopus* females were purchased from the University of Rennes I (France). After anesthetizing *Xenopus* females by immersion in 1 g l^{-1} MS222 solution (tricaine methane sulfonate; Sandoz), ovarian lobes were surgically removed and placed in ND96 medium (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 5 mM HEPES/NaOH, pH 7.5). Stages I to VI oocytes were spotted and taken according to their size and pigmentation [19]. Oocytes were isolated and follicle cells were partially removed by 1 mg ml^{-1} collagenase A (Roche Applied Science) treatment for 30 min followed by a manual microdissection. Oocytes were stored at 14°C in ND96 medium until experiments.

Germinal vesicle breakdown (GVBD) kinetics experiments

Meiotic resumption was induced by incubating stage VI oocytes in ND96 medium containing 10 μM of progesterone (Sigma-Aldrich). All experiments were performed at 19°C. GVBD, which reflects oocyte entry into the maturation process was scored by the appearance of a white spot at the animal pole of the oocyte. For each time point, batches of ten oocytes were taken respecting the white spots ratio and stored at −20°C until biochemical analyses.

© 2009 Tous droits réservés.
http://doc.univ-lille1.fr

Thèse de Vanessa Dehennaut, Lille 1, 2008

Oocyte activation kinetics experiments

Stage VI oocytes were incubated overnight in ND96 medium containing 10 μM of progesterone. The next day, metaphase II-arrested oocytes were transferred into ND96 medium containing 1 μM calcium ionophore (A23187, Sigma-Aldrich). For each time point, batches of 5 activated-oocytes were taken according to morphological criteria (*i.e.*, pigment contraction at the animal pole of the oocyte) and stored at −20°C until biochemical analyses.

In vitro fertilization (IVF)

To obtain eggs, females were primed with 500 U of human chorionic gonadotropin (hCG, Sigma-Aldrich). The male was euthanized, testis were dissected and kept in 0.1X MBS (Modified Barth's Saline, 88 mM NaCl, 1 mM KCl, 1 mM $MgSO_4$, 2.5 mM $NaHCO_3$, 10 mM $CaCl_2$, 5 mM HEPES/NaOH, pH 7.8) medium at 4°C until use. For fertilization, eggs were harvested by squeezing the abdomen of the female, directly transferred into a Petri dish and a fragment of testis was gently "paint" over the surface of the eggs. Ten minutes after fertilization, dishes were flood with 0.1X MBS. Then fertilized eggs were dejellied in 2% (*w*/*v*) cysteine (Sigma-Aldrich) adjusted to pH 8.0 with NaOH, rinsed three times with 1X MBS and replace in 0.1X MBS. Development of embryos was allowed at 23°C. Batches of five embryos were taken at different times of development according to the normal table of *Xenopus laevis* (Daudin) [20] and kept at −20°C for biochemical analyses.

SDS-PAGE and Western blotting

Proteins (the equivalent of one oocyte or one embryo was loaded per lane) were run on a 17.5% modified SDS-PAGE—this kind of gel allows a better discrimination between protein isoforms of phosphorylation-and electro-blotted onto nitrocellulose sheet [21]. Blots were saturated in 5% (*w*/*v*) non-fatty milk in TBS (Tris-buffered saline)-Tween [15 mM Tris/HCl, 140 mM NaCl, 0.05% (*v*/*v*) Tween] for 45 min. Primary antibodies were incubated overnight at 4°C. Mouse monoclonal anti-*O*-GlcNAc (RL-2; Affinity Bioreagents), rabbit polyclonal anti-OGT (DM-17; Sigma-Aldrich), mouse monoclonal anti-Erk2 (D-2; Santa Cruz Biotechnologies), rabbit polyclonal anti-β-catenin (H-102; Santa Cruz Biotechnologies) and rabbit polyclonal anti-Cyclin B2 (generously provided by Dr. John Gannon from the ICRF, South Mimms, UK) antibodies were used at a dilution of 1:1,000. Rabbit polyclonal anti-actin (I-19; Santa Cruz Biotechnologies) antibodies were used at a dilution of 1:10,000. Then nitrocellulose membranes were washed three times for 10 min each in TBS-Tween and incubated with either an anti-mouse horseradish peroxidase-labeled secondary antibody or an anti-rabbit horseradish peroxidase-labeled secondary antibody (GE healthcare) at a dilution of 1:10,000. Finally, three washes of 10 min each were performed with TBS-Tween and the detection was carried out with enhanced chemiluminescence (GE Healthcare).

UDP-GlcNAc pools measurement by HPAEC (high performance anion exchange chromatography)

Oocytes or embryos were lysed in 1 ml of hypotonic buffer (10 mM Tris/HCl, 10 mM NaCl, 15 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM $MgCl_2$ and proteases inhibitors, pH 7.2). Fifty microlitres of 1 M HCl were then added to the lysate and the mixture was passed through a 1.5 ml Dowex 50WX2-400 column. The column was washed with 7.5 ml of bi-permuted water (18 MΩ water). The unbound fraction and washes were collected on ice and adjusted to pH 8.0 with 500 μl of Tris/HCl 1 M. Of the diluted fraction, 500 μl was injected using a ProPAC-PA1 column (4×250 mm) on a Dionex (Jouy en Josas, France) HPLC system. The elution was achieved as following: Tris/HCl 20 mM, pH 9.2 (solution A) for 1 min; elution gradient for 29 min with 85% of A and 15% NaCl at 2 M (solution B); plateau of 5 min in the same conditions; 10 min elution gradient until 100% of B was reached; plateau at 100% of B for 5 min. The column was then re-equilibrated in 100% of A. The flow rate was 0.8 ml min^{-1}. Detection was performed using a UV–visible spectrophotometric detector (SPD-6AV, Shimadzu, Champs sur Marne, France) at a wavelength of 256 nm.

Densitometric analyses

Variations of *O*-GlcNAc contents and OGT expression were performed by densitometric analyses of Western Blots using the GeneTools software (File version: 3.07.03; Syngene).

Results

O-GlcNAc, OGT and UDP-GlcNAc contents vary during oogenesis

Stages I-VI oocytes were isolated according to criteria of size and pigmentation (Fig. 1A). After extraction, proteins were resolved by SDS-PAGE and analyzed according to their *O*-GlcNAc content, OGT and β-catenin expression and equal loading of the gel was ascertained by an anti-actin staining (Fig. 1B, representative of four independent experiments). The data of four experiments were summarized in Fig. 1C for the changes in *O*-GlcNAc level and in Fig. 1D for the OGT expression. We observed a high

© 2009 Tous droits réservés.
http://doc.univ-lille1.fr

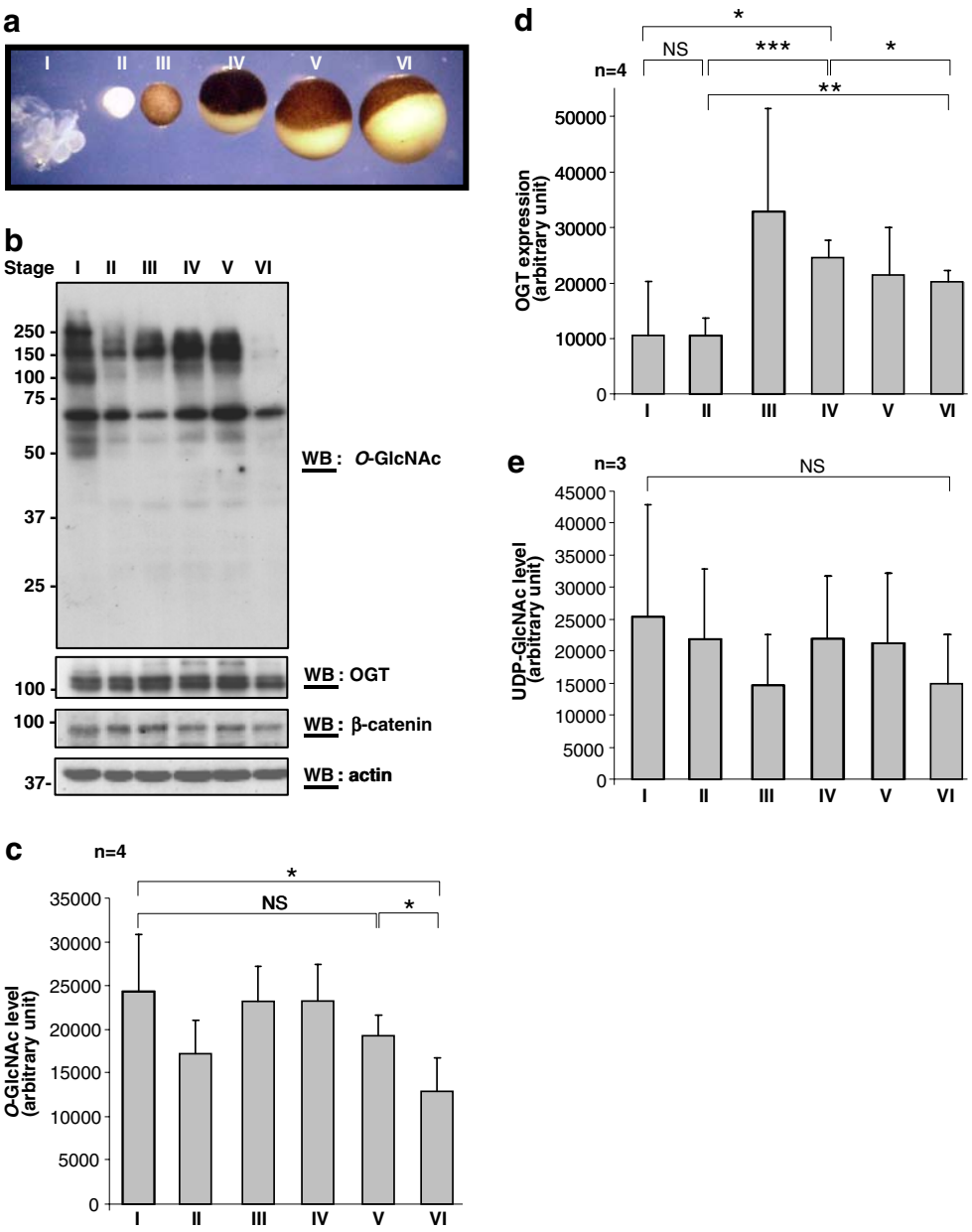


Fig. 1 *O*-GlcNAc content decreases during oogenesis. **A** Pictures showing the time course of oogenesis. Stages I to VI oocytes were taken according to criteria of size and pigmentation [19]. **B**—Oocytes were homogenized in lysis buffer and analysed according to their *O*-GlcNAc, OGT, β-catenin and actin contents by Western blot. Protein mass markers are indicated at the *left* (kDa). *WB* Western blot. **C** Histogram showing the *O*-GlcNAc level obtained by densitometric analyses of Western blots. Results correspond to the mean value± SD of four independent experiments (**P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001, respectively, *NS* not significative). **D** Histogram showing the OGT expression obtained by densitometric analyses of Western blots. Results correspond to the mean value± SD of four independent experiments (**P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001 respectively, *NS* not significative). **E** UDP-GlcNAc pools of the different stages of oocytes were assessed by HPAEC. Results correspond to the mean value±SD of three independent experiments (**P*< 0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001 respectively, *NS* not significative)

and a rather constant *O*-GlcNAc level from stage I to stage V oocytes that was followed by a slight decrease of the glycosylation status at stage VI (Fig. 1B and C). The latter decrease was partially correlated to the slight decrease in OGT expression shown for stage VI oocyte when compared to stages I–IV oocytes (Fig. 1B and D). Note that the OGT expression increase observed between the oocytes of stage II and the oocytes of stage III could not be considered as significant due to the high variability found for the stage III OGT amount from one experiment to another. No change in the β-catenin content was observed. For each stage, the UDP-GlcNAc pool was assayed using high performance anion exchange chromatography (Fig. 1E) as previously described [6]. No significant changes in the UDP-GlcNAc pools were observed between the different stages.

Progesterone-induced meiotic resumption is accompanied by a fast increase in O-GlcNAc content long before the mos-erk2 and the MPF pathways activation

Previously, we reported that *Xenopus* oocyte meiotic resumption was accompanied with a burst in the *O*-GlcNAc content [22], and that OGT inhibition [6] or recombinant OGT microinjection [23] altered the GVBD progression, underlying the crucial role of *O*-GlcNAc in meiotic resumption. To determine the timely occurrence of *O*-

© 2009 Tous droits réservés.
http://doc.univ-lille1.fr

Thèse de Vanessa Dehennaut, Lille 1, 2008

GlcNAc increase during meiosis progression, fully-grown stage VI oocytes (Fig. 2A, left picture) were stimulated with progesterone. Every 2 h post-progesterone addition, oocytes were scored for white spot formation, attesting GVBD (Fig. 2A, right picture). GVBD percentages were calculated and reported in a histogram (Fig. 2B). For each time point, batches of ten oocytes were collected respecting the white spot ratio. The oocytes were lysed and analyzed by Western blot according to their *O*-GlcNAc content and their OGT expression (Fig. 2C, two top panels). Activations of the Mos-Erk2 and MPF pathways were examined using an anti-Erk2 antibody and an anti-Cyclin B2 antibody, respectively (Fig. 2C, two middle panels). The discrimination between the active form and the non active form of these two proteins is based on the doublet pattern of both proteins: the non-phosphorylated lower migrating one is the inactive form, whereas the upper band is the active phosphorylated form. The accumulation of β-catenin and the expression of actin were also examined (Fig. 2C, two bottom panels). The anti-*O*-GlcNAc staining showed a burst of the *O*-GlcNAc level 2 h after the meiotic resumption stimulation: at this time, none of the oocytes exhibited morphological (Fig. 2B) or biochemical (Fig. 2C) typical changes characteristic of GVBD. In this set of experiments, the first white spots appeared only 6 h after progesterone incubation but Erk2 and Cyclin B2 can be detected in their activated form only 8 h after progesterone treatment. This *O*-GlcNAc rise does not seem to be correlated with an increase in OGT expression since we did not observe any changes in OGT level during the time course of the GVBD kinetic. In contrast, β-catenin started to accumulate 6 h post-progesterone treatment and reach a maximal expression near 10 h after hormonal stimulation.

Since the *O*-GlcNAc level increased long before the activation of the Mos-Erk2 and the MPF pathways, we hypothesized that its up-regulation coincides with the early events of meiotic resumption. The two first hours following hormonal stimulation by progesterone, batches of oocytes were taken every 10 min and analyzed as described above (Fig. 2D). Western blots presented in Fig. 2D are representative of four independent experiments. The averages and the standard deviations of the different values obtained for these four independent experiments were calculated and represented in two histograms: Fig. 2E for *O*-GlcNAc changes and Fig. 2F for OGT expression. We observed a statistically significant increase in *O*-GlcNAc content 40 min after progesterone stimulation (Fig. 2D and E). *O*-GlcNAc increased progressively until 80 min and then remained at a constant level. Even if there is no significant difference in OGT expression when we compared time 0 to time 120 min (Fig. 2D and F), slight variations can be detected during this time laps, which are concomitant with the *O*-GlcNAc profile: OGT expression increased between 0 and 90 min and slightly decreased thereafter. These results underline a potential role for *O*-GlcNAc glycosylation in the initiation of the meiotic resumption.

O-GlcNAc level is kept high and constant during oocyte activation

At the end of the maturation process, eggs are arrested at the metaphase of the second meiotic division in anticipation for fertilization. The interaction between the sperm and the egg membrane provokes a rise in the intracellular calcium, which is responsible of egg activation [24]. The calcium wave releases the egg from metaphase II arrest and is characterized by both inactivation of the MPF and the Mos-Erk2 pathways mainly due to Cyclin and Mos proteolysis by the ubiquitin–proteasome pathway [25, 26]. Ca^{2+}-increasing agents mimic the fertilization calcium wave, thereby activating eggs metabolism and ending meiosis. To investigate the *O*-GlcNAc dynamics upon egg activation, metaphase II-arrested oocyte were stimulated with the calcium ionophore A23187. Eggs exhibiting typical morphological sign of activation (pigments contraction at eggs apex; Fig. 3A, right), were taken every 5 min and analyzed according to their *O*-GlcNAc content, OGT expression, β-catenin accumulation as described above (Fig. 3B). Activation process triggering was ensured by checking the Erk2 and the Cyclin B2 status. We observed a degradation of Cyclin B2 15 min post calcium ionophore stimulation followed by a newly synthesis of the protein 30 min after metaphase II released (Fig. 3B, see the arrow heads on the anti-Cyclin B2 staining) and an inactivation of Erk2 30 min post-release. These results are consistent with previous reports [27]. Except slight variations for some *O*-GlcNAc proteins, both *O*-GlcNAc level and OGT expression remained high and constant during the time course of the experiment as well as β-catenin stability. Thus, calcium induced-egg activation is not accompanied with any significant changes in *O*-GlcNAc level or OGT expression.

O-GlcNAc dynamics during early embryogenesis

Next we studied *O*-GlcNAc level changes accompanying *Xenopus* early embryogenesis. After fertilization, embryos were taken off at different stages of the embryogenesis process from the cortical rotation until hatching according to the Normal Table of Daudin (Fig. 4A) [20]. More precisely, the glycosylation levels were examined during early cleavages (Fig. 4A, stages 1–6), late segmentation (Fig. 4A, stages 7–9), gastrulation (Fig. 4A, stages 10–11.5), neurulation (Fig. 4A, stages 12.5–21) and beginning of the organogenesis before (Fig. 4A, stages 22–25) and after the hatching of the embryo (Fig. 4A, stages 25–28).

© 2009 Tous droits réservés.
http://doc.univ-lille1.fr

After lysis of the embryos, proteins were resolved on SDS-PAGE and analyzed according to their *O*-GlcNAc content, OGT expression and β-catenin accumulation (Fig. 4B). β-catenin was used here as a marker for embryogenesis progression. Indeed, as it has been intensively described [28], accumulation of β-catenin was observed along with blastomere cleavages during segmentation process (Fig. 4B, stages 1–9). From gastrulation to hatching, embryos exhibited high amounts of the protein. An accumulation of its fragments of proteolysis were revealed on Western blot as lower migrating bands. The results presented in Fig. 4B are representative of five independent experiments. These different experiments were summarized in Fig. 4C for changes in the *O*-GlcNAc level and in Fig. 4D for the OGT expression. We have also determined the UDP-GlcNAc levels for three independent experiments as described in Fig. 1 (Fig. 4E). From the histograms and Western blots analyses, one can observe that the *O*-GlcNAc level was very high during the early cleavages and the segmentation of the embryos (Fig. 4B and C, stages 1–9). This *O*-GlcNAc rate is correlated with an increasing expression of OGT between stage 1 and 9 (Fig. 4B and D), but also with a slight increasing amount of UDP-GlcNAc (Fig. 4E). At the onset of gastrulation, *O*-GlcNAc, OGT and UDP-GlcNAc significantly dropped. Thereafter, *O*-GlcNAc content continued to diminish until the mid-neurula (Fig. 4C, compare stage 11.5–12 with 15–17), but no correlation was found with the OGT expression (Fig. 4D) and the UDP-GlcNAc level (Fig. 4E), this latter UDP-GlcNAc level staying relatively low until stage 28. Finally, *O*-GlcNAc level only re-increased at the late neurula and remained high even after the hatching of the embryo.

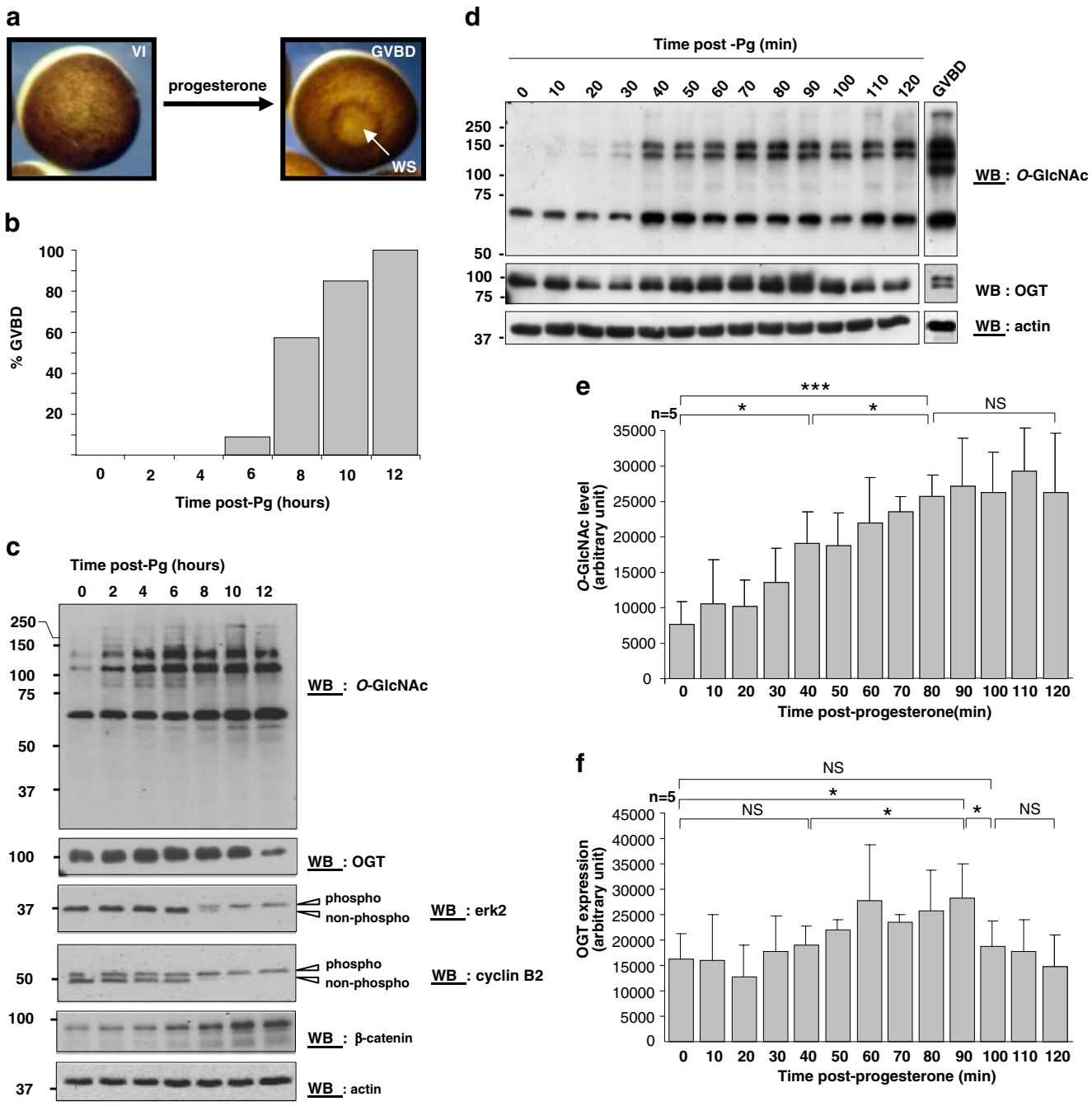
Fig. 2 Progesterone-induced meiotic resumption is accompanied by a fast increase in *O*-GlcNAc content. **A** The *left picture* represents a fully grown stage VI oocyte, namely immature oocyte. Upon progesterone stimulation, immature oocyte resumes meiosis. This phenomenon is first characterized by the germinal vesicle breakdown (*GVBD*), which leads to the appearance of a white spot at the animal pole of the oocyte indicated by WS (*right picture*). **B** Meiotic resumption was induced by progesterone treatment. Every 2 h post-progesterone stimulation, oocytes were observed and white spots corresponding to GVBD oocytes were counted. The histogram shows the percentage of GVBD during the time course of oocyte maturation of one representative experiment. Oocytes were picked up respecting the white spots ratio for further biochemical analyses. **C** For each time point, oocytes were homogenized in lysis buffer and analysed according to their *O*-GlcNAc, OGT, β-catenin and actin contents by Western blot. Activation of the Mos-Erk2 and MPF pathways were also assessed using respectively an anti-Erk2 and an anti-Cyclin B2 antibody. Arrows heads at the right of the figure indicate the phosphorylated (*phospho*) and the non-phosphorylated (*non-phospho*) forms of CyclinB2 and Erk2. Protein mass markers are indicated at the *left* (kDa).*WB* Western blot, *Pg* progesterone. Results are representative of four independent experiments. **D** Stage VI oocytes were stimulated with progesterone and picked up every 10 min until 2 h. During this laps time, no morphological sign of GVBD were observed. A batch of ten GVBD oocytes was also taken 12 h post-progesterone treatment and served as a maturation positive control (*right of the figure*). **O**ocytes were analysed according to their *O*-GlcNAc, OGT and actin contents by Western blots. Protein mass markers are indicated at the *left* (kDa).*WB* Western blot, *Pg* progesterone. **E** Histogram showing the *O*-GlcNAc level obtained by densitometric analyses of Western blots. Results correspond to the mean value±SD of five independent experiments (*$P<0.05$, **$P<0.01$, ***$P<0.001$ respectively, *NS* not significative). **F** Histogram showing the OGT expression obtained by densitometric analyses of Western blots. Results correspond to the mean value±SD of five independent experiments (*$P<0.05$, **$P<0.01$, ***$P<0.001$ respectively, *NS* not significative)

Discussion

External development in amphibians and fishes offers the unique opportunity to directly monitor morphological and biochemical events occurring during embryogenesis, related to proliferation, differentiation and migration. In this study we took advantage of the African clawed frog *Xenopus laevis* model to assess the levels of *O*-GlcNAc, UDP-GlcNAc and OGT expression from oogenesis to early embryogenesis.

Among the plethora of PTM regulating signaling pathways, addition and removal of *O*-GlcNAc on target proteins have emerged as a key regulation feature of nuclear and cytoplasmic proteins fates. The functions of *O*-GlcNAc have been partially explored during gametogenesis in the sole model of amphibian [6, 7, 22, 29], but strikingly, this model has not been extensively exploited. Yet a few years ago, the works of Fang and Miller [29] have stressed the potential role of *O*-GlcNAc in the cell cycle progression. These authors have capped *O*-GlcNAc moieties by micro-injecting galactosyltransferase into the cytoplasm of *Xenopus* oocytes, blocking both *O*-GlcNAc removal and *O*-GlcNAc-mediated lectin-like interactions. This approach led to the observation that *O*-GlcNAc removal blockade was toxic for cell cycle progression, especially at the G2/M phase transition; in return it has limited effect in immature oocytes. These results strengthened the importance of *O*-GlcNAcase in the removal of *O*-GlcNAc residues that are necessary for the progression of the cell cycle. Unfortunately, at this moment no antibody raised against the *Xenopus O*-GlcNAcase is available limiting the study of the hydrolase. On the same model, Slawson *et al.* [7] described higher levels of *O*-GlcNAc in stages I–II oocytes in comparison to the stages III–IV, that they correlated to an increase of the *O*-GlcNAcase activity. While for some experiments the anti-*O*-GlcNAc profiles we have obtained were close to the profile reported by these authors, we failed to detect any statistically significant changes between oocytes from stages I to V. Nevertheless, we observed a

© 2009 Tous droits réservés.
http://doc.univ-lille1.fr



drop in the *O*-GlcNAc level in stage VI compared to stage V. This drop was neither related to a decrease in OGT expression nor in the UDP-GlcNAc levels since both did not exhibit major changes between stages V and VI. This *O*-GlcNAc decrease might be rather related to an increase in the *O*-GlcNAcase activity, as previously proposed [7]. Once oogenesis is achieved, stage VI oocytes resume maturation process upon hormonal stimulation by progesterone. In this context, we previously reported that oocyte GVBD or M-phase entry was accompanied by an increase in *O*-GlcNAc level and that OGT inhibitors prevented meiosis progression. In contrast, inhibiting the HBP rate-limiting enzyme glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase (GFAT) with azaserine or DON, failed to interfere with the GVBD kinetics [6]. The ineffectiveness of these two inhibitors was explained by the assay of the UDP-GlcNAc pools of immature and matured oocytes that revealed that the nucleotide-sugar concentration was unchanged during the meiotic resumption. Thus, oocytes run on a preexisting UDP-GlcNAc pool during GVBD. Since

© 2009 Tous droits réservés.

http://doc.univ-lille1.fr

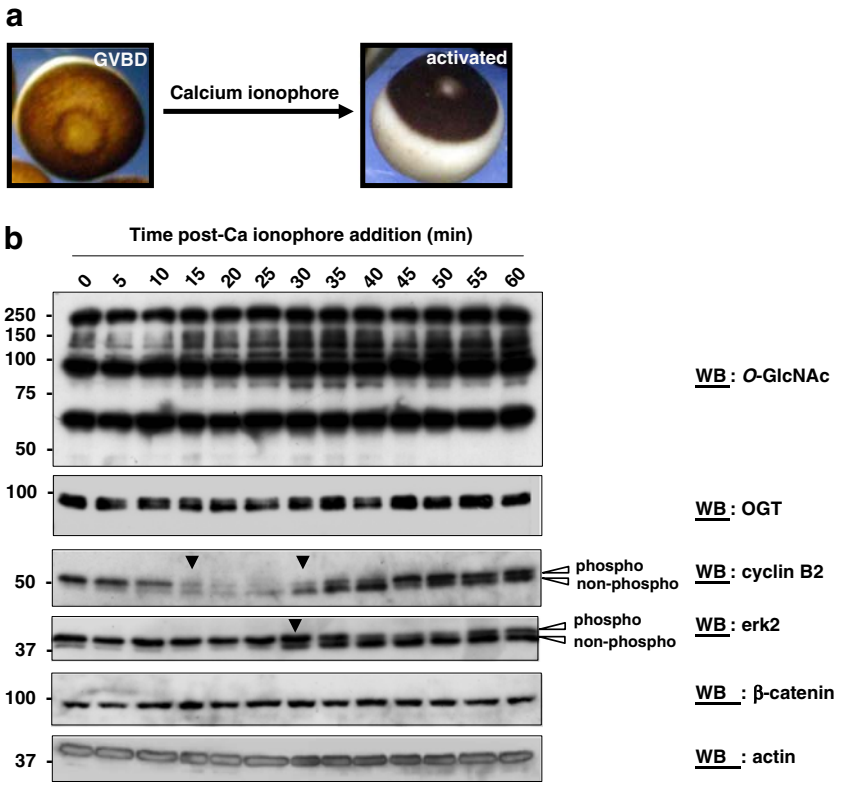
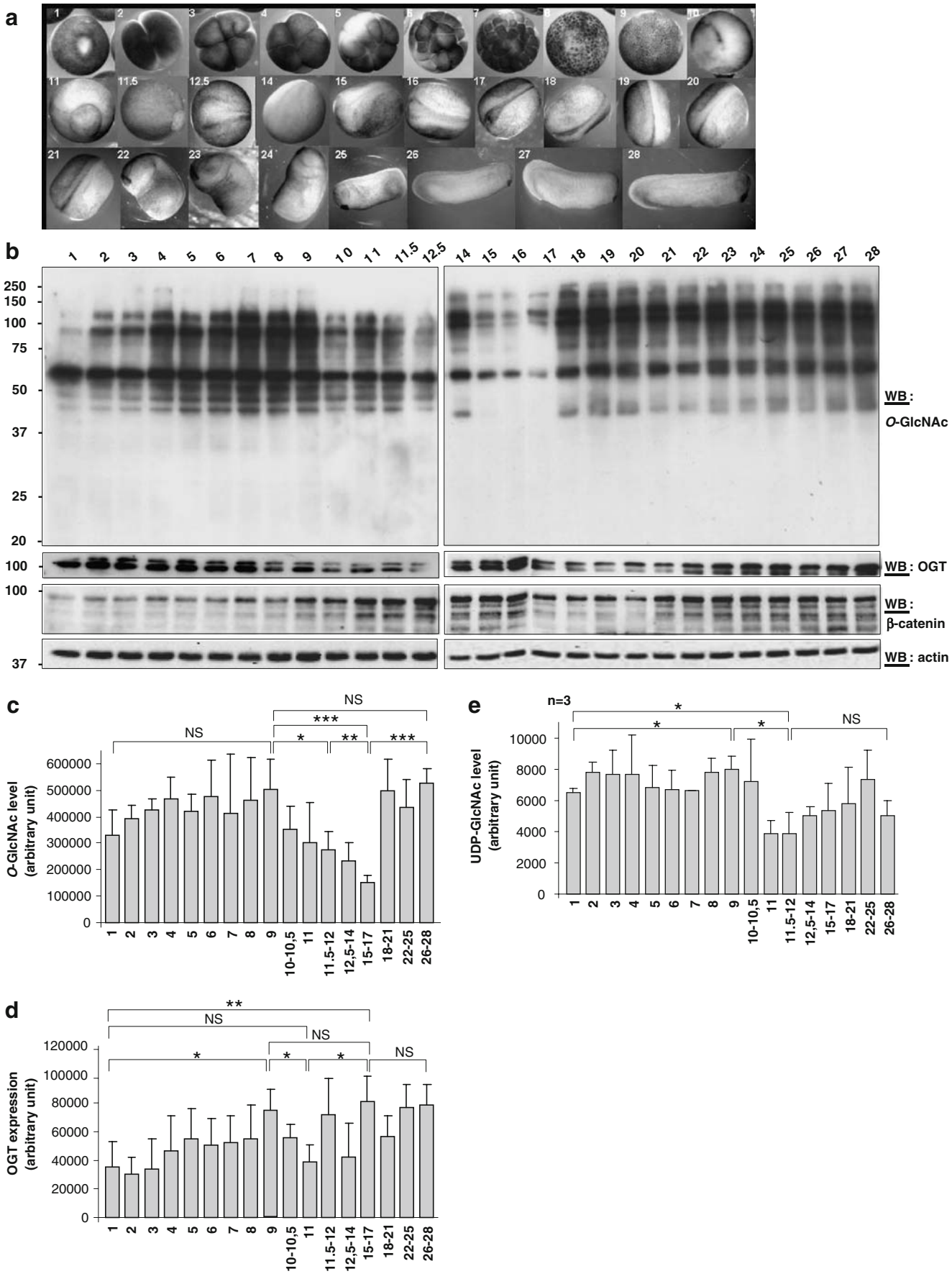


Fig. 3 The *O*-GlcNAc level stays high and constant during oocyte activation. Metaphase II-arrested oocyte activation was stimulated by the calcium ionophore addition. Oocytes which presented morphological sign of activation were taken every 5 min after stimulation until 60 min for biochemical analyses. **A** Pictures showing a metaphase II-arrested oocyte (*left picture*) *versus* an activated one (*right picture*) with typical contracted pigments at the animal pole of the oocyte. **B** For each time point, oocytes were homogenized in lysis buffer and analysed according to their *O*-GlcNAc, OGT, β-catenin and actin contents by Western blots. The level of activity of the Mos-Erk2 and MPF pathways were also assessed using an anti-Erk2 and an anti-cyclin B2 antibody, respectively. *White arrowheads* at the *right* of the figure indicate the phosphorylated (*phospho*) and non-phosphorylated (*non-phospho*) forms of CyclinB2 and Erk2. The *black arrowheads* point out the time of inactivation and the re-synthesis of Cyclin B2 and the inactivation of Erk2. Protein mass markers are indicated at the *left* (kDa). *WB* Western blot

meiotic progression does not depend upon UDP-GlcNAc changes, we further looked at OGT expression during GVBD time course experiments. We observed that the burst in the *O*-GlcNAc level preceded by several hours the activation of both the MPF and the Mos-Erk2 pathways and that this *O*-GlcNAc increase did not correlate with changes in OGT expression. Then, we attempted to determine the precise dynamics of the *O*-GlcNAc variation at the early steps of meiotic resumption. A significant change in *O*-GlcNAc content was observed about 40 to 50 min following progesterone addition, whereas a transient and slight peak of OGT expression was observed. One can hypothesize that this *O*-GlcNAc increase could be linked to the early events of meiotic resumption, one of them being a reduction in cAMP leading to PKA inactivation [30]. PKA has been shown to inhibit GFAT by modifying the Ser205 [31]. Such PKA inhibition could be one way to increase the *O*-GlcNAc levels in oocyte. But as previously discussed, we have demonstrated that the inhibition of

Fig. 4 *O*-GlcNAc level fluctuates all along early embryogenesis. **A** ▶ Pictures representing the different developmental stages according to the Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin) that were analysed in this study. **B** For each developmental stage showed above, embryos were homogenized in lysis buffer and analysed according to their *O*-GlcNAc, OGT, β-catenin and actin contents by Western blots. Results are representative of five independent experiments. **C** Histogram showing the *O*-GlcNAc level obtained by densitometric analyses of Western blots. Results correspond to the mean value±SD of three to five independent experiments (*$P<0.05$, **$P<0.01$, ***$P<0.001$, respectively, *NS* not significative). **D** Histogram showing the OGT expression obtained by densitometric analyses of Western blots. Results correspond to the mean value±SD of three to five independent experiments (*$P<0.05$, **$P<0.01$, ***$P<0.001$, respectively, *NS*, not significative). **E**—UDP-GlcNAc pools of the different stages of oocytes were assessed by HPAEC. Results correspond to the mean value±SD of three independent experiments (*$P<0.05$, **$P<0.01$, ***$P<0.001$, respectively, *NS* not significative)

© 2009 Tous droits réservés.
http://doc.univ-lille1.fr



© 2009 Tous droits réservés.

GFAT was inefficient in our attempts to block the meiotic resumption [6]. Another event occurring within the first hours following hormonal stimulation is the activation of the poly-adenylation machinery, which permits the translation of key-proteins like Mos and Cyclin B [32, 33]. Even if only a few papers described the implication of *O*-GlcNAc in the translational processes, the hypothesis that *O*-GlcNAc would control both the poly-adenylation and/or the translation machinery should not be not discarded [34].

From fertilization to early organogenesis, three successive phases may be discriminate correlatively to *O*-GlcNAc, UDP-GlcNAc levels and OGT expression: (1) from fertilization to the onset of gastrulation, (2) from gastrulation to the beginning of closure of the neural tube (stage 15–17) and finally (3) from stage 17 up to stage 28. β-catenin, which is essential for the dorsal determination of *Xenopus* embryos [28, 35], was used in our set of experiments as a marker for embryogenesis progression. β-catenin does not accumulate in immature oocytes while being phosphorylated by GSK-3β and then degraded; its accumulation appeared to be dependent upon *O*-GlcNAc [22]. Because both GSK-3β and β-catenin are substrates for OGT [22, 36], a role for OGT in the accumulation of the dorsal determinant of the embryo is hypothesised. Here we observed that UDP-GlcNAc and *O*-GlcNAc levels remained high during segmentation, which is consistent with an active role for *O*-GlcNAc in proliferation and cell cycle regulation mechanisms [4–6, 23]. Interestingly, we observed a decrease of *O*-GlcNAc content and a decrease in OGT expression at the onset of gastrulation, a step at which cytoskeletal arrangements driven by rapid cell divisions are not compatible with those needed for morphogenesis [37]. If inhibitory phosphorylation of MPF is considered as a key regulation to postpone mitosis to favor gastrulation, down-regulation of *O*-GlcNAc levels might also emerge as a key event for morphogenetic movements at gastrulation. Concomitantly to *O*-GlcNAc level and OGT expression decreases, we observed a drop in the UDP-GlcNAc pool. This drop might be due to the beginning of glycolysis, starting at the onset of gastrulation [38, 39]. Indeed, once entered into the cell, glucose is immediately phosphorylated into glucose-6-phosphate that in turn is isomerized into fructose-6-phosphate. This latter could then either enter the glycolysis to produce ATP or could be directed through the HBP for forming UDP-GlcNAc. The ATP production is crucial for cell migration, which requests cell shape rearrangements: the drop in *O*-GlcNAc level observed at the onset of gastrulation could be then driven by the need of glucose to produce energy. A role for *O*-GlcNAc variation in development has been also suspected in the zebrafish [12], in which six variants for zOGT (var1-6) were found and shown to be regulated at the mRNA level during embryogenesis: var1 and 2 mRNAs disappeared at the shield stage, whereas var3 and 4 mRNA were reported to increase at this stage, where the morphogenetic movements of epiboly begins. mRNAs levels of var5 and 6 remained quite constant throughout the embryogenesis. Unfortunately, no *O*-GlcNAc activity measurements have been performed in this model that would have given an insight in the role of this shift of zOGT expression at the onset of gastrulation. While mechanisms underlying the morphogenetic movements may differ from zebrafish to amphibian, both models suggest a role for *O*-GlcNAc regulating enzymes at the onset of gastrulation.

Finally, an increase in *O*-GlcNAc was observed at the beginning of the neural tube closure (stage 17), correlated with an increase in UDP-GlcNAc, while no significant changes in OGT expression were found from stage 17 to 28. Further works are requested to determine the localization of OGT, as well as *O*-GlcNAcase, since *O*-GlcNAc levels, OGT and *O*-GlcNAcase expressions may exhibit organ-specific patterns. Special attention may be focused on neural tissues, since *O*-GlcNAc is highly expressed in such tissues and that perturbations in this glycosylation have been linked to neurodegenerative disorders [40].

This study provides a platform to decipher the functions of *O*-GlcNAc in the developmental processes and suggest unsuspected and specific functions for *O*-GlcNAc regulating proteins during embryonic events like cell migration occurring especially during gastrulation or cell differentiation associated with organogenesis.

Acknowledgements This work was granted by the "Centre National de la Recherche Scientifique", the "Association pour la Recherche contre le Cancer" and the "Université des Sciences et Technologie de Lille I". We thank Arlette Lescuyer-Rousseau for technical assistance. VD is a recipient of a fellowship from the "Ministère de la Recherche et de l'Enseignement".

References

1. Roos, M.D., Hanover, J.A.: Structure of *O*-linked GlcNAc transferase: mediator of glycan-dependent signaling. Biochem. Biophys. Res. Commun. **271**, 275–280 (2000). doi:10.1006/bbrc.2000.2600
2. Iyer, S.P., Hart, G.W.: Dynamic nuclear and cytoplasmic glycosylation: enzymes of *O*-GlcNAc cycling. Biochemistry. **42**, 2493–2499 (2003). doi:10.1021/bi020685a
3. Lehman, D.M., Fu, D.J., Freeman, A.B., Hunt, K.J., Leach, R.J., Johnson-Pais, T., *et al.*: A single nucleotide polymorphism in MGEA5 encoding *O*-GlcNAc-selective *N*-acetyl-beta-D glucosaminidase is associated with type 2 diabetes in Mexican Americans. Diabetes. **54**, 1214–1221 (2005). doi:10.2337/diabetes.54.4.1214
4. Zachara, N.E., Hart, G.W.: Cell signaling, the essential role of *O*-GlcNAc!. Biochim. Biophys. Acta. **1761**, 599–617 (2006)
5. Slawson, C., Zachara, N.E., Vosseller, K., Cheung, W.D., Lane, M. D., Hart, G.W.: Perturbations in *O*-linked beta-*N*-acetylglucosamine protein modification cause severe defects in mitotic progression and cytokinesis. J. Biol. Chem. **280**, 32944–32956 (2005). doi:10.1074/jbc.M503396200
6. Dehennaut, V., Lefebvre, T., Sellier, C., Leroy, Y., Gross, B., Walker, S., *et al.*: *O*-linked *N*-acetylglucosaminyltransferase inhibition pre-

© 2009 Tous droits réservés.
http://doc.univ-lille1.fr

Thèse de Vanessa Dehennaut, Lille 1, 2008

vents G2/M transition in *Xenopus laevis* oocytes. J. Biol. Chem. **282**, 12527–12536 (2007). doi:10.1074/jbc.M700444200
7. Slawson, C., Shafii, S., Amburgey, J., Potter, R.: Characterization of the *O*-GlcNAc protein modification in *Xenopus laevis* oocyte during oogenesis and progesterone-stimulated maturation. Biochim. Biophys. Acta **1573**, 121–129 (2002)
8. Hanover, J.A., Forsythe, M.E., Hennessey, P.T., Brodigan, T.M., Love, D.C., Ashwell, G., *et al*.: *Caenorhabditis elegans* model of insulin resistance: altered macronutrient storage and dauer formation in an OGT-1 knockout. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **102**, 11266–11271 (2005). doi:10.1073/pnas.0408771102
9. O'Donnell, N., Zachara, N.E., Hart, G.W., Marth, J.D.: Ogt-dependent X-chromosome-linked protein glycosylation is a requisite modification in somatic cell function and embryo viability. Mol. Cell. Biol. **24**, 1680–1690 (2004). doi:10.1128/MCB.24.4.1680-1690.2004
10. Shafi, R., Iyer, S.P., Ellies, L.G., O'Donnell, N., Marek, K.W., Chui, D., *et al*.: The *O*-GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **97**, 5735–5739 (2000). doi:10.1073/pnas.100471497
11. Forsythe, M.E., Love, D.C., Lazarus, B.D., Kim, E.J., Prinz, W. A., Ashwell, G.: *Caenorhabditis elegans* ortholog of a diabetes susceptibility locus: oga-1 (O-GlcNAcase) knockout impacts *O*-GlcNAc cycling, metabolism, and dauer. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **103**, 11952–11957 (2006). doi:10.1073/pnas.0601931103
12. Sohn, K.C., Do, S.I.: Transcriptional regulation and *O*-GlcNAcylation activity of zebrafish OGT during embryogenesis. Biochem. Biophys. Res. Commun. **337**, 256–263 (2005). doi:10.1016/j.bbrc.2005.09.049
13. Gurdon, J.B., Hopwood, N.: The introduction of *Xenopus laevis* into developmental biology: of empire, pregnancy testing and ribosomal genes. Int. J. Dev. Biol. **44**, 43–50 (2000)
14. Matova, N., Cooley, L.: Comparative aspects of animal oogenesis. Dev. Biol. **231**, 291–320 (2001). doi:10.1006/dbio.2000.0120
15. Jessus, C., Ozon, R.: How does Xenopus oocyte acquire its competence to undergo meiotic maturation? Biol. Cell. **96**, 187–192 (2004). doi:10.1016/j.biolcel.2003.12.007
16. Masui, Y., Wang, P.: Cell cycle transition in early embryonic development of *Xenopus laevis*. Biol. Cell **90**, 537–548 (1998). doi:10.1016/S0248-4900(99)80011-2
17. Saka, Y., Smith, J.C.: Spatial and temporal patterns of cell division during early *Xenopus* embryogenesis. Dev. Biol. **229**, 307–318 (2001). doi:10.1006/dbio.2000.0101
18. Klein, S.L., Strausberg, R.L., Wagner, L., Pontius, J., Clifton, S. W., Richardson, P.: Genetic and genomic tools for *Xenopus* research: the NIH *Xenopus* initiative. Dev. Dyn. **225**, 384–391 (2002). doi:10.1002/dvdy.10174
19. Dumont, J.N.: Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. J. Morphol. **136**, 153–179 (1972). doi:10.1002/jmor.1051360203
20. Nieuwkoop, P.D. and Faber, J. (Eds): Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Punlishing, New York (1994).
21. Bodart, J.F., Baert, F.Y., Sellier, C., Duesbery, N.S., Flament, S., Vilain, J.P.: Differential roles of p39Mos-Xp42Mpk1 cascade proteins on Raf1 phosphorylation and spindle morphogenesis in Xenopus oocytes. Dev. Biol. **283**, 373–383 (2005). doi:10.1016/j.ydbio.2005.04.031
22. Lefebvre, T., Baert, F., Bodart, J.F., Flament, S., Michalski, J.C., Vilain, J.P.: Modulation of *O*-GlcNAc glycosylation during Xenopus oocyte maturation. J. Cell. Biochem. **93**, 999–1010 (2004). doi:10.1002/jcb.20242
23. Dehennaut, V., Hanoulle, X., Bodart, J.F., Vilain, J.P., Michalski, J.C., Landrieu, I.: Microinjection of recombinant *O*-GlcNAc transferase potentiates Xenopus oocytes M-phase entry. Biochem. Biophys. Res. Commun. **369**, 539–546 (2008). doi:10.1016/j.bbrc.2008.02.063
24. Sato, K., Fukami, Y., Stith, B.J.: Signal transduction pathways leading to Ca^{2+} release in a vertebrate model system: lessons from Xenopus eggs. Semin. Cell Dev. Biol. **17**, 285–292 (2006). doi:10.1016/j.semcdb.2006.02.008
25. Glotzer, M., Murray, A.W., Kirschner, M.W.: Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. Nature. **349**, 132–138 (1991). doi:10.1038/349132a0
26. Nishizawa, M., Furuno, N., Okazaki, K., Tanaka, H., Ogawa, Y., Sagata, N.: Degradation of Mos by the N-terminal proline (Pro2)-dependent ubiquitin pathway on fertilization of Xenopus eggs: possible significance of natural selection for Pro2 in Mos. EMBO J. **12**, 4021–4027 (1993)
27. Bodart, J.F., Bechard, D., Bertout, M., Gannon, J., Rousseau, A., Vilain, J.P.: Activation of Xenopus eggs by the kinase inhibitor 6-DMAP suggests a differential regulation of cyclin B and p39(mos) proteolysis. Exp. Cell Res. **253**, 413–421 (1999). doi:10.1006/excr.1999.4662
28. Miller, J.R., Moon, R.T.: Signal transduction through beta-catenin and specification of cell fate during embryogenesis. Genes Dev. **10**, 2527–2539 (1996). doi:10.1101/gad.10.20.2527
29. Fang, B., Miller, M.W.: Use of galactosyltransferase to assess the biological function of *O*-linked *N*-acetyl-*d*-glucosamine: a potential role for *O*-GlcNAc during cell division. Exp. Cell Res. **263**, 243–253 (2001). doi:10.1006/excr.2000.5110
30. Wang, J., Liu, X.J.: Progesterone inhibits protein kinase A (PKA) in Xenopus oocytes: demonstration of endogenous PKA activities using an expressed substrate. J. Cell Sci. **117**, 5107–5116 (2004). doi:10.1242/jcs.01383
31. Chang, Q., Su, K., Baker, J.R., Yang, X., Paterson, A.J., Kudlow, J.E.: Phosphorylation of human glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase by cAMP-dependent protein kinase at serine 205 blocks the enzyme activity. J. Biol. Chem. **275**, 21981–21987 (2000). doi:10.1074/jbc.M001049200
32. Sheets, M.D., Wu, M., Wickens, M.: Polyadenylation of c-mos mRNA as a control point in Xenopus meiotic maturation. Nature **374**, 511–516 (1995). doi:10.1038/374511a0
33. Radford, H.E., Meijer, H.A., de Moor, C.H.: Translational control by cytoplasmic polyadenylation in Xenopus oocytes. Biochim. Biophys. Acta **1779**, 217–229 (2008)
34. Datta, B., Ray, M.K., Chakrabarti, D., Wylie, D.E., Gupta, N.K.: Glycosylation of eukaryotic peptide chain initiation factor 2 (eIF-2)-associated 67-kDa polypeptide (p67) and its possible role in the inhibition of the eIF-2 kinase-catalyzed phosphorylation of the eIF-2 alpha subunit. J. Biol. Chem. **264**, 20620–20624 (1989)
35. Heasman, J., Crawford, A., Goldstone, K., Garner-Hamrick, P., Gumbiner, B., McCrea, P., *et al*.: Overexpression of cadherins and underexpression of beta-catenin inhibit dorsal mesoderm induction in early Xenopus embryos. Cell **79**, 791–803 (1994). doi:10.1016/0092-8674(94)90069-8
36. Lubas, W.A., Hanover, J.A.: Functional expression of *O*-linked GlcNAc transferase. Domain structure and substrate specificity. J. Biol. Chem. **275**, 10983–10988 (2000). doi:10.1074/jbc.275.15.10983
37. Duncan, T., Su, T.T.: Embryogenesis: coordinating cell division with gastrulation. Curr. Biol. **14**, R305–R307 (2004). doi:10.1016/j.cub.2004.03.050
38. Dworkin, M.B., Dworkin-Rastl, E.: Metabolic regulation during early frog development: glycogenic flux in Xenopus oocytes, eggs, and embryos. Dev. Biol. **132**, 512–523 (1989). doi:10.1016/0012-1606(89)90246-7
39. Dworkin, M.B., Dworkin-Rastl, E.: Glycogen breakdown in cleaving Xenopus embryos is limited by ADP. Mol. Reprod. Dev. **32**, 354–362 (1992). doi:10.1002/mrd.1080320408
40. Lefebvre, T., Guinez, C., Dehennaut, V., Beseme-Dekeyser, O., Morelle, W., Michalski, J.C.: Does *O*-GlcNAc play a role in neurodegenerative diseases? Expert Rev. Proteomics. **2**, 265–275 (2005). doi:10.1586/14789450.2.2.265

© 2009 Tous droits réservés.
http://doc.univ-lille1.fr

Annexe

© 2009 Tous droits réservés.

http://doc.univ-lille1.fr

En marge de mes travaux de recherche, j'ai également participé à une étude visant à comprendre la relation existant entre la *O*-GlcNAc et l'ubiquitinylation des protéines en vue de leur dégradation par le protéasome, ce qui m'a permis d'être associée à la publication suivante :

- **PUBLICATION 5**

Guinez C, Mir AM, **Dehennaut V**, Cacan R, Harduin-Lepers A, Michalski JC, Lefebvre T. (2008). « Protein ubiquitination is modulated by O-GlcNAc glycosylation » *FASEB J.*22: 2901-11.

J'ai également participé à la rédaction d'une revue et d'un chapitre d'ouvrage relatant l'implication de la *O*-GlcNAc dans l'étiologie des maladies neurodégénératives (publication 6 et 7), des cancers et du diabète de type II (publication 7).

- **PUBLICATION 6**

Lefebvre T, Guinez C, **Dehennaut V**, Beseme-Dekeyser O, Morelle W and Michalski JC. (2005). « Does O-GlcNAc play a role in neurodegenerative diseases? » *Expert Rev Proteomics.* 2, 265-75.

- **PUBLICATION 7**

Lefebvre T, **Dehennaut V**, Guinez C and Michalski JC. (2007). « Involvement of O-linked N-acetylglucosamine in type-2 diabetes, neurological disorders and cancer. » *Research signpost, "New developments in therapeutic glycomics"*. 37/661(2) 377-392.

© 2009 Tous droits réservés.

PUBLICATION 5

© 2009 Tous droits réservés.

http://doc.univ-lille1.fr

Thèse de Vanessa Dehennaut, Lille 1, 2008

The FASEB Journal • Research Communication

Protein ubiquitination is modulated by *O*-GlcNAc glycosylation

Céline Guinez, Anne-Marie Mir, Vanessa Dehennaut, René Cacan, Anne Harduin-Lepers, Jean-Claude Michalski, and Tony Lefebvre[1]

UMR USTL/CNRS, Laboratoire de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Villeneuve d'Ascq, France

ABSTRACT **During the past two decades, *O*-GlcNAc modification of cytosolic and nuclear proteins has been intensively studied. Nevertheless, the function of this post-translational modification remains unclear. It has been recently speculated that *O*-GlcNAc could act as a protective signal against proteasomal degradation, both by modifying target substrates and/or by inhibiting the proteasome itself. In this work, we have investigated the putative relation between *O*-GlcNAc and the ubiquitin pathway. First, we showed that the level of both modifications increased rapidly after thermal stress but, unlike ubiquitinated proteins, *O*-GlcNAc-modified proteins failed to be stabilized by inhibiting proteasome function. Increasing *O*-GlcNAc levels, using glucosamine or PUGNAc, enhanced ubiquitination. Inversely, when *O*-GlcNAc levels were reduced, using forskolin or glucose deprivation, ubiquitination decreased. Targeted-RNA interference of *O*-GlcNAc transferase also reduced ubiquitination and moreover halved cell thermotolerance. Finally, we demonstrated that the ubiquitin-activating enzyme E1 was *O*-GlcNAc modified and that its glycosylation and its interaction with Hsp70 varied according to the conditions of cell culture. Altogether, these results show that *O*-GlcNAc and ubiquitin are not strictly antagonistic post-translational modifications, but rather that the former might regulate the latter, and also suggest that E1 could be one of the common links between the two pathways. —Guinez, C., Mir, A.-M., Dehennaut, V., Cacan, R., Harduin-Lepers, A., Michalski, J.-C., Lefebvre, T. Protein ubiquitination is modulated by *O*-GlcNAc glycosylation. *FASEB J.* 22, 2901–2911 (2008)**

Key Words: OGT RNA interference · heat shock · proteasomal degradation

PROTEOLYSIS IS AN ESSENTIAL PROCESS for the function and viability of cells. Newly synthesized proteins that remain unfolded and nuclear proteins that are retranslocated to the cytosol are mainly degraded by the ubiquitin-proteasome pathway (1). This process is observed in both healthy and injured cells. In addition, the ubiquitin-proteasome pathway also plays an important role in the regulation of the level of proteins with a short half-life, such as the cyclins acting during the cell cycle (2) or transcription factors (3). The proteasome contributes also in the elimination of chemically or metabolically damaged proteins that contain hydrophobic peptide segments, which have a tendency to aggregate. These proteins are toxic for cell homeostasis and require a rapid degradation by a cellular mechanism known as the ubiquitin-proteasome system (UPS) (4).

It has been recently speculated that proteins could be protected against proteasomal degradation by *O*-linked *N*-acetylglucosaminylation (*O*-GlcNAc) (5–8). *O*-GlcNAc is the major glycosylation type found within the cytosolic and nuclear compartments of eukaryotic cell (9, 10). The *O*-GlcNAc process results in the covalent linkage performed by the *O*-GlcNAc transferase (OGT) of a single *N*-acetylglucosamine residue to a serine or a threonine residue of substrate proteins. This *O*-GlcNAc protein modification does not require a strict consensus sequence on the polypeptide chain; however, OGT needs a specific peptidic environment: usually *O*-GlcNAc linkage occurs near a proline residue and in serine/threonine-enriched regions. Interestingly, OGT modifies sequences that are similar to PEST sequences (peptide segments enriched in proline, glutamic acid, serine, and threonine residues), the latter being a signal targeting the proteins through the ubiquitin-proteasome pathway (11). Activation of PEST sequences frequently occurs after phosphorylation (12). Because there exists a relation between *O*-GlcNAc and phosphorylation, it can be assumed that *O*-GlcNAc counteracts the phosphorylation effect in order to protect proteins. Indeed, it has been recently demonstrated that modification of p53 at serine 149 by *O*-GlcNAc prevents its degradation by decreasing its phosphorylation at threonine 155 leading to a blockade of ubiquitination (13). Another study has shown that the *O*-GlcNAc glycosylation of Sp1 reduced its susceptibility to proteasomal destruction as studied in cells cultured in a medium supplemented with glucosamine and that on the contrary, glucose star-

[1] Correspondence: UMR USTL/CNRS 8576, Laboratoire de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, IFR 147, 59655 Villeneuve d'Ascq, France. E-mail: tony.lefebvre@univ-lille1.fr
doi: 10.1096/fj.07-102509

© 2009 Tous droits réservés. http://doc.univ-lille1.fr

vation was shown to diminish the half-life of this transcription factor (5). Another example that strongly supports a protective function of *O*-GlcNAc is that of the β-estrogen-receptor (β-ER), which comprises a *O*-GlcNAc motif in a peptide sequence with a high PEST sequence score (6). The glycosylated form of β-ER was more resistant to proteasomal degradation than the unglycosylated form, whereas a mutant that mimicked a constitutive phosphorylated β-ER form was more sensitive to the degradation. Recently, it has also been demonstrated that the proteasome itself could be regulated through the *O*-GlcNAc glycosylation of the 19S-regulatory subunit (7). This inhibition of proteasome by *O*-GlcNAc adds another glycosylation-mediated regulatory level of protein protection. Finally, our group has demonstrated that the constitutive form of the 70-kDa heat-shock protein family (Hsc70) and the inducible one (Hsp70) displayed a lectin activity toward *O*-GlcNAc residues (14, 15). This affinity was enhanced when cells were stressed (15, 16). Accordingly, one can hypothesize that OGT and Hsp70 can act in synergy to prevent proteins from aggregation and degradation: first, by modifying substrates with *O*-GlcNAc and second, by Hsp70 binding on the glycosylated proteins.

In this report, we first corroborate previous published data (17) showing that after thermal stress *O*-GlcNAc level was enhanced: this rapid *O*-GlcNAc rise occurs in parallel to the ubiquitin pathway activation. In addition, we show that proteasome inhibition stabilizes protein ubiquitination but not protein *O*-GlcNAc-modification. Modulation of the *O*-GlcNAc content by chemical inhibitors or by OGT RNA interference affects ubiquitination. Surprisingly, E1, an ubiquitin-activating enzyme that initiates the process of protein ubiquitination, is modified with *O*-GlcNAc and physically interacts with Hsp70. Both, E1 glycosylation and E1-Hsp70 interaction vary with cell culture conditions and with induced stress, suggesting a possible regulation of protein ubiquitination by E1 *O*-GlcNAc modification.

MATERIALS AND METHODS

Cell cultures

HepG2 and HeLa cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Life Technologies, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (v/v), 2 mM L-glutamine, 5 IU/ml penicillin, and 50 μg/ml streptomycin at 37°C in a humidified atmosphere enriched with 5% CO_2. HepG2 cell culture dishes (diameter 100 mm) were preliminarily coated with 0.1% porcine gelatin (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France). For glucose deprivation experiments, cells were rinsed with 10 ml of glucose-depleted medium supplemented with 10% FCS and 1 mM sodium pyruvate and incubated for 24 h either in this medium or in this medium supplemented with 5–20 mM glucosamine (Sigma) for 24 h (15). Thermal stress was induced by placing cells at 42°C in a 5% CO_2 enriched atmosphere either for 24 h or for the indicated time periods (See **Fig. 1**; kinetic experiments).

MG132 (*N*-carbobenzoxyl-Leu-Leu-leucinal, 8 mM stock solution in dimethyl sulfoxide at −80°C; Sigma) was used at a final concentration of 8 μM. PUGNAc [*O*-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene)amino *N*-phenylcarbamate] was used at a final concentration of 250 μM, and forskolin was used at a final concentration of 50 μM.

Immunoprecipitation and coimmunoprecipitation

HepG2 cells were first washed with 10 ml of cold phosphate-buffered saline (PBS). For immunoprecipitation experiments, cells were lysed on ice with lysis buffer [10 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100 (v/v), 0.5% sodium deoxycholate (w/v), 0.1% sodium dodecyl sulfate (w/v) and protease inhibitors, pH 7.4]. Cell extracts were then centrifuged at 20,000 *g* for 30 min at 4°C. Supernatants were incubated together with the mouse monoclonal anti-*O*-GlcNAc antibody [RL2; Affinity Bioreagents (Ozyme), St. Quentin Yvelines, France] at a final dilution of 1:400 or with the rabbit polyclonal anti-ubiquitin (Stressgen, Tebu-bio, Le Perray en Yvelines, France) at a final dilution of 1:500 and placed at 4°C overnight. For immunoprecipitation of E1, the polyclonal anti-E1 antibody (ab34711; Abcam, Cambridge, UK) was used at a final concentration of 1:500. Antibody-bound proteins were recovered after adding either 30 μl of Sepharose-labeled protein G for RL2, or 30 μl of Sepharose-labeled protein A for anti-ubiquitin and anti-E1 (GE Healthcare, Templemars, France) for 1 h at 4°C. Beads were gently centrifuged for 1 min and subsequently washed with the following buffers: lysis buffer, lysis buffer supplemented with 500 mM NaCl, lysis buffer/TNE (10 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, and 1 mM EDTA, pH 7.4) (v/v), and finally with TNE alone.

For coimmunoprecipitation, cells were lysed on ice in a lysis buffer containing 20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40 (v/v), and protease inhibitors, pH 8.0. Whole cell extracts were centrifuged at 20,000 *g* for 30 min at 4°C, and supernatants were collected. Immunoprecipitation with the anti-Hsp70 antibody (Stressgen) was carried out at a final concentration of 5 μl/ml overnight at 4°C, followed by an incubation with Sepharose-labeled protein A for 1 h at 4°C. Beads were gently centrifuged for 1 min and washed 4× for 5 min each with the lysis buffer.

Controls for the immunoprecipitation specificities were performed with normal mouse IgG1 (Sigma) and with normal rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA).

SDS-PAGE, Western blot analysis, and antibody staining

Equal amounts of extracted proteins were subjected to Western blot analysis. Samples were analyzed by 10% SDS-PAGE under reducing conditions, and proteins were electroblotted on nitrocellulose sheet (GE Healthcare). Equal loading was verified using Ponceau red staining and by the use of anti-tubulin or anti-actin antibodies. Membranes were first saturated for 45 min with 5% nonfatty acid milk in Tris-buffered saline (TBS) -Tween buffer [20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, and 0.05% Tween (v/v), pH 8.0]. Mouse monoclonal anti-*O*-GlcNAc (RL2), mouse monoclonal anti-ubiquitin (Sigma), and mouse monoclonal anti-E1 (2G2.3–5, Sigma) antibodies were used at a final dilution of 1:1000. Rabbit polyclonal anti-OGT (AL28; kind gift from Gerald W. Hart, Johns Hopkins Institute, Baltimore, MD, USA) was used at a dilution of 1:2000; rabbit polyclonal anti-ubiquitin antibody, at a dilution of 1:10,000; rabbit polyclonal anti-E1 antibody

© 2009 Tous droits réservés. http://doc.univ-lille1.fr

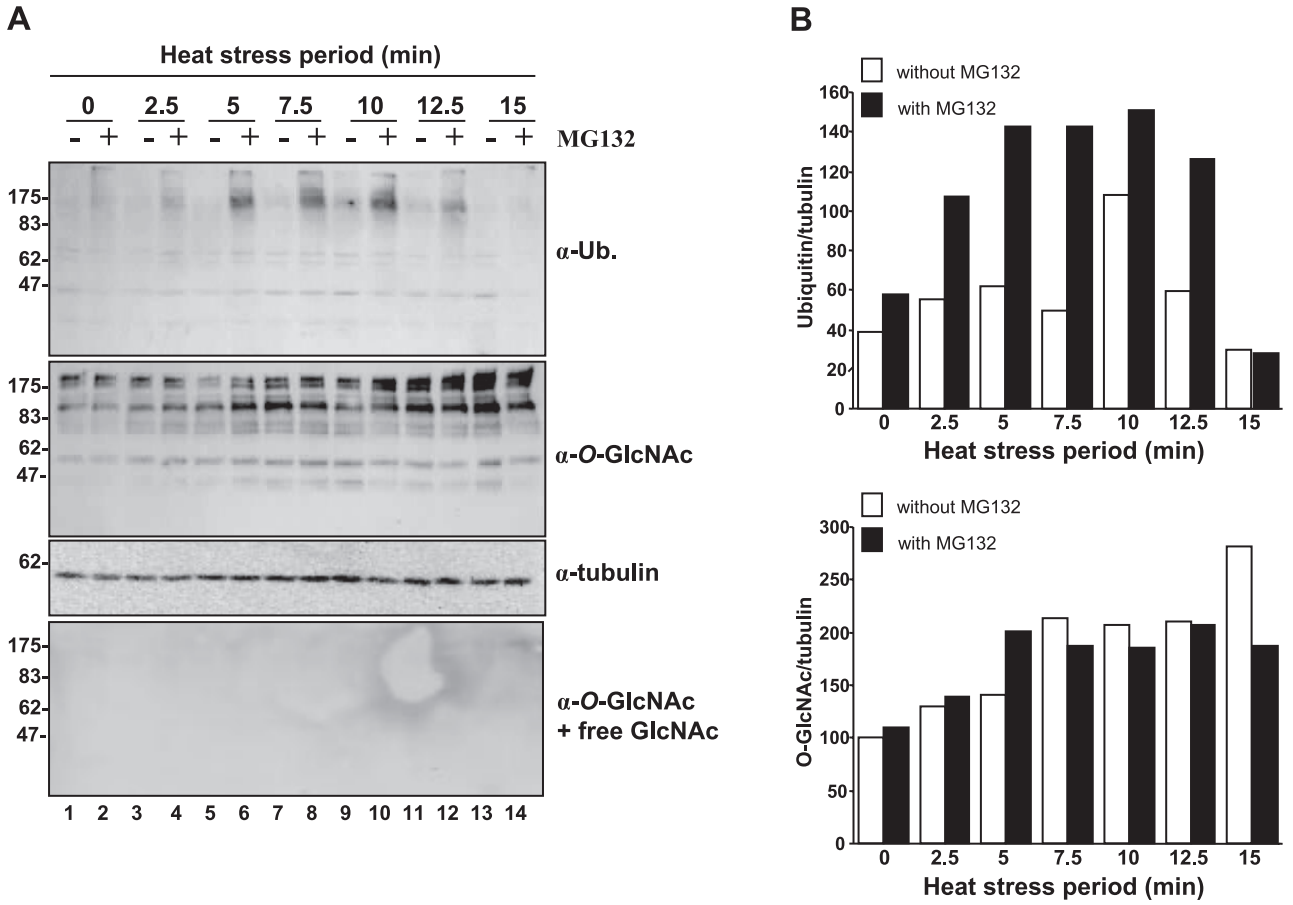


Figure 1. Time course of *O*-GlcNAc and ubiquitin levels during thermal stress. *A*) Western blot analysis of HepG2 cells incubated for increasing time periods at 42°C to induce a thermal stress in the presence or the absence of the reversible proteasome inhibitor MG132. The ubiquitin and *O*-GlcNAc contents were evaluated using an anti-ubiquitin antibody (α-Ub) or an anti-*O*-GlcNAc antibody (α-*O*-GlcNAc). The specificity of the anti-*O*-GlcNAc antibody was examined by incubating the antibody with 0.5 M of free GlcNAc. Blots are representative of 4 independent experiments. Equal loading of the samples was ensured using an anti-tubulin antibody (α-tubulin). Protein mass markers are indicated at left (kDa). *B*) Densitometric analysis of the blots shown in *A*. Histograms depict densitometric values normalized to the tubulin densitometric values in the corresponding samples. Top: ubiquitin staining; bottom: *O*-GlcNAc staining. Open bars, control cells; solid bars, MG132-treated cells.

(ab34711; Abcam), at a dilution of 1:5000; rabbit polyclonal anti-tubulin antibody, at a dilution of 1:500; and rabbit polyclonal anti-actin, at a dilution of 1:10,000. The specificity of RL2 staining was ensured at different stages of the experiments by incubating the first antibody with 0.5 M of free *N*-acetylglucosamine. Membranes were incubated with the different antibodies overnight at 4°C, then washed 3× with TBS-Tween for 10 min and incubated with either an anti-rabbit or an anti-mouse horseradish peroxidase-labeled secondary antibody at a dilution of 1:10,000 for 1 h. Finally, 3 washes of 10 min each were performed with TBS-Tween, and the detection was carried out with enhanced chemiluminescence (GE Healthcare).

Densitometry analyses of the Western blots were done with the GeneTools software (File version: 3.07.03; Syngene, Cambridge, UK).

RNA interference (RNAi)

RNAis were designed for the human OGT sequence. Oligonucleotides were designed, synthesized, and purchased from Eurogentec (Angers, France). Double-stranded oligonucleotide (named 1153) used in this study was the following: 5′GGA GGC UAU UCG AAU CAG U 3′ (antisense sequence: 5′ACU GAU UCG AAU AGC CUC C 3′). As a negative control, RNAi oligonucleotides designed for green fluorescent protein (GFP) were used (sense sequence: 5′ GAA CGG CAU CAA GGU GAA CTT 3′; antisense sequence: 5′ GUU CAC CUU GAU GCC GUU CTT 3′). DreamFect reagent (OZ Biosciences, Marseille, France; 8 μl) was diluted with serum- and antibiotic free Opti-MEM I Reduced Serum Medium (1×) liquid with GlutaMAX I medium (Opti-MEM/GlutaMAX; Invitrogen) to a final volume of 100 μl. RNAi (2 μg) was diluted with Opti-MEM/GlutaMAX to a final volume of 100 μl. The 100 μl diluted transfection reagent and the 100 μl diluted RNAi solution were then mixed and incubated for 20 min. The 200 μl RNAi solution was added to HeLa cells maintained in 1.8 ml of Opti-MEM/GlutaMAX per well in a 6-well plate. This procedure was repeated every 24 h for 4 days. Ninety-six hours after incubation with the oligonucleotides, OGT expression and activity were tested by immunoblotting, either with rabbit anti-OGT antibodies (AL28) to test OGT levels or with RL2 antibodies to check *O*-GlcNAc levels. Viability of the transfected cells was enquired by duplicating the transfections in a 24-well plate (all volumes and quantities were divided by 2), using the trypan blue exclusion method (16).

© 2009 Tous droits réservés. http://doc.univ-lille1.fr

Sambucus nigra agglutinin (SNA) staining

After OGT silencing, crude cellular extracts were run on a 10% SDS-PAGE and electroblotted; membranes were then incubated with the digoxigenin-coupled SNA (DIG Glycan differentiation kit; Roche, Meylan, France) at a final concentration of 1:1000 in TBS-Tween for 1 h at room temperature. This incubation was followed by 3 washes of 10 min each with TBS-Tween. The membranes were incubated with an alkaline phosphatase-labeled anti-digoxigenin secondary antibody at a final concentration of 1:1000 in TBS-Tween for 1 h. After 3 washes of 10 min each with TBS-Tween, proteins were visualized by the addition of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate and nitro-blue tetrazolium.

Immunofluorescence experiment

HepG2 and HeLa cells were grown on coverglasses for 48 h and afterward washed twice with cold PBS. For RNAi experiments, the amount of each reagent was adjusted to a 6-well plate. Cells were fixed in 3% of paraformaldehyde in cold PBS for 15 min and subsequently washed with PBS. Excess of paraformaldehyde was eliminated with a solution of 50 mM ammonium chloride for 10 min. After washing with PBS, cells were permeabilized with 0.1% Triton-X100 for 5 min. Nonspecific sites were blocked with goat serum. Coverglasses were then incubated for 30 min with either anti-*O*-GlcNAc (RL2), anti-OGT (AL28), or anti-ubiquitin, each at a dilution of 1:100 in a 10% goat serum solution (in PBS). After 3 washes with PBS, the coverglasses were covered with fluorescein isothiocyanate (FITC) and Texas Red-labeled secondary antibodies (dilution 1:50). Nuclei were specifically stained with 4′,6′-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Cells were visualized using an Axioplan 2 imaging microscope (Zeiss, Jena, Germany) and an Axio Cam HRc camera (AxioVision; Zeiss).

RESULTS

The ubiquitin-proteasome system represents the main pathway whereby cytosolic and nuclear proteins are degraded. Recently, evidence has emerged that both cytosolic and nuclear proteins might be protected against such degradation by *O*-GlcNAc. However, our knowledge about the mechanism of *O*-GlcNAc protection is still limited. Accordingly, we investigated the influence of *O*-GlcNAc on protein ubiquitination and tried to enlighten the role of both post-translational modifications (PTMs) at the cellular and at the molecular level.

Heat-shock treatment induces changes in levels of O-GlcNAc and ubiquitin

We were interested in establishing the evolution of ubiquitination and *O*-GlcNAc glycosylation of cells during thermal stress situations. For that purpose, we investigated the ubiquitin and *O*-GlcNAc modifications of proteins in HepG2 cells after exposure to thermal stress (42°C) for increasing time periods. This experiment was performed either in the presence or in the absence of MG132, a reversible proteasome inhibitor (Fig. 1). For each condition, the amounts of *O*-GlcNAc and ubiquitin were evaluated by Western blot analysis (Fig. 1*A*). Afterward, the blots were densitometrically measured, and the values were accordingly reported in histograms (Fig. 1*B*). As illustrated in Fig. 1*A, B*, the content of both ubiquitin and *O*-GlcNAc rapidly increased in HepG2 cells during thermal stress (Fig. 1*A*, lane 5; ~5 min after onset of stress). However, ubiquitin-containing proteins reached their maximal level after 10 min of exposure to 42°C (Fig. 1*A*, lane 10), whereas the levels of *O*-GlcNAc increased steadily to a maximum level at 15 min of exposure to 42°C (Fig. 1). These results are consistent with data previously published by Zachara *et al.* (17) showing that *O*-GlcNAc levels increased rapidly in response to a large variety of stresses. Intriguingly, in contrast to ubiquitin, the *O*-GlcNAc responses were insensitive to the inhibition of the proteasome (Fig. 1*A, B*). To verify the specificity of the *O*-GlcNAc staining, blots were restained with RL2 in the presence of free *N*-acetylglucosamine. All of the RL2 staining was abrogated by the free *N*-acetylglucosamine, showing that the staining was specific.

O-GlcNAc and ubiquitin modify proteins concomitantly

In our quest to better understand the putative relation or interplay between ubiquitin and *O*-GlcNAc, we examined the nuclear and the cytosolic distribution of *O*-GlcNAc and ubiquitinated proteins. These studies were performed by immunofluorescence microscopy, using the monoclonal anti-*O*-GlcNAc antibody RL2 in conjunction with an FITC-coupled secondary antibody and a polyclonal anti-ubiquitin antibody in conjunction with a Texas Red-coupled secondary antibody. The nucleus was stained with DAPI (blue coloration). As shown in **Fig. 2*A***, ubiquitin labeling (α-Ub) was mainly present in the cytosolic compartment. By superimposing the images of ubiquitinated stained proteins and DAPI staining (Fig. 2*A*; α-Ub/DAPI) a few red spots were also visible in the nucleus. In contrast, as shown in merged pictures with DAPI, *O*-GlcNAc glycosylation was predominantly localized in the nucleus. A more diffuse green color was also visible in the cytoplasm. By superimposing both the ubiquitin and the *O*-GlcNAc stained images, colocalization of the two PTMs was shown to be restricted to the cytoplasm (orange).

We hypothesized that some *O*-GlcNAc proteins could be ubiquitinated concurrently. To verify this hypothesis, we performed immunoprecipitation experiments. HepG2 cell extracts were immunoprecipitated either with the anti-*O*-GlcNAc or the anti-ubiquitin antibodies. Subsequently, anti-*O*-GlcNAc and anti-ubiquitin precipitated proteins were analyzed by Western blot and visualized both with the anti-ubiquitin antibodies (Fig. 2*B*, bottom panel) and the anti-*O*-GlcNAc antibody (top panel). We observed that some proteins could be both *O*-GlcNAc glycosylated and modified with ubiquitin. The staining of the two antibodies was more intense when cells were incubated both with glucosamine and MG132. The specificity of the different immunoprecipitation experiments performed with MG132 was ensured by using normal mouse IgG1 and normal rabbit

© 2009 Tous droits réservés. http://doc.univ-lille1.fr

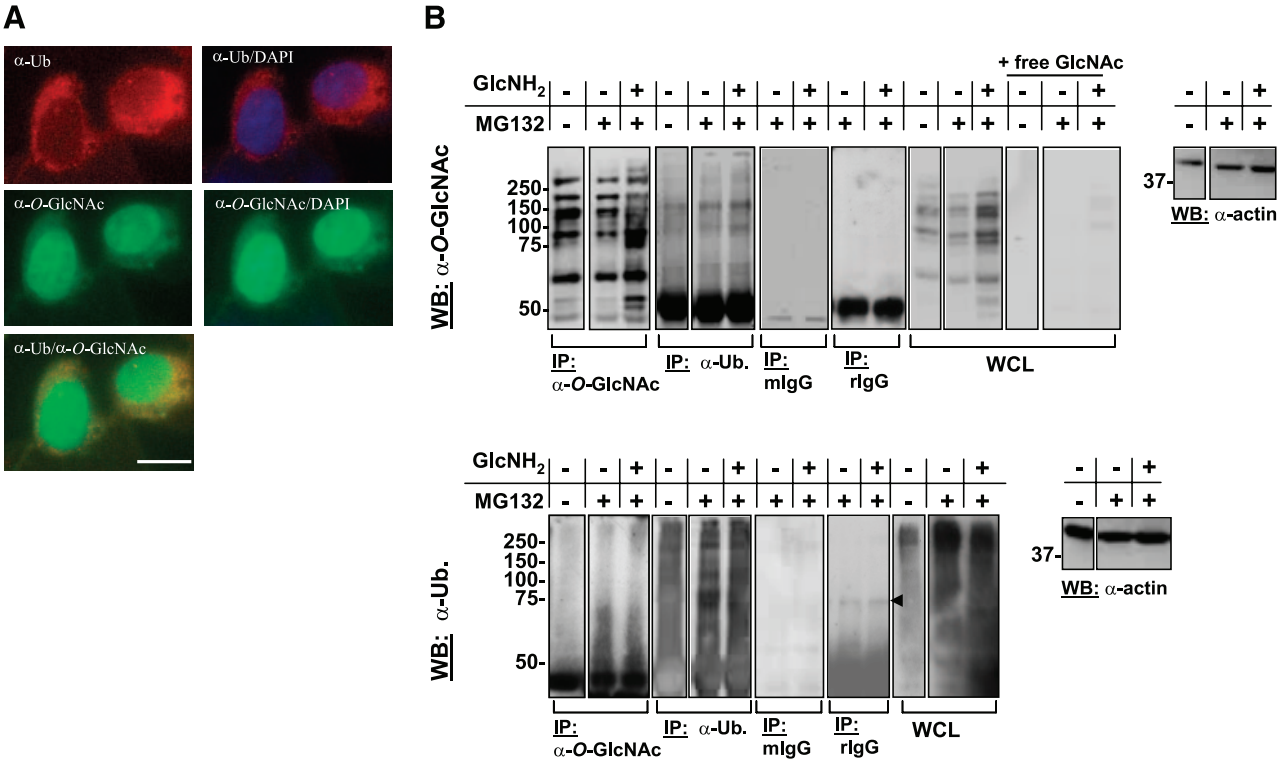


Figure 2. Ubiquitin and *O*-GlcNAc are not strictly antagonistic PTMs. *A*) Investigation of the presence of ubiquitinated proteins and *O*-GlcNAc proteins in HepG2 cells using indirect immunofluorescent microscopy. Ubiquitin is visualized using a polyclonal anti-ubiquitin antibody (α-Ub) in conjunction with a Texas Red-labeled secondary antibody (red staining). *O*-GlcNAc is visualized with a monoclonal anti-*O*-GlcNAc antibody (α-*O*-GlcNAc) in conjunction with an FITC-labeled secondary antibody (green). Nucleus is stained with DAPI (blue). Scale bar = 20 μm. *B*) To check the concomitant presence of *O*-GlcNAc and ubiquitin on the same proteins, immunoprecipitation experiments were performed on HepG2 cell extracts either with an anti-*O*-GlcNAc antibody or with anti-ubiquitin antibodies. Prior analyses of cells were glucose-deprived and supplemented with 20 mM glucosamine (w/o Glc+GlcNH2) for 16 h with MG132 or cells were cultured in normal DMEM in the presence or in the absence of MG132. Bound proteins were analyzed by Western blot for their *O*-GlcNAc content (top panel) and for their ubiquitin content (bottom panel); blots are representative of 3 independent experiments. The specificity of the antibodies was scrutinized with normal mouse IgG1 and normal rabbit IgG. Arrowhead indicates an unspecific band. Whole cell lysates were stained with an anti-*O*-GlcNAc and with anti-ubiquitin antibodies. The specificity of anti-*O*-GlcNAc was enforced by incubating the antibody with free GlcNAc. Equal loading of the lanes was checked using an anti-actin antibody. Protein mass markers are indicated at left (kDa). IP, immunoprecipitation; WB, Western blot; WCL, whole cell lysates.

IgG (Fig. 2*B*, IP mIgG and rIgG). Staining of the whole cell lysates (WCL) with the anti-*O*-GlcNAc and the anti-ubiquitin is also shown. The specificity of RL2 was checked by incubating the antibody with free *N*-acetylglucosamine. Equal loading was ascertained by staining with the anti-actin antibody.

Perturbation of intracellular O-GlcNAc content leads to variations in ubiquitination status

In our next set of experiments, we wanted to examine whether the levels of MG132-stabilized ubiquitinated proteins were modulated by *O*-GlcNAc content increase and decrease. For that purpose, we decided to modulate the efficiency of the hexosamine biosynthetic pathway (HBP) which produces UDP-GlcNAc (the donor for *O*-GlcNAc addition). *O*-GlcNAc decrease was induced either by glucose starvation (cell viability: 83.4±3.57 *vs.* 93.1±5.65% for control cells) or by treating cells with an activator of adenyl cyclase namely forskolin (cell viability: 93.2±3.42%). Activation of adenyl cyclase leads to the activation of PKA, which, in turn, blocks the HBP. *O*-GlcNAc increase was performed by culturing cells in presence of extra glucosamine (cell viability: 94.9±0.79%). Surprisingly, ubiquitin and *O*-GlcNAc levels were reduced both by deprivation of glucose and treatment with forskolin (**Fig. 3*A***). As illustrated in Fig. 3*A* by the histograms of the densitometrical measured values adjusted to tubulin expression, the levels of reduction were different for ubiquitinated and for *O*-GlcNAc modified proteins (Fig. 3*A*). Interestingly, the treatment of HepG2 with glucosamine rescued both the *O*-GlcNAc level and, to a lesser extent, the ubiquitin level that was diminished by glucose deprivation, while the ubiquitin level remained less than that of control cells. Such an increase of ubiquitination provoked by glucosamine was previously shown in Fig. 2*B*.

Next, we wondered whether treating the HepG2 cells with PUGNAc (cell viability: 84.45±15.71%), an inhibitor of *O*-GlcNAcase used to increase *O*-GlcNAc levels, also exerted an influence on the MG132-

© 2009 Tous droits réservés. http://doc.univ-lille1.fr

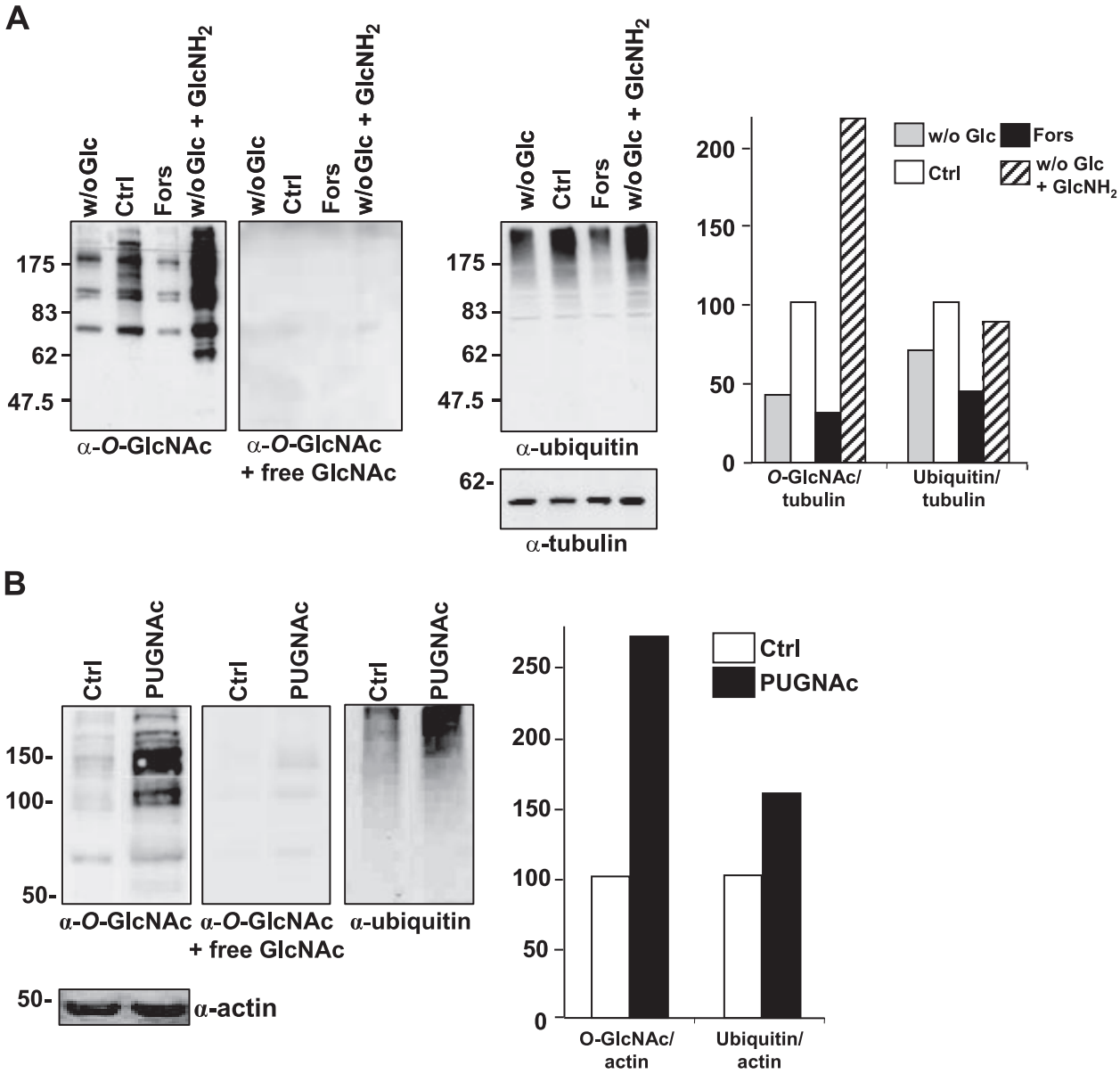


Figure 3. Modulation of *O*-GlcNAc levels influences ubiquitination. *A*) Western blot analysis of HepG2 cells cultured in normal DMEM (Ctrl), without glucose (w/o Glc), without glucose but with glucosamine (w/o Glc+$GlcNH_2$), or in presence of forskolin (Fors) to modulate *O*-GlcNAc levels and in the presence of MG132 to stabilize ubiquitinated proteins. Crude extract proteins were analyzed for *O*-GlcNAc (left panels) and ubiquitin (right top panel) contents. A control for the specificity of anti-*O*-GlcNAc specificity was included by incubating the antibody with free GlcNAc. Equal loading was ensured using an anti-tubulin antibody (right bottom panel). Histogram at right depicts densitometric values for each lane, normalized to the respective tubulin expression. *B*) Western blot analysis of HepG2 cells cultured in the presence or in the absence of PUGNAc and with MG132. Crude extract proteins were analyzed for *O*-GlcNAc content with an anti-*O*-GlcNAc antibody (incubated without or with free GlcNAc) or for ubiquitin content with an anti-ubiquitin antibody. Actin was used as an equal loading control. Graph at right depicts densitometric values normalized to actin expression. Results are representative of 3 independent experiments.

stabilized ubiquitination levels of proteins within HepG2 cells. Accordingly, crude cell extracts from cells grown in the presence and absence of PUGNAc were analyzed by Western blot analysis. Blots were hybridized both with an anti *O*-GlcNAc and an anti-ubiquitin. As illustrated by Fig. 3*B*, both PTMs were shown to be increased by the PUGNAc treatment. The latter results and our observations with forskolin, glucose starvation, and glucosamine reinforce our hypothesis that *O*-GlcNAc and ubiquitin PTMs could be linked to each other. In a control experiment, the specificity of RL2 was ensured by incubating the antibody with free GlcNAc (Fig. 3*A*, right panel; *B*, middle panel). Although for the latter, the staining was not completely abolished, the remaining signal could be attributed to the necessity of anti-*O*-GlcNAc antibodies to recognize both the glycosyl part of the epitope and the peptidic backbone, the latter being not chased out by the free sugar. Densitometrical analyses of the two experiments are represented below each set of

© 2009 Tous droits réservés. http://doc.univ-lille1.fr

Fig. 3. Ubiquitin and *O*-GlcNAc signals were normalized *vs.* tubulin or actin signal intensities.

We noticed that a loading control performed with tubulin showed that PUGNAc-treated cells expressed a slightly higher amount of tubulin than control cells (data not shown), whereas no significant difference could be seen with actin. This discrepancy can be reflected to the modification of alpha-tubulin with *O*-GlcNAc (18) and consequently to its greater stability in the presence of PUGNAc.

OGT silencing impairs ubiquitination and decreases cell viability

Because modulation of *O*-GlcNAc contents induces concomitant changes in the level of ubiquitinated proteins, we investigated the putative role of OGT in the ubiquitination process. To attain such insight, OGT knockdown was performed using the RNAi technology. HeLa cells were transfected with OGT RNAi and incubated at 37°C for 96 h. A control experiment was done with oligonucleotides used to knock down the GFP expression. As a negative control, HeLa cells were transfected exclusively with the DreamFect reagent, indicated as the vehicle in **Fig. 4**. OGT silencing, as well as the decrease of *O*-GlcNAc-bearing proteins, was followed by immunoblotting (Fig. 4*A*). Beta-tubulin was used to ensure equal loading of the samples. To investigate whether OGT silencing did not perturbate *N*- and *O*-glycosylations, we performed a lectin staining with SNA. This lectin binds specifically to sialic acid linked in α2,6 to a galactose residue. The lectin blot demonstrated that OGT silencing did not disturb *N*- and *O*-glycosylation pathways (Fig. 4*B*). The efficiency of OGT silencing and, accordingly, changes in *O*-GlcNAc incorporation was also visualized using immunofluorescent microscopy (**Fig. 5*A***). First, we observed that the knockdown of OGT expression decreased cell viability, as assessed by counting living cells (Fig. 5*A*; DAPI staining), which reinforces the hypothesis that OGT is essential for cell life (17). Then, the top and middle panels of Fig. 5*A* show that OGT silencing impaired OGT expression and reduced *O*-GlcNAc levels, respectively, as expected; but especially, we observed that OGT knockdown decreased the ubiquitination of proteins (Fig. 5*A*, bottom panel). These results were validated by immunoblotting; control cells (Fig. 5*B*, 37°C) and heat-shocked cells (Fig. 5*B*, 42°C) were analyzed according to their *O*-GlcNAc and ubiquitin contents. Both at 37°C and at 42°C, cells exhibited less *O*-GlcNAc and ubiquitin levels when OGT was knocked down. It has to be noted that for a temperature of 42°C, cells transfected with the 1153 oligonucleotide were less viable than mock cells, demonstrating that *O*-GlcNAc is also an essential PTM for the resistance of the cells to heat (Fig. 5*C*) (similar repercussions on cell viability when *O*-GlcNAc was reduced or blocked were previously obtained by Zachara *et al.*, ref. 17). The latter experiments reinforce the hypothesis that ubiquitination and *O*-GlcNAc glycosylation processes may have a common regulation in normal and injured cells.

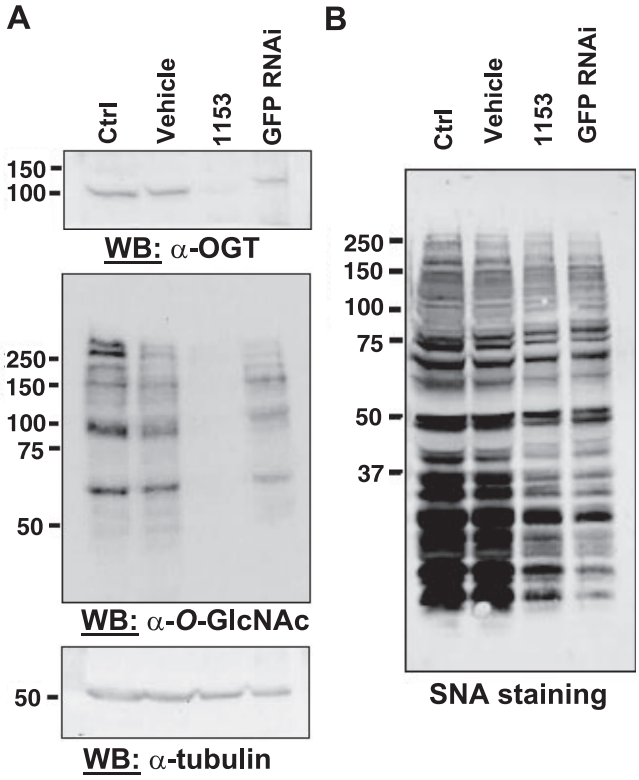


Figure 4. Validation of the OGT RNAi procedure. OGT silencing was ascertained using RNAi oligonucleotide (1153) transfected HeLa cells. Cell extracts were recuperated 96 h post-transfection. *A*) Western blot analysis of the effectiveness of RNAi on OGT silencing using anti-OGT and anti-*O*-GlcNAc antibodies. Equal loading was ensured by using an anti-tubulin antibody. *B*) Western blot analysis with SNA staining of crude cell extracts to ensure that OGT silencing did not affect other glycosylation types. Protein mass markers are indicated at left (kDa). Ctrl, cell extract from untransfected control cells; vehicle, cell extract from cells transfected exclusively with transfection reagent (DreamFect); 1153, cell extract from cells transfected with oligonucleotides used for OGT silencing; GFP RNAi, cell extract from cells transfected with oligonucleotides used for GFP silencing (negative control).

E1 O-GlcNAc status

Because of the common features existing between ubiquitination and *O*-GlcNAc, we hypothesized that the ubiquitination process could be regulated by *O*-GlcNAc. Accordingly, we sought to determine whether E1, the ubiquitin-activating enzyme that initiates the ubiquitination process, could be modified with *O*-GlcNAc (**Fig. 6**). HepG2 cells were cultured under different conditions, including normal conditions, in the presence of 25 mM glucose (Ctrl); heat-shocked at 42°C (HS); without glucose (w/o Glc); and without glucose but supplemented with 5 mM glucosamine (w/o Glc+$GlcNH_2$). After cell lysis, cell extracts were immunopurified either with the

© 2009 Tous droits réservés. http://doc.univ-lille1.fr

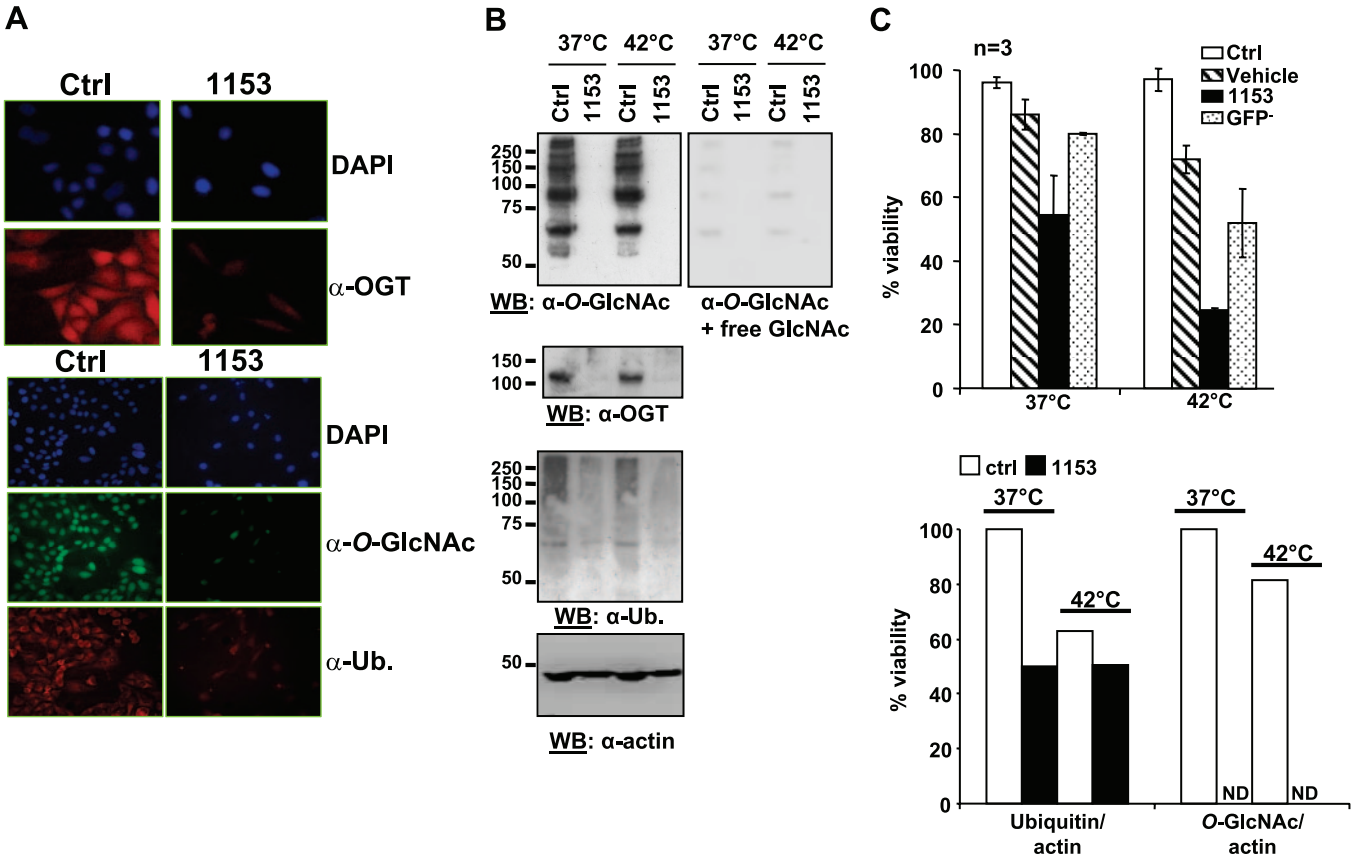


Figure 5. OGT silencing leads to a decrease in protein ubiquitination and results in reduced cell viability. *A*) Top: the effectiveness of OGT silencing is visualized by indirect immunofluorescence microscopy using the anti-OGT antibody (α-OGT; AL28) with a secondary antibody coupled to Texas Red. Nuclei are stained with DAPI. Bottom: the *O*-GlcNAc levels of control cells and cells transfected by OGT specific RNAi are visualized using an anti-*O*-GlcNAc antibody (α-*O*-GlcNAc; RL2) in conjunction with a FITC-coupled anti-mouse secondary antibody. The ubiquitin content is visualized using an anti-ubiquitin antibody (α-Ub) in conjunction with a Texas Red-coupled anti-rabbit secondary antibody. *B*) Western blot analysis of the effect of OGT silencing on ubiquitinated protein levels under normal conditions (37°C) and under heat stress (42°C). Ubiquitinated proteins are visualized with an anti-ubiquitin antibody (α-Ub). OGT silencing is verified using anti-OGT (α-OGT) and anti-*O*-GlcNAc (α-*O*-GlcNAc; RL2) antibodies. Results are representative of 3 independent experiments. Equal loading control was ensured using anti-actin (α-actin). A control for the specificity of anti-*O*-GlcNAc was ensured by incubating the antibody with free GlcNAc. Variations of ubiquitin and *O*-GlcNAc within the cell extract contents are illustrated in the histogram (the densitometric values for each sample were normalized according to the respective actin expression). Protein mass markers are indicated at left (kDa). *C*) Assessment of the effect of OGT silencing on cell viability and thermally stressed cells using the blue trypan method (n=3). Ctrl, untransfected cells; vehicle, cells treated with transfection reagent only (DreamFect); 1153, cells transfected with oligonucleotides used for OGT silencing; GFP$^-$, cells transfected with oligonucleotides used for GFP silencing (negative control).

anti-*O*-GlcNAc antibody (Fig. 6*A*) or with the polyclonal anti-E1 antibodies (pE1) (Fig. 6*B*). E1 was found to be slightly *O*-GlcNAc modified in control cells and in glucose-deprived cells (Fig. 6*A, B*), and no detectable band was found in heat-shocked cells. In contrast, when cells were treated with glucosamine, *O*-GlcNAc modification of E1 was enhanced. Interestingly, as illustrated in Fig. 6*A*, we showed that E1 coimmunoprecipitated with Hsp70. In addition, the interaction between E1 and Hsp70 is dependent on the *O*-GlcNAc status of E1, because it was greater when cells were incubated with glucosamine.

Subsequently, we examined how glycosylation of E1 was affected by OGT silencing in HeLa cells. As illustrated in Fig. 6*C*, OGT silencing decreased E1 glycosylation. The latter results suggest that E1 glycosylation could be one of the processes by which ubiquitination and *O*-GlcNAc contents are linked.

DISCUSSION

O-GlcNAc is a highly dynamic PTM that can counteract phosphorylation at the same site or at an adjacent site (19, 20). *O*-GlcNAc can modify numerous nucleocytoplasmic proteins that belong to diverse families, including metabolic enzymes, transcription factors, heat-shock proteins, and architectural proteins (21). Although the list of *O*-GlcNAc-modified proteins still increases, the function of this glycosylation type remains to be elucidated. However, several observations

© 2009 Tous droits réservés. http://doc.univ-lille1.fr

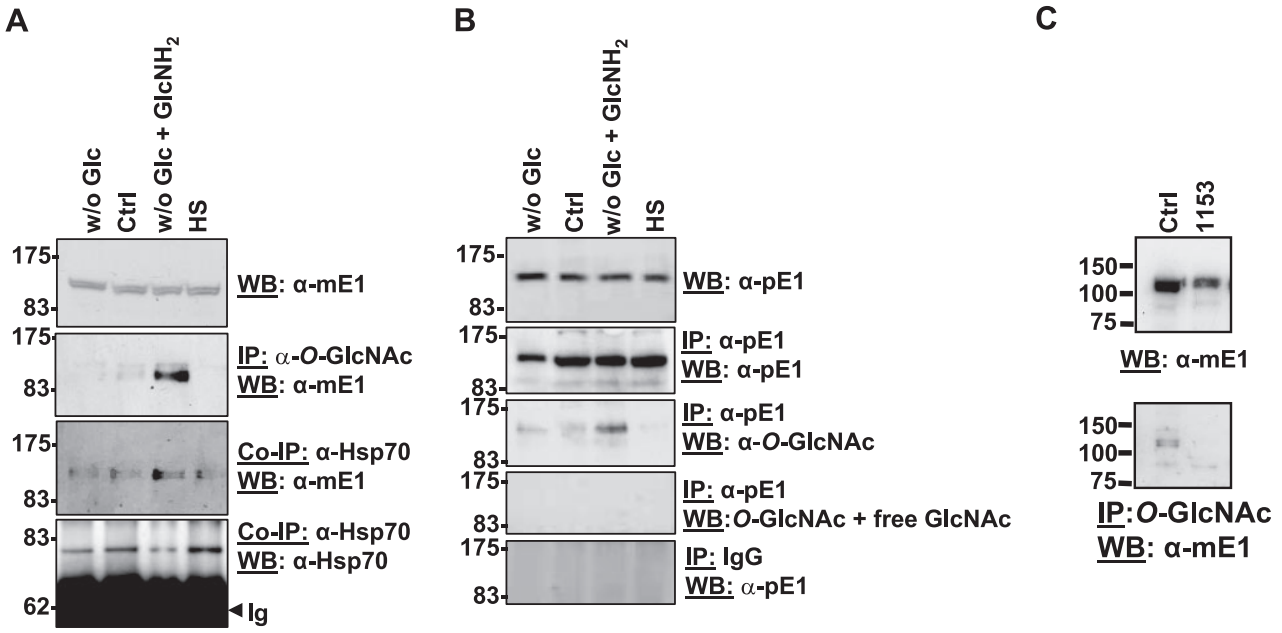


Figure 6. E1 is *O*-GlcNAc modified. *A*) Cells were cultured in different conditions: Ctrl, cells cultured in DMEM; w/o Glc, cells cultured in glucose-depleted DMEM medium; w/o Glc + $GlcNH_2$, cells cultured in glucose-depleted DMEM medium supplied with 5 mM glucosamine; HS, cells grown in heat shock at 42°C for 24 h. Cell extracts were immunoprecipitated with an anti-*O*-GlcNAc antibody. Coimmunoprecipitations were also performed with an anti-Hsp70 antibody. Immunoprecipitates (IP) and coimmunoprecipitates (Co-IP) were run on a 10% SDS-PAGE and electroblotted and stained with the monoclonal anti-E1 antibody (2G2.3–5, mE1). A control of Hsp70 immunoprecipitation was realized with an anti-Hsp70 antibody. *B*) To confirm the *O*-GlcNAc modification of E1, a polyclonal anti-E1 directed antibody (ab34711, pE1) was used to immunopurified E1. Immunoprecipitates were run on SDS-PAGE and stained either with the polyclonal anti-E1 antibodies (pE1) or with the anti-*O*-GlcNAc antibody (with and without free *N*-acetylglucosamine). Controls of immunoprecipitations were performed with normal mouse IgG1 and normal rabbit IgG. *C*) Effect of OGT silencing on E1 *O*-GlcNAc glycosylation was evaluated by immunoprecipitation of crude extracts with an anti-*O*-GlcNAc antibody and subsequently by the staining of the bound-proteins with the mouse anti-E1 antibody (mE1). Equal loading was determined with the two anti-E1-antibodies for the three panels. Each result was reproducible. Protein mass markers are indicated at left (kDa).

have led to the hypothesis that *O*-GlcNAc could stabilize proteins by preventing proteasomal degradation (5, 6). The reduced protein degradation by *O*-GlcNAc may be due to the *O*-GlcNAc modification of the 19S-regulatory subunit of the proteasome (7, 8), accordingly inhibiting its function or modifying the protein substrates directly, making them more stable. Indeed, experiments have shown that a wide variety of stresses (*e.g.*, UV, hyperthermia, H_2O_2) inflicted on cells led to an increase of *O*-GlcNAc content on a large panel of proteins (22). Sohn *et al.* (23) also showed that hyperthermia was followed by an increase in *O*-GlcNAc modification. In addition, these researchers demonstrated that cells overexpressing OGT support stress better than control cells. They hypothesized that OGT might behave as a chaperone by modifying unfolded hydrophobic peptide segment exposed after cell injury, which may lead concurrently to protection of degradation. Our group recently reported the GlcNAc-binding property of Hsp70 (15). This lectin activity occurs after thermal or nutrient stresses (15, 16). Accordingly, we postulated that *O*-GlcNAc glycosylation of damaged proteins and Hsp70-GlcNAc binding properties act in synergy. This synergy may protect target proteins against proteasome activity by binding *O*-GlcNAc-exposed motifs to Hsp70. Despite these exciting observations, the function of *O*-GlcNAc in protein protection is far from being entirely deciphered.

In the present study, we explored the putative relation between *O*-GlcNAc and ubiquitin: the *O*-GlcNAc modification seeming to be a signal acting against protein degradation and the ubiquitination being a well-described proteasome-targeting PTM. Intriguingly, it appeared that in contrast to the reciprocal relation between *O*-GlcNAc and phosphorylation, no reciprocity between *O*-GlcNAc and ubiquitination could be demonstrated. However, when a thermal stress was applied to cells, both PTMs were enhanced (Fig. 1). Unlike ubiquitination, which is stabilized by MG132, no effect of MG132 could be shown on *O*-GlcNAc glycosylation. This suggests that *O*-GlcNAc proteins are not degraded by the proteasome at the same rate as ubiquitinated proteins. This last result could present a discrepancy with an earlier report (17). Indeed, these researchers found that cells treated with an inhibitor of the proteasome (ALLN or MG132) exhibited higher *O*-GlcNAc levels than untreated ones. This difference in results could be explained by the procedures used in the two studies: *1*) the researchers treated the cells for 1 h, and then cells were returned to 37°C treatment for various times, whereas in the present work, we treated cells for increasing time periods (for a maximum of 15 min),

© 2009 Tous droits réservés. http://doc.univ-lille1.fr

and studies were immediately performed; *2*) the cell type was different, as they used Cos7, and we used HepG2; and *3*) the temperature used for heat-treating the cells was 45°C in the cited article and 42°C in the present work.

On the basis of our observations, we hypothesized that, after stress, proteins could be modified with both PTMs and that *O*-GlcNAc would transiently allow the protection of modified proteins, whereas ubiquitination targets the protein to the proteasome. Nevertheless, immunoprecipitation experiments presented in the present work show that *O*-GlcNAc and ubiquitin can coexist on the same proteins (Fig. 2*B*). This reinforces our suggestion that ubiquitin and *O*-GlcNAc are capable of acting in conjunction. Conversely, we noticed some discrepancies between levels of *O*-GlcNAc proteins when cells were treated with glucosamine and additionally treated with MG132. Indeed, the *O*-GlcNAc content was higher in MG132-treated cells than in nontreated cells (Fig. 2*B*). We assume that this difference is caused by a synergistic inhibition of the proteasome by MG132, in addition to its modification with *O*-GlcNAc (7); however, this remains to be elucidated.

Concluding from earlier knowledge and the results presented in the present work, we propose that the ubiquitin/*O*-GlcNAc ratio could be the switch for a protein to take the path of destruction or the path of repairing. We also wondered whether the ubiquitination process itself could be regulated by *O*-GlcNAc. Accordingly, we reasoned that when the *O*-GlcNAc dynamism was perturbed either upward or downward, ubiquitination contents followed the same modifications. As illustrated by our experiments, there might be, indeed, a common regulation between the two PTMs. In our quest to find the link between these two PTMs, we demonstrated that the ubiquitin-activating enzyme E1 was itself *O*-GlcNAc glycosylated and that this modification was modulated by cell culture conditions and stress (Fig. 6). We also showed an interaction between E1 and Hsp70; intriguingly, the interaction correlated with the glycosylation level of E1. Further investigations are necessary to determine whether the interaction between these two partners is regulated by the glycosylation status of E1. However, Cole and Hart (24) have demonstrated that the synaptosomal enzymatic form of deubiquitination (ubiquitin carboxyl hydrolase-L1; UCH-L1) is *O*-GlcNAc modified; therefore, one can hypothesize that both the ubiquitination pathway and the deubiquitination process could be regulated by *O*-GlcNAc. As for E1, the effect of *O*-GlcNAc on this enzyme is yet unknown, but it can be assumed that it directly regulates its activity. Nevertheless, a putative regulation of protein ubiquitination through E1 *O*-GlcNAc modification is an interesting field to investigate.

Given recent findings, it could be interesting to indicate the nature of the change we found in the ubiquitination levels occurring after the *O*-GlcNAc level increase: does it affect more particularly the monoubiquitination, the multiubiquitination, or the polyubiquitination? Considering the Western blot profiles that we obtained during this study, we incline rather toward a polyubiquitination change. Indeed, it has been recently shown that according to the type of polyubiquitin chains found on a substrate, the function managed by polyubiquitination was different (25). For example, Lys(48)-linked chains have been shown to target proteins for proteasomal degradation, whereas Lys(63)-linked chains have been implicated in other biological functions, such as endocytosis or signal transduction. It could be envisioned that *O*-GlcNAc may favor one linkage rather than another; then, if the Lys(48)-linked chains are found after *O*-GlcNAc increase, one can suppose that the glycosylation may assist the degradation of the ubiquitinated proteins. Conversely, if rather the Lys(63)-linked chains are found, it can be speculated that the ubiquitination induced by *O*-GlcNAc increase enables the cell to endure stress or serves any other function.

Obviously, at this stage, more extensive investigations are needed to increase our understanding of the role played by *O*-GlcNAc in the proteasomal processing. But it appears quite clear that it has a protective effect on protein stability, and a comparison can be drawn between the quality control function played by calreticulin and calnexin in the endoplasmic *reticulum via* the gluco/degluco cycle (26, 27) *vs.* Hsp70 *via* the *O*-GlcNAc/de-*O*-GlcNAc cycle.

This work opens a new door on the study of protein stability and questions about the relations linking the *O*-GlcNAc dynamism to the ubiquitin pathway. FJ

C.G. was a recipient of a fellowship from the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement. We thank Le Centre National de la Recherche Scientifique and the University of Lille I. We are indebted to Prof. Gerald W. Hart's laboratory (Johns Hopkins Institute, Baltimore, MD, USA) for the generous gift of the anti-OGT antibody (AL28). GFP RNAi was a kind gift from Prof. Fabrice Allain and Dr. Agnès Denys (UMR/CNRS 8576, Villeneuve d'Ascq, France). PUGNAc was kindly provided by Prof. Jérôme Lemoine (UMR/CNRS 5579, Villeurbanne, France). We are grateful to Prof. Marijke Van Ghelue for the final reading of the manuscript and for the English grammatical corrections.

REFERENCES

1. Pines, J., and Lindon, C. (2005) Proteolysis: anytime, any place, anywhere? *Nat. Cell Biol.* **7,** 731–735
2. Zhang, Z., Wang, H., Li, M., Agrawal, S., Chen, X., and Zhang, R. (2004) MDM2 is a negative regulator of p21WAF1/CIP1, independent of p53. *J. Biol. Chem.* **16,** 16000–16006
3. Minegishi, N., Suzuki, N., Kawatani, Y., Shimizu, R., and Yamamoto, M. (2005) Rapid turnover of GATA-2 via ubiquitin-proteasome protein degradation pathway. *Genes Cells* **10,** 693–704
4. Mayer, J., and Layfield, R., eds. (2005) *Essays in Biochemistry: The Ubiquitin-Proteasome System,* Portland Press, London, UK
5. Han, I., and Kudlow, J. I. (1997) Reduced *O*-glycosylation of Sp1 is associated with increased proteasome susceptibility. *Mol. Cell. Biol.* **17,** 2550–2558
6. Cheng, X., and Hart, G. W. (2001) Alternative *O*-glycosylation/*O*-phosphorylation of serine-16 in murine estrogen receptor

© 2009 Tous droits réservés. http://doc.univ-lille1.fr

beta: post-translational regulation of turnover and transactivation activity. *J. Biol. Chem.* **276,** 10570–10575
7. Zhang, F., Su, K., Yang, X., Bowe, D. B., Paterson, A. J., and Kudlow, J. E. (2003) *O*-GlcNAc modification is an endogenous inhibitor of the proteasome. *Cell* **115,** 715–725
8. Zachara, N. E., and Hart, G. W. (2004) *O*-GlcNAc modification: a nutritional sensor that modulates proteasome function. *Trends Cell Biol.* **14,** 218–221
9. Love, D. C., and Hanover, J. A. (2005) The hexosamine signaling pathway: deciphering the "O-GlcNAc code" [Online]. *Sci. STKE* **312,** re13
10. Vosseller, K., Sakabe, K., Wells, L., and Hart, G. W. (2002) Diverse regulation of protein function by O-GlcNAc: a nuclear and cytoplasmic carbohydrate post-translational modification. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **6,** 851–857
11. Rechsteiner, M., and Rogers, S. C. (1996) PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem. Sci.* **21,** 267–276
12. Martinez, L. O., Agerholm-Larsen, B., Wang, N., Chen, W., and Tall, A. R. (2003) Phosphorylation of a pest sequence in ABCA1 promotes calpain degradation and is reversed by ApoA-I. *J. Biol. Chem.* **278,** 37368–37374
13. Yang, W. H., Kim, J. E., Nam, H. W., Ju, J. W., Kim, H. S., Kim, Y. S., and Cho, J. W. (2006) Modification of p53 with *O*-linked *N*-acetylglucosamine regulates p53 activity and stability. *Nat. Cell Biol.* **8,** 1074–1083
14. Lefebvre, Cieniewski, T., Lemoine, C., Guerardel, J., Leroy, Y., Zanetta, Y., J. P., and Michalski, J. C. (2001) Identification of *N*-acetyl-D-glucosamine-specific lectins from rat liver cytosolic and nuclear compartments as heat-shock proteins. *Biochem. J.* **360,** 179–188
15. Guinez, C., Lemoine, J., Michalski, J. C., and Lefebvre, T. (2004) 70-kDa-heat shock protein presents an adjustable lectinic activity towards *O*-linked *N*-acetylglucosamine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **319,** 21–26
16. Guinez, C., Losfeld, M. E., Cacan, R., Michalski, J. C., and Lefebvre, T. Modulation of HSP70 GlcNAc-directed lectin activity by glucose availability and utilization. *Glycobiology* 16, 22–28, 2006
17. Zachara, N. E., O' Donnell, N., Cheung, W. D., Mercer, J. J., Marth, J. D., and Hart, G. W. (2004) Dynamic *O*-GlcNAc modification of nucleocytoplasmic proteins in response to stress. A survival response of mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **279,** 30133–30142
18. Walgren, J. L., Vincent, T. S., Schey, K. L., and Buse, M. G. (2003) High glucose and insulin promote *O*-GlcNAc modification of proteins, including alpha-tubulin. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **284,** E424–E434
19. Comer, F. I., and Hart, G. W. (2001) Reciprocity between *O*-GlcNAc and *O*-phosphate on the carboxyl terminal domain of RNA polymerase II. *Biochemistry* **40,** 7845–7852
20. Kamemura, K., Hayes, B. K., Comer, F. I., and Hart, G. W. (2002) Dynamic interplay between *O*-glycosylation and *O*-phosphorylation of nucleocytoplasmic proteins: alternative glycosylation/phosphorylation of THR-58, a known mutational hot spot of c-Myc in lymphomas, is regulated by mitogens. *J. Biol. Chem.* **277,** 19229–19235
21. Zhu, W., Leber, B., and Andrews, D. W. Cytoplasmic *O*-glycosylation prevents cell surface transport of E-cadherin during apoptosis. *EMBO J.* **20,** 5999–6007, 2001
22. Zachara, N. E., and Hart, G. W. (2004) O-GlcNAc a sensor of cellular state: the role of nucleocytoplasmic glycosylation in modulating cellular function in response to nutrition and stress. *Biochim. Biophys. Acta* **1673,** 13–28
23. Sohn, K. C., Lee, K. Y., Park, J. E., and Do, S. I. (2004) OGT functions as a catalytic chaperone under heat stress response: a unique defense role of OGT in hyperthermia. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **322,** 1045–1051
24. Cole, R. N. and Hart, G. W. (2001) Cytosolic *O*-glycosylation is abundant in nerve terminals. *J. Neurochem.* **79,** 1080–1089
25. Windheim, M., Peggie, M., and Cohen, P. (2008) Two different classes of E2 ubiquitin-conjugating enzymes are required for the mono-ubiquitination of proteins and elongation by polyubiquitin chains with a specific topology. *Biochem. J.* **409**, 723–729
26. Parodi, A. J. (2000) Protein glucosylation and its role in protein folding. *Annu. Rev. Biochem.* **69,** 69–93
27. Cacan, R., Duvet, S., Kmiecik, D., Labiau, O., Mir, A. M., and Verbert, A. (1998) 'Glyco-deglyco' processes during the synthesis of *N*-glycoproteins. *Biochimie (Paris)* **80,** 59–68

Received for publication December 18, 2007.
Accepted for publication March 27, 2008.

© 2009 Tous droits réservés. http://doc.univ-lille1.fr

PUBLICATION 6

© 2009 Tous droits réservés.

http://doc.univ-lille1.fr

Thèse de Vanessa Dehennaut, Lille 1, 2008

Does *O*-GlcNAc play a role in neurodegenerative diseases?

Tony Lefebvre†, Céline Guinez, Vanessa Dehennaut, Olivia Beseme-Dekeyser, Willy Morelle and Jean-Claude Michalski

There are several lines of evidence that the modification of proteins by cytosolic- and nuclear-specific *O*-linked *N*-acetylglucosamine (*O*-GlcNAc) glycosylation is closely related to neuropathologies, particularly Alzheimer's disease. Several neuronal proteins have been identified as being modified with *O*-GlcNAc; these proteins could form part of the inclusion bodies found, for example, in the most frequently observed neurologic disorder (i.e., Alzheimer's disease; Tau protein and β-amyloid peptide are the well known aggregated proteins). *O*-GlcNAc proteins are also implicated in synaptosomal transport (e.g., synapsins and clathrin-assembly proteins). Inclusion bodies are partly characterized by a deficiency in the ubiquitin–proteasome system, avoiding the degradation of aggregated proteins. From this perspective, it appears interesting that substrate proteins could be protected against proteasomal degradation by being covalently modified with single N-acetylglucosamine on serine or threonine, and that the proteasome itself is modified and regulated by *O*-GlcNAc (in this case the turnover of neuronal proteins correlates with extracellular glucose). Interestingly, glucose uptake and metabolism are impaired in neuronal disorders, and this phenomenon is linked to increased phosphorylation. In view of the existence of the dynamic interplay between *O*-GlcNAc and phosphorylation, it is tempting to draw a parallel between the use of glucose, *O*-GlcNAc glycosylation and phosphorylation. Lastly, the two enzymes responsible for *O*-GlcNAc dynamism (i.e., *O*-GlcNAc transferase and glucosaminidase) are both enriched in the brain and genes that encode the two enzymes are located in two regions that are found to be frequently mutated in neurologic disorders. The data presented in this review strongly suggest that *O*-GlcNAc could play an active role in neurodegenerative diseases.

Expert Rev. Proteomics 2(2), xxx–xxx (2005)

CONTENTS

OGT & glucosaminidase: the partners that make *O*-GlcNAc versatile
OGT
GlcNAcase
O-GlcNAc in brain: autopsy of *O*-GlcNAc glycosylation
Tau: the best characterized neuronal *O*-GlcNAc protein
Numerous vesicular transport proteins are modified with *O*-GlcNAc
Proteasomal degradation & neuronal diseases
Glucose in *O*-GlcNAc metabolism: importance of glucose in brain
Expert opinion
Five-year view
Key issues
References
Affiliations

†Author for correspondence
UMR 8576, Centre National de la Recherche Scientifique, Laboratoire de Chimie-Biologique, Bâtiment C9, 59655 Villeneuve d'Ascq, France
Tel.: +33 320 434 155
Fax: +33 320 436 555
tony.lefebvre@univ-lille1.fr

KEYWORDS:
β-amyloid, neuronal disorders, *O*-GlcNAc, proteasome, Tau, vesicular transport

Glycosylation of serine and threonine residues in cytosolic and nuclear proteins with single *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) has been proven crucial for cell life during the past 20 years [1]. The structural simplicity of *O*-GlcNAc, its localization and versatility have put this single monosaccharide on the fringe of classic glycosylation. The most remarkable feature of *O*-GlcNAc is its ability to counteract phosphorylation at the same or neighboring sites on the peptide backbone. This conclusion was drawn by mapping *O*-GlcNAc sites at, or near, known phosphorylation sites [2,3] and by using kinase and phosphatase inhibitors that lead either to an increase or a decrease in the *O*-GlcNAc process [4,5]. One of the consequences of the existing competition between these two post-translational modifications on the same protein is that it results in differences in the behavior, which are mainly due to physical differences induced by these two post-translational modifications: the neutrality of *O*-GlcNAc sugar strikingly contrasts with the acidity of phosphorylation, the first being uncharged regardless of the pH, whereas the second is negatively charged at a physiologic pH (the conformational differences of the protein generate an assembly with different partners, so the activity may be modified (FIGURE 1). It is important to note that not all phosphorylation sites are in competition with *O*-GlcNAc and vice versa. This implicates that the functions of

10.1586/14789450.2.2.xxx
© 2005 Future Drugs Ltd
ISSN 1478-9450

© 2009 Tous droits réservés.
http://doc.univ-lille1.fr

Thèse de Vanessa Dehennaut, Lille 1, 2008

O-GlcNAc do not all ensue from this dynamic interplay. Beyond this existing competition between *O*-GlcNAc and phosphate, the functions of glycosylation remain unclear. However, it appears obvious that *O*-GlcNAc plays a critical role in:

- Transcriptional processes, with the modification of RNA polymerase II
- Transcription factors (i.e., repressors and histone deacetylase)
- Protein traffic (glycosylation of COPII is implicated in vesicular transport and glycosylation of nucleoporins has a role in nuclear translocation)
- Protein stability (modification of proteins to be protected against proteasomal degradation [6–8] and of the proteasome itself [9,10])

Several lines of evidence suggest that *O*-GlcNAc could be critical in many diseases such as cancers or diabetes and that any dysfunction in the regulation of the glyco–deglyco process could contribute to brain disorders.

This review will focus on the various ways in which modifications in *O*-GlcNAc could be involved in neurologic pathologies.

OGT & glucosaminidase: the partners that make *O*-GlcNAc versatile

The nucleocytoplasmic enzymes that are responsible for the versatility of *O*-GlcNAc are both well studied: the first transfers GlcNAc groups from UDP-GlcNAc onto serine and threonine residues of the peptidic backbone, and the second hydrolyzes them. They are respectively known as *O*-linked *N*-acetylglucosaminyl transferase (OGT) and *O*-linked *N*-acetylglucosaminidase (GlcNAcase). These enzymes are particularly enriched in the cytosol of synaptosomes [11].

OGT

Features of O*-linked* N*-acetylglucosaminyltransferase*

OGT (uridine diphospho-*N*-acetylglucosamine: polypeptide β-*N*-acetylglucosaminyltransferase) was first characterized in rat cytosolic liver and in extracts of rabbit reticulocyte membranes [12,13]. The enzyme is highly conserved, with 80% homology between *Caenorhabditis elegans* and human. OGT migrates as two bands by sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE): the first (α) has a molecular weight of 110 kDa and the second (β) a molecular weight of 78 kDa. The 78-kDa unit is thought to be a proteolytic form of the 110 kDa one. Numerous tissues, of which brain is one, only contain the α-subunit (110 kDa). OGT is enriched in the pancreas (β-cells) and brain, however, it is also found in plants, where it is named SPINDLY and is involved in the gibberellin pathway (hormones that have various functions in plant growth and development) [14]. OGT is phosphorylated on a tyrosine residue and is itself *O*-GlcNAc glycosylated, suggesting an autoregulation via the monosaccharide. OGT is reported to bear homology with a large group of various sugar processing enzymes that includes glycogen phosphorylase, UDP-GlcNAc-2-epimerase and MurG, a glycosyl transferase [15]. Proteins homologous to OGT form a large superfamily known as the glycogen phosphorylase/glycogen transferase family.

The gene that encodes OGT is located on the Xq13 chromosomal region [16,17], and Cre-loxP recombination has shown that OGT was necessary for embryonic stem cell viability [17]. Other research efforts (on the molecular mechanism by which growth factors regulate hematopoietic cell viability or apoptosis) have demonstrated that OGT was also involved in the prevention of apoptosis [18].

Recently, alloxan, a β-cell toxin that shares analogy with uracil, was described as an inhibitor of OGT [19]. Alloxan blocked both glucosamine- and streptozotocin-induced protein glycosylation. Nevertheless, this inhibitor is also able to block β-cell glucokinase and may even inhibit other enzymes recognizing uracil moieties.

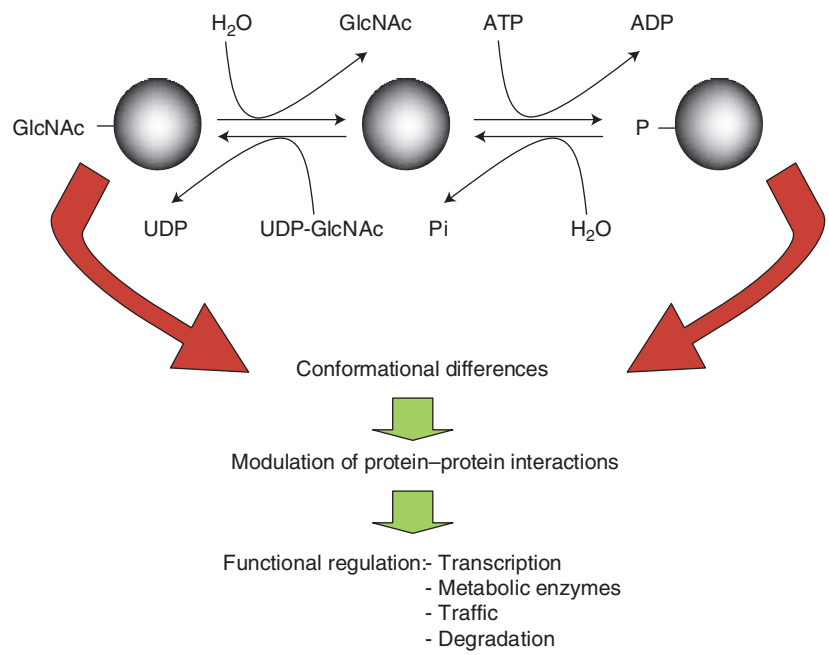


Figure 1. Hypothetical model by which *O*-GlcNAc regulates protein activity. *O*-GlcNAc and phosphorylation could be reciprocal on a same serine or threonine residue or on adjacent sites. Since *O*-GlcNAc glycosylation and phosphate differ by their charge (at physiologic pH, phosphate is negatively charged, whereas *O*-GlcNAc is uncharged), this physical difference induces a localized modification in the conformation of the protein (local deformation). The protein conformation is then modified and as a consequence interacting partners differ (since the recognized form is not the same). This finally leads to a regulation of protein functions.
GlcNAc: *N*-acetylglucosamine.

© 2009 Tous droits réservés. http://doc.univ-lille1.fr

OGT partners

OGT contains 9–13 tetratricopeptides (TPR) [20], a 34-amino acid protein–protein interaction domain found in a plethora of proteins [21], which is localized at the N-terminus and that is involved in interactions with other proteins. Different partners that physically interact with OGT have been described. Using a yeast two-hybrid assay, Iyer and coworkers have shown that GRIF1 (GABAA receptor-interacting factoR1) and its homolog, OIP106, are OGT-interacting proteins [22]. Both proteins, which contain coiled-coil domains, interact with the TPR of OGT. RNA polymerase II also coimmunoprecipitated with OGT and OIP106, suggesting that OIP106 targets OGT to the transcriptional machinery in order to glycosylate many of its components. In the same field, Yang and coworkers have highlighted a new mechanism by which transcription can be repressed [23]. OGT is recruited to promoters by the corepressor mSin3A, where it glycosylates many factors of the transcriptional machinery. This mechanism could act in parallel with histone deacetylation to promote gene silencing. Lastly, OGT has been shown to interact with the serine/threonine protein phosphatase (PP)1-β and PP1-γ [24]. OGT and PP1 could work in co-operation: PP1 should dephosphorylate sites that could be subsequently modified by OGT. This could be one way in which OGT is regulated.

TPRs have been shown to directly interact with *O*-GlcNAc-modified substrates such as OIP106 or p62 [25]. For OIP106, Iyer and Hart showed that it was TPR 2–6 that were important for glycosylation by OGT. Additionally, the isolated TPR domain of OGT competitively inhibited glycosylation of the OGT-interacting protein. These studies demonstrated the pivotal importance of TPR in substrate glycosylation.

Importance of OGT in brain

In several reports, it has been demonstrated that *O*-GlcNAc has important functional roles for physiologic processes in neuronal cells. Recently, it was shown that both OGT and *O*-GlcNAc were enriched in brain and particularly in hippocampal neurons [26] and Purkinje cells [26,27]. Using fluorescent-tagged anti-OGT antibody in Purkinje cells, OGT was shown to be particularly enriched in the nucleus, perikaryon and dentrites. At the subcellular level electron microscopy revealed that OGT was enriched in euchromatin, cytoplasmic matrix, at the nerve terminal and around microtubules in dentrites. In the nerve terminal, OGT was localized with a high density in the presynaptic terminal, rather than in postsynaptic terminals [27]. These results were corroborated using an anti-*O*-GlcNAc antibody. Finally, as mentioned above, OGT is located in the Xq13 region, which is known to contain genes involved in X-linked Parkinson's disease [14].

GlcNAcase

O-GlcNAcase has been purified for the first time from rat spleen [28] and has recently been cloned [29]. *O*-GlcNAcase gene maps to the chromosomal location 10q24, a region associated with Alzheimer's disease (AD) and other neurologic disorders [30,31].The protein encoded by the gene contains 916 amino acids and has a molecular weight of 103 kDa. As OGT, *O*-GlcNAcase is a nucleocytoplasmic enzyme that is distributed in all tissues and is particularly abundant in brain, skeletal muscle and pancreas. *O*-GlcNAcase was originally known as a hyaluronidase, and it was also referred to as hexosaminidase C (with a near-neutral pH optimum in contrast with hexosaminidase A and B, which are lysosomal and have acidic pH optima). Two inhibitors are known for *O*-GlcNAcase: streptozotocin, an irreversible inhibitor [32], and PUGNAc, *O*-(2-acetamido-2-deoxy D-glucopyranosylidene)amino-*N*-phenylcarbamate [33]. *O*-GlcNAcase did not share protein motifs with other components. Heat shock protein (HSP)110 and heat-shock cognate protein (HSC)70 and intracellular signal transducers (amphiphysin, DRP-2 and calcineurin, deregulations of which have all been associated with neurologic diseases) appear to complex with *O*-GlcNAcase [34].

O-GlcNAcase possesses an intrinsic histone acetyltransferase (HAT) activity [35]. The authors named the enzyme NCOAT for nuclear cytoplasmic *O*-GlcNAcase and acetyltransferase. It is tempting to consider that via its enzymatic activity, *O*-GlcNAcase could reverse the effect of OGT on the inhibition of the transcriptional machinery and could also act through its HAT activity to allow eukaryotic gene transcription.

O-GlcNAc in brain: autopsy of *O*-GlcNAc glycosylation

Many studies have underlined the importance of *O*-GlcNAc in neuronal tissues. *O*-GlcNAc expression has been studied by enzyme-linked immunosorbent assay measurement in healthy mouse cerebellar neurons at different ages. It has been shown that this glycosylation was ubiquitously expressed from embryo (day 10) until adulthood, with no significant difference in the expression of subcellular fractions from mice brains [36]. Labelling with [^{3}H]-galactose has demonstrated an enrichment of rat synaptosome in *O*-GlcNAc proteins [11] and, using enzymatic activities measurement, the authors showed an enrichment of OGT and *O*-GlcNAcase in the nerve terminal [27].

One of the pioneering studies that pointed to the importance of *O*-GlcNAc in neuropathologies was performed by Griffith and Schmitz, who established that the expression of proteins modified with *O*-GlcNAc was significantly upregulated in AD brains compared with age-matched controls (for this purpose the authors used bovine galactosyltransferase in conjunction with [^{3}H]-galactose for the detection of *O*-GlcNAc residues) [37]. In the same field, and using the same technical approach, *O*-GlcNAc levels have been compared in autopsied normal human brains and in human AD brains [38]. Contrary to Griffith and Schmitz, Yao and Coleman concluded that the number of *O*-GlcNAc-containing proteins and overall *O*-GlcNAc level do not appear to be different between AD and control brains (normal age-matched controls). However, this group found a significant change with a marked reduction on a 160 kDa *O*-GlcNAc-bearing protein in AD that they identified as being AP-3. Recently (using also *O*-GlcNAc residues galactosylation with bovine galactosyltransferase), Robertson and coworkers showed that *O*-GlcNAc was reduced in both heat-stable Tau-enriched preparations from AD and fronto-temporal

© 2009 Tous droits réservés. http://doc.univ-lille1.fr

Thèse de Vanessa Dehennaut, Lille 1, 2008

dementia [39]. The authors attributed these discrepancies found between research groups to the methods used to generate fractions and to label terminal sugars. Lastly, the level of *O*-GlcNAc was determined in AD and control brains using radioimmuno dot-blots with anti-*O*-GlcNAc antibody [40]. The *O*-GlcNAc level in AD brains was 22% lower than in control brains. To conclude, it appears clear that *O*-GlcNAc levels tend to decrease in neuronal diseases, and more particularly in AD.

To date, it is difficult to draw up a list of *O*-GlcNAc proteins (between 80 and 120 proteins are known) since it is growing almost every day. Nevertheless, numerous neuronal proteins known to be phosphorylated were reported to be *O*-GlcNAc modified. These proteins are itemized in TABLE I. Importantly, the authors note that even if most of these proteins are implicated in neurodegenerative diseases, it cannot currently be considered or asserted whether or not the glycosylation of these proteins is implicated in such disorders. In other words, it is not clearly established that glycosylation has an impact on the function of these proteins.

Protein aggregation & the β-amyloid peptide

Protein aggregation is one of the characteristic features in neuronal disorders [50]. Protein misfolding, and consequently aggregation, could occur either in the cell itself (with inclusion body formation) or in the extracellular space. Aggregates usually consist of fibers that contain misfolded proteins with a β-sheet conformation, known as amyloid. In Huntington's disease, huntingtin is the main protein that deposits (caused by a CAG repeat that encodes polyglutamine repeats, such as in other polyglutamine diseases with deposits of atrophin-1 or ataxins); in Parkinson's disease α-synuclein aggregates; in amyotrophic lateral schlerosis, the aggregate factor remains unknown; and in Prion diseases the prion protein itself aggregates. The well known case of protein aggregation is that of the extracellular aggregates neuritic plaques (senile plaques) found in AD, the major component of which is the β-amyloid peptide (42 amino acids). β-amyloid peptide is derived from the sequential intracellular cleavage of β-amyloid precursor protein (APP) [1]. APP is an ubiquitously expressed Type I membrane protein that contains a large extracellular region, a transmembrane helix and a short cytoplasmic tail. It is generated by alternative splicing that leads to multiple transcripts in which three variants are mainly expressed in brain: APP695 (the most highly expressed isoform), APP751 and APP770. APP is modified with *O*-linked *N*-acetylglucosamine [41]. It was the first reported plasma protein that bears *O*-GlcNAc residues, whereas the glycosylated sites were not mapped. The relationship between APP, *O*-GlcNAc glycosylation, APP processing and AD is unknown.

Table 1. Identified *O*-GlcNAc neuronal proteins.

O-GlcNAc neuronal proteins	Function	Ref.
β-amyloid precursor	Precursor of the β-amyloid that is involved in amyloid plaque formation	[41]
Microtubule-associated proteins: -MAP1, -2 and -4 (high-molecular-weight) -Tau protein	Promote microtubule assembly and stability	[5,42,43]
Neurofilament H, M and L	Major neuronal intermediate filaments in adult neurons in central and peripheral nervous system. Responsible for maintaining the calibre of axons	[44,45]
Synapsin I	Anchors synaptic vesicles to cytoskeleton	[46]
Ankyrin (node of Ranvier)	Involved in the coupling of the voltage-dependent sodium channel and in bridging the membrane to the spectrin/actin network	[47]
Assembly protein-3	Clathrin assembly protein	[48]
Collapsin response mediator protein-2	Growth cone collapse	[11]
Ubiquitin carboxyl hydrolase-L1	Deubiquitinating enzyme	[11]
β-synuclein	Enriched at the presynaptic membrane and associated with membranes and vesicles	[11]
Sox (sry-related high mobility group box)-2	CNS and embryo transcription factor (belongs to the high-mobility group of minor groove DNA-binding proteins)	[41]
Activating transcription factor-2	Brain-enriched transcription factor that possesses an intrinsic histone acteyltransferase	[49]
PDZ-GEF, postsynaptic density-95, discs large, and Zonula occludens-1-guanine nucleotide-exchange factor	Guanine nucleotide-exchange factor for RAP1/2	[49]
Synaptopodin	Dendritic spine formation	[49]
Bassoon	Synaptic vesicle cycling	[49]

© 2009 Tous droits réservés. http://doc.univ-lille1.fr

Tau: the best characterized neuronal *O*-GlcNAc protein

Structure & function of Tau

Tubulin associated unit (Tau) proteins are part of a group of low-molecular-weight microtubule-associated proteins [52]. They arise from the alternative splicing of a single gene located on chromosome 17 in the 17q21 region. In neurons, Tau proteins promote the assembly, stability and orientation of tubulin monomers into microtubules to constitute the axonal microtubules network. By SDS-PAGE, Tau proteins appear as phosphorylated isoforms with molecular masses ranging from 45 to 70 kDa. Their degree of phosphorylation is a good marker of cell integrity. Structurally, Tau proteins can be divided into three parts: an acidic N-terminal region that contains a projection domain to cytoskeletal components, a central region that contains numerous proline residues and forms a target for proteins kinases, and a basic C-terminal region containing three (3R) or four (4R) tubulin-binding repeats. Phosphorylation sites are mainly located on each side of tubulin-binding repeats except for a few locations inside this domain. Then, the phosphorylation state of Tau proteins is crucial in microtubule assembly. On this point, Tau proteins are disturbed in numerous neurodegenerative disorders. These Tau dysfunctions (which result from Tau aggregation) lead to the collapse of the microtubule network and the presence of intraneuronal lesions. These abnormalities can differ in terms of structure (paired helical filaments [PHF] or straight filaments) or in terms of Tau isoform composition.

Tau O*-GlcNAc modification studies*

Tau proteins are modified by numerous post-translational modifications (this underlines and reinforces the crucial importance of Tau proteins). These post-translational modifications increase the number of Tau isoforms and may imply numerous different functions for the protein. Among these modifications are phosphorylation, glycation (nonenzymatic glycosylation), ubiquitination, proteolysis, *N*-acetylation, *N*- and *O*-glycosylation and *O*-GlcNAc glycosylation.

O-GlcNAc glycosylation of Tau proteins was first demonstrated on bovine Tau, which is modified with 12 or more *O*-GlcNAc at a stoichiometry of 4 moles of *O*-GlcNAc per mole of Tau [43]. Initial site mapping on bovine Tau indicated that one major attachment site for *O*-GlcNAc was localized on the microtubule-binding domain on bovine Tau [43]. Nonpathogenic Tau is modified with two to three moles of phosphate per mole of Tau whereas Tau found in AD could contain up to three to four more *O*-GlcNAc residues. The number of phosphorylated sites can reach 30, both on Tau and PHF-Tau. It appears clear that *O*-GlcNAc could not regulate all phosphorylation sites since it appears that there are more phosphorylation sites than *O*-GlcNAc sites.

O*-GlcNAc & phosphorylation relationship with Tau*

The putative interaction between *O*-GlcNAc and phosphorylation on Tau proteins was studied in a human neuroblastoma cell line [5]. Okadaic acid (a PP1 and -2A inhibitor extracted from marine sponge) induced Tau hyperphosphorylation and was first accompanied by a decrease in the *O*-GlcNAc content of Tau proteins, and secondly by a decrease in the nuclear transport of these proteins. *O*-GlcNAc glycosylation (detected with a lectin that specifically binds *O*-GlcNAc terminal residues) occurred on the less phosphorylated molecules (evidenced with phospho- and nonphospho-Tau-directed antibodies). These studies only indicated a global correlation between *O*-GlcNAc and phosphorylation on Tau but did not point to the exact location where such a relationship occured.

The regulation of Tau phosphorylation by *O*-GlcNAc was conducted on human brain Tau, using a panel of antiphospho-Tau antibodies [40]. *O*-GlcNAc reduced phosphorylation at S199, S202, T205, T212, S214, S262 and S396 in PC12 cells but not at S404. On rat brain slices, *O*-GlcNAc glycosylation reinforced or had no impact on phosphorylation at S202, S214 and S404. The differences found on the two models could be attributed to the composition in Tau proteins. The authors remarkably suggested that these three phosphorylated sites were near a phosphorylation site that was negatively regulated by *O*-GlcNAc: S202 is near S199, S214 is near S212 and T217, and S404 is near S396. Thus, phosphorylation of Tau could be either negatively regulated on the same site by *O*-GlcNAc and, on a proximal site, by phosphorylation. In the same way, studies using Tau- and OGT-cotransfected cells fully corroborated these experiments since Robertson and coworkers showed a decrease in phosphorylation on S202, T212, S214, T231, S396, S404 and S409 when OGT was overexpressed [39]. On the other hand, they did not see any decrease on T181, T205 and S262. Discrepancies between the work of Liu and coworkers and Robertson and coworkers could be related to the cell line used (PC12 cells for the first study and CHO cells in the latter) or to the treatment performed to modify *O*-GlcNAc (treatment with PUGNAc or streptozotocin in the first report, and transfection of OGT in the second one) or phosphorylation (use of okadaic acid in the first study).

Unfortunately, functions of *O*-GlcNAc on Tau remain unclear: does *O*-GlcNAc just counteract the effect of phosphorylation, leading to interactions with different partners, or are *O*-GlcNAc functions more sophisticated? Part of the answer could lie in the competition between *O*-GlcNAc and phosphorylation on Tau proteins, contributing to their nuclear localization. Exact localization of *O*-GlcNAc sites on Tau proteins could help us to understand how these residues could influence the function of these microtubule-associated unit proteins. Since Tau proteins are hyperphosphorylated in many neurodegenerative diseases, this *O*-GlcNAc/phosphorylation competition may be disrupted in the course of such pathologies [5]. The existence of a balance between phosphorylation and *O*-GlcNAc glycosylation could explain why, *in vivo*, hyperphosphorylated Tau proteins that aggregated in paired-helical filaments are devoid of *O*-GlcNAc residues. Hence, *O*-GlcNAc glycosylation may be a marker of healthy brain Tau. Here again, the authors insist on the point that even on Tau, only the balance between *O*-GlcNAc and phosphorylation could not explain all Tau

© 2009 Tous droits réservés. http://doc.univ-lille1.fr

functions and all disorders where Tau intervenes. Not all the phosphorylation sites on Tau could be counteracted by *O*-GlcNAc and vice versa. Consequently, some Tau functions could be related only to phosphorylation.

Numerous vesicular transport proteins are modified with *O*-GlcNAc

CRMP-2, β-synuclein, UCH-L1, synaptodin & bassoon

The nerve terminal is particularly enriched with *O*-GlcNAc glycosylation [11], and both enzymes of cycling *O*-GlcNAc are abundant in the cytosol of synaptosome. Three neuron-specific proteins have been identified among these *O*-GlcNAc proteins: collapsing mediator protein (CRMP)-2, β-synuclein and ubiquitin carboxyl hydrolase (UCH)-L1 [11]. All three phosphoproteins are involved in signal transduction and are linked to neurodegenerative diseases. CRMP-2 is the major protein identified as containing *O*-GlcNAc. It belongs to a group of developmentally regulated proteins and mediates growth cone collapse. β-synuclein belongs to a group of soluble proteins, the synucleins. They are enriched at the presynaptic terminals of neurons and can reversibly associate with synthetic membranes and vesicles. UCH-L1 belongs to a group of deubiquitinating enzymes and is involved in the turnover of proteins. It is known that phosphorylation is involved in the regulation of proteins and membranes trafficking in pre- and postsynaptic nerve terminal and thus, as proposed by the authors, it could be considered that *O*-GlcNAc can counteract the phosphorylation effect on such proteins via the dynamic interplay between *O*-GlcNAc and phosphate, and that a deregulation of this process can play an active role in neurodegeneration.

Most recently, two proteins that are important for synaptic function were identified using a chemoenzymatic approach that utilizes an engineered galactosyltransferase enzyme to selectively label *O*-GlcNAc proteins with a ketone-biotin tag [49]. Proteins identified include the actin-associated protein synaptopodin, which is essential for dendritic spine formation, and bassoon, a scaffolding protein that plays a critical role in synaptic vesicle cycling [49].

Assembly protein-3

One of the clathrin assembly proteins (APs), AP-3, has been well studied in terms of glycosylation. Synaptic vesicles assemble at the presynaptic compartment through a clathrin-dependent mechanism that involves one or more APs, one of which is AP-3. AP-3 is a synapse-specific protein (also known as pp155, AP180, NP185 and F1–20) that is involved in promoting clathrin assembly in clathrin-coated vesicles, probably in synaptic vesicle recycling. *In vivo*, phosphorylation of AP-3 weakens both the binding of AP-2 by AP-3 and the co-operative clathrin binding activity of these proteins [53]. Using pulse-chase experiments, it has been shown that the mature form of AP-3 was also *O*-GlcNAc modified but that the phosphorylated form of AP-3 bound to WGA-sepharose [48]. This indicates that both modifications could be present together on the same molecule. These two post-translational modifications (*O*-GlcNAc and phosphorylation) have been mapped to the central 50 kDa structural domain. Capping of *O*-GlcNAc residues by galactosylation did not affect interaction between AP-3 and clathrin, suggesting that *O*-GlcNAc did not interfere with the interaction between AP-3 and clathrin. Yao and Coleman found a marked reduction on AP-3 in AD, which is negatively correlated with the density of neurofibrillary tangles (i.e., intraneuronal aggregates constituted by hyperphosphorylated Tau proteins) [54]. In fact, it was the level of AP-3 proteins that decreased in AD, while the *O*-GlcNAc/AP-3 ratio remained unchanged. Loss of glycosylated AP-3 may be an earlier event in the pathologic cascade of synapses in AD.

Synapsin I

Synapsin I has also been well characterized in terms of *O*-GlcNAc glycosylation [46]. Synapsin I belongs to a family of five related neuron-specific phosphoproteins (synapsins) associated with synaptic vesicle membranes that are involved in the regulation of neurotransmitter release [55]. They tether synaptic vesicles to actin filaments in a phosphorylation-dependent manner, controlling the number of vesicles available for release at the nerve terminus. A growing body of evidence suggests that synapsins play a significant part in neuronal development. They participate in the formation and maintenance of synaptic contacts among central neurons. Synapsins anchor synaptic vesicles to the cytoskeleton and ensure a steady supply of fusion-competent synaptic vesicles. Synapsins are phosphorylated and it is well known that phosphorylation plays a role in their interactions with synaptic vesicle and the cytoskeleton. Synapsin I is also *O*-GlcNAc glycosylated on seven sites that are present in the B and D domains: S55, T56, T87, S516, T524, T562 and S576 [46]. While these glycosylation sites are located around five phosphorylation sites, it is unlikely that competition between *O*-GlcNAc and phosphate occurs on these residues. With the use of synthetic peptides, the authors demonstrated that *O*-GlcNAc glycosylation at sites T562 and S576 did not strongly modify the Km of the calcium/calmodulin-dependent protein kinase II for phosphorylation at S566.

Sec24p

A study has demonstrated that Sec24p, a component of COPII, was modified with *O*-GlcNAc during interphase, whereas Sec23p, Sec13p, Sec31p or Sar1p were not [56]. When cells started mitosis the glycosylation was lost and Sec24p was phosphorylated. Nevertheless, the putative competition between *O*-GlcNAc and phosphorylation in the regulation of the mechanism by which the endoplasmic reticulum (ER)-to-Golgi transport could be regulated has not been demonstrated.

Proteasomal degradation & neuronal diseases

Aggregated proteins found in neurologic diseases & ubiquitin–proteasome system dysfunction

One of the common characteristics of neurologic diseases is a dysfunction of the ubiquitin–proteasome system (UPS) and the intracellular deposition of aggregated and ubiquitinated proteins [57]. As mentioned above, Parkinson's disease, AD, Huntington's

© 2009 Tous droits réservés. http://doc.univ-lille1.fr

and other polyglutamine diseases, amyotrophic lateral fibrosis and prion diseases are characterized by protein aggregation and inclusion [50]. Protein aggregation can result from three independent failures:

- A defect in the protein that increases its insolubility
- An acceleration of its synthesis
- A defect in its degradation

This concept is largely reinforced since ubiquitin is found in high concentrations in aggregates and in nerve cell death, leading to the conclusion that UPS is deregulated and that the proteasome is inhibited. For example, huntingtin aggregates can be labeled with antibodies directed against ubiquitin that should be regarded as a marker of misfolded proteins and as a signal for proteasome targeting. The pathologic mark of Parkinson's disease is Lewy body formation, which are inclusions of fibrillar and misfolded proteins found in the cytoplasm of neurons near the nucleus. As for Huntington's disease, Lewy bodies can be labeled with antiubiquitin, anti-α-synuclein, antiparkin, antisynphilin, antineurofilaments and antisynaptic vesicle proteins. In amyotrophic lateral sclerosis, ubiquitinated aggregates are also found in patient brains. Finally in prion diseases, pathologies are caused by an abnormally folded prion protein both intra- and extracellularly.

O-GlcNAc glycosylation & proteasomal regulation

Recently, it has been shown that the proteasome machinery was modified with *O*-GlcNAc [9,10] and that it can be regulated by this post-translational modification (OGT modifies the proteasome and inhibits its activity) [10]. Liu and coworkers suggested that since *O*-GlcNAcase was located at the 10q locus [30,31], a chromosomal region frequently mutated during AD, a genetic impairment of *O*-GlcNAcase gene results in a dysfunction of proteasome activity due to the nonhydrolysis of the *O*-GlcNAc inhibitory effect on the 19S regulatory cap. Finally, the proteasome failed to degrade the aggregates (an alternative of this defect is the autophagic pathway). This hypothesis is partly in contradiction with the idea that in neuronal disorders, and more particularly in AD, *O*-GlcNAc tends to decrease. Nevertheless, it appears increasingly likely that when a protein is modified with *O*-GlcNAc, it is less sensitive to proteasomal degradation [6–8]. Consequently, the two phenomena should act in synergy, since if proteins are protected with *O*-GlcNAc, and if the proteasome is inhibited, the degradation rate of proteins will then be greatly reduced.

In another study, Cole and Hart demonstrated that the deubiquitinylation enzyme UCH-L1 was *O*-GlcNAc modified in the synaptosome [11]. It is premature to interpret this result, but it is exciting to put forward that *O*-GlcNAc could also be involved in the regulation of protein targeting at the proteasome by modifying such enzymes: a misregulation of such a process by *O*-GlcNAc could reinforce the effect of *O*-GlcNAc in protein turnover. In this field, it will be very interesting to observe the existence of such a modification on parkin, an E3 ligase catalyzing the addition of ubiquitin to specific substrates targeted to UPS and found in Parkinson's disease. Furthermore, in addition to ubiquitinated substrates found in inclusion, chaperone proteins and proteasome components are also part of these, and this reinforces the problem of UPS dysregulation in neuronal disorders. Recently, the authors' laboratory has shown that chaperones of the HSP70 family share a lectinic activity against GlcNAc residues, and that this biologic function is dramatically enhanced by stress [58]. Such lectinic activity must be studied in neurologic diseases.

Glucose in *O*-GlcNAc metabolism: importance of glucose in brain

Hexosamine biosynthetic pathway

A total of 2–5% of extracellular glucose could be used for the modification of proteins with *O*-GlcNAc through the hexosamine biosynthetic pathway [59]. Interestingly, many proteins involved in the metabolism of glucose are themselves *O*-GlcNAc modified: casein kinase II, glycogen synthase kinase-3 [60] and insulin receptor substrate-1 and -2 [61]. Glutamine:fructose-6-phosphate amido transferase, which catalyzes the conversion of fructose-6-phosphate to glucosamine-6-phosphate, is the rate-limiting enzyme acting in the hexosamine biosynthetic pathway and is considered as the key enzyme [62]. This enzyme can be bypassed by replacement of glucose with glucosamine (directly forming glucosamine-6-phosphate), which allows an enhancement of protein *O*-GlcNAc modification.

Glucose & O-GlcNAc in brain

Glucose metabolism is essential for neural function: it influences many normal cellular processes, from neurotransmitter synthesis to ATP production. Glucose metabolism (and consequently energy) changes in aging brain, both in the insulin and in the acetylcholine signal transduction. Cumulative evidences suggest that during aging and AD, brain actively adapts its glucose metabolism. Glucose is preserved for anabolism and the oxidative utilization of ketone bodies is enhanced [63]. It is suggested that in AD, brain may not follow a suicide but a rescue program. Changes in glucose brain levels have been observed in mainly neurodegenerative diseases and so may be involved in pathologic processes [64]. Thus, starting from the link between glucose and *O*-GlcNAc metabolism and since brain is a great glucose consumer, it is likely that brain may be particularly sensitive to glucose metabolism for its *O*-GlcNAc glycosylation processes.

It is well known that in AD brain, glucose uptake and metabolism are impaired, and it appears that this failure could be a cause of neurodegeneration. Experiments performed on nonhuman primates have clearly demonstrated that a decrease in cerebral glucose consumption correlated with an impairment in memory [65]. Nevertheless, although it clearly appears that *O*-GlcNAc in AD is deficient, this impairment is not understood. To tentatively respond in part to this question, cytosolic protein *O*-GlcNAc levels in 19 AD brains and 15 controls was determined depending on the postmortem time [40]. Nonlinear regression of the analyzed results have shown that in AD brain, *O*-GlcNAc was 22% lower than in controls, indicating compromised *O*-GlcNAc glycosylation in the disease.

© 2009 Tous droits réservés. http://doc.univ-lille1.fr

Thèse de Vanessa Dehennaut, Lille 1, 2008

Glucose & phosphorylation in brain

Several models have described a relationship between glucose level and phosphorylation, involving specific protein kinases. The hypothesis that mitogen-activated protein kinases (MAPKs) form transducers for the damaging effects of high glucose has been tested [66]. MAPKs are involved in the etiology of diabetic neuropathies both via the direct effects of glucose and via glucose-induced oxidative stress.

A link was also established between diabetes and neurofilaments phosphorylation. Changes in the phosphorylation status of neurofilaments could lead to severe impairments in the axon structure and function that may be found in diabetics. Using two animal models of Type 1 diabetes, it was demonstrated that in diabetic animals, an increase in neurofilament phosphorylation occurs via an increase in the phosphorylation of a jun N-terminal kinase (JNK) isoform and of extracellular signal-regulated kinases (ERK), which in turn hyperphosphorylates neurofilaments [67]. In diabetic rat neurons, hyperphosphorylation of neurofilaments may contribute to the distal sensory axonopathy observed in diabetes. It has been suggested that hyperglycemia-induced activation of stress-activated protein kinases (neurofilament kinases such as JNK), may be a primary etiologic event in diabetic neuropathy [68]. Other studies performed on starving mice have shown Tau hyperphosphorylation with a regional selectivity similar to those observed in AD [69]. As for neurofilament, Tau-specific kinases and Ser/Thr phosphatases are involved. During starvation, Tau phosphorylation was accompanied by a decrease in Tau-specific kinase activity: Tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 and cyclin-dependent kinase-5. In this process of Tau hyperphosphorylation, it is also suggested that inhibition of PP2A is predominant.

To conclude on this section, it is currently not possible to correlate an increase of phosphorylation in neuronal disorders to the decrease of *O*-GlcNAc. Nevertheless, using okadaic acid the authors have shown that a dynamic interplay between *O*-GlcNAc glycosylation and phosphorylation could occur on Tau proteins and on many other nonidentified neuronal proteins [5,70].

Expert opinion

This review attempts to collect a maximum of links that have been established between *O*-GlcNAc glycosylation and neurologic diseases. Unfortunately, compared with phosphorylation, very little is known about *O*-GlcNAc and brain disorders; phosphorylation has been well studied in numerous neuronal proteins, the best characterized examples being Tau and neurofilaments. In contrast, *O*-GlcNAc is a relatively recently discovered post-translational modification and studies performed on proteins are more a description of the glycosylation than a study of its biologic significance. For the moment, *O*-GlcNAc's impact in pathologies does not allow us to clearly understand its importance in brain disorders, even if there is evidence of its relationship with such diseases. The first parallel is that enzymes regulating *O*-GlcNAc dynamism are located on chromosomal regions linked to these disorders. However, in order to confirm that these enzymes are involved in such diseases, more studies and experiments need to be performed. The function of *O*-GlcNAc in neuronal proteins must be determined. For instance, according to the existence of the *O*-GlcNAc–phosphorylation balance, a protein in its glycosylated form is likely to have a different role than when it is phosphorylated; however, not all *O*-GlcNAc sites are regulated by phosphorylation. Thus, functions of *O*-GlcNAc are not directly correlated to phosphorylation. An exciting finding is that glycosylated Tau could be a marker for healthy brain in contradiction with

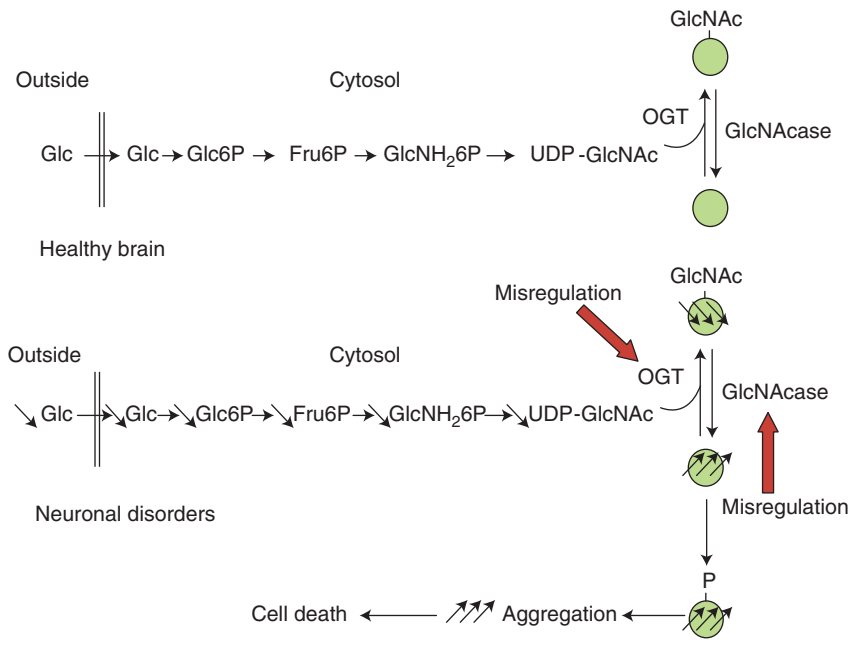


Figure 2. The importance of *O*-GlcNAc in neuropathologies. This scheme summarizes the potential involvement of *O*-GlcNAc in neuropathologies. In healthy brains, both OGT and *O*-GlcNAcase are enriched, allowing for efficient regulation of the glyco–deglyco process with *O*-GlcNAc. When neuronal disorders occur, the two enzymes of the cycling *O*-GlcNAc may be misregulated since they are both located on chromosomal regions that are involved in neurodegenerative disorders. This misregulation is all the more important since enzymes are particularly enriched in the brain. As glucose uptake is affected in such pathologies, this contributes to a deregulation in *O*-GlcNAc (which should particularly decrease). In view of the existence of the balance between *O*-GlcNAc and phosphorylation, phosphorylation increases in neurologic diseases (e.g., Tau), and leads to an enhancement of the aggregation that finally induces cell death.
GlcNAc: *N*-acetylglucosamine; GlcNAcase: *O*-linked *N*-acetylglucosaminidase;
OGT: *O*-linked *N*-acetylglucosaminyl transferase.

© 2009 Tous droits réservés. http://doc.univ-lille1.fr

hyperphosphorylated Tau. Finally, the link drawn between glucose metabolism, phosphorylation and *O*-GlcNAc really needs to be further investigated. FIGURE 2 is a recapitulative scheme of the potential role and implication of *O*-GlcNAc in neuronal disorders.

Five-year view

In the years to come, we should be able to understand the functions of *O*-GlcNAc much better; by locating the exact glycosylation sites of proteins, by knowing the interacting partners in the different protein forms (phosphorylated, unmodified and glycosylated), and by studying conformational changes induced by sugar on neuronal proteins. Research that will be performed on the mechanism by which *O*-GlcNAc processes failed in aging neurons, leading to a perturbation of the phosphorylation status of proteins via the dynamic interplay between *O*-GlcNAc and phosphates, will certainly show one of the key events of neuronal disruption. The authors believe that the answer will be found in glucose metabolism, and those working on gerontology and people working on diabetes will certainly see their research efforts focus on the same point. We hope that these findings will highlight the contribution, and will confirm the critical role of *O*-GlcNAc in neuronal diseases.

Key issues

- Many neuronal proteins are modified with the cytosolic- and nuclear-specific *O-linked N-acetylglucosamine (O*-GlcNAc) post-translational modification.
- Most of these proteins, if not all, are phosphoproteins, and several are involved in neurologic diseases (Tau, amyloid precursor protein, synapsins and neurofilaments).
- Vesicular transport is mediated by numerous *O*-GlcNAc proteins (e.g., assembly protein-3, synapsin or bassoon).
- Two major mechanisms that are impaired during neuronal disorders can be tightly regulated by *O*-GlcNAc: proteasomal-directed protein degradation (substrate proteins), the proteasome itself and enzymes of deubiquitinylation.
- Numerous components involved in the ubiquitin–proteasome system (chaperones, ubiquitinated ligands, structures of proteasome) are localized on inclusion bodies, which are characteristic of misfolded proteins.
- Enzymes that regulate the versatility of *O*-GlcNAc are enriched in brain and particularly in the cytosol of synaptosomes. They are also located on chromosomal regions that are frequently mutated in neurologic disorders.

References

Papers of special note have been highlighted as:
• of interest
•• of considerable interest

1 Slawson C, Hart GW. Dynamic interplay between *O*-GlcNAc and *O*-phosphate: the sweet side of protein regulation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13, 631–636 (2003).

2 Comer FI, Hart GW. Reciprocity between *O*-GlcNAc and *O*-phosphate on the carboxyl terminal domain of RNA polymerase II. *Biochemistry* 40, 7845–7852 (2001).

3 Kamemura K, Hayes BK, Comer FI *et al.* Dynamic interplay between *O*-glycosylation and *O*-phosphorylation of nucleocytoplasmic proteins: alternative glycosylation/phosphorylation of THR-58, a known mutational hot spot of c-Myc in lymphomas, is regulated by mitogens. *J. Biol. Chem.* 277, 19229–19235 (2002).

•• **Using two antibodies, one produced by the authors (one against unmodified Thr58 of c-myc and the other against Thr58 in its glycosylated form) and one commercial antibody (raised against the phosphorylated form of Thr58), the authors indisputably demonstrated the direct relationship between *O*-GlcNAc and phosphorylation.**

4 Griffith LS, Schmitz B. *O*-linked *N*-acetylglucosamine levels in cerebellar neurons respond reciprocally to pertubations of phosphorylation. *Eur. J. Biochem.* 262, 824–831 (1999).

5 Lefebvre T, Ferreira S, Dupond-Wallois L *et al.* Evidence of a balance between phosphorylation and *O*-GlcNAc glycosylation of Tau proteins – A role in nuclear localization. *Biochim. Biophys. Acta* 1619, 167–176 (2003).

6 Han I, Kudlow JE. Reduced *O*-glycosylation of Sp1 is associated with increased proteasome susceptibility. *Mol. Cell. Biol.* 17, 2550–2558 (1997).

•• **First evidence that *O*-GlcNAc could be a protective signal against proteasomal degradation and is the basis of many other studies that demonstrate that one of the functions of glycosylation is to prevent the degradation of proteins.**

7 Cheng X, Cole RN, Zaia J *et al.* Alternative *O*-glycosylation/*O*-phosphorylation of the murine estrogen receptor β. *Biochemistry* 39, 11609–11620 (2000).

8 Hatsell S, Medina L, Merola J *et al.* Plakoglobin is *O*-Glycosylated close to the N-terminal destruction box. *J. Biol. Chem.* 278, 37745–37752 (2003).

9 Sumegi M, Hunyadi-Gulyas E, Medzihradszky KF *et al.* 26S proteasome subunits are *O*-linked *N*-acetylglucosamine-modified in *Drosophila melanogaster. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312, 1284–1289 (2003).

10 Zhang F, Su K, Yang X *et al.* *O*-GlcNAc modification is an endogenous inhibitor of the proteasome. *Cell* 115, 715–725 (2003)

•• **Evidence that *O*-GlcNAc could regulate protein stability not only at the protein level (by modifying the substrate protein), but also in *O*-GlcNAc as an on/off button on the 19S regulatory subunit of 26S proteasome.**

11 Cole RN, Hart GW Cytosolic *O*-glycosylation is abundant in nerve terminals. *J. Neurochem.* 79, 1080–1089 (2001).

12 Haltiwanger RS, Holt GD, Hart GW. Enzymatic addition of *O*-GlcNAc to nuclear and cytoplasmic proteins. Identification of a uridine diphospho-*N*-acetylglucosamine:peptide β-*N*-acetylglucosaminyltransferase. *J. Biol. Chem.* 265, 2563–2568 (1990).

13 Haltiwanger RS, Blomberg MA, Hart GW. Glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins. Purification and characterization of a uridine diphospho-*N*-acetylglucosamine:polypeptide β-*N*-acetylglucosaminyltransferase. *J. Biol. Chem.* 267, 9005–9013 (1992).

14 Swain SM, Tseng TS, Olszewski NE. Altered expression of SPINDLY affects gibberellin response and plant development. *Plant Physiol.* 126, 1174–1185 (2001).

© 2009 Tous droits réservés. http://doc.univ-lille1.fr

15 Wrabl JO, Grishin NV. Homology between *O*-linked GlcNAc transferases and proteins of the glycogen phosphorylase superfamily. *J. Mol. Biol.* 314, 365–374 (2001).

16 Shafi R, Iyer SP, Ellies LG *et al.* The *O*-GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97, 5735–5739 (2000).

17 Nolte D, Muller U. Human *O*-GlcNAc transferase (OGT): genomic structure, analysis of splice variants, fine mapping in Xq13.1. *Mamm. Genome* 13, 62–64 (2002).

18 Fletcher BS, Dragstedt C, Notterpek L *et al.* Functional cloning of SPIN-2, a nuclear anti-apoptotic protein with roles in cell cycle progression. *Leukemia* 16, 1507–1518 (2002).

19 Konrad RJ, Zhang F, Hale JE *et al.* Alloxan is an inhibitor of the enzyme *O*-linked *N*-acetylglucosamine transferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293, 207–212 (2002).

20 Kreppel LK, Blomberg MA, Hart GW. Dynamic glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Cloning and characterization of a unique *O*-GlcNAc transferase with multiple tetratricopeptide repeats. *J. Biol. Chem.* 272, 9308–9315 (1997).

21 Blatch GL, Lassle M. The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein–protein interactions. *Bioessays* 21, 932–939 (1999).

22 Iyer SP, Akimoto Y, Hart GW. Identification and cloning of a novel family of coiled-coil domain proteins that interact with *O*-GlcNAc transferase. *J. Biol. Chem.* 278, 5399–5409 (2003).

23 Yang X, Zhang F, Kudlow JE. Recruitment of *O*-GlcNAc transferase to promoters by corepressor mSin3A: coupling protein *O*-GlcNAcylation to transcriptional repression. *Cell* 110, 69–80 (2002).

24 Wells L, Kreppel LK, Comer FI *et al.* *O*-GlcNAc transferase is in a functional complex with protein phosphatase 1 catalytic subunits. *J. Biol. Chem.* 38466–38470 (2004).

25 Iyer SP, Hart GW Roles of the tetratricopeptide repeat domain in *O*-GlcNAc transferase targeting and protein substrate specificity. *J. Biol. Chem.* 278, 24608–24616 (2003).

26 Liu K, Paterson AJ, Zhang F *et al.* Accumulation of protein *O*-GlcNAc modification inhibits proteasomes in the brain and coincides with neuronal apoptosis in brain areas with high *O*-GlcNAc metabolism. *J. Neurochem.* 89, 1044–1055 (2004).

27 Akimoto, Y, Comer FI, Cole, RN *et al.* Localization of the *O*-GlcNAc transferase and *O*-GlcNAc-modified proteins in rat cerebellar cortex. *Brain Res.* 966, 194–205 (2003).

•• **Thorough study on the localization of *O*-linked N-acetylglucosaminyl transferase (OGT) (mRNA and protein) using *in situ* hybridization histochemistry, immunofluorescence and electron microscopy.**

28 Dong DL, Hart GW Purification and characterization of an *O*-GlcNAc selective *N*-acetyl-β-D-glucosaminidase from rat spleen cytosol. *J. Biol. Chem.* 269, 19321–19330 (1994).

29 Gao Y, Wells L, Comer FI *et al.* Dynamic *O*-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: cloning and characterization of a neutral, cytosolic β-N-acetyl glucosaminidase from human brain. *J. Biol. Chem.* 276, 9838–9845 (2001).

30 Bertram L, Blacker D, Mullin K *et al.* Evidence for genetic linkage of Alzheimer's disease to chromosome 10q. *Science* 290, 2302–2303 (2000).

31 Myers A, Holmans P, Marshall H *et al.* Susceptibility locus for Alzheimer's disease on chromosome 10. *Science* 290, 2304–2305 (2000).

32 Roos MD, Xie W, Su K *et al.* Streptozotocin, an analog of *N*-acetylglucosamine, blocks the removal of *O*-GlcNAc from intracellular proteins. *Proc. Assoc. Am. Physicians* 110, 422–432 (1998).

33 Haltiwanger RS, Grove K, Philipsberg GA. Modulation of *O*-linked N-acetyl glucosamine levels on nuclear and cytoplasmic proteins *in vivo* using the peptide *O*-GlcNAc-β-N-acetyl glucosaminidase inhibitor *O*-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene)amino-N-phenylcarbamate. *J. Biol. Chem.* 273, 3611–3617 (1998).

34 Wells L, Gao Y, Mahoney JA *et al.* Dynamic *O*-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: further characterization of the nucleocytoplasmic β-*N*-acetylglucosaminidase, *O*-GlcNAcase. *J. Biol. Chem.* 277, 1755–1761 (2002).

35 Toleman C, Paterson AJ, Whisenhunt TR, Kudlow JE. Characterization of the histone acetyltransferase (HAT) domain of a bifunctional protein with activable *O*-GlcNAcase and HAT activities. *J. Biol. Chem.* 279, 53665–53673 (2004).

36 Rex-Mathes M, Werner S, Strutas D *et al.* *O*-GlcNAc expression in developing and aging mouse mouse brain. *Biochimie* 83, 583–590 (2001).

37 Griffith LS, Schmitz B. *O*-linked *N*-acetylglucosamine is upregulated in Alzheimer brains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 213, 424–431 (1995).

38 Yao PJ, Coleman PD. Reduction of *O*-linked *N*-acetylglucosamine-modified assembly protein-3 in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 18, 2399–2411 (1998).

39 Robertson LA, Moya KL, Breen KC. The potential role of tau protein *O*-glycosylation in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 6, 489–495 (2004).

40 Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I *et al.* *O*-GlcNAcylation regulates phosphorylation of tau: a mechanism involved in Alzheimer's disease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101, 10804–10809 (2004).

41 Griffith LS, Mathes M, Schmitz B. β-amyloid precursor protein is modified with *O*-linked N-acetylglucosamine. *J. Neurosc. Res.* 41, 270–278 (1995).

42 Ding M, Vandre DD. High molecular weight microtubule-associated proteins contain *O*-linked-N-acetylglucosamine. *J. Biol. Chem.* 271, 12555–12561 (1996).

43 Arnold CS, Johnson GV, Cole RN *et al.* The microtubule-associated protein tau is extensively modified with *O*-linked *N*-acetylglucosamine. *J. Biol. Chem.* 271, 28741–28744 (1996).

44 Dong DL, Xu, ZS, Hart GW *et al.* Cytoplasmic *O*-GlcNAc modification of the head domain and the KSP repeat motif of the neurofilament protein neurofilament-H. *J. Biol. Chem.* 271, 20845–20852 (1996).

45 Al-Chalabi A, Miller CC. Neurofilaments and neurological disease. *Bioessays* 4, 346–355 (2003).

46 Cole RN, Hart GW. Glycosylation sites flank phosphorylation sites on synapsin I: *O*-linked N-acetylglucosamine residues are localized within domains mediating synapsin I interactions. *J. Neurochem.* 73, 418–428 (1999).

47 Zhang X, Bennett V. Identification of *O*-linked *N*-acetylglucosamine modification of ankyrinG isoforms targeted to nodes of Ranvier. *J. Biol. Chem.* 271, 31391–31398 (1986).

48 Murphy JE, Hanover JA, Froehlich M *et al.* Clathrin assembly protein AP-3 is phosphorylated and glycosylated on the 50-kDa structural domain. *J. Biol. Chem.* 269, 21346–21352 (1994).

49 Khidekel N, Ficaro SB, Peters EC *et al.* Exploring the *O*-GlcNAc proteome: direct identification of *O*-GlcNAc-modified proteins from the brain. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101, 13132–13137 (2004).

© 2009 Tous droits réservés.

http://doc.univ-lille1.fr

• **A new strategy for studying the *O*-GlcNAc proteome. This approach utilizes an engineered galactosyltransferase enzyme to selectively label *O*-GlcNAc proteins with a ketone-biotin tag. It permits the identification of 25 new *O*-GlcNAc proteins.**

50 Ross CA, Poirier MA. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nature Med.* 10, S10–S17 (2004).

•• **Interesting review on the link between protein aggregation and the more common neuronal disorders.**

51 Wolfe MS. Secretase as a target for Alzheimer's disease. *Curr. Top. Med. Chem.* 2, 371–383 (2002).

52 Delacourte A, Buee L. Tau pathology: a marker of neurodegenerative disorders. *Curr. Opin. Neurol.* 13, 371–376 (2000).

•• **Exhaustive review on Tau proteins.**

53 Hao W, Luo Z, Zheng L *et al.* AP180 and AP-2 interact directly in a complex that co-operatively assembles clathrin. *J. Biol. Chem.* 274, 22785–22794 (1999).

54 Yao PJ, Coleman PD. Reduced *O*-glycosylated clathrin assembly protein AP180: implication for synaptic vesicle recycling dysfunction in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 252, 33–36 (1998).

55 Ferreira A, Rapoport M. The synapsins: beyond the regulation of neurotransmitter release. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 589–595 (2002).

56 Dudognon P, Maeder-Garavaglia C, Carpentier JL *et al.* Regulation of a COPII component by cytosolic *O*-glycosylation during mitosis. *FEBS Lett.* 561, 44–50 (2004).

57 Bence NF, Sampat RM, Kopito RR. Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science.* 292, 1552–1555 (2001).

58 Guinez C, Lemoine J, Michalski J-C *et al.* 70-kDa heat shock protein presents an adjustable lectinic activity towards *O*-linked N-acetylglucosamine *Biochem. Biophys. Res. Com.* 319, 21–26 (2004).

59 Wells L, Vosseller K, Hart GW. A role for N-acetylglucosamine as a nutrient sensor and mediator of insulin resistance. *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 222–228 (2003).

60 Lubas WA, Hanover JA. Functional expression of *O*-linked GlcNAc transferase. Domain structure and substrate specificity. *J. Biol. Chem.* 275, 10983–10988 (2000).

61 Patti ME, Virkamaki A, Landaker EJ *et al.*, Activation of the hexosamine pathway by glucosamine *in vivo* induces insulin resistance of early postreceptor insulin signaling events in skeletal muscle. *Diabetes* 48, 1562–1571 (1999).

62 Sayeski PP, Kudlow JE. Glucose metabolism to glucosamine is necessary for glucose stimulation of transforming growth factor-α gene transcription. *J. Biol. Chem.* 271, 15237–15243 (1996).

63 Heininger K. A unifying hypothesis of Alzheimer's disease. IV. Causation and sequence of events. *Rev. Neurosci.* 11, 213–328 (2000).

• **Interesting view on metabolism in Alzheimer's disease.**

64 Hoyez S. Risk factors for Alzheimer's disease during aging. Impacts of glucose/energy metabolism. *J. Neural. Transm. Suppl.* 54, 187–194 (1998).

65 Blaizot X, Meguro K, Millien I *et al.* Correlations between visual recognition memory and neocortical and hippocampal glucose metabolism after bilateral rhinal cortex lesions in the baboon: implications for Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 21, 9166–9170 (2002).

66 Purves T, Middlemas A, Agthong S *et al.* A role for mitogen-activated protein kinases in the etiology of diabetic neuropathy. *FASEB J.* 15, 2508–2514 (2001).

67 Fernyhough P, Gallagher A, Averill SA. Aberrant neurofilaments phosphorylation in sensory neurons of rats with diabetic neuropathy. *Diabetes* 48, 881–889 (1999).

68 Fernyhough P, Schmidt RE. Neurofilaments in diabetic neuropathy. *Int. Rev. Neurobiol.* 50, 115–144 (2002).

69 Planel E, Yasutake K, Fujita SC *et al.* Inhibition of protein phosphatases 2A overrides tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3-β and cyclin-dependent kinase 5 inhibition and results in tau hyperphosphorylation in the hippocampus of starved mouse. *J. Biol. Chem.* 276, 34298–34306 (2001).

70 Lefebvre T, Alonso C, Mahboub S *et al.* Effect of okadaic acid on *O*-linked N-acetylglucosamine levels in a neuroblastoma cell line. *Biochim. Biophys. Acta* 1472, 71–81 (1999).

Affiliations

• *Tony Lefebvre, PhD*
UMR 8576, Centre National de la Recherche Scientifique, Laboratoire de Chimie-Biologique, Bâtiment C9, 59655 Villeneuve d'Ascq, France
Tel.: +33 320 434 155
Fax: +33 320 436 555
tony.lefebvre@univ-lille1.fr

• *Céline Guinez*
UMR 8576, Centre National de la Recherche Scientifique, Laboratoire de Chimie-Biologique, Bâtiment C9, 59655 Villeneuve d'Ascq, France
Tel.: +33 320 434 155
Fax: +33 320 436 555

• *Vanessa Dehennaut*
UMR 8576, Centre National de la Recherche Scientifique, Laboratoire de Chimie-Biologique, Bâtiment C9, 59655 Villeneuve d'Ascq, FranceUPRES-EA, 1033 Laboratoire de Biologie du Développement, IFR 118, USTL, Bâtiment SN3, 59655 Villeneuve d'Ascq, France
Tel.: +33 320 434 155
Fax: +33 320 436 555

• *Olivia Beseme-Dekeyser*
UMR 8576, Centre National de la Recherche Scientifique, Laboratoire de Chimie-Biologique, Bâtiment C9, 59655 Villeneuve d'Ascq, France
Tel.: +33 820 434 155
Fax: +33 320 436 555

• *Willy Morelle, PhD*
UMR 8576, Centre National de la Recherche Scientifique, Laboratoire de Chimie-Biologique, Bâtiment C9, 59655 Villeneuve d'Ascq, France
Tel.: +33 320 434 155
Fax: +33 320 436 555

• *Jean-Claude Michalski, PhD*
UMR 8576, Centre National de la Recherche Scientifique, Laboratoire de Chimie-Biologique, Bâtiment C9, 59655 Villeneuve d'Ascq, France
Tel.: +33 320 434 146
Fax: +33 320 436 555

© 2009 Tous droits réservés. http://doc.univ-lille1.fr

PUBLICATION 7

© 2009 Tous droits réservés.

http://doc.univ-lille1.fr

Thèse de Vanessa Dehennaut, Lille 1, 2008

Research Signpost
37/661 (2), Fort P.O., Trivandrum-695 023, Kerala, India

New Developments in Therapeutic Glycomics, 2006: 377-392 ISBN: 81-7736-266-6
Editors: Maryse Delehedde and Hugues Lortat-Jacob

16 Involvement of *O*-linked N-acetylglucosamine in type-2 diabetes, neurological disorders and cancer

Tony Lefebvre, Vanessa Dehennaut, Céline Guinez and Jean-Claude Michalski
Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR 8576, bâtiment C9
Cité Scientifique, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655
Villeneuve d'Ascq, France

Abstract

Glycosylation is with phosphorylation the widespread post-translational modification of proteins since we consider that 50% of proteins are glycosylated. Among all the myriad of glycosylation types that exist, O-GlcNAc is the most abundant found within the cytosolic and nuclear compartments of cells. O-GlcNAc is versatile and can counteract the effect of

Correspondence/Reprint request: Dr. Tony Lefebvre, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle UMR 8576, bâtiment C9, Cité Scientifique, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq, France. E-mail: tony.lefebvre@univ-lille1.fr

© 2009 Tous droits réservés. http://doc.univ-lille1.fr

Thèse de Vanessa Dehennaut, Lille 1, 2008

phosphorylation at the same site or at an adjacent one. While the exact functions of O-GlcNAc are not yet entirely deciphered we know that it is implicated in numerous fundamental processes in cell. A deregulation of its equilibrium could lead to different diseases including type-2 diabetes, neuronal disorders and cancers. Type-2 diabetes is linked to O-GlcNAc since glucose is the major source for UDP-GlcNAc synthesis, the sugar-nucleotide donor for OGT, the enzyme that modifies substrates. Interestingly, OGT is enriched in beta-cells and alloxan (an OGT inhibitor) and streptozotocin (an O-GlcNAcase inhibitor) were known to produce experimental animals diabetes. In addition, numerous components of the insulin transduction pathway are O-GlcNAc modified suggesting a regulation of glucose uptake and metabolism by O-GlcNAc. A plethora of structural proteins, including neuronal proteins (neurofilaments, Tau, beta-amyloid precursor...), and of transcriptional-implicated proteins (transcription factors, oncogenes and tumours suppressors) are also O-GlcNAc. This suggests in the first case a regulation of neuronal diseases progress by a dysfunction of the O-GlcNAc balance and in the second one an involvement of O-GlcNAc in cancer development. In this last example, the glycosylation could take a part in DNA binding, transactivation activity or protein-protein interactions to regulate transcriptional processes, and in the regulation of the cell cycle.

Introduction

Post-translational modifications could regulate protein functions

Recent sequencing of the human genome has revealed with amazement that it only contains 30000 genes against the 100000 expected [1]. How an organism as complex as ours could be regulated by so few components? A part of the response resides in the fact that a protein encoded by a single gene could possess different functions. This functionality is the result in part that many post-translational modifications (PTM) like phosphorylation, acetylation or glycosylation can modulate protein interactions by modifying specific amino-acids (e. g., modification of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain by phosphorylation, glycosylation or without any modification, involves differential transcriptional activity [2]). A protein can also according to its PTM reach a distinct compartment [3] and interact with different partners. In this chapter we will interest more particularly to a glycosylation type named ***O*-GlcNAc** for *O*-linked N-acetylglucosaminylation.

O-GlcNAc is different from *N*- and *O*-glycosylation

O-GlcNAc glycosylation is the modification of proteins by a single residue of N-acetylglucosamine (that is neither epimerized nor elongated) on serine and threonine groups. Hundreds of proteins are modified by this type of

© 2009 Tous droits réservés. http://doc.univ-lille1.fr

Thèse de Vanessa Dehennaut, Lille 1, 2008

glycosylation including structural proteins [4] and particularly numerous neuronal structural proteins such as neurofilaments, synapsin or Tau (for review see [5]) ; proteins playing a role in transcription such as RNA polymerase II [2]; transcriptions factors such as Elf-1 [3], c-Myc [6], Pax-6 [7] or CREB (cAMP response element binding protein) [8], Stat-5 [9] ; co-repressors such as mSin3A [9] and even histone deacetylases such as HDAC1 [10]. *O*-GlcNAc was first evidenced on the surface of intact lymphocytes using bovine milk galactosyltransferase as an impermeant probe [11]. After investigation, it appeared that the finding of *O*-GlcNAc constituted a major breakthrough in glycobiology, and that it challenged two dogmas in our understanding of glycosylation:

- for the first time a glycosylation type was found to have a high content in the cytosolic and nuclear compartments of eukaryota, whereas, until that date, glycosylation had been confined in the lumen of endoplasmic reticulum and Golgi apparatus or to membranous proteins and secretory pathways
- the versatility of *O*-GlcNAc demonstrated that a glycosylation could not be always static (as for *N*-glycans or classical *O*-glycans).

O-GlcNAc is versatile and polyvalent

As was mentioned above, one of the main features of *O*-GlcNAc is its versatility since it is often compared to phosphorylation (for review see [12]). Like phosphorylation-dephosphorylation processes that are regulated by a set of kinases and phosphatases, the glyco-deglyco process is also controlled by two cytosolic and nuclear distributed enzymes (for review see [13]), i.e. the *O*-GlcNAc transferase (OGT) that transfers the monosaccharide from UDP-GlcNAc to the protein [14] and *O*-N-acetylglucosaminidase (*O*-GlcNAcase) that hydrolyses the sugar [15]. Moreover, *O*-GlcNAc could compete with phosphorylation for the same site or in the vicinity, causing mutual exclusion [2, 16]. The consequence of the existing competition between these two PTM on a protein is that it should result in differences in the behaviour of this protein that must be mainly due to physical differences brought by these two PTM: the neutrality of *O*-GlcNAc sugar strikingly contrasts with the acidity of phosphorylation, the first one being uncharged whatever the pH, whereas the second is negatively charged at physiological pH (the conformational differences of the protein engender the assembly with different partners and so activity could be modified).

Beyond this competition between *O*-GlcNAc and phosphate the functions played by the glycosylation is still unclear. Notwithstanding, it appears clearer and clearer that *O*-GlcNAc plays a pivotal role (i) in transcriptional processes both by modifying RNA polymerase II, transcription factors, repressors and histone deacetylase (see above), (ii) in protein trafficking (glycosylation of

© 2009 Tous droits réservés. http://doc.univ-lille1.fr

Thèse de Vanessa Dehennaut, Lille 1, 2008

COPII that is implicated in vesicular transport [17] and glycosylation of nucleoporins that play a role in nuclear translocation [18]), (iii) in protein stability (modification of Heat Shock Proteins [19, 20] that control proteins folding and aggregation, and the proteasome itself [21, 22]), (iv) and in enzymatic activity [4] (figure 1, middle bottom panel).

There are several lines of evidences that *O*-GlcNAc could be determinant in numerous diseases such as cancers or diabetes and that a dysfunction of the regulation of the glyco-deglyco process could contribute to brain disorders.

Glucose, the hexosamine biosynthetic pathway and *O*-GlcNAc: The link to type-2 diabetes?

Insulin resistance and type-2 diabetes development

While under intensive study, development of diabetes (which one of the hallmarks is chronic hyperglycemia) and particularly of type-2 diabetes is unclear. Constant nutrient excess and low energy dispense are two predisposal factors of type-2 diabetes. Insulin resistance (that occurred in pancreatic beta-cells, liver, adipocytes and skeletal muscle) coupled to glucose toxicity is responsible for the complications that include vascular disorders. Insulin resistance inhibits both glucose uptake and glycogen synthesis in skeletal muscle and adipocytes and it is suggested that this resistance to insulin is a manner for the organism to respond to nutrient excess. In the early 90's, Marshall and Traxinger [23], that should be considered as the pioneers in the field of the hexosamine biosynthetic pathway (HBP, see below for more details), remarked that insulin resistance development requires three key components, i. e. glucose, insulin and glutamine. The role of glutamine in the development of type 2 diabetes had to be found in the regulation of the glutamine:fructose-6-phosphate amido-transferase (GFAT), the rate-limiting and key-enzyme acting in the hexosamine biosynthetic pathway, that catalyses the conversion of fructose-6-phosphate in glucosamine-6-phosphate (for review see [24]) (figure 1).

The hexosamine biosynthetic pathway and *O*-GlcNAc synthesis

A few years ago it has been established that *O*-GlcNAc was intimately linked to glucose metabolism (for review see [25]). 2 to 5% of extracellular glucose is used for *O*-GlcNAc modification of proteins through the HBP. *O*-GlcNAc has been postulated to act as a sensor implicated in insulin resistance and in the decrease of glucose uptake by cells. First, the hypothesis of a negative feedback of a glucose transport regulation by the flux of glucose through HBP was advanced in insulin target cells [25]. Second, Robinson et al have shown that when rat hemidiaphragms were incubated in glucosamine or in high glucose, glucose-uptake decreased [26]. Latter, it was shown that

© 2009 Tous droits réservés. http://doc.univ-lille1.fr

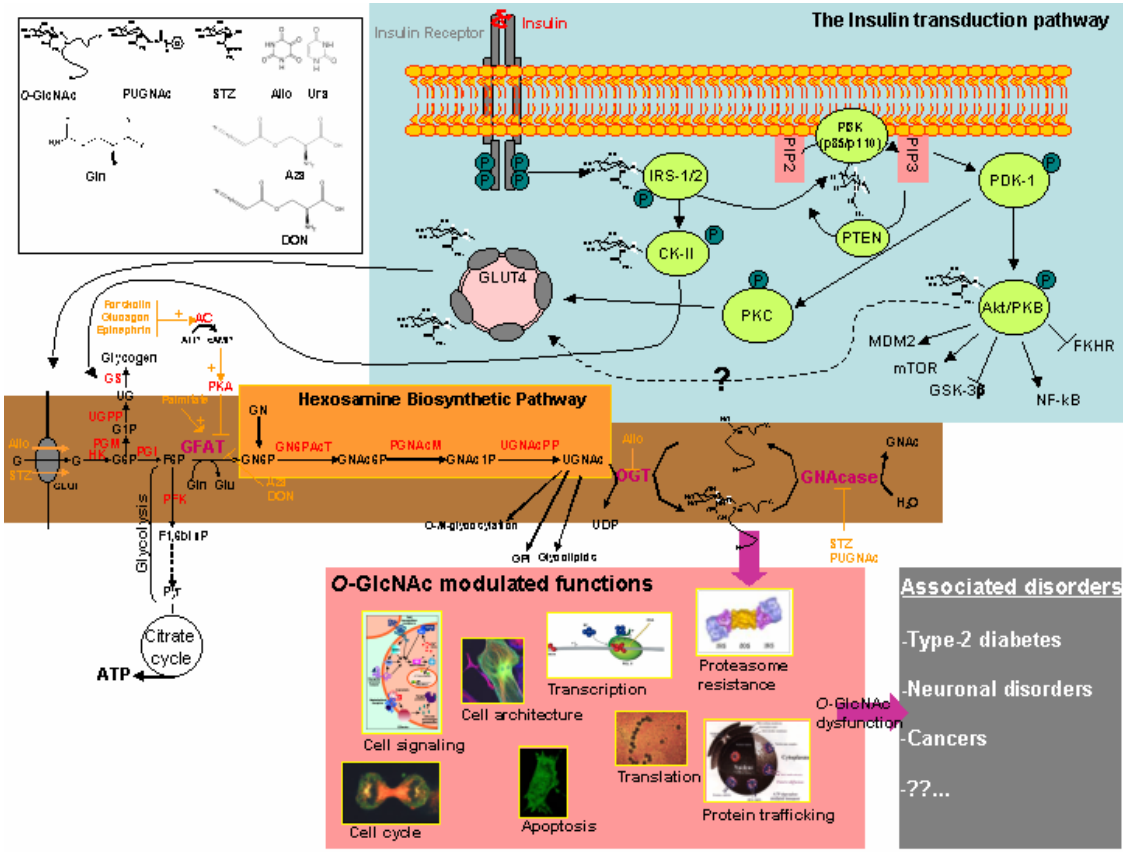


Figure 1. The insulin transduction and the hexosamine biosynthetic pathways. Top left box- Structures of *O*-GlcNAc, alloxan (note the structural similarity with uracil), streptozotocin, PUGNAc, azaserine and DON (note the structural similarities with glutamine). Alloxan is an inhibitor of OGT, STZ and PUGNAc are inhibitors of *O*-GlcNAcase and aza and DON inhibit GFAT.

Conventional and non-conventional abbreviations: AC, adenylate cyclase; **Akt**, RAC (related to the A and C kinases)-alpha serine/threonine-protein kinase; **Allo**, Alloxan; **Aza**, azaserine; cAMP, cyclic-adenosine mono-phosphate; **ATP**, adenosine tri-phosphate; **DON**, 6-Diazo-5-oxo-L-norleucine; **F6P**, fructose-6-phosphate; **F1, 6bisP**, fructose-1, 6-bis phosphate; **FKHR**, Forkhead homolog 1 (rhabdomyosarcoma); **G**, glucose; **GNAc**, N-acetylglucosamine; **G6P**, glucose-6-phosphate; **G1P**, Glucose-1-phosphate; **GN**, glucosamine; **GN6P**, glucosamine-6-phosphate; **GNAc6P**, N-acetylglucosamine-6-phosphate; **GNAc1P**, N-acetylglucosamine-1-phosphate; **GPI**, glycosyla-phosphatidylinositol; **Gln**, glutamine; **Glu**, glutamate; **GLUT**, glucose transporter; **GFAT**, glutamine : fructose-6-phosphate amido-transferase; **GN6PAcT**, glucosamine-6-phosphate acetyl transferase; **GS**, glycogen synthase; **GNAcase**, *O*-GlcNAcase; **GSK-3β**, glycogen synthase kinase-3; **HK**, hexokinase; **IRS-1/2**, insulin receptor subtrates 1 and 2; **mTOR**, mammalian target of rapamycin; **MDM2**, murine double minute 2; **NFκB**, nuclear factor kappa B; **OGT**, *O*-GlcNAc transferase; **PIP2**, phosphatidylinositol-4, 5 bisphosphate; **PIP3**, phosphatidylinositol-3, 4, 5 triphosphate; **PGM**, phospho-glucomutase; **PGNAcM**, phospho-N-acetylglucosamine mutase; **PUGNAc**, *O*-(2-acetamido-2-deoxy-d-glucopyranosylidene)amino-N-phenylcarbamate;

© 2009 Tous droits réservés. http://doc.univ-lille1.fr

Thèse de Vanessa Dehennaut, Lille 1, 2008

Figure 1. Legend continued

Pyr, pyruvate; **PKA**, protein kinase A; **PKB**, protein kinase B (Akt); **PKC**, protein kinase C; **PGI**, phosphoglucose isomerase; **PI3K**, PI-3(phosphatidylinositol-3) kinase (p85/p110); **PDK-1**, phosphatidylinositol-dependent protein kinase-1; **PTEN**, phosphatases and tensin homolog; **STZ**, streptozotocin; **UGNAc**, uridine di-phospho N-acetylglucosamine; **UG**, uridine di-phospho N-acetylglucose; **UDP**, uridine di-phosphate; **UGNAcPP**, uridine di-phospho-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase; **UGPP**, uridine di-phospho-glucose pyrophosphorylase.

glucosamine-induced insulin resistance was accompanied by an increase in UDP-GlcNAc [27]. Using transgenic overexpression of *O*-GlcNAc transferase (OGT) McClain et al. showed a type-2 diabetic phenotype [28]. This observation linked insulin resistance phenomenon to *O*-GlcNAc glycosylation processes. In the same topic, incubation of rat epitrochlearis muscles with PUGNAc, an *O*-GlcNAcase inhibitor (see below), induced an increase in the *O*-GlcNAc level of proteins and a reduced glucose transport, suggesting that *O*-GlcNAc glycosylation of proteins can induce insulin resistance [29]. Taken together these observations strongly support the pivotal role of *O*-GlcNAc in reduced glucose transport and insulin resistance through HBP.

Conversion of glucose to *O*-GlcNAc has been deciphered (figure 1). Once the glucose enters the cell, it is converted to glucose-6-phosphate by hexokinase. Glucose-6-phosphate could be then epimerized in glucose-1-phosphate by phosphoglucomutase, to be activated in UDP-glucose for glycogen synthesis or converted to fructose-6-phosphate by phosphoglucose(hexose) isomerase. A few amount of fructose-6-phosphate is converted to glucosamine-6-phosphate by GFAT (the majority of fructose-6-phosphate is directed to glycolysis). Glucosamine-6-phosphate is acetylated in N-acetyl glucosamine-6-phosphate through the action of the glucosamine-6-phosphate N-acetyltransferase, epimerized in N-acetyl glucosamine-1-phosphate by phosho-N-acetylglucosamine mutase and activated to UDP-GlcNAc by UDP-GlcNAc pyrophosphorylase. UDP-GlcNAc then serves for the glycosylation of both *O*-glycosylation (including *O*-GlcNAc) and *N*-glycosylation, glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor and glycolipids. Note that glucosamine is able to go round GFAT to enhance *O*-GlcNAc glycosylation and to provoke itself insulin resistance.

Insulin signal transduction and *O*-GlcNAc

Insulin resistance effect, and so glucose-uptake decrease was correlated with a defect in GLUT4 glucose transporter to the plasma membrane [30]. In normal conditions vesicles that contain GLUT4 transporter are translocated to the plasma membrane in response to glucose stimulation and permit glucose to

© 2009 Tous droits réservés. http://doc.univ-lille1.fr

enter adipocytes or skeletal muscle cells. Mechanism by which GLUT4 can not integrate plasma membrane in insulin-resistance is not known, but the Akt pathway could be the track by which this process failed [31] (figure 1). After insulin binds to its receptor, an activation of the intrinsic tyrosine kinase activity is triggered. Insulin receptor substrates are recruited to insulin receptors (IRS1/2) and are themselves tyrosine phosphorylated. PI-3(phosphoinoside-3) kinase (p85/p110) migrates to the plasma membrane and phosphorylates phosphatidylinositol-4, 5 bisphosphate (PIP2) to phosphatidylinositol-3, 4, 5 triphosphate (PIP3). PDK-1 (phosphatidylinositol-dependent protein kinase-1) is then activated and phosphorylates protein kinase B/Akt that in turn phosphorylates different substrates including GSK-3β (figure 1). The link between Akt and GLUT4 is not really established and it is not know how at this stage insulin resistance occurred. Nevertheless, numerous compounds of the insulin pathway or involved in glucose metabolism have been described to be *O*-GlcNAc modified: Akt, GLUT4, casein-kinase II, glycogen synthase kinase-3 [32] and IRS-1 and 2 [33] (figure 1). Based on this knowledge it is easy to suppose that *O*-GlcNAc could play an active part in insulin resistance by the defect of glycosylation of one or other component. Since glucose and *O*-GlcNAc are linked, one can suppose that a defect in *O*-GlcNAc metabolism will be reflected on insulin pathway and so to a decrease in glucose uptake.

Diabetogenics drugs and *O*-GlcNAc

Three inhibitors of the cycling *O*-GlcNAc enzymes are currently used. *O*-N-acetylglucosaminidase could be inhibited by two drugs, streptozotocin (STZ, 2-deoxy-2-(3-(methyl-3-nitrosoureido)-D-glucopyranose) and PUGNAc (*O*-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene)amino-N-phenylcarbamate) and OGT is inhibited by alloxan, an uracile analogue [34] (figure 1, left top box). Alloxan and STZ are widely used to induce experimental diabetes in animals [35]. Their action on beta-cells is deciphered and well-described [35]. Both are rapidly transported into the cell by the GLUT2 transporter. Resultant experimental diabetes is the consequence of the generation of free radicals products (reactive oxygen species), but the mechanism of inhibition is different between alloxan and STZ.

In solution, alloxan (which is hydrophilic and unstable) is in equilibrium with its reduction product, dialuric acid that generates superoxide radicals ($O_2^{\cdot}$) through a redox cycle. Under the action of superoxide dismutase, superoxide radicals form hydrogen peroxide (H_2O_2). These hydrogen peroxide molecules sustain the Fenton reaction in the presence of Fe^{2+} ions and are then splinted into two hydroxyl radicals ($OH^{\cdot}$). These radicals are highly toxic for the cell (especially beta-cells) and in conjunction with an increase flux of calcium into

© 2009 Tous droits réservés. http://doc.univ-lille1.fr

Thèse de Vanessa Dehennaut, Lille 1, 2008

the cells, they provoke beta-cells death and consequently an inhibition of insulin secretion.

STZ provokes DNA alkylation through its nitrosourea group particularly on the O^6 of guanine. Damaged DNA induces an activation of ADP-ribosylation and poly-ADP-ribosylation results in the consummation of NAD^+ and ATP leading to the depletion of these two molecules. The nitrosourea group is also a source of NO when STZ is metabolized into the cell.

Starting from the diabetogenic effects of alloxan and STZ through the formation of free radicals and since these drugs are OGT and *O*-GlcNAcase inhibitors, it can be suppose a synergistic action of alloxan and STZ in experimental diabetes development. As we discussed above, *O*-GlcNAc seems to take an active part on the development of insulin resistance and glucose toxicity, and this role must be amplified by the fact that OGT is particularly enriched in pancreas [36]. This explains why STZ is so toxic for beta-cells: high expression of OGT results in high *O*-GlcNAc levels in beta-cells that can not be counteract by the inhibited *O*-GlcNAcase.

O-GlcNAc and neuronal disorders

Importance of *O*-GlcNAc in the central nervous system

While it is difficult to draw up the list of the *O*-GlcNAc proteins (more than 120 *O*-GlcNAc proteins are known to date), numerous neuronal proteins known to be phosphorylated were reported to be *O*-GlcNAc modified (for review see [5]). Most of them are implicated in neurodegenerative diseases: Tau and beta-amyloid being the best example in Alzheimer's disease (AD) and neurofilaments in lateral amyotrophic sclerosis and AD.

The three following points underline the importance of *O*-GlcNAc metabolism in neurons:

- the study of *O*-GlcNAc expression in healthy mouse cerebellar neurons of different ages [37] has shown that the glycosylation is ubiquitously expressed from embryo (day 10) until adulthood, with no significant difference in expression of subcellular fractions from mice brains,
- rat synaptosome is enriched in *O*-GlcNAc proteins [38] and nerve terminal are enriched in enzymes regulating the *O*-GlcNAc process [39].
- neuronal cultured-cells (Kelly) are more susceptible to the misbalance between *O*-GlcNAc and phosphorylation provoked by okadaic acid (a broad spectrum phosphatases inhibitor) than HeLa or Cos cells [40].

The first works performed in autopsied normal human brain and in human AD brains were that of Griffith and Schmitz who established that the expression of proteins modified with *O*-GlcNAc was significantly up-regulated in AD brains compared to age-matched control brains [41]. On the other hand Yao and

© 2009 Tous droits réservés. http://doc.univ-lille1.fr

Thèse de Vanessa Dehennaut, Lille 1, 2008

Coleman did not found any difference in the *O*-GlcNAc proteins level between AD and control brains (normal age-matched controls) except for a 160 kDa *O*-GlcNAc protein for which a marked decrease was observed in AD. This protein has been identified as AP-3 [42]. More recently, Robertson et al. showed that *O*-GlcNAc was reduced both in heat-stable Tau-enriched preparations from AD and fronto-temporal dementia [43]. These authors imputed the discrepancies found between the research groups on the methods used to generate fractions and to label terminal sugars.

Protein aggregation in neuronal disorders

Protein aggregation and ubiquitin-proteasome system (UPS) dysfunction are two characteristic features of neurological diseases (for review see [44]). Protein misfolding and then aggregation could occur either in the cell itself (with inclusion body formation) or in the extracellular space.

Aggregates usually consist in fibers that contain misfolded proteins with a beta-sheet conformation, termed amyloid:

- in Huntington's disease, huntingtin is the main protein that deposits. This aggregation is caused by a CAG repeat coding for a polyglutamine strench (as other polyglutamine diseases).
- in Parkinson's disease, it is the alpha-synuclein that aggregates
- in amyotrophic lateral sclerosis, the aggregate factor remains unknown to date
- in Prion diseases it is the prion protein itself that aggregates.

Aggregation is either the result of a defect in the protein which increases its insolubility, or can be the result of an acceleration of its synthesis or a defect in its degradation. This idea is largely reinforced by the account that ubiquitin is found in large amount in aggregates and in nerve cell death, leading to the conclusion that UPS is deregulated and that proteasome is inhibited. For example huntingtin aggregates can be labeled with antibodies directed against ubiquitin that should be regarded as a marker of the misfolded proteins and as a signal for proteasome targeting. The pathological hallmark in Parkinson's disease are Lewy bodies that are inclusions of fibrillar and misfolded proteins found in the cytoplasm of neurons near the nucleus. As for Huntington's disease, Lewy bodies can be labeled with anti-ubiquitin, anti-alpha-synuclein, anti-parkin, anti-synphilin, anti-neurofilaments and anti-synaptic vesicle proteins. In amyotrophic lateral sclerosis, ubiquitinated aggregates are found also in patient brains. Finally in prion diseases, pathologies are caused by an abnormally folded prion protein both intracellularly and extracellularly.

The well-known case of such an aggregation process is the extracellular aggregates neuritic plaques (senile plaques) found in AD and which major

© 2009 Tous droits réservés. http://doc.univ-lille1.fr

Thèse de Vanessa Dehennaut, Lille 1, 2008

component is the beta-amyloid peptide (42 amino-acid) that derived from the sequential intracellular cleavage of APP (beta-amyloid precursor protein). Cleavage of APP occurs via either a nonamyloidogenic (generating soluble APPα and a truncated Aβ fragment) or an amyloidogenic pathways (generating Aβ and soluble APPβ). APP is a ubiquitously expressed type I membrane protein that contains a large extracellular region, a transmembrane helix and a short cytoplasmic tail. It has been demonstrated that APP is modified with *O*-linked N-acetylglucosamine [45] (it was the first report of a plasma protein that bears *O*-GlcNAc residues). The relationship between APP *O*-GlcNAc glycosylation and APP processing and AD is unknown.

Proteasomal degradation failure in neuronal disorders

It has been recently reported that the proteasome machinery was modified with *O*-GlcNAc [20, 21] and can be regulated by this post-translational modification since after modification by OGT, proteasome was inhibited [21]. It has been proposed that since *O*-GlcNAcase is located on 10q locus [46, 47], a chromosomal region frequently mutated during AD, a genetic impairment of *O*-GlcNAcase gene will result in a dysfunction of proteasome activity by non-hydrolyze of the *O*-GlcNAc inhibitory effect on 19S regulatory cap. Finally, proteasome failed to degrade aggregates (the alternative pathway is that of autophagia). Moreover it seems more and more probable that when a protein is modified with *O*-GlcNAc, it is less sensitive to proteasomal degradation [48-50]. In consequence the two phenomenons should act in synergy since if proteins are protected with *O*-GlcNAc, and if the proteasome is inhibited then the degradation rate of proteins will be greatly reduced.

The enzyme of de-ubiquitinylation, ubiquitin carboxyl hydrolase-L1 (UCH-L1) is also modified with *O*-GlcNAc in the synaptosome [38]. We can extend the protective role of *O*-GlcNAc on proteins against proteasomal degradation since a defect in the dynamism of *O*-GlcNAc on UCH-L1 could be an other argument for the resistance of aggregates against degradation. In this field, it will be very interesting to look at the existence of such a modification on parkin, an E3 ligase that catalyses addition of ubiquitin to specific substrates targeted to UPS and found in Parkinson's disease. Moreover, in addition of ubiquitinated substrates found in inclusion, chaperones proteins and proteasome components are also part of these inclusions, and this reinforces the problem of dysregulation of UPS in neuronal disorders.

Glucose metabolism and neural function

Glucose controls many cellular processes, from neurotransmitter synthesis to ATP production. Glucose metabolism, and consequently energy, is changed in aging brain both in the insulin and in the acetylcholine signal transduction.

© 2009 Tous droits réservés. http://doc.univ-lille1.fr

Thèse de Vanessa Dehennaut, Lille 1, 2008

Cumulative evidences suggest that during aging and AD, brain actively adapts its glucose metabolism. Glucose is preserved for anabolism and then the oxidative utilisation of ketone bodies is enhanced [51]. It is suggested that in AD, brain may not follow a suicide but a rescue program. Changes in glucose brain levels have been shown in numerous neurodegenerative diseases and then may be involved in pathological processes [52]. Thus, brain is likely to be susceptible to lowered glucose metabolism for its *O*-GlcNAc glycosylation processes.

Interestingly, diabetic neuropathies are a complication of diabetes mellitus and have been linked to poor glycemic control. Diabetes mellitus that is characterized by a deficiency of glucose uptake and utilisation doubles the likelihood of developing AD [53]. It is well-known that in AD brain, glucose uptake and metabolism are impaired and it seems that this failure could be a cause of neurodegeneration. Experiments performed on non-humans primates have clearly demonstrated that a decrease in cerebral glucose consummation correlated with an impairment in memory [54]. Nevertheless, while it appears clear that *O*-GlcNAc in AD is deficient, this impairment is not understood. To tentatively respond in part to this question, cytosolic proteins *O*-GlcNAc level of 19 AD brains and of 15 controls was determined in function of post-mortem delay [55]. Non-linear regression of the analysed results have shown that in AD brain, *O*-GlcNAc was 22% lower than in control, indicating the compromised *O*-GlcNAc glycosylation in such disease.

Cancers and *O*-GlcNAc

Cancers are characterised by an uncontrolled cell proliferation. Among the described *O*-GlcNAc-proteins many are implicated in cancerisation processes. These proteins could be either oncogenes like c-Myc [56] and v-erb-A [57] or tumours suppressors like p53 [58] and HIC1 [59]. We must add that numerous factors implicated in transcriptional processes are themselves *O*-GlcNAc-modified (see below). In this field it is important to remember that cancer progress can result from the mutation of oncogenes or tumours suppressors, and by aberrant transcription of cancer-specific genes.

Regulation of transcriptional activity by *O*-GlcNAc house keeping

The role of *O*-GlcNAc in transcriptional processes has been described for some transcription factors and especially for the house keeping transcription factor Sp1 [48, 60, 61]. *O*-GlcNAc could have different functional consequences regarding transcriptional activity.

Sensitivity to proteasomal degradation

A relationship between *O*-GlcNAc glycosylation and the sensitivity to proteasomal degradation has been reported. Sp1 has been shown to be

© 2009 Tous droits réservés. http://doc.univ-lille1.fr

Thèse de Vanessa Dehennaut, Lille 1, 2008

hyperglycosylated when cells were treated with glucosamine, whereas under glucose starvation hypoglycosylation occurred [48]. Correlating with this hypoglycosylated state, Sp1 was rapidly proteolytically degraded by proteasome and this degradation could be prevented by glucose or glucosamine treatment through the hexosamine biosynthetic pathway [48]. Another example is the murine beta estrogen receptor where the glycosylation occurs on Ser 16, a known phosphorylation site located near a PEST sequence [49]. This argues for a function of *O*-GlcNAc in the stability of the beta estrogen receptor.

Protein interactions modulation

O-GlcNAc could play a critical function in the regulation of protein-protein interactions. A single *O*-GlcNAc residue is present in the glutamine-rich transactivation domain of Sp1 (B-c) [61] and this modification is a major determinant for hydrophobic interactions between Sp1 and two partners: the TATA-binding-protein-associated factor (TAF110) and holo-Sp1 since *O*-GlcNAc inhibits proteins interactions. Recently it has been shown that the cyclic AMP-responsive element-binding protein, CREB, is *O*-GlcNAc glycosylated at two sites within the Q2 domain and that *O*-GlcNAc disrupts the interaction between CREB and TAFII [8] thereby inhibiting the transcriptional activity of CREB. A few years ago, a direct link between *O*-GlcNAc and transcriptional repression has been deciphered. The authors demonstrated that the *O*-GlcNAc transferase (OGT) interacts with the corepressor mSin3A and that this complex is targeted to promoters where OGT inactivates transcription factors and RNA polymerase II by *O*-GlcNAc modification [10]. This HDAC-independent mechanism acts in concert with histone deacetylation to repress genes transcription.

Regulation of DNA-binding

Another function of *O*-GlcNAc in the regulation of transcriptional activity could implicate interactions of transcription factors with DNA. P53 is a tumor suppressor containing a carboxy-terminal basic region that plays a role in the repression of the DNA-binding activity. It has been shown that *O*-GlcNAc glycosylation of this C-terminal region can abrogate this repression [58]. A correlation has also been found between glycosylation of Sp1 and its ability to bind DNA. This DNA-binding could be enhanced by palmitate, via the activation of the hexosamine pathway by increasing the expression of GFAT that results in elevated UDP-GlcNAc. Conversely, this DNA-binding activity is abrogated when Sp1 is deglycosylated by enzymatic treatment [62]. Experiments on the implication of *O*-GlcNAc on the DNA binding of HIC1 (Hypermethylated in cancer1) have been investigated [59]. *O*-GlcNAc modification of HIC1 proteins occurred preferentially in the DNA-binding domain. Non-glycosylated and glycosylated forms of full-length HIC1 proteins

© 2009 Tous droits réservés. http://doc.univ-lille1.fr

Thèse de Vanessa Dehennaut, Lille 1, 2008

displayed the same specific DNA-binding activity proving that the *O*-GlcNAc modification was not directly implicated in the specific DNA recognition of HIC1. N-terminal truncated forms proteins exhibited a strikingly differential activity, as the glycosylated truncated forms are unable to bind DNA whereas the unglycosylated ones do. Interestingly, these short proteins are *O*-GlcNAc modified in their C-terminal tail but not in the DNA-binding domain, as for the full-length proteins.

Control of the cell cycle by *O*-GlcNAc

As mentioned above, one of the fundamental mechanisms of cancer progression is uncontrolled cell proliferation. This anarchic proliferation is usually the result of dysfunctions occurring in the cell cycle (for review see [63]). Numerous studies tend to demonstrate that *O*-GlcNAc is intimately linked to cell cycle regulation. It has been observed that changes in *O*-GlcNAc levels occurred when T-lymphocytes were activated with mitogens. Using HT29 cells (human colon cells) it has been shown that when microtubules were destabilized an increase in *O*-GlcNAc on cytokeratins occurred [64]. Micro-injection of galactosyltransferase (an enzyme that cap *O*-GlcNAc residues) inhibits Xenopus oocytes M-phase entry, and block S to M phase transition [65]. On the same model, it has been shown that the G2 to M phase transition was accompanied with an enhanced *O*-GlcNAc glycosylation [66]. Taken together, these points strongly support a regulation of cell cycle by *O*-GlcNAc.

Importantly, when PUGNAc was used to inhibit *O*-GlcNAcase on cultured-cells, cells progressed through the cell cycle more slowly than untreated cells [67]. This delay was more pronounced during the S-phase progression and at the G2/M boundary, corroborating the previously described study on Xenopus oocyte maturation [66]. By contrast the inhibition of GFAT with DON (6-diazo-5oxo-norleucine), on the one hand decreased *O*-GlcNAc levels and on the other hand quickened S-phase and G2/M progression. In return GFAT inhibition delayed G1 progression in comparison with controls or PUGNAc treated cells. Indubitably these last data demonstrate that *O*-GlcNAc dynamism is a key-mechanism in the cell cycle progression. It is suggested that active actors in the regulation of cell cycle are *O*-GlcNAc modified and that glycosylation (perhaps in competition with phosphorylation) could act as a switch ON/OFF in the activity of them.

References

1. Venter, J. C. et al. 2001, Science, 291, 1304
2. Comer, F.I. and Hart, G.W. 2001, Biochemistry. 40, 7845
3. Juang, Y.T., Solomou, E.E., Rellahan, B. and Tsokos, G.C. 2002, J. Immunol. 168, 2865
4. Cieniewski-Bernard, C., Bastide, B., Lefebvre, T., Lemoine, J., Mounier, Y. and Michalski, J.C. 2004, Mol. Cell. Proteomics. 3, 577

© 2009 Tous droits réservés. http://doc.univ-lille1.fr

Thèse de Vanessa Dehennaut, Lille 1, 2008

5. Lefebvre, T., Guinez, C., Dehennaut, V., Beseme-Dekeyser, O., Morelle, W. and Michalski, J.C. 2005, Expert Rev Proteomics. 2, 265
6. Kamemura, K., Hayes, B.K., Comer, F.I. and Hart, G.W. 2002, J. Biol. Chem. 277, 19229
7. Lefebvre, T., Planque, N., Leleu, D., Bailly, M., Caillet-Boudin, M.L., Saule, S. and Michalski, J.C. 2002, J. Cell. Biochem. 85, 208
8. Lamarre-Vincent, N. and Hsieh-Wilson, L.C. 2003, J. Am. Chem. Soc. 125, 6612
9. Gewinner, C., Hart, G., Zachara, N., Cole, R., Beisenherz-Huss, C. and Groner, B. 2004, J. Biol. Chem. 279, 3563
10. Yang, X., Zhang, F. and Kudlow, J.E. 2002, Cell. 110, 69
11. Torres, C.R and Hart, G.W. 1984, J. Biol. Chem. 259, 3308
12. Whelan, S.A. and Hart, G.W. 2003, Circ. Res. 93, 1047
13. Iyer, S.P. and Hart, G.W. 2003, Biochemistry 42, 2493
14. Iyer, S.P. and Hart, G.W. 2003, J. Biol. Chem. 278, 24608
15. Wells, L., Gao, Y., Mahoney, J.A., Vosseller, K., Chen, C., Rosen, A. and Hart, G.W. 2002, J. Biol. Chem. 277, 1755
16. Slawson, C. and Hart, G.W. 2003, Curr. Opin. Struct. Biol. 13, 631
17. Dudognon, P., Maeder-Garavaglia, C., Carpentier. J.L. and Paccaud, J.P. 2004, FEBS Lett. 561, 44
18. Guinez, C., Morelle, W., Michalski, J.C. and Lefebvre, T. 2005, Int. J. Biochem. Cell. Biol. 37, 765
19. Walgren, J.L., Vincent, T.S., Schey, K.L. and Buse, M.G. 2003, Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 284, E424
20. Guinez, C., Lemoine, J., Michalski, J.C. and Lefebvre, T. 2004, Biochem. Biophys. Res. Commun. 319, 21
21. Sumegi, M., Hunyadi-Gulyas, E., Medzihradszky, K.F. and Udvardy, A. 2003, Biochem. Biophys. Res. Commun. 312, 128
22. Zhang, F., Su, K., Yang, X., Bowe, D.B., Paterson, A.J. and Kudlow, J.E. 2003, Cell, 115, 715
23. Marshall, S., Bacote, V. and Traxinger, R.R. 1991, J. Biol. Chem. 266, 4706
24. Marshall, S. 2002, Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes 9, 160
25. Wells, L., Vosseler, K. and Hart, G.W. 2003, Cell. Mol. Life Sci. 60, 222
26. Robinson, K.A., Sens, D.A. and Buse, M.G. 1993, Diabetes 42, 1333
27. Rossetti, L., Hawkins, M., Chen, W., Gindi, J. and Barzilai, N. 1995, J. Clin. Invest. 96, 132
28. McClain, D.A., Lubas, W.A., Cooksey, R.C., Hazel, M., Parker, G.J., Love, D.C. and Hanover, J.A. 2002, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 99, 10695
29. Arias, E.B., Kim, J. and Cartee, G.D. 2004, Diabetes 53, 921
30. Cooksey, R.C., Hebert, L.F. Jr, Zhu, J.H., Wofford, P., Garvey, W.T. and McClain, D.A. 1999, Endocrinology 140, 1151
31. Cho, H., Mu, J., Kim, J.K., Thorvaldsen, J.L., Chu, Q. and Crenshaw, E.B. 3rd, Kaestner K.H., Bartolomei M.S., Shulman, G.I. and Birnbaum, M.J. 2001, Science, 292, 1728
32. Lubas, W.A. and Hanover, J.A. 2000, J. Biol. Chem. 275, 10983
33. Patti, M.E., Virkamaki, A., Landaker, E.J., Kahn, C.R. and Yki-Jarvinen, H. 1999, Diabetes 48, 1562

© 2009 Tous droits réservés. http://doc.univ-lille1.fr

34. Konrad, R.J., Zhang, F., Hale, J.E., Knierman, M.D., Becker, G.W. and Kudlow, J.E. 2002, Biochem. Biophys. Res. Com. 293, 207
35. Szkudelski, T. 2001, Physiol. Res. 50, 536
36. Hanover, J.A., Lai, Z., Lee, G., Lubas, W.A. and Sato, S.M. 1999, Arch. Biochem. Biophys. 362, 38
37. Rex-Mathes, M., Werner, S., Strutas, D. *et al.* 2001, Biochimie, 83, 583
38. Cole, R.N. and Hart, G.W. 2001, J. Neurochem. 79, 1080
39. Akimoto, Y., Comer, F.I., Cole, R.N. *et al.* Brain Res. 966, 194
40. Lefebvre, T., Alonso, C., Mahboub, S., Dupire, M.J., Zanetta, J.P., Caillet-Boudin, M.L. and Michalski, J.C. 1999, Biochim. Biophys. Acta 1472, 71
41. Griffith, L.S. and Schmitz, B. 1995, Biochem. Biophys. Res. Commun. 213, 424
42. Yao, P.J. and Coleman, P.D. 1998, J. Neurosci. 18, 2399
43. Robertson, L.A., Moya, K.L. and Breen, K.C. 2004, J. Alzheimers Dis. 6, 489
44. Bence, N.F., Sampat, R.M. and Kopito, R.R. 2001, Science, 292, 1552
45. Griffith, L.S., Mathes, M. and Schmitz, B. 1995, J. Neurosc. Res. 41, 270
46. Bertram, L., Blacker, D., Mullin, K., Keeney, D., Jones, J., Basu, S., Yhu, S., McInnis, M.G., Go, R.C, Vekrellis, K., Selkoe, D.J., Saunders, A.J. and Tanzi, R.E. 2000, Science 290, 2302
47. Myers, A., Holmans, P., Marshall, H., Kwon, J., Meyer, D., Ramic, D., Shears, S., Booth, J., DeVrieze, F.W., Crook, R., Hamshere, M., Abraham, R., Tunstall, N., Rice, F., Carty, S., Lillystone, S., Kehoe, P., Rudrasingham, V., Jones, L., Lovestone, S., Perez-Tur, J., Williams, J., Owen, M.J., Hardy, J. and Goate, A.M. 2000, Science 290, 2304
48. Han, I. and Kudlow, J.E. 1997, Mol. Cell. Biol. 17, 2550
49. Cheng, X., Cole, R.N., Zaia, J. and Hart, G.W. 2000, Biochemistry 39, 11609
50. Hatsell, S., Medina, L., Merola, J., Haltiwanger, R.S. and Cowin, P. 2003, J. Biol. Chem. 278, 37745
51. Heininger, K. 2000, Rev. Neurosci. 11, 213
52. Hoyez, S. 1998, J. Neurol. Transm. Suppl. 54, 187
53. Craft, S., Newcomer, J., Kanne, S., Dagogo-Jack, S., Cryer, P., Sheline, Y., Luby, J., Dagogo-Jack, A. and Alderson, A.1996, Neurobiol. Aging 17, 123
54. Blaizot, X., Meguro, K., Millien, I., Baron, J.C. and Chavoix, C. 2002, J. Neurosc. 21, 9166
55. Liu, F., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., Hart, G.W. and Gong, C.X. 2004, Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 101, 10804
56. Chou, T.Y., Dang, C.V. and Hart, G.W. 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 92, 4417
57. Privalsky, M.L. 1990, J. Virol. 64, 463
58. Shaw, P., Freeman, J., Bovey, R. and Iggo, R. 1996, Oncogene. 12, 921
59. Lefebvre, T., Pinte, S., Guerardel, C., Deltour, S., Martin-Soudant, N., Slomianny, M.C., Michalski, J.C. and Leprince, D. 2004, Eur. J. Biochem. 271, 3843
60. Jackson, S.P. and Tjian, R. 1988, Cell, 55, 125
61. Roos, M.D., Su, K., Baker, J.R. and Kudlow, J.E. 1997, Mol. Cell. Biol., 17, 6472
62. Weigert, C., Klopfer, K., Kausch, C., Brodbeck, K., Stumvoll, M., Haring, H.U. and Schleicher, E.D. 2003, Diabetes, 52, 650
63. Slawson, C., Housley, M.P. and Hart, G.W. 2006, J. Cell. Biochem. 97, 71
64. Haltiwanger, R.S. and Philipsberg, G.A. 1997, J. Biol. Chem. 272, 8752

© 2009 Tous droits réservés. http://doc.univ-lille1.fr

Thèse de Vanessa Dehennaut, Lille 1, 2008

65. Fang, B. and Miller, M. W. 2001, Exp. Cell. Res. 263, 243
66. L+-efebvre, T., Baert, F., Bodart, J.F., Flament, S., Michalski, J.C. and Vilain, J.P. 2004, J. Cell. Biochem. 93, 999
67. Slawson, S., Zachara, N.E., Vosseler, K., Cheung, W.D., Lane, M.D. and Hart, G.W. 2005, J. Biol. Chem. 280, 32944

© 2009 Tous droits réservés. http://doc.univ-lille1.fr

Bibliographie

© 2009 Tous droits réservés.

http://doc.univ-lille1.fr

- A -

Abrieu A, Brassac T, Galas S, Fisher D, Labbé JC, Dorée M. (1998). The Polo-like kinase Plx1 is a component of the MPF amplification loop at the G2/M-phase transition of the cell cycle in Xenopus eggs. *J Cell Sci*.**111**, 1751-1757

Abrieu A, Lorca T, Labbé JC, Morin N, Keyse S, Dorée M. (1996). MAP kinase does not inactivate, but rather prevents the cyclin degradation pathway from being turned on in Xenopus egg extracts. *J Cell Sci*.**109**, 239-246

Akimoto Y, Hart GW, Wells L, Vosseller K, Yamamoto K, Munetomo E, Ohara-Imaizumi M, Nishiwaki C, Nagamatsu S, Hirano H, Kawakami H. (2007). Elevation of the post-translational modification of proteins by O-linked N-acetylglucosamine leads to deterioration of the glucose-stimulated insulin secretion in the pancreas of diabetic Goto-Kakizaki rats. *Glycobiology*.**17,**127-140

Akimoto Y, Comer FI, Cole RN, Kudo A, Kawakami H, Hirano H, Hart GW. (2003). Localization of the O-GlcNAc transferase and O-GlcNAc-modified proteins in rat cerebellar cortex.*Brain Res*. **966**, 194-205

Alexander GE, Chen K, Pietrini P, Rapoport SI, Reiman EM. (2002). Longitudinal PET Evaluation of Cerebral Metabolic Decline in Dementia: A Potential Outcome Measure in Alzheimer's Disease Treatment Studies. *Am J Psychiatry*. **159**, 738-745

Andersen CB, Sakaue H, Nedachi T, Kovacina KS, Clayberger C, Conti M, Roth RA. (2003). Protein kinase B/Akt is essential for the insulin- but not progesterone-stimulated resumption of meiosis in Xenopus oocytes. *Biochem J*. **369**, 227-238

Andersen CB, Roth RA, Conti M. (1998). Protein kinase B/Akt induces resumption of meiosis in Xenopus oocytes. *J Biol Chem*. **273**, 18705-18708.

Andersen SS, Karsenti E. (1997). XMAP310: a Xenopus rescue-promoting factor localized to the mitotic spindle. *J Cell Biol*. **139**, 975-983

Andrali SS, Qian Q, Ozcan S. (2007). Glucose mediates the translocation of NeuroD1 by O-linked glycosylation. *J Biol Chem*. **282**, 5589-15596

Andrali SS, März P, Ozcan S. (2005). Ataxin-10 interacts with O-GlcNAc transferase OGT in pancreatic beta cells. *Biochem Biophys Res Commun*. **337**, 149-153.

Arion D, Meijer L, Brizuela L, Beach D. (1988). Cdc2 is a component of the M phase-specific histone H1 kinase: evidence for identity with MPF. *Cell*. **55**, 371-378.

Arnold CS, Johnson GV, Cole RN, Dong DL, Lee M, Hart GW. (1996). The microtubule-associated protein tau is extensively modified with O-linked N-acetylglucosamine. *J Biol Chem*. **271,** 28741-28744

Avruch J, Khokhlatchev A, Kyriakis JM, Luo Z, Tzivion G, Vavvas D, Zhang XF. (2001). Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Recent Prog Horm Res*. **56**:127-155.

© 2009 Tous droits réservés.

- B -

Baert F, Bodart JF, Bocquet-Muchembled B, Lescuyer-Rousseau A, Vilain JP. (2003). Xp42(Mpk1) activation is not required for germinal vesicle breakdown but for Raf complete phosphorylation in insulin-stimulated Xenopus oocytes. *J Biol Chem*. **278,** 49714-49720.

Bai WL, Singh B, Karshin WL, Shonk RA, Arlinghaus RB. (1991). Phosphorylation of v-mos Ser 47 by the mitotic form of p34cdc2. *Oncogene*. **6**, 1715-1723.

Bagowski CP, Myers JW, Ferrell JE Jr. (2001). The classical progesterone receptor associates with p42 MAPK and is involved in phosphatidylinositol 3-kinase signaling in Xenopus oocytes. *J Biol Chem*. **276**, 37708-37714.

Ball LE, Berkaw MN, Buse MG. (2006). Identification of the major site of O-linked beta-N-acetylglucosamine modification in the C terminus of insulin receptor substrate-1. *Mol Cell Proteomics*. **5,** 313-323.

Banchio C, Schang LM, Vance DE. (2004). Phosphorylation of Sp1 by cyclin-dependent kinase 2 modulates the role of Sp1 in CTP:phosphocholine cytidylyltransferase alpha regulation during the S phase of the cell cycle. *J Biol Chem*. **279,** 40220-40226

Barkoff A, Ballantyne S, Wickens M. (1998). Meiotic maturation in Xenopus requires polyadenylation of multiple mRNAs. *EMBO J*. **17,** 3168-3175

Barnard DC, Ryan K, Manley JL, Richter JD. (2004). Symplekin and xGLD-2 are required for CPEB-mediated cytoplasmic polyadenylation. *Cell*. **119,** 641-651

Baron AD, Zhu JS, Zhu JH, Weldon H, Maianu L, Garvey WT. (1995). Glucosamine induces insulin resistance in vivo by affecting GLUT 4 translocation in skeletal muscle. Implications for glucose toxicity. *J Clin Invest*. **96,** 2792-2801.

Bayaa M, Booth RA, Sheng Y, Liu XJ. (2000). The classical progesterone receptor mediates Xenopus oocyte maturation through a nongenomic mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97**, 12607-12612

Becker BE, Romney SJ, Gard DL. (2003). XMAP215, XKCM1, NuMA, and cytoplasmic dynein are required for the assembly and organization of the transient microtubule array during the maturation of Xenopus oocytes. *Dev Biol*. **261**, 488-505

Benko DM, Haltiwanger RS, Hart GW, Gibson W. (1988). Virion basic phosphoprotein from human cytomegalovirus contains O-linked N-acetylglucosamine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **85**, 2573-2577.

Blondeau JP, Baulieu EE. (1984). Progesterone receptor characterized by photoaffinity labelling in the plasma membrane of Xenopus laevis oocytes. *Biochem J*. **219,** 785-792

Bodart JF, Baert FY, Sellier C, Duesbery NS, Flament S, Vilain JP. (2005). Differential roles of p39Mos-Xp42Mpk1 cascade proteins on Raf1 phosphorylation and spindle morphogenesis in Xenopus oocytes. *Dev Biol*. **283,** 373-383

Bodart JF, Gutierrez DV, Nebreda AR, Buckner BD, Resau JR, Duesbery NS. (2002a) Characterization of MPF and MAPK activities during meiotic maturation of Xenopus tropicalis oocytes. *Dev Biol*. **245,** 348-361

© 2009 Tous droits réservés.

Bodart JF, Flament S, Vilain JP. (2002b). Metaphase arrest in amphibian oocytes: interaction between CSF and MPF sets the equilibrium. *Mol Reprod Dev*. **61**, 570-574

Bodart JF, Rodeau JL, Vilain JP, Flament S. (2001). c-Mos proteolysis is independent of the CA(2+) rise induced by 6-DMAP in Xenopus oocytes. *Exp Cell Res*. **266**, 187-192

Bodart JF, Béchard D, Bertout M, Gannon J, Rousseau A, Vilain JP, Flament S. (1999a). Activation of Xenopus eggs by the kinase inhibitor 6-DMAP suggests a differential regulation of cyclin B and p39(mos) proteolysis. *Exp Cell Res*. **253**, 413-421

Bodart JF, Béchard D, Bertout M, Rousseau A, Gannon J, Vilain JP, Flament S. (1999b). Inhibition of protein tyrosine phosphatases blocks calcium-induced activation of metaphase II-arrested oocytes of Xenopus laevis. *FEBS Lett*. **457**, 175-178

Boehmelt G, Fialka I, Brothers G, McGinley MD, Patterson SD, Mo R, Hui CC, Chung S, Huber LA, Mak TW, Iscove NN. (2000a). Cloning and characterization of the murine glucosamine-6-phosphate acetyltransferase EMeg32. Differential expression and intracellular membrane association. *J Biol Chem.* **275**, 12821-12832.

Boehmelt G, Wakeham A, Elia A, Sasaki T, Plyte S, Potter J, Yang Y, Tsang E, Ruland J, Iscove NN, Dennis JW, Mak TW. (2000b). Decreased UDP-GlcNAc levels abrogate proliferation control in EMeg32-deficient cells. *EMBO J*. **19**, 5092-5104.

Booher RN, Holman PS, Fattaey A. (1997). Human Myt1 is a cell cycle-regulated kinase that inhibits Cdc2 but not Cdk2 activity.*J Biol Chem*. **272,** 22300-22306

Borgne A, Ostvold AC, Flament S, Meijer L. (1999). Intra-M phase-promoting factor phosphorylation of cyclin B at the prophase/metaphase transition. *J Biol Chem*. **274**, 11977-11986

Bork K, Kannicht C, Nöhring S, Reutter W, Weidemann W, Hart GW, Horstkorte R. (2008). N-propanoylmannosamine interferes with O-GlcNAc modification of the tyrosine 3-monooxygenase and stimulates dopamine secretion. *J Neurosci Res*. **86**, 647-652

Boucaut JC, Darribère T, Boulekbache H, Thiery JP. (1984). Prevention of gastrulation but not neurulation by antibodies to fibronectin in amphibian embryos. *Nature.* **307**, 364-367

Braidman I, Carroll M, Dance N, Robinson D, Poenaru L, Weber A, Dreyfus JC, Overdijk B, Hooghwinkel GJ. (1974). Characterisation of human N-acetyl-beta-hexosaminidase C. *FEBS Lett*. **41**, 181-184.

Broschat KO, Gorka C, Page JD, Martin-Berger CL, Davies MS, Huang Hc HC, Gulve EA, Salsgiver WJ, Kasten TP. (2002). Kinetic characterization of human glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase I: potent feedback inhibition by glucosamine 6-phosphate. *J Biol Chem.* **277**, 14764-14770

Brouhard GJ, Stear JH, Noetzel TL, Al-Bassam J, Kinoshita K, Harrison SC, Howard J, Hyman AA. (2008). XMAP215 is a processive microtubule polymerase. *Cell.* **132**, 79-88

Buse MG, Robinson KA, Marshall BA, Hresko RC, Mueckler MM. (2002). Enhanced O-GlcNAc protein modification is associated with insulin resistance in GLUT1-overexpressing muscles. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **283**, E241-E250

Butkinaree C, Cheung WD, Park SJ, Park K, Barber M, Hart GW. (2008). Characterization of beta-N-acetylglucosaminidase (O-GlcNAcase) cleavage by caspase-3 during apoptosis.*J Biol Chem.* Epub ahead of print

© 2009 Tous droits réservés.

- C -

Cao Q, Richter JD. (2002). Dissolution of the maskin-eIF4E complex by cytoplasmic polyadenylation and poly(A)-binding protein controls cyclin B1 mRNA translation and oocyte maturation. *EMBO J.* **21**, 3852-3862

Castro A, Peter M, Magnaghi-Jaulin L, Vigneron S, Galas S, Lorca T, Labbé JC. (2001). Cyclin B/cdc2 induces c-Mos stability by direct phosphorylation in Xenopus oocytes. *Mol Biol Cell*. **12**, 2660-2671

Champattanachai V, Marchase RB, Chatham JC. (2008). Glucosamine Protects Neonatal Cardiomyocytes from Ischemia-Reperfusion Injury via increased protein O-GlcNAc and increased mitochondrial Bcl-2. *Am J Physiol Cell Physiol.* Epub ahead of print

Champattanachai V, Marchase RB, Chatham JC. (2007). Glucosamine protects neonatal cardiomyocytes from ischemia-reperfusion injury via increased protein-associated O-GlcNAc. *Am J Physiol Cell Physiol*. **292**, C178-C187

Chang Q, Su K, Baker JR, Yang X, Paterson AJ, Kudlow JE. (2000). Phosphorylation of human glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase by cAMP-dependent protein kinase at serine 205 blocks the enzyme activity. *J Biol Chem*. **275**, 21981-21987

Charlesworth A, Wilczynska A, Thampi P, Cox LL, MacNicol AM. (2006). Musashi regulates the temporal order of mRNA translation during Xenopus oocyte maturation. *EMBO J.* **25**, 2792-2801

Charlesworth A, Ridge JA, King LA, MacNicol MC, MacNicol AM. (2002). A novel regulatory element determines the timing of Mos mRNA translation during Xenopus oocyte maturation. *EMBO J.* **21**, 2798-2806

Charlesworth A, Welk J, MacNicol AM. (2000). The temporal control of Wee1 mRNA translation during Xenopus oocyte maturation is regulated by cytoplasmic polyadenylation elements within the 3'-untranslated region. *Dev Biol.* **227**, 706-719.

Chen D, Juárez S, Hartweck L, Alamillo JM, Simón-Mateo C, Pérez JJ, Fernández-Fernández MR, Olszewski NE, García JA. (2005). Identification of secret agent as the O-GlcNAc transferase that participates in Plum pox virus infection. *J Virol.* **79**, 9381-9387

Chen M, Li D, Krebs EG, Cooper JA. (1997). The casein kinase II beta subunit binds to Mos and inhibits Mos activity. *Mol Cell Biol.* **17**, 1904-1912

Chen M, Cooper JA. (1997).The beta subunit of CKII negatively regulates Xenopus oocyte maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **94**, 9136-9140.

Chen M, Cooper JA. (1995). Ser-3 is important for regulating Mos interaction with and stimulation of mitogen-activated protein kinase kinase. *Mol Cell Biol*. **15**, 4727-4734

Cheng X, Hart GW. (2001). Alternative O-glycosylation/O-phosphorylation of serine-16 in murine estrogen receptor beta: post-translational regulation of turnover and transactivation activity. *J Biol Chem.* **276**, 10570-10575

Cheng X, Cole RN, Zaia J, Hart GW. (2000). Alternative O-glycosylation/O-phosphorylation of the murine estrogen receptor beta. *Biochemistry*. **39**, 11609-11620.

© 2009 Tous droits réservés.

Chesnel F, Bazile F, Pascal A, Kubiak JZ. (2007). Cyclin B2/cyclin-dependent kinase1 dissociation precedes CDK1 Thr-161 dephosphorylation upon M-phase promoting factor inactivation in Xenopus laevis cell-free extract. *Int J Dev Biol.* **51**, 297-305

Chesnel F, Bazile F, Pascal A, Kubiak JZ. (2006). Cyclin B dissociation from CDK1 precedes its degradation upon MPF inactivation in mitotic extracts of Xenopus laevis embryos. *Cell Cycle.* **5**, 1687-1698

Chesnel F, Vignaux F, Richard-Parpaillon L, Huguet A, Kubiak JZ. (2005). Differences in regulation of the first two M-phases in Xenopus laevis embryo cell-free extracts. *Dev Biol.* **285**, 358-375.

Cheung WD, Hart GW. (2008). AMP-activated Protein Kinase and p38 MAPK Activate O-GlcNAcylation of Neuronal Proteins during Glucose Deprivation. *J Biol Chem.* **283**, 13009-13020

Chou CF, Omary MB. (1994). Mitotic arrest with anti-microtubule agents or okadaic acid is associated with increased glycoprotein terminal GlcNAc's. *J Cell Sci*. **107**, 1833-1843

Chou CF, Omary MB. (1993). Mitotic arrest-associated enhancement of O-linked glycosylation and phosphorylation of human keratins 8 and 18. *J Biol Chem*. **268**, 4465-4472

Chou CF, Smith AJ, Omary MB. (1992). Characterization and dynamics of O-linked glycosylation of human cytokeratin 8 and 18. *J Biol Chem.* **267**, 3901-3906

Chou TY, Dang CV, Hart GW. (1995a). Glycosylation of the c-Myc transactivation domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**, 4417-4421

Chou TY, Hart GW, Dang CV. (1995b). c-Myc is glycosylated at threonine 58, a known phosphorylation site and a mutational hot spot in lymphomas. *J Biol Chem*. **270**, 18961-18965

Chuang LM, Hausdorff SF, Myers MG Jr, White MF, Birnbaum MJ, Kahn CR. (1994). Interactive roles of Ras, insulin receptor substrate-1, and proteins with Src homology-2 domains in insulin signaling in Xenopus oocytes. *J Biol Chem.* **269**, 27645-27649

Cieniewski-Bernard C, Bastide B, Lefebvre T, Lemoine J, Mounier Y, Michalski JC. (2004). Identification of O-linked N-acetylglucosamine proteins in rat skeletal muscle using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*. **3**, 577-585

Clark RJ, McDonough PM, Swanson E, Trost SU, Suzuki M, Fukuda M, Dillmann WH. (2003). Diabetes and the accompanying hyperglycemia impairs cardiomyocyte calcium cycling through increased nuclear O-GlcNAcylation. *J Biol Chem*. **278**, 44230-44237

Clarke PR, Zhang C. (2008). Spatial and temporal coordination of mitosis by Ran GTPase. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **9**, 464-477

Cole RN, Hart GW. (2001). Cytosolic O-glycosylation is abundant in nerve terminals. *J Neurochem*. **79**, 1080-1089

Cole RN, Hart GW. (1999). Glycosylation sites flank phosphorylation sites on synapsin I: O-linked N-acetylglucosamine residues are localized within domains mediating synapsin I interactions. *J Neurochem*. **73**, 418-428

Comer FI, Hart GW. (2001) Reciprocity between O-GlcNAc and O-phosphate on the carboxyl terminal domain of RNA polymerase II. *Biochemistry.* **40**, 7845-7852

© 2009 Tous droits réservés.

Comtesse N, Maldener E, Meese E. (2001). Identification of a nuclear variant of MGEA5, a cytoplasmic hyaluronidase and a beta-N-acetylglucosaminidase. *Biochem Biophys Res Commun.* **283**, 634-640

- D -

Daar I, Yew N, Vande Woude GF. (1993). Inhibition of mos-induced oocyte maturation by protein kinase A. *J Cell Biol.* **120**, 1197-1202

D'Alessandris C, Andreozzi F, Federici M, Cardellini M, Brunetti A, Ranalli M, Del Guerra S, Lauro D, Del Prato S, Marchetti P, Lauro R, Sesti G. (2004). Increased O-glycosylation of insulin signaling proteins results in their impaired activation and enhanced susceptibility to apoptosis in pancreatic beta-cells. *FASEB J.* **18**, 959-961

D'Andrea LD, Regan L. (2003). TPR proteins: the versatile helix. *Trends Biochem Sci*. **28**, 655-662

Darribère T. (1997). Biologie du développement le modèle amphibien. *Diderot multimédia*

Datta R, Choudhury P, Ghosh A, Datta B. (2003). A glycosylation site, 60SGTS63, of p67 is required for its ability to regulate the phosphorylation and activity of eukaryotic initiation factor 2alpha. *Biochemistry*. **42**, 5453-5460

Dauphinee SM, Ma M, Too CK. (2005). Role of O-linked beta-N-acetylglucosamine modification in the subcellular distribution of alpha4 phosphoprotein and Sp1 in rat lymphoma cells. *J Cell Biochem*. **96**, 579-588

Davidson LA, Hoffstrom BG, Keller R, DeSimone DW. (2002). Mesendoderm extension and mantle closure in Xenopus laevis gastrulation: combined roles for integrin alpha(5)beta(1), fibronectin, and tissue geometry. *Dev Biol*. **242**, 109-129

De Moor CH, Richter JD. (1999). Cytoplasmic polyadenylation elements mediate masking and unmasking of cyclin B1 mRNA. *EMBO J.* **18**, 2294-2303

De Moor CH, Richter JD. (1997). The Mos pathway regulates cytoplasmic polyadenylation in Xenopus oocytes. *Mol Cell Biol.* **17**, 6419-6426

Deng J, Lang S, Wylie C, Hammes SR. (2008). XGPR3 is a Constitutively Active Cell Surface G Protein-Coupled Receptor that Participates in Maintaining Meiotic Arrest in Xenopus Laevis Oocytes.*Mol Endocrinol.* Epub ahead of print

Deng Y, Li B, Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Brandt R, Gong CX. (2008). Regulation between O-GlcNAcylation and phosphorylation of neurofilament-M and their dysregulation in Alzheimer disease. *FASEB J.* **22**, 138-145

Dennis RJ, Taylor EJ, Macauley MS, Stubbs KA, Turkenburg JP, Hart SJ, Black GN, Vocadlo DJ, Davies GJ. (2006). Structure and mechanism of a bacterial beta-glucosaminidase having O-GlcNAcase activity. *Nat Struct Mol Biol.* **13**, 365-371

Dentin R, Hedrick S, Xie J, Yates J 3rd, Montminy M. (2008). Hepatic glucose sensing via the CREB coactivator CRTC2. *Science*. **319**, 1402-1405

Derua R, Stevens I, Waelkens E, Fernandez A, Lamb N, Merlevede W, Goris J. (1997). Characterization and physiological importance of a novel cell cycle regulated protein kinase in Xenopus laevis oocytes that phosphorylates cyclin B2. *Exp Cell Res.* **230**, 310-324.

© 2009 Tous droits réservés.

Deuter-Reinhard M, Apell G, Pot D, Klippel A, Williams LT, Kavanaugh WM. (1997). SIP/SHIP inhibits Xenopus oocyte maturation induced by insulin and phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol.* **17**, 2559-2565

Devault A, Martinez AM, Fesquet D, Labbé JC, Morin N, Tassan JP, Nigg EA, Cavadore JC, Dorée M. (1995). MAT1 ('menage à trois') a new RING finger protein subunit stabilizing cyclin H-cdk7 complexes in starfish and Xenopus CAK. *EMBO J.* **14**, 5027-5036

Dickson KS, Bilger A, Ballantyne S, Wickens MP. (1999). The cleavage and polyadenylation specificity factor in Xenopus laevis oocytes is a cytoplasmic factor involved in regulated polyadenylation. *Mol Cell Biol*. **19**, 5707-5717

Dieckmann-Schuppert A, Bause E, Schwarz RT. (1993). Studies on O-glycans of Plasmodium-falciparum-infected human erythrocytes. Evidence for O-GlcNAc and O-GlcNAc-transferase in malaria parasites. *Eur J Biochem.* **216**, 779-788.

Ding M, Vandré DD. (1996). High molecular weight microtubule-associated proteins contain O-linked-N-acetylglucosamine. *J Biol Chem*. **271**, 12555-12561.

Donadio AC, Lobo C, Tosina M, de la Rosa V, Martín-Rufián M, Campos-Sandoval JA, Matés JM, Márquez J, Alonso FJ, Segura JA. (2008). Antisense glutaminase inhibition modifies the O-GlcNAc pattern and flux through the hexosamine pathway in breast cancer cells. *J Cell Biochem.* **103**, 800-811

Dong DL, Xu ZS, Hart GW, Cleveland DW. (1996). Cytoplasmic O-GlcNAc modification of the head domain and the KSP repeat motif of the neurofilament protein neurofilament-H. *J Biol Chem.* **271**, 20845-20852.

Dong DL, Hart GW. (1994). Purification and characterization of an O-GlcNAc selective N-acetyl-beta-D-glucosaminidase from rat spleen cytosol. *J Biol Chem.* **269**, 19321-19330.

Dong DL, Xu ZS, Chevrier MR, Cotter RJ, Cleveland DW, Hart GW. (1993). Glycosylation of mammalian neurofilaments. Localization of multiple O-linked N-acetylglucosamine moieties on neurofilament polypeptides L and M. *J Biol Chem.* **268**, 16679-16687.

Donzelli M, Draetta GF. (2003). Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO Rep*. **4**, 671-677

Dorée M, Hunt T. (2002). From Cdc2 to Cdk1: when did the cell cycle kinase join its cyclin partner? *J Cell Sci.* **115**, 2461-2464

Dorfmueller HC, Borodkin VS, Schimpl M, Shepherd SM, Shpiro NA, van Aalten DM. (2006). GlcNAcstatin: a picomolar, selective O-GlcNAcase inhibitor that modulates intracellular O-glcNAcylation levels. *J Am Chem Soc.* **128**, 16484-16485

Du XL, Edelstein D, Dimmeler S, Ju Q, Sui C, Brownlee M. (2001). Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *J Clin Invest.* **108**, 1341-1348.

Duckworth BC, Weaver JS, Ruderman JV. (2002). G2 arrest in Xenopus oocytes depends on phosphorylation of cdc25 by protein kinase A. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **99**, 16794-16799

© 2009 Tous droits réservés.

Duesbery NS, Webb CP, Leppla SH, Gordon VM, Klimpel KR, Copeland TD, Ahn NG, Oskarsson MK, Fukasawa K, Paull KD, Vande Woude GF. (1998). Proteolytic inactivation of MAP-kinase-kinase by anthrax lethal factor. *Science.* **280**, 734-737

Dumont J, Petri S, Pellegrin F, Terret ME, Bohnsack MT, Rassinier P, Georget V, Kalab P, Gruss OJ, Verlhac MH. (2007). A centriole- and RanGTP-independent spindle assembly pathway in meiosis I of vertebrate oocytes. *J Cell Biol.* **176**, 295-305

Dumont JN. (1972). Oogenesis in Xenopus laevis (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol.* **136**, 153-179.

Dupré A, Jessus C, Ozon R, Haccard O. (2002a). Mos is not required for the initiation of meiotic maturation in Xenopus oocytes. *EMBO J.* **21**, 4026-4036.

Dworkin MB, Dworkin-Rastl E. (1991). Carbon metabolism in early amphibian embryos. *Trends Biochem Sci.* **16**, 229-234

Dworkin MB, Dworkin-Rastl E. (1989). Metabolic regulation during early frog development: glycogenic flux in Xenopus oocytes, eggs, and embryos. *Dev Biol*. **132**, 512-523

- *E* -

El-Jouni W, Haun S, Hodeify R, Hosein Walker A, Machaca K. (2007). Vesicular traffic at the cell membrane regulates oocyte meiotic arrest.*Development*. **134**, 3307-3315

El-Etr M, Schorderet-Slatkine S, Baulieu EE. (1979). Meiotic maturation in Xenopus laevis oocytes initiated by insulin. *Science.* **205**, 1397-1399.

Erikson E, Maller JL. (1991). Purification and characterization of ribosomal protein S6 kinase I from Xenopus eggs. *J Biol Chem.* **266**, 5249-5255

Erikson E, Maller JL. (1989). In vivo phosphorylation and activation of ribosomal protein S6 kinases during Xenopus oocyte maturation. *J Biol Chem.* **264**, 13711-13717

Erikson E, Maller JL. (1985). A protein kinase from Xenopus eggs specific for ribosomal protein S6. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **82**, 742-746.

Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D, Hunt T. (1983). Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell.* **33**, 389-396.

Evaul K, Jamnongjit M, Bhagavath B, Hammes SR. (2007). Testosterone and progesterone rapidly attenuate plasma membrane Gbetagamma-mediated signaling in Xenopus laevis oocytes by signaling through classical steroid receptors. *Mol Endocrinol*. **21**, 186-196

- *F* -

Fabian JR, Morrison DK, Daar IO. (1993). Requirement for Raf and MAP kinase function during the meiotic maturation of Xenopus oocytes. *J Cell Biol.* **122**, 645-652.

Fan HY, Sun QY. (2004). Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. *Biol Reprod*. **70**, 535-547

© 2009 Tous droits réservés.

Fang B, Miller MW. (2001). Use of galactosyltransferase to assess the biological function of O-linked N-acetyl-d-glucosamine: a potential role for O-GlcNAc during cell division. *Exp Cell Res*. **263**, 243-253

Farook VS, Bogardus C, Prochazka M. (2002). Analysis of MGEA5 on 10q24.1-q24.3 encoding the beta-O-linked N-acetylglucosaminidase as a candidate gene for type 2 diabetes mellitus in Pima Indians. *Mol Genet Metab*. **77**, 189-193

Faruki S, Dorée M, Karsenti E. (1992). cdc2 kinase-induced destabilization of MAP2-coated microtubules in Xenopus egg extracts. *J Cell Sci.* **101**, 69-78

Favreau C, Worman HJ, Wozniak RW, Frappier T, Courvalin JC. (1996). Cell cycle-dependent phosphorylation of nucleoporins and nuclear pore membrane protein Gp210. *Biochemistry.* **35**, 8035-8044

Featherstone C, Russell P. (1991). Fission yeast p107wee1 mitotic inhibitor is a tyrosine/serine kinase. *Nature*. **349**, 808-811

Federici M, Menghini R, Mauriello A, Hribal ML, Ferrelli F, Lauro D, Sbraccia P, Spagnoli LG, Sesti G, Lauro R. (2002). Insulin-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase is impaired by O-linked glycosylation modification of signaling proteins in human coronary endothelial cells. *Circulation.* **106**, 466-472.

Ferby I, Blazquez M, Palmer A, Eritja R, Nebreda AR. (1999). A novel p34(cdc2)-binding and activating protein that is necessary and sufficient to trigger G(2)/M progression in Xenopus oocytes. *Genes Dev.* **13**, 2177-2189.

Fesquet D, Labbé JC, Derancourt J, Capony JP, Galas S, Girard F, Lorca T, Shuttleworth J, Dorée M, Cavadore JC. (1993). The MO15 gene encodes the catalytic subunit of a protein kinase that activates cdc2 and other cyclin-dependent kinases (CDKs) through phosphorylation of Thr161 and its homologues. *EMBO J.* **12**, 3111-3121

Finidori-Lepicard J, Schorderet-Slatkine S, Hanoune J, Baulieu EE. (1981). Progesterone inhibits membrane-bound adenylate cyclase in Xenopus laevis oocytes. *Nature.* **292**, 255-257

Finlay DR, Newmeyer DD, Price TM, Forbes DJ. (1987). Inhibition of in vitro nuclear transport by a lectin that binds to nuclear pores. *J Cell Biol*.**104**, 189-200

Fisher DL, Mandart E, Dorée M. (2000). Hsp90 is required for c-Mos activation and biphasic MAP kinase activation in Xenopus oocytes. *EMBO J.* **19**, 1516-1524

Fisher DL, Brassac T, Galas S, Dorée M. (1999). Dissociation of MAP kinase activation and MPF activation in hormone-stimulated maturation of Xenopus oocytes. *Development.* **126**, 4537-4546.

Fisher RP, Morgan DO. (1994). A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell*. **78**, 713-724.

Forristall C, Pondel M, Chen L, King ML. (1995). Patterns of localization and cytoskeletal association of two vegetally localized RNAs, Vg1 and Xcat-2. *Development.* **121**, 201-208

Forsythe ME, Love DC, Lazarus BD, Kim EJ, Prinz WA, Ashwell G, Krause MW, Hanover JA. (2006). Caenorhabditis elegans ortholog of a diabetes susceptibility locus: oga-1 (O-GlcNAcase) knockout impacts O-GlcNAc cycling, metabolism, and dauer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**, 11952-11957

© 2009 Tous droits réservés.

Fortune JE, Concannon PW, Hansel W. (1975). Ovarian progesterone levels during in vitro oocyte maturation and ovulation in Xenopus laevis. *Biol Reprod.* **13**, 561-567

Fox CA, Sheets MD, Wickens MP. (1989). Poly(A) addition during maturation of frog oocytes: distinct nuclear and cytoplasmic activities and regulation by the sequence UUUUUAU. *Genes Dev.* **3**, 2151-2162.

Freeman RS, Meyer AN, Li J, Donoghue DJ. (1992). Phosphorylation of conserved serine residues does not regulate the ability of mosxe protein kinase to induce oocyte maturation or function as cytostatic factor. *J Cell Biol.* **116**, 725-735

Freeman RS, Pickham KM, Kanki JP, Lee BA, Pena SV, Donoghue DJ. (1989). Xenopus homolog of the mos protooncogene transforms mammalian fibroblasts and induces maturation of Xenopus oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **86**, 5805-5809

Fülöp N, Zhang Z, Marchase RB, Chatham JC. (2007). Glucosamine cardioprotection in perfused rat hearts associated with increased O-linked N-acetylglucosamine protein modification and altered p38 activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **292**, H2227-H2236

Furuno N, Kawasaki A, Sagata N. (2003). Expression of cell-cycle regulators during Xenopus oogenesis. *Gene Expr Patterns*. **3**, 165-168.

Furuno N, Nishizawa M, Okazaki K, Tanaka H, Iwashita J, Nakajo N, Ogawa Y, Sagata N. (1994). Suppression of DNA replication via Mos function during meiotic divisions in Xenopus oocytes. *EMBO J.* **13**, 2399-2410

- G -

Gaffré M, Dupré A, Valuckaite R, Suziedelis K, Jessus C, Haccard O. (2006). Deciphering the H-Ras pathway in Xenopus oocyte. *Oncogene*. **25**, 5155-5162

Gallo CJ, Hand AR, Jones TL, Jaffe LA. (1995). Stimulation of Xenopus oocyte maturation by inhibition of the G-protein alpha S subunit, a component of the plasma membrane and yolk platelet membranes. *J Cell Biol.* **130**, 275-284.

Gandy JC, Rountree AE, Bijur GN. (2006). Akt1 is dynamically modified with O-GlcNAc following treatments with PUGNAc and insulin-like growth factor-1. *FEBS Lett.* **580**, 3051-3058.

Gao Y, Miyazaki J, Hart GW. (2003). The transcription factor PDX-1 is post-translationally modified by O-linked N-acetylglucosamine and this modification is correlated with its DNA binding activity and insulin secretion in min6 beta-cells. *Arch Biochem Biophys*. **415**, 155-163.

Gao Y, Wells L, Comer FI, Parker GJ, Hart GW. (2001). Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: cloning and characterization of a neutral, cytosolic beta-N-acetylglucosaminidase from human brain. *J Biol Chem.* **276**, 9838-9845

Gard DL, Cha BJ, Roeder AD. (1995). F-actin is required for spindle anchoring and rotation in Xenopus oocytes: a re-examination of the effects of cytochalasin B on oocyte maturation. *Zygote*. **3**, 17-26

Gard DL. (1992). Microtubule organization during maturation of Xenopus oocytes: assembly and rotation of the meiotic spindles. *Dev Biol*. **151**, 516-530.

© 2009 Tous droits réservés.

Gautier J, Minshull J, Lohka M, Glotzer M, Hunt T, Maller JL. (1990). Cyclin is a component of maturation-promoting factor from Xenopus. *Cell*. **60**, 487-494.

Gautier J, Norbury C, Lohka M, Nurse P, Maller J. (1988). Purified maturation-promoting factor contains the product of a Xenopus homolog of the fission yeast cell cycle control gene cdc2+. *Cell*. **54**, 433-439

Gewinner C, Hart G, Zachara N, Cole R, Beisenherz-Huss C, Groner B. (2004). The coactivator of transcription CREB-binding protein interacts preferentially with the glycosylated form of Stat5. *J Biol Chem.* **279**, 3563-3572

Godeau JF, Schorderet-Slatkine S, Hubert P, Baulieu EE. (1978). Induction of maturation in Xenopus laevis oocytes by a steroid linked to a polymer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **75**, 2353-2357

Goldberg HJ, Whiteside CI, Hart GW, Fantus IG. (2006). Posttranslational, reversible O-glycosylation is stimulated by high glucose and mediates plasminogen activator inhibitor-1 gene expression and Sp1 transcriptional activity in glomerular mesangial cells. *Endocrinology*. **147**, 222-231

González SA, Burrone OR. (1991). Rotavirus NS26 is modified by addition of single O-linked residues of N-acetylglucosamine. *Virology*. **182**, 8-16

Gotoh Y, Moriyama K, Matsuda S, Okumura E, Kishimoto T, Kawasaki H, Suzuki K, Yahara I, Sakai H, Nishida E. (1991). Xenopus M phase MAP kinase: isolation of its cDNA and activation by MPF. *EMBO J.* **10**, 2661-2668

Greig KT, Antonchuk J, Metcalf D, Morgan PO, Krebs DL, Zhang JG, Hacking DF, Bode L, Robb L, Kranz C, de Graaf C, Bahlo M, Nicola NA, Nutt SL, Freeze HH, Alexander WS, Hilton DJ, Kile BT. (2007). Agm1/Pgm3-mediated sugar nucleotide synthesis is essential for hematopoiesis and development. *Mol Cell Biol*. **27**, 5849-5859

Greis KD, Gibson W, Hart GW. (1994). Site-specific glycosylation of the human cytomegalovirus tegument basic phosphoprotein (UL32) at serine 921 and serine 952. *J Virol.* **68**, 8339-8349

Griffith LS, Mathes M, Schmitz B. (1995). Beta-amyloid precursor protein is modified with O-linked N-acetylglucosamine. *J Neurosci Res*. **41**, 270-278.

Grinstein E, Jundt F, Weinert I, Wernet P, Royer HD. (2002). Sp1 as G1 cell cycle phase specific transcription factor in epithelial cells. *Oncogene*. **21**, 1485-1492.

Gross BJ, Kraybill BC, Walker S. (2005). Discovery of O-GlcNAc transferase inhibitors. *J Am Chem Soc*. **127**, 14588-14589.

Gross SD, Lewellyn AL, Maller JL. (2001). A constitutively active form of the protein kinase p90Rsk1 is sufficient to trigger the G2/M transition in Xenopus oocytes. *J Biol Chem*. **276**, 46099-46103

Gross SD, Schwab MS, Taieb FE, Lewellyn AL, Qian YW, Maller JL. (2000). The critical role of the MAP kinase pathway in meiosis II in Xenopus oocytes is mediated by p90(Rsk). *Curr Biol*. **10**, 430-438.

Gross SD, Schwab MS, Lewellyn AL, Maller JL. (1999). Induction of metaphase arrest in cleaving Xenopus embryos by the protein kinase p90Rsk. *Science*. **286**, 1365-1367

© 2009 Tous droits réservés.

Guinez C, Mir AM, Leroy Y, Cacan R, Michalski JC, Lefebvre T. (2007). Hsp70-GlcNAc-binding activity is released by stress, proteasome inhibition, and protein misfolding. *Biochem Biophys Res Commun*. **361**, 414-420

Guinez C, Losfeld ME, Cacan R, Michalski JC, Lefebvre T. (2006). Modulation of HSP70 GlcNAc-directed lectin activity by glucose availability and utilization. *Glycobiology*. **16**, 22-28

Guinez C, Lemoine J, Michalski JC, Lefebvre T. (2004). 70-kDa-heat shock protein presents an adjustable lectinic activity towards O-linked N-acetylglucosamine. *Biochem Biophys Res Commun*. **319**, 21-26.

Guo Z, Dunphy WG. (2000). Response of Xenopus Cds1 in cell-free extracts to DNA templates with double-stranded ends. *Mol Biol Cell*. **11**, 1535-1546

Gurcel C, Vercoutter-Edouart AS, Fonbonne C, Mortuaire M, Salvador A, Michalski JC, Lemoine J. (2008). Identification of new O-GlcNAc modified proteins using a click-chemistry-based tagging. *Anal Bioanal Chem*. **390**, 2089-2097

Gutierrez GJ, Vögtlin A, Castro A, Ferby I, Salvagiotto G, Ronai Z, Lorca T, Nebreda AR. (2006). Meiotic regulation of the CDK activator RINGO/Speedy by ubiquitin-proteasome-mediated processing and degradation. *Nat Cell Biol*. **8**, 1084-1094

-*H*-

Haccard O, Lewellyn A, Hartley RS, Erikson E, Maller JL. (1995). Induction of Xenopus oocyte meiotic maturation by MAP kinase. *Dev Biol*. **168**, 677-682

Haccard O, Sarcevic B, Lewellyn A, Hartley R, Roy L, Izumi T, Erikson E, Maller JL. (1993). Induction of metaphase arrest in cleaving Xenopus embryos by MAP kinase. *Science*. **262**, 1262-1265

Hagmann J, Grob M, Burger MM. (1992). The cytoskeletal protein talin is O-glycosylated. *J Biol Chem*. **267**, 14424-14428

Hagting A, Karlsson C, Clute P, Jackman M, Pines J. (1998). MPF localization is controlled by nuclear export. *EMBO J*. **17**, 4127-4138

Hainaut P, Kowalski A, Giorgetti S, Baron V, Van Obberghen E. (1991). Insulin and insulin-like-growth-factor-I (IGF-I) receptors in Xenopus laevis oocytes. Comparison with insulin receptors from liver and muscle. *Biochem J*. **273**, 673-678

Hake LE, Richter JD. (1994). CPEB is a specificity factor that mediates cytoplasmic polyadenylation during Xenopus oocyte maturation. *Cell*. **79**, 617-627

Haltiwanger RS, Grove K, Philipsberg GA. (1998). Modulation of O-linked N-acetylglucosamine levels on nuclear and cytoplasmic proteins in vivo using the peptide O-GlcNAc-beta-N-acetylglucosaminidase inhibitor O-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene)amino-N-phenylcarbamate. *J Biol Chem.* **273**, 3611-3617

Haltiwanger RS, Philipsberg GA. (1997). Mitotic arrest with nocodazole induces selective changes in the level of O-linked N-acetylglucosamine and accumulation of incompletely processed N-glycans on proteins from HT29 cells. *J Biol Chem.* **272**, 8752-8758

© 2009 Tous droits réservés.

Haltiwanger RS, Blomberg MA, Hart GW. (1992). Glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins. Purification and characterization of a uridine diphospho-N-acetylglucosamine:polypeptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase. *J Biol Chem*. **267**, 9005-9013

Haltiwanger RS, Holt GD, Hart GW. (1990). Enzymatic addition of O-GlcNAc to nuclear and cytoplasmic proteins. Identification of a uridine diphospho-N-acetylglucosamine:peptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase. *J Biol Chem*. **265**, 2563-2568

Han I, Oh ES, Kudlow JE. (2000). Responsiveness of the state of O-linked N-acetylglucosamine modification of nuclear pore protein p62 to the extracellular glucose concentration. *Biochem J*. **350**, 109-114

Han I, Kudlow JE. (1997). Reduced O glycosylation of Sp1 is associated with increased proteasome susceptibility. *Mol Cell Biol*. **17**, 2550-2558

Hanlon N, Barford D. (1998). Purification and crystallization of the CDK-associated protein phosphatase KAP expressed in Escherichia coli. *Protein Sci*. **7**, 508-511

Hanover JA, Forsythe ME, Hennessey PT, Brodigan TM, Love DC, Ashwell G, Krause M. A. (2005). Caenorhabditis elegans model of insulin resistance: altered macronutrient storage and dauer formation in an OGT-1 knockout. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**, 11266-11271

Hanover JA, Yu S, Lubas WB, Shin SH, Ragano-Caracciola M, Kochran J, Love DC. (2003). Mitochondrial and nucleocytoplasmic isoforms of O-linked GlcNAc transferase encoded by a single mammalian gene. *Arch Biochem Biophys*. **409**, 287-297

Hanover JA, Cohen CK, Willingham MC, Park MK. (1987). O-linked N-acetylglucosamine is attached to proteins of the nuclear pore. Evidence for cytoplasmic and nucleoplasmic glycoproteins. *J Biol Chem*. **262**, 9887-9894

Hartweck LM, Genger RK, Grey WM, Olszewski NE. (2006). SECRET AGENT and SPINDLY have overlapping roles in the development of Arabidopsis thaliana L. Heyn. *J Exp Bot*. **57**, 865-875

Hartweck LM, Scott CL, Olszewski NE. (2002). Two O-linked N-acetylglucosamine transferase genes of Arabidopsis thaliana L. Heynh. have overlapping functions necessary for gamete and seed development. *Genetics*. **161**, 1279-1291

Hatsell S, Medina L, Merola J, Haltiwanger R, Cowin P. (2003). Plakoglobin is O-glycosylated close to the N-terminal destruction box. *J Biol Chem*. **278**, 37745-37752

Hausen P, Riebesell M. (1991). The early development of Xenopus laevis : an atlas of the histology. *Springer-Verlag*

Heart E, Choi WS, Sung CK. (2000). Glucosamine-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. **278**, E103-E112

Heasman J. (2006). Patterning the early Xenopus embryo. *Development*. **133**, 1205-1217

Hebert LF Jr, Daniels MC, Zhou J, Crook ED, Turner RL, Simmons ST, Neidigh JL, Zhu JS, Baron AD, McClain DA. (1996). Overexpression of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase in transgenic mice leads to insulin resistance. *J Clin Invest*. **98**, 930-936

Heckel D, Comtesse N, Brass N, Blin N, Zang KD, Meese E. (1998). Novel immunogenic antigen homologous to hyaluronidase in meningioma. *Hum Mol Genet*. **7**, 1859-1872

© 2009 Tous droits réservés.

Hehl S, Stoyanov B, Oehrl W, Schönherr R, Wetzker R, Heinemann SH. (2001). Phosphoinositide 3-kinase-gamma induces Xenopus oocyte maturation via lipid kinase activity. *Biochem J*. **360**, 691-698

Hiromura M, Choi CH, Sabourin NA, Jones H, Bachvarov D, Usheva A. (2003). YY1 is regulated by O-linked N-acetylglucosaminylation (O-glcNAcylation). *J Biol Chem*. **278**, 14046-14052

Hochegger H, Klotzbücher A, Kirk J, Howell M, le Guellec K, Fletcher K, Duncan T, Sohail M, Hunt T. (2001). New B-type cyclin synthesis is required between meiosis I and II during Xenopus oocyte maturation. *Development*. **128**, 3795-3807

Hofmann I, Schnölzer M, Kaufmann I, Franke WW. (2002). Symplekin, a constitutive protein of karyo- and cytoplasmic particles involved in mRNA biogenesis in Xenopus laevis oocytes. *Mol Biol Cell*. **13**, 1665-1676

Holt GD, Snow CM, Senior A, Haltiwanger RS, Gerace L, Hart GW. (1987). Nuclear pore complex glycoproteins contain cytoplasmically disposed O-linked N-acetylglucosamine. *J Cell Biol*. **104**, 1157-1164

Holt GD, Hart GW. (1986). The subcellular distribution of terminal N-acetylglucosamine moieties. Localization of a novel protein-saccharide linkage, O-linked GlcNAc. *J Biol Chem*. **261**, 8049-8057

Horne MM, Guadagno TM. (2003). A requirement for MAP kinase in the assembly and maintenance of the mitotic spindle. *J Cell Biol*. **161**, 1021-1028

Housley MP, Rodgers JT, Udeshi ND, Kelly TJ, Shabanowitz J, Hunt DF, Puigserver P, Hart GW. (2008). O-GlcNAc regulates FoxO activation in response to glucose. *J Biol Chem*. **283**, 16283-16292

Hu Y, Belke D, Suarez J, Swanson E, Clark R, Hoshijima M, Dillmann WH. (2005). Adenovirus-mediated overexpression of O-GlcNAcase improves contractile function in the diabetic heart. *Circ Res*. **96**, 1006-1013

Hu Y, Riesland L, Paterson AJ, Kudlow JE. (2004). Phosphorylation of mouse glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase 2 (GFAT2) by cAMP-dependent protein kinase increases the enzyme activity. *J Biol Chem*. **279**, 29988-29993

Huang W, Kessler DS, Erikson RL. (1995). Biochemical and biological analysis of Mek1 phosphorylation site mutants. *Mol Biol Cell*. **6**, 237-245

Huchon D, Rime H, Jessus C, Ozon R. (1993). Control of metaphase I formation in Xenopus oocyte: effects of an indestructible cyclin B and of protein synthesis. *Biol Cell*. **77**, 133-141

Huchon D, Crozet N, Cantenot N, Ozon R. (1981a). Germinal vesicle breakdown in the Xenopus laevis oocyte: description of a transient microtubular structure. *Reprod Nutr Dev*. **21**, 135-148

Huchon D, Ozon R, Fischer EH, Demaille JG. (1981b). The pure inhibitor of cAMP-dependent protein kinase initiates Xenopus laevis meiotic maturation. A 4-step scheme for meiotic maturation. *Mol Cell Endocrinol*. **22**, 211-222

Hutchins JR, Dikovskaya D, Clarke PR. (2003). Regulation of Cdc2/cyclin B activation in Xenopus egg extracts via inhibitory phosphorylation of Cdc25C phosphatase by Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II. *Mol Biol Cell*. **14**, 4003-4014

© 2009 Tous droits réservés.

Hutchins JR, Dikovskaya D, Clarke PR. (2002). Dephosphorylation of the inhibitory phosphorylation site S287 in Xenopus Cdc25C by protein phosphatase-2A is inhibited by 14-3-3 binding. *FEBS Lett*. **528**, 267-271

- I -

Inaba M, Maede Y. (1989). O-N-acetyl-D-glucosamine moiety on discrete peptide of multiple protein 4.1 isoforms regulated by alternative pathways. *J Biol Chem*. **264**, 18149-18155

Inoue D, Ohe M, Kanemori Y, Nobui T, Sagata N. (2007). A direct link of the Mos-MAPK pathway to Erp1/Emi2 in meiotic arrest of Xenopus laevis eggs. *Nature*. **446**, 1100-1104

Izumi T, Maller JL. (1993). Elimination of cdc2 phosphorylation sites in the cdc25 phosphatase blocks initiation of M-phase. *Mol Biol Cell*. **4**, 1337-1350

Izumi T, Walker DH, Maller JL. (1992). Periodic changes in phosphorylation of the Xenopus cdc25 phosphatase regulate its activity. *Mol Biol Cell*. **3**, 927-939

Iwabuchi M, Ohsumi K, Yamamoto TM, Sawada W, Kishimoto T. (2000). Residual Cdc2 activity remaining at meiosis I exit is essential for meiotic M-M transition in Xenopus oocyte extracts. *EMBO J*. **19**, 4513-4523

Iyer SP, Akimoto Y, Hart GW. (2003). Identification and cloning of a novel family of coiled-coil domain proteins that interact with O-GlcNAc transferase. *J Biol Chem*. **278**, 5399-5409

Izhaki A, Swain SM, Tseng TS, Borochov A, Olszewski NE, Weiss D. (2001). The role of SPY and its TPR domain in the regulation of gibberellin action throughout the life cycle of Petunia hybrida plants. *Plant J*. **28**, 181-190

Izumi T, Maller JL. (1991). Phosphorylation of Xenopus cyclins B1 and B2 is not required for cell cycle transitions. *Mol Cell Biol*. **11**, 3860-3867

- J -

Jacobsen SE, Olszewski NE. (1993). Mutations at the SPINDLY locus of Arabidopsis alter gibberellin signal transduction. *Plant Cell*. **5**, 887-896

Jackson SP, Tjian R. (1988). O-glycosylation of eukaryotic transcription factors: implications for mechanisms of transcriptional regulation. *Cell*. **55**, 125-33

Jacobelli S, Hanocq J, Baltus E, Brachet J. (1974). Hormone-induced maturation of Xenopus laevis oocytes: effects of different steroids and study of the properties of a progesterone receptor. *Differentiation*. **2**, 129-135

James LR, Tang D, Ingram A, Ly H, Thai K, Cai L, Scholey JW. (2002). Flux through the hexosamine pathway is a determinant of nuclear factor kappaB- dependent promoter activation. *Diabetes*. **51**, 1146-1156

Janicot M, Flores-Riveros JR, Lane MD. (1991). The insulin-like growth factor 1 (IGF-1) receptor is responsible for mediating the effects of insulin, IGF-1, and IGF-2 in Xenopus laevis oocytes. *J Biol Chem*. **266**, 9382-9391

© 2009 Tous droits réservés.

Jeffrey PD, Russo AA, Polyak K, Gibbs E, Hurwitz J, Massagué J, Pavletich NP. (1995). Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature*.**376**, 313-320

Jínek M, Rehwinkel J, Lazarus BD, Izaurralde E, Hanover JA, Conti E. (2004). The superhelical TPR-repeat domain of O-linked GlcNAc transferase exhibits structural similarities to importin alpha. *Nat Struct Mol Biol*. **11**, 1001-1007

Josefsberg Ben-Yehoshua L, Lewellyn AL, Thomas P, Maller JL. (2007). The role of Xenopus membrane progesterone receptor beta in mediating the effect of progesterone on oocyte maturation. *Mol Endocrinol*. **21**, 664-673

Joseph EM, Melton DA. (1998). Mutant Vg1 ligands disrupt endoderm and mesoderm formation in Xenopus embryos. *Development*. **125**, 2677-2685

Juang YT, Solomou EE, Rellahan B, Tsokos GC. (2002). Phosphorylation and O-linked glycosylation of Elf-1 leads to its translocation to the nucleus and binding to the promoter of the TCR zeta-chain. *J Immunol*. **168**, 2865-2871

- K -

Kamemura K, Hayes BK, Comer FI, Hart GW. (2002). Dynamic interplay between O-glycosylation and O-phosphorylation of nucleocytoplasmic proteins: alternative glycosylation/phosphorylation of THR-58, a known mutational hot spot of c-Myc in lymphomas, is regulated by mitogens. *J Biol Chem*. **277**, 19229-19235

Karaiskou A, Leprêtre AC, Pahlavan G, Du Pasquier D, Ozon R, Jessus C. (2004). Polo-like kinase confers MPF autoamplification competence to growing Xenopus oocytes. *Development*. **131**, 1543-1552

Karaiskou A, Perez LH, Ferby I, Ozon R, Jessus C, Nebreda AR. (2001). Differential regulation of Cdc2 and Cdk2 by RINGO and cyclins. *J Biol Chem*. **276**, 36028-36034

Karaïskou A, Jessus C, Brassac T, Ozon R. (1999). Phosphatase 2A and polo kinase, two antagonistic regulators of cdc25 activation and MPF auto-amplification. *J Cell Sci*. **112**, 3747-3756

Keady BT, Kuo P, Martínez SE, Yuan L, Hake LE. (2007). MAPK interacts with XGef and is required for CPEB activation during meiosis in Xenopus oocytes. *J Cell Sci*. **120,**1093-1103

Kearse KP, Hart GW. (1991a). Topology of O-linked N-acetylglucosamine in murine lymphocytes. *Arch Biochem Biophys*. **290**, 543-548

Kearse KP, Hart GW. (1991b). Lymphocyte activation induces rapid changes in nuclear and cytoplasmic glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **88**, 1701-1705

Keller R, Davidson LA, Shook DR. (2003). How we are shaped: the biomechanics of gastrulation. *Differentiation*. **71**, 171-205

Kelly WG, Dahmus ME, Hart GW. (1993). RNA polymerase II is a glycoprotein. Modification of the COOH-terminal domain by O-GlcNAc. *J Biol Chem*. **268**, 10416-10424

Kelly WG, Hart GW. (1989). Glycosylation of chromosomal proteins: localization of O-linked N-acetylglucosamine in Drosophila chromatin. *Cell*. **57**, 243-251

© 2009 Tous droits réservés.

Khidekel N, Ficarro SB, Clark PM, Bryan MC, Swaney DL, Rexach JE, Sun YE, Coon JJ, Peters EC, Hsieh-Wilson LC. (2007). Probing the dynamics of O-GlcNAc glycosylation in the brain using quantitative proteomics. *Nat Chem Biol*. **3**, 339-348

Khidekel N, Ficarro SB, Peters EC, Hsieh-Wilson LC. (2004). Exploring the O-GlcNAc proteome: direct identification of O-GlcNAc-modified proteins from the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **101**, 13132-13137

Kim EJ, Amorelli B, Abdo M, Thomas CJ, Love DC, Knapp S, Hanover JA. (2007). Distinctive inhibition of O-GlcNAcase isoforms by an alpha-GlcNAc thiolsulfonate. *J Am Chem Soc*. **129**, 14854-14855

Kim EJ, Kang DO, Love DC, Hanover JA. (2006a). Enzymatic characterization of O-GlcNAcase isoforms using a fluorogenic GlcNAc substrate. *Carbohydr Res*. **341**, 971-982

Kim EJ, Perreira M, Thomas CJ, Hanover JA. (2006b). An O-GlcNAcase-specific inhibitor and substrate engineered by the extension of the N-acetyl moiety. *J Am Chem Soc*. **128**, 4234-4235

Kim JH, Richter JD. (2007). RINGO/cdk1 and CPEB mediate poly(A) tail stabilization and translational regulation by ePAB. *Genes Dev*. **21**, 2571-2579

Kim JH, Richter JD. (2006). Opposing polymerase-deadenylase activities regulate cytoplasmic polyadenylation. *Mol Cell*. **24**, 173-183

Kim HS, Kim EM, Lee J, Yang WH, Park TY, Kim YM, Cho JW. (2006). Heat shock protein 60 modified with O-linked N-acetylglucosamine is involved in pancreatic beta-cell death under hyperglycemic conditions. *FEBS Lett*. **580**, 2311-2316

Kim YH, Song M, Oh YS, Heo K, Choi JW, Park JM, Kim SH, Lim S, Kwon HM, Ryu SH, Suh PG. (2006). Inhibition of phospholipase C-beta1-mediated signaling by O-GlcNAc modification. *J Cell Physiol*. **207**, 689-696

Kimura K, Hirano M, Kobayashi R, Hirano T. (1998). Phosphorylation and activation of 13S condensin by Cdc2 in vitro. *Science*. **282**, 487-490

King IA, Hounsell EF. (1989). Cytokeratin 13 contains O-glycosidically linked N-acetylglucosamine residues. *J Biol Chem*. **264**, 14022-14028

King ML, Messitt TJ, Mowry KL. (2005). Putting RNAs in the right place at the right time: RNA localization in the frog oocyte. *Biol Cell*. **97**, 19-33

Kloc M, Etkin LD. (1995). Two distinct pathways for the localization of RNAs at the vegetal cortex in Xenopus oocytes. *Development*. **121**, 287-297

Knapp S, Abdo M, Ajayi K, Huhn RA, Emge TJ, Kim EJ, Hanover JA. (2007). Tautomeric modification of GlcNAc-thiazoline. *Org Lett*. **9**, 2321-2324

Kobayashi H, Minshull J, Ford C, Golsteyn R, Poon R, Hunt T. (1991). On the synthesis and destruction of A- and B-type cyclins during oogenesis and meiotic maturation in Xenopus laevis. *J Cell Biol*. **114**, 755-765

Konrad RJ, Zhang F, Hale JE, Knierman MD, Becker GW, Kudlow JE. (2002). Alloxan is an inhibitor of the enzyme O-linked N-acetylglucosamine transferase. *Biochem Biophys Res Commun*. **293**, 207-212

© 2009 Tous droits réservés.

Kops GJ, Weaver BA, Cleveland DW. (2005). On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat Rev Cancer*. **5**, 773-785

Kornfeld R. (1967). Studies on L-glutamine D-fructose 6-phosphate amidotransferase. I. Feedback inhibition by uridine diphosphate-N-acetylglucosamine. *J Biol Chem*. **242**, 3135-3141

Kosako H, Gotoh Y, Nishida E. (1994). Mitogen-activated protein kinase kinase is required for the mos-induced metaphase arrest. *J Biol Chem*. **269**, 28354-28358

Kreppel LK, Hart GW. (1999). Regulation of a cytosolic and nuclear O-GlcNAc transferase. Role of the tetratricopeptide repeats. *J Biol Chem*. 274, 32015-32022

Kreppel LK, Blomberg MA, Hart GW. (1997). Dynamic glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Cloning and characterization of a unique O-GlcNAc transferase with multiple tetratricopeptide repeats. *J Biol Chem*. **272**, 9308-9315

Kristjánsdóttir K, Safi A, Shah C, Rudolph J. (2006). Autophosphorylation of Ser66 on Xenopus Myt1 is a prerequisite for meiotic inactivation of Myt1. *Cell Cycle*. **5**, 421-427

Ku M, Melton DA. (1993). Xwnt-11: a maternally expressed Xenopus wnt gene. *Development*. **119**, 1161-1173

Kumagai A, Yakowec PS, Dunphy WG. (1998). 14-3-3 proteins act as negative regulators of the mitotic inducer Cdc25 in Xenopus egg extracts. *Mol Biol Cell*. **9,** 345-354

Kumagai A, Dunphy WG. (1996). Purification and molecular cloning of Plx1, a Cdc25-regulatory kinase from Xenopus egg extracts. *Science*. **273**, 1377-1380

Kumagai A, Dunphy WG. (1992). Regulation of the cdc25 protein during the cell cycle in Xenopus extracts. *Cell*. **70**, 139-151

Kuo M, Zilberfarb V, Gangneux N, Christeff N, Issad T. (2008). O-glycosylation of FoxO1 increases its transcriptional activity towards the glucose 6-phosphatase gene. *FEBS Lett*. **582**, 829-834

- L -

Lacroix I, Lipcey C, Imbert J, Kahn-Perlès B. (2002). Sp1 transcriptional activity is up-regulated by phosphatase 2A in dividing T lymphocytes. *J Biol Chem*. **277**, 9598-9605

Lamarre-Vincent N, Hsieh-Wilson LC. (2003). Dynamic glycosylation of the transcription factor CREB: a potential role in gene regulation. *J Am Chem Soc*. **125**, 6612-6613

Lazarus BD, Love DC, Hanover JA. (2006). Recombinant O-GlcNAc transferase isoforms: identification of O-GlcNAcase, yes tyrosine kinase, and tau as isoform-specific substrates. *Glycobiology*. **16**, 415-421

Lazarus BD, Roos MD, Hanover JA. (2005. Mutational analysis of the catalytic domain of O-linked N-acetylglucosaminyl transferase. *J Biol Chem*. **280**, 35537-35544

Lee SC, Steinhardt RA. (1981). pH changes associated with meiotic maturation in oocytes of Xenopus laevis. *Dev Biol*. **85**, 358-369

© 2009 Tous droits réservés.

Lefebvre T, Pinte S, Guérardel C, Deltour S, Martin-Soudant N, Slomianny MC, Michalski JC, Leprince D. (2004). The tumor suppressor HIC1 (hypermethylated in cancer 1) is O-GlcNAc glycosylated. *Eur J Biochem.* **271**, 3843-3854

Lefebvre T, Ferreira S, Dupont-Wallois L, Bussière T, Dupire MJ, Delacourte A, Michalski JC, Caillet-Boudin ML. (2003). Evidence of a balance between phosphorylation and O-GlcNAc glycosylation of Tau proteins--a role in nuclear localization. *Biochim Biophys Acta*. **1619**, 167-176

Lefebvre T, Planque N, Leleu D, Bailly M, Caillet-Boudin ML, Saule S, Michalski JC. (2002). O-glycosylation of the nuclear forms of Pax-6 products in quail neuroretina cells. *J Cell Biochem*. **85**, 208-218

Lefebvre T, Cieniewski C, Lemoine J, Guerardel Y, Leroy Y, Zanetta JP, Michalski JC. (2001). Identification of N-acetyl-d-glucosamine-specific lectins from rat liver cytosolic and nuclear compartments as heat-shock proteins. *Biochem J*. **360**, 179-188

Lehman DM, Fu DJ, Freeman AB, Hunt KJ, Leach RJ, Johnson-Pais T, Hamlington J, Dyer TD, Arya R, Abboud H, Göring HH, Duggirala R, Blangero J, Konrad RJ, Stern MP. (2005). A single nucleotide polymorphism in MGEA5 encoding O-GlcNAc-selective N-acetyl-beta-D glucosaminidase is associated with type 2 diabetes in Mexican Americans. *Diabetes*. **54**, 1214-1221

Lenormand JL, Dellinger RW, Knudsen KE, Subramani S, Donoghue DJ. (1999). Speedy: a novel cell cycle regulator of the G2/M transition. *EMBO J*. **18**, 1869-1877

Lewis T, Groom LA, Sneddon AA, Smythe C, Keyse SM. (1995). XCL100, an inducible nuclear MAP kinase phosphatase from Xenopus laevis: its role in MAP kinase inactivation in differentiated cells and its expression during early development. *J Cell Sci*. **108**, 2885-2896

Li X, Lu F, Wang JZ, Gong CX. (2006). Concurrent alterations of O-GlcNAcylation and phosphorylation of tau in mouse brains during fasting. *Eur J Neurosci*. **23**, 2078-2086

Li Y, Roux C, Lazereg S, LeCaer JP, Laprévote O, Badet B, Badet-Denisot MA. (2007). Identification of a novel serine phosphorylation site in human glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase isoform 1. *Biochemistry*. **46**, 13163-13169

Lieberman SL, Ruderman JV. (2004). CK2 beta, which inhibits Mos function, binds to a discrete domain in the N-terminus of Mos. *Dev Biol*. **268**, 271-279

Lin CY, Madsen ML, Yarm FR, Jang YJ, Liu X, Erikson RL. (2000). Peripheral Golgi protein GRASP65 is a target of mitotic polo-like kinase (Plk) and Cdc2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97**, 12589-12594

Liu J, Marchase RB, Chatham JC. (2007a). Glutamine-induced protection of isolated rat heart from ischemia/reperfusion injury is mediated via the hexosamine biosynthesis pathway and increased protein O-GlcNAc levels. *J Mol Cell Cardiol*. **42**, 177-185

Liu J, Marchase RB, Chatham JC. (2007b). Increased O-GlcNAc levels during reperfusion lead to improved functional recovery and reduced calpain proteolysis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **293**, H1391-H1399

Liu J, Pang Y, Chang T, Bounelis P, Chatham JC, Marchase RB. (2006). Increased hexosamine biosynthesis and protein O-GlcNAc levels associated with myocardial protection against calcium paradox and ischemia. *J Mol Cell Cardiol*. **40**, 303-312

© 2009 Tous droits réservés.

Liu J, Maller JL. (2005). Calcium elevation at fertilization coordinates phosphorylation of XErp1/Emi2 by Plx1 and CaMK II to release metaphase arrest by cytostatic factor. *Curr Biol*. **15**, 1458-1468.

Liu JX, Singh B, Wlodek D, Arlinghaus RB. (1990). Cell cycle-mediated structural and functional alteration of P85gag-mos protein kinase activity. *Oncogene*. **5**, 171-178

Liu K, Paterson AJ, Zhang F, McAndrew J, Fukuchi K, Wyss JM, Peng L, Hu Y, Kudlow JE. (2004). Accumulation of protein O-GlcNAc modification inhibits proteasomes in the brain and coincides with neuronal apoptosis in brain areas with high O-GlcNAc metabolism. *J Neurochem*. **89**, 1044-1055

Liu XJ, Sorisky A, Zhu L, Pawson T. (1995). Molecular cloning of an amphibian insulin receptor substrate 1-like cDNA and involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced Xenopus oocyte maturation. *Mol Cell Biol*. **15**, 3563-3570

Liu Z, Patiño R. (1993). High-affinity binding of progesterone to the plasma membrane of Xenopus oocytes: characteristics of binding and hormonal and developmental control. *Biol Reprod*. **49**, 980-988

Lohka MJ, Hayes MK, Maller JL. (1988). Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **85**, 3009-3013

López-Hernández E, Santos E. (1999). Oncogenic Ras-induced germinal vesicle breakdown is independent of phosphatidylinositol 3-kinase in Xenopus oocytes. *FEBS Lett*. **451**, 284-288

Lorca T, Castro A, Martinez AM, Vigneron S, Morin N, Sigrist S, Lehner C, Dorée M, Labbé JC. (1998). Fizzy is required for activation of the APC/cyclosome in Xenopus egg extracts. *EMBO J*. **17**, 3565-3575

Lorca T, Cruzalegui FH, Fesquet D, Cavadore JC, Méry J, Means A, Dorée M. (1993). Calmodulin-dependent protein kinase II mediates inactivation of MPF and CSF upon fertilization of Xenopus eggs. *Nature*. **366**, 270-273

Lorca T, Labbé JC, Devault A, Fesquet D, Capony JP, Cavadore JC, Le Bouffant F, Dorée M. (1992). Dephosphorylation of cdc2 on threonine 161 is required for cdc2 kinase inactivation and normal anaphase. *EMBO J*. **11**, 2381-2390

Love DC, Hanover JA. (2005). The hexosamine signaling pathway: deciphering the "O-GlcNAc code". *Sci STKE*. **312**, re13

Love DC, Kochan J, Cathey RL, Shin SH, Hanover JA. (2003). Mitochondrial and nucleocytoplasmic targeting of O-linked GlcNAc transferase. *J Cell Sci*. **116**, 647-654

Lowe M, Rabouille C, Nakamura N, Watson R, Jackman M, Jämsä E, Rahman D, Pappin DJ, Warren G. (1998). Cdc2 kinase directly phosphorylates the cis-Golgi matrix protein GM130 and is required for Golgi fragmentation in mitosis. *Cell*. **94**, 783-793

Lubas WA, Hanover JA. (2000). Functional expression of O-linked GlcNAc transferase. Domain structure and substrate specificity. *J Biol Chem*. **275**, 10983-10988

Lubas WA, Frank DW, Krause M, Hanover JA. (1997). O-Linked GlcNAc transferase is a conserved nucleocytoplasmic protein containing tetratricopeptide repeats. *J Biol Chem*. **272**, 9316-9324

© 2009 Tous droits réservés.

Lubas WA, Smith M, Starr CM, Hanover JA. (1995). Analysis of nuclear pore protein p62 glycosylation. *Biochemistry*. **34**, 1686-1694

Lutz LB, Jamnongjit M, Yang WH, Jahani D, Gill A, Hammes SR. (2003). Selective modulation of genomic and nongenomic androgen responses by androgen receptor ligands. *Mol Endocrinol*. **17**, 1106-1116

Lutz LB, Cole LM, Gupta MK, Kwist KW, Auchus RJ, Hammes SR. (2001). Evidence that androgens are the primary steroids produced by Xenopus laevis ovaries and may signal through the classical androgen receptor to promote oocyte maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **98**, 13728-13733

Lutz LB, Kim B, Jahani D, Hammes SR. (2000). G protein beta gamma subunits inhibit nongenomic progesterone-induced signaling and maturation in Xenopus laevis oocytes. Evidence for a release of inhibition mechanism for cell cycle progression. *J Biol Chem*. **275**, 41512-41520

- M -

Ma C, Benink HA, Cheng D, Montplaisir V, Wang L, Xi Y, Zheng PP, Bement WM, Liu XJ. (2006). Cdc42 activation couples spindle positioning to first polar body formation in oocyte maturation. *Curr Biol*. **16**, 214-220

MacArthur H, Houston DW, Bubunenko M, Mosquera L, King ML. (2000). DEADSouth is a germ plasm specific DEAD-box RNA helicase in Xenopus related to eIF4A. Mech Dev. **95**, 291-295

Majumdar G, Harrington A, Hungerford J, Martinez-Hernandez A, Gerling IC, Raghow R, Solomon S. (2006). Insulin dynamically regulates calmodulin gene expression by sequential o-glycosylation and phosphorylation of sp1 and its subcellular compartmentalization in liver cells. *J Biol Chem*. **281**, 3642-3650

Majumdar G, Harmon A, Candelaria R, Martinez-Hernandez A, Raghow R, Solomon SS. (2003). O-glycosylation of Sp1 and transcriptional regulation of the calmodulin gene by insulin and glucagon. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. **285**, E584-E591

Malumbres M, Barbacid M. (2001). To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer*. Dec;**1**, 222-231

Maller JL. (2003). Signal transduction. Fishing at the cell surface. *Science*. **300**, 594-595

Maller JL, Koontz JW. (1981). A study of the induction of cell division in amphibian oocytes by insulin. *Dev Biol*. **85**, 309-316

Maller JL, Krebs EG. (1977). Progesterone-stimulated meiotic cell division in Xenopus oocytes. Induction by regulatory subunit and inhibition by catalytic subunit of adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J Biol Chem*. **252**, 1712-1718

Margolis SS, Walsh S, Weiser DC, Yoshida M, Shenolikar S, Kornbluth S. (2003). PP1 control of M phase entry exerted through 14-3-3-regulated Cdc25 dephosphorylation. *EMBO J*. **22**, 5734-5745

Marshall S, Bacote V, Traxinger RR. (1991). Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. *J Biol Chem*. **266**, 4706-4712

© 2009 Tous droits réservés.

Martelli AM, Cocco L, Capitani S, Miscia S, Papa S, Manzoli FA. (2007). Nuclear phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate, phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, and PTen: emerging key regulators of anti-apoptotic signaling and carcinogenesis. *Eur J Histochem*. **51**, 125-131

Martinez S, Pastén P, Suarez K, García A, Nualart F, Montecino M, Hinrichs MV, Olate J. (2007). Classical Xenopus laevis progesterone receptor associates to the plasma membrane through its ligand-binding domain. *J Cell Physiol*. **211**, 560-567

Martinez S, Grandy R, Pasten P, Montecinos H, Montecino M, Olate J, Hinrichs MV. (2006). Plasma membrane destination of the classical Xenopus laevis progesterone receptor accelerates progesterone-induced oocyte maturation. *J Cell Biochem*. **99**, 853-859

Martinez-Fleites C, Macauley MS, He Y, Shen DL, Vocadlo DJ, Davies GJ. (2008). Structure of an O-GlcNAc transferase homolog provides insight into intracellular glycosylation. *Nat Struct Mol Biol*. **15**, 764-765

März P, Stetefeld J, Bendfeldt K, Nitsch C, Reinstein J, Shoeman RL, Dimitriades-Schmutz B, Schwager M, Leiser D, Ozcan S, Otten U, Ozbek S. (2006). Ataxin-10 interacts with O-linked beta-N-acetylglucosamine transferase in the brain. *J Biol Chem*. **281,** 20263-20270

Masui Y, Wang P. (1998). Cell cycle transition in early embryonic development of Xenopus laevis. *Biol Cell*. **90**, 537-548

Masui Y, Markert CL. (1971). Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J Exp Zool*. **177**, 129-145

Maton G, Lorca T, Girault JA, Ozon R, Jessus C. (2005). Differential regulation of Cdc2 and Aurora-A in Xenopus oocytes: a crucial role of phosphatase 2A. *J Cell Sci*. **118**, 2485-2494

Matten WT, Copeland TD, Ahn NG, Vande Woude GF. (1996). Positive feedback between MAP kinase and Mos during Xenopus oocyte maturation. *Dev Biol*. **179**, 485-492

Matten W, Daar I, Vande Woude GF. (1994). Protein kinase A acts at multiple points to inhibit Xenopus oocyte maturation. *Mol Cell Biol.* **14**, 4419-4426

McClain DA, Lubas WA, Cooksey RC, Hazel M, Parker GJ, Love DC, Hanover JA. (2002). Altered glycan-dependent signaling induces insulin resistance and hyperleptinemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **99**, 10695-10699

McGrew LL, Dworkin-Rastl E, Dworkin MB, Richter JD. (1989). Poly(A) elongation during Xenopus oocyte maturation is required for translational recruitment and is mediated by a short sequence element. *Genes Dev*. **3**, 803-815

Medina L, Grove K, Haltiwanger RS. (1998). SV40 large T antigen is modified with O-linked N-acetylglucosamine but not with other forms of glycosylation. *Glycobiology*. **8**, 383-391

Meikrantz W, Smith DM, Sladicka MM, Schlegel RA. (1991). Nuclear localization of an O-glycosylated protein phosphotyrosine phosphatase from human cells. *J Cell Sci*. **98**, 303-307

Mendez R, Barnard D, Richter JD. (2002). Differential mRNA translation and meiotic progression require Cdc2-mediated CPEB destruction. *EMBO J*. **21**, 1833-1844

Mendez R, Murthy KG, Ryan K, Manley JL, Richter JD. (2000a). Phosphorylation of CPEB by Eg2 mediates the recruitment of CPSF into an active cytoplasmic polyadenylation complex. *Mol Cell.* **6**, 1253-1259

© 2009 Tous droits réservés.

Mendez R, Hake LE, Andresson T, Littlepage LE, Ruderman JV, Richter JD. (2000b). Phosphorylation of CPE binding factor by Eg2 regulates translation of c-mos mRNA. *Nature*. **404**, 302-307

Miake-Lye R, Kirschner MW. (1985). Induction of early mitotic events in a cell-free system. *Cell*. **41**, 165-175

Miller MW, Hanover JA. (1994). Functional nuclear pores reconstituted with beta 1-4 galactose-modified O-linked N-acetylglucosamine glycoproteins. *J Biol Chem*. **269**, 9289-9297

Minshull J, Murray A, Colman A, Hunt T. (1991). Xenopus oocyte maturation does not require new cyclin synthesis. *J Cell Biol*. **114**, 767-772

Minshull J, Blow JJ, Hunt T. (1989). Translation of cyclin mRNA is necessary for extracts of activated xenopus eggs to enter mitosis. *Cell*. **56**, 947-956

Mochida S, Hunt T. (2007). Calcineurin is required to release Xenopus egg extracts from meiotic M phase. *Nature*. **449**, 336-340

Mood K, Bong YS, Lee HS, Ishimura A, Daar IO. (2004). Contribution of JNK, Mek, Mos and PI-3K signaling to GVBD in Xenopus oocytes. *Cell Signal*. **16**, 631-642

Morris MC, Heitz A, Mery J, Heitz F, Divita G. (2000). An essential phosphorylation-site domain of human cdc25C interacts with both 14-3-3 and cyclins. *J Biol Chem*. **275**, 28849-28857

Mosquera L, Forristall C, Zhou Y, King ML. (1993). A mRNA localized to the vegetal cortex of Xenopus oocytes encodes a protein with a nanos-like zinc finger domain. *Development*. **117**, 377-386

Mueller PR, Coleman TR, Kumagai A, Dunphy WG. (1995). Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15. *Science*. **270**, 86-90

Mulner-Lorillon O, Bellé R, Cormier P, Drewing S, Minella O, Poulhe R, Schmalzing G. (1995). Brefeldin A provokes indirect activation of cdc2 kinase (MPF) in Xenopus oocytes, resulting in meiotic cell division. *Dev Biol*. **170**, 223-229

Mulner O, Huchon D, Thibier C, Ozon R. (1979). Cyclic AMP synthesis in Xenopus laevis oocytes: inhibition by progesterone. *Biochim Biophys Acta*. **582**, 179-184

Murakami MS, Moody SA, Daar IO, Morrison DK. (2004). Morphogenesis during Xenopus gastrulation requires Wee1-mediated inhibition of cell proliferation. *Development*. **131**, 571-580

Murakami MS, Vande Woude GF. (1998). Analysis of the early embryonic cell cycles of Xenopus; regulation of cell cycle length by Xe-wee1 and Mos. *Development*. **125**, 237-248

Murphy JE, Hanover JA, Froehlich M, DuBois G, Keen JH. (1994). Clathrin assembly protein AP-3 is phosphorylated and glycosylated on the 50-kDa structural domain. *J Biol Chem*. **269**, 21346-21352

Musicki B, Kramer MF, Becker RE, Burnett AL. (2005). Inactivation of phosphorylated endothelial nitric oxide synthase (Ser-1177) by O-GlcNAc in diabetes-associated erectile dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **102**, 11870-11875

Muslin AJ, Klippel A, Williams LT. (1993a). Phosphatidylinositol 3-kinase activity is important for progesterone-induced Xenopus oocyte maturation. *Mol Cell Biol*. **13**, 6661-6666

© 2009 Tous droits réservés.

Muslin AJ, MacNicol AM, Williams LT. (1993b). Raf-1 protein kinase is important for progesterone-induced Xenopus oocyte maturation and acts downstream of mos. *Mol Cell Biol*. **13**, 4197-4202

Myers A, Holmans P, Marshall H, Kwon J, Meyer D, Ramic D, Shears S, Booth J, DeVrieze FW, Crook R, Hamshere M, Abraham R, Tunstall N, Rice F, Carty S, Lillystone S, Kehoe P, Rudrasingham V, Jones L, Lovestone S, Perez-Tur J, Williams J, Owen MJ, Hardy J, Goate AM. (2000). Susceptibility locus for Alzheimer's disease on chromosome 10. *Science*. **290**, 2304-2305

-N-

Nakajima H, Toyoshima-Morimoto F, Taniguchi E, Nishida E. (2003). Identification of a consensus motif for Plk (Polo-like kinase) phosphorylation reveals Myt1 as a Plk1 substrate. *J Biol Chem*. **278**, 25277-25280

Nakajo N, Yoshitome S, Iwashita J, Iida M, Uto K, Ueno S, Okamoto K, Sagata N. (2000). Absence of Wee1 ensures the meiotic cell cycle in Xenopus oocytes. *Genes Dev*. **14**, 328-338

Nakajo N, Oe T, Uto K, Sagata N. (1999). Involvement of Chk1 kinase in prophase I arrest of Xenopus oocytes. *Dev Biol*. **207**, 432-444

Nanashima N, Asano J, Hayakari M, Nakamura T, Nakano H, Yamada T, Shimizu T, Akita M, Fan Y, Tsuchida S. (2005). Nuclear localization of STAT5A modified with O-linked N-acetylglucosamine and early involution in the mammary gland of Hirosaki hairless rat. *J Biol Chem*. **280**, 43010-43016

Nebreda AR, Gannon JV, Hunt T. (1995). Newly synthesized protein(s) must associate with p34cdc2 to activate MAP kinase and MPF during progesterone-induced maturation of Xenopus oocytes. *EMBO J*. **14**, 5597-5607

Nelkin B, Nichols C, Vogelstein B. (1980). Protein factor(s) from mitotic CHO cells induce meiotic maturation in Xenopus laevis oocytes *FEBS Lett*. **109**, 233-238

Nishiyama T, Ohsumi K, Kishimoto T. (2007). Phosphorylation of Erp1 by p90rsk is required for cytostatic factor arrest in Xenopus laevis eggs. *Nature*. **446**, 1096-1099

Nishizawa M, Furuno N, Okazaki K, Tanaka H, Ogawa Y, Sagata N. (1993). Degradation of Mos by the N-terminal proline (Pro2)-dependent ubiquitin pathway on fertilization of Xenopus eggs: possible significance of natural selection for Pro2 in Mos. *EMBO J*. **12**, 4021-4027

Nishizawa M, Okazaki K, Furuno N, Watanabe N, Sagata N. (1992). The 'second-codon rule' and autophosphorylation govern the stability and activity of Mos during the meiotic cell cycle in Xenopus oocytes. *EMBO J*. **11**, 2433-2446

Noach N, Segev Y, Levi I, Segal S, Priel E. (2007). Modification of topoisomerase I activity by glucose and by O-GlcNAcylation of the enzyme protein. *Glycobiology*. **17**, 1357-1364

Nolte D, Niemann S, Müller U. (2003). Specific sequence changes in multiple transcript system DYT3 are associated with X-linked dystonia parkinsonism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **100**, 10347-10352

Nolte D, Müller U. (2002). Human O-GlcNAc transferase (OGT): genomic structure, analysis of splice variants, fine mapping in Xq13.1. *Mamm Genome*. **13**, 62-64

© 2009 Tous droits réservés.

Nöt LG, Marchase RB, Fülöp N, Brocks CA, Chatham JC. (2007). Glucosamine administration improves survival rate after severe hemorrhagic shock combined with trauma in rats. *Shock*. **28**, 345-352

- O -

Oberman F, Yisraeli JK. (1995). Two protocols for nonradioactive in situ hybridization to Xenopus oocytes. *Trends Genet*. **11**, 83-84

O'Connor CM, Smith LD. (1976). Inhibition of oocyte maturation by theophylline: possible mechanism of action. *Dev Biol*. **52**, 318-322

O'Donnell N, Zachara NE, Hart GW, Marth JD. (2004). Ogt-dependent X-chromosome-linked protein glycosylation is a requisite modification in somatic cell function and embryo viability. *Mol Cell Biol*. **24**, 1680-1690

Ohsumi K, Sawada W, Kishimoto T. (1994). Meiosis-specific cell cycle regulation in maturing Xenopus oocytes. *J Cell Sci*. **107**, 3005-3013

Okumura E, Fukuhara T, Yoshida H, Hanada Si S, Kozutsumi R, Mori M, Tachibana K, Kishimoto T. (2002). Akt inhibits Myt1 in the signalling pathway that leads to meiotic G2/M-phase transition. *Nat Cell Biol*. **4**, 111-116

Okuyama R, Marshall S. (2003). UDP-N-acetylglucosaminyl transferase (OGT) in brain tissue: temperature sensitivity and subcellular distribution of cytosolic and nuclear enzyme. *J Neurochem*. **86**, 1271-1280

Olszewski N, Sun TP, Gubler F. (2002). Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways. *Plant Cell*. **14**, S61-S80

Oskarsson M, McClements WL, Blair DG, Maizel JV, Vande Woude GF. (1980). Properties of a normal mouse cell DNA sequence (sarc) homologous to the src sequence of Moloney sarcoma virus. *Science*. **207**, 1222-1224

Ossipova O, He X, Green J. (2002). Molecular cloning and developmental expression of Par-1/MARK homologues XPar-1A and XPar-1B from Xenopus laevis. *Mech Dev*. **119**, S143-S148

- P -

Padmanabhan K, Richter JD. (2006). Regulated Pumilio-2 binding controls RINGO/Spy mRNA translation and CPEB activation. *Genes Dev*. **20**, 199-209

Palmer A, Gavin AC, Nebreda AR. (1998). A link between MAP kinase and p34(cdc2)/cyclin B during oocyte maturation: p90(rsk) phosphorylates and inactivates the p34(cdc2) inhibitory kinase Myt1. *EMBO J*. **17**, 5037-5047

Park MK, D'Onofrio M, Willingham MC, Hanover JA. (1987). A monoclonal antibody against a family of nuclear pore proteins (nucleoporins): O-linked N-acetylglucosamine is part of the immunodeterminant. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **84**, 6462-6466

© 2009 Tous droits réservés.

Park SY, Ryu J, Lee W. (2005). O-GlcNAc modification on IRS-1 and Akt2 by PUGNAc inhibits their phosphorylation and induces insulin resistance in rat primary adipocytes. *Exp Mol Med*. **37**, 220-229

Parker G, Taylor R, Jones D, McClain D. (2004). Hyperglycemia and inhibition of glycogen synthase in streptozotocin-treated mice: role of O-linked N-acetylglucosamine. *J Biol Chem*. **279**, 20636-20642

Parker GJ, Lund KC, Taylor RP, McClain DA. (2003). Insulin resistance of glycogen synthase mediated by o-linked N-acetylglucosamine. *J Biol Chem*. **278**, 10022-10027

Patra D, Wang SX, Kumagai A, Dunphy WG. (1999). The xenopus Suc1/Cks protein promotes the phosphorylation of G(2)/M regulators. *J Biol Chem*. **274**, 36839-36842

Patra D, Dunphy WG. (1998). Xe-p9, a Xenopus Suc1/Cks protein, is essential for the Cdc2-dependent phosphorylation of the anaphase- promoting complex at mitosis. *Genes Dev*. **12**, 2549-2559

Patra D, Dunphy WG. (1996). Xe-p9, a Xenopus Suc1/Cks homolog, has multiple essential roles in cell cycle control. *Genes Dev*. **10**, 1503-1515

Patti ME, Virkamäki A, Landaker EJ, Kahn CR, Yki-Järvinen H. (1999). Activation of the hexosamine pathway by glucosamine in vivo induces insulin resistance of early postreceptor insulin signaling events in skeletal muscle. *Diabetes*. **48**, 1562-1571

Payne DM, Rossomando AJ, Martino P, Erickson AK, Her JH, Shabanowitz J, Hunt DF, Weber MJ, Sturgill TW. (1991). Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO J*. **10**, 885-892

Perdiguero E, Pillaire MJ, Bodart JF, Hennersdorf F, Frödin M, Duesbery NS, Alonso G, Nebreda AR. (2003). Xp38gamma/SAPK3 promotes meiotic G(2)/M transition in Xenopus oocytes and activates Cdc25C. *EMBO J*. **22**, 5746-5756

Perkowska E, Macgregor HC, Birnstiel ML. (1968). Gene amplification in the oocyte nucleus of mutant and wild-type Xenopus laevis. *Nature*. **217**, 649-650

Perona R. (2006). Cell signalling: growth factors and tyrosine kinase receptors. *Clin Transl Oncol*. **8**, 77-82

Peter M, Labbé JC, Dorée M, Mandart E. (2002). A new role for Mos in Xenopus oocyte maturation: targeting Myt1 independently of MAPK. *Development*. **129**, 2129-2139

Peter M, Castro A, Lorca T, Le Peuch C, Magnaghi-Jaulin L, Dorée M, Labbé JC. (2001). The APC is dispensable for first meiotic anaphase in Xenopus oocytes. *Nat Cell Biol*. **3**, 83-87

Pham CD, Vuyyuru VB, Yang Y, Bai W, Singh B. (1999). Evidence for an important role of serine 16 and its phosphorylation in the stabilization of c-Mos. *Oncogene*. **18**, 4287-4294

Picard A, Galas S, Peaucellier G, Dorée M. (1996). Newly assembled cyclin B-cdc2 kinase is required to suppress DNA replication between meiosis I and meiosis II in starfish oocytes. *EMBO J*. **15**, 3590-3598

Pines J, Hunter T. (1994). The differential localization of human cyclins A and B is due to a cytoplasmic retention signal in cyclin B. *EMBO J*. **13**, 3772-3781

© 2009 Tous droits réservés.

Pol-Rodriguez MM, Schwartz GA, English AW. (2001). Post-translational phosphorylation of the slow/beta myosin heavy chain isoform in adult rabbit masseter muscle. *J Muscle Res Cell Motil*. **22**, 513-519

Poon RY, Yamashita K, Adamczewski JP, Hunt T, Shuttleworth J. (1993). The cdc2-related protein p40MO15 is the catalytic subunit of a protein kinase that can activate p33cdk2 and p34cdc2. *EMBO J*. **12**, 3123-3132

Posada J, Yew N, Ahn NG, Vande Woude GF, Cooper JA. (1993). Mos stimulates MAP kinase in Xenopus oocytes and activates a MAP kinase kinase in vitro. *Mol Cell Biol*. **13**, 2546-2553

Posada J, Sanghera J, Pelech S, Aebersold R, Cooper JA. (1991). Tyrosine phosphorylation and activation of homologous protein kinases during oocyte maturation and mitogenic activation of fibroblasts. *Mol Cell Biol*. **11**, 2517-2528

Privalsky ML. (1990). A subpopulation of the avian erythroblastosis virus v-erbA protein, a member of the nuclear hormone receptor family, is glycosylated. *J Virol*. **64**, 463-466

- Q -

Qian YW, Erikson E, Taieb FE, Maller JL. (2001). The polo-like kinase Plx1 is required for activation of the phosphatase Cdc25C and cyclin B-Cdc2 in Xenopus oocytes. *Mol Biol Cell*. **12**, 1791-1799

Qian YW, Erikson E, Li C, Maller JL. (1998a). Activated polo-like kinase Plx1 is required at multiple points during mitosis in Xenopus laevis. *Mol Cell Biol*. **18**, 4262-4271

Qian YW, Erikson E, Maller JL. (1998b). Purification and cloning of a protein kinase that phosphorylates and activates the polo-like kinase Plx1. *Science*. **282**, 1701-1704

- R -

Rabouille C, Levine TP, Peters JM, Warren G. (1995). An NSF-like ATPase, p97, and NSF mediate cisternal regrowth from mitotic Golgi fragments. *Cell*. **82**, 905-914

Rao FV, Dorfmueller HC, Villa F, Allwood M, Eggleston IM, van Aalten DM. (2006). Structural insights into the mechanism and inhibition of eukaryotic O-GlcNAc hydrolysis. *EMBO J*. **25**, 1569-1578

Raman M, Chen W, Cobb MH. (2007). Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*. **26**, 3100-3112

Rapp UR, Goldsborough MD, Mark GE, Bonner TI, Groffen J, Reynolds FH Jr, Stephenson JR. (1983). Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **80**, 4218-4222

Rasar M, DeFranco DB, Hammes SR. (2006). Paxillin regulates steroid-triggered meiotic resumption in oocytes by enhancing an all-or-none positive feedback kinase loop. *J Biol Chem*. **281**, 39455-39464

Rauh NR, Schmidt A, Bormann J, Nigg EA, Mayer TU. (2005). Calcium triggers exit from meiosis II by targeting the APC/C inhibitor XErp1 for degradation. *Nature*. **437**, 1048-1052

© 2009 Tous droits réservés.

Reason AJ, Morris HR, Panico M, Marais R, Treisman RH, Haltiwanger RS, Hart GW, Kelly WG, Dell A. (1992). Localization of O-GlcNAc modification on the serum response transcription factor. *J Biol Chem*. **267**, 16911-16921

Reynhout JK, Smith LD. (1974). Studies on the appearance and nature of a maturation-inducing factor in the cytoplasm of amphibian oocytes exposed to progesterone. *Dev Biol*. **38**, 394-400

Richter JD, Sonenberg N. (2005). Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature*. **433**, 477-480

Rime H, Jessus C, Ozon R. (1995). Tyrosine phosphorylation of p34cdc2 is regulated by protein phosphatase 2A in growing immature Xenopus oocytes. *Exp Cell Res*. **219**, 29-38

Rime H, Huchon D, De Smedt V, Thibier C, Galaktionov K, Jessus C, Ozon R. (1994). Microinjection of Cdc25 protein phosphatase into Xenopus prophase oocyte activates MPF and arrests meiosis at metaphase I. *Biol Cell*. **82**, 11-22

Rime H, Haccard O, Ozon R. (1992). Activation of p34cdc2 kinase by cyclin is negatively regulated by cyclic amp-dependent protein kinase in Xenopus oocytes. *Dev Biol*. **151**, 105-110

Ríos-Cardona D, Ricardo-González RR, Chawla A, Ferrell JE Jr. (2008). A role for GPRx, a novel GPR3/6/12-related G-protein coupled receptor, in the maintenance of meiotic arrest in Xenopus laevis oocytes. *Dev Biol*. **317**, 380-388

Robertson LA, Moya KL, Breen KC. (2004). The potential role of tau protein O-glycosylation in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. **6**, 489-495

Robertson M, Swain SM, Chandler PM, Olszewski NE. (1998). Identification of a negative regulator of gibberellin action, HvSPY, in barley. *Plant Cell*. **10**, 995-1007

Robinson KA, Sens DA, Buse MG. (1993). Pre-exposure to glucosamine induces insulin resistance of glucose transport and glycogen synthesis in isolated rat skeletal muscles. Study of mechanisms in muscle and in rat-1 fibroblasts overexpressing the human insulin receptor. *Diabetes*. **42**, 1333-1346

Roeder AD, Gard DL. (1994). Confocal microscopy of F-actin distribution in Xenopus oocytes. *Zygote*. **2**, 111-124

Romo X, Pastén P, Martínez S, Soto X, Lara P, de Arellano AR, Torrejón M, Montecino M, Hinrichs MV, Olate J. (2008). xRic-8 is a GEF for Gsalpha and participates in maintaining meiotic arrest in Xenopus laevis oocytes. *J Cell Physiol*. **214**, 673-80

Romo X, Hinrichs MV, Guzmán L, Olate J. (2002). G(alpha)s levels regulate Xenopus laevis oocyte maturation. *Mol Reprod Dev*. **63**, 104-109

Roos MD, Hanover JA. (2000). Structure of O-linked GlcNAc transferase: mediator of glycan-dependent signaling. *Biochem Biophys Res Commun*. **271**, 275-280

Roos MD, Xie W, Su K, Clark JA, Yang X, Chin E, Paterson AJ, Kudlow JE. (1998). Streptozotocin, an analog of N-acetylglucosamine, blocks the removal of O-GlcNAc from intracellular proteins. *Proc Assoc Am Physicians*. **110**, 422-432

Roos MD, Su K, Baker JR, Kudlow JE. (1997). O glycosylation of an Sp1-derived peptide blocks known Sp1 protein interactions. *Mol Cell Biol*. **17**, 6472-6480

© 2009 Tous droits réservés.

Roquemore EP, Chevrier MR, Cotter RJ, Hart GW. (1996). Dynamic O-GlcNAcylation of the small heat shock protein alpha B-crystallin. *Biochemistry*. **35**, 3578-3586

Rossetti L, Hawkins M, Chen W, Gindi J, Barzilai N. (1995). In vivo glucosamine infusion induces insulin resistance in normoglycemic but not in hyperglycemic conscious rats. *J Clin Invest*. **96**, 132-140

Roy LM, Swenson KI, Walker DH, Gabrielli BG, Li RS, Piwnica-Worms H, Maller JL. (1991). Activation of p34cdc2 kinase by cyclin A. *J Cell Biol*. **113**, 507-514

Roy LM, Singh B, Gautier J, Arlinghaus RB, Nordeen SK, Maller JL. (1990). The cyclin B2 component of MPF is a substrate for the c-mos(xe) proto-oncogene product. *Cell*. **61**, 825-831

-S-

Sadler SE, Maller JL. (1981). Progesterone inhibits adenylate cyclase in Xenopus oocytes. Action on the guanine nucleotide regulatory protein. *J Biol Chem*. **256**, 6368-6373

Sagata N, Daar I, Oskarsson M, Showalter SD, Vande Woude GF. (1989a). The product of the mos proto-oncogene as a candidate "initiator" for oocyte maturation. *Science*. **245**, 643-646

Sagata N, Watanabe N, Vande Woude GF, Ikawa Y. (1989b). The c-mos proto-oncogene product is a cytostatic factor responsible for meiotic arrest in vertebrate eggs. *Nature*. **342**, 512-518

Sagata N, Oskarsson M, Copeland T, Brumbaugh J, Vande Woude GF. (1988). Function of c-mos proto-oncogene product in meiotic maturation in Xenopus oocytes. *Nature*. **335**, 519-525

Sato K, Fukami Y, Stith BJ. (2006). Signal transduction pathways leading to Ca2+ release in a vertebrate model system: lessons from Xenopus eggs. *Semin Cell Dev Biol*. **17**, 285-292

Satterwhite LL, Lohka MJ, Wilson KL, Scherson TY, Cisek LJ, Corden JL, Pollard TD. (1992). Phosphorylation of myosin-II regulatory light chain by cyclin-p34cdc2: a mechanism for the timing of cytokinesis. *J Cell Biol*. **118**, 595-605

Sayat R, Grubac V, Wiltshire L, Persad S. (2008). O-GlcNAc-glycosylation of beta-catenin regulates its nuclear localization and transcriptional activity. *Exp Cell Res*. Epub ahead of print

Schirm M, Kalmokoff M, Aubry A, Thibault P, Sandoz M, Logan SM. (2004). Flagellin from Listeria monocytogenes is glycosylated with beta-O-linked N-acetylglucosamine. *J Bacteriol*. **186**, 6721-6727

Schmidt A, Rauh NR, Nigg EA, Mayer TU. (2006). Cytostatic factor: an activity that puts the cell cycle on hold. *J Cell Sci*. **119**, 1213-1218

Schmidt A, Duncan PI, Rauh NR, Sauer G, Fry AM, Nigg EA, Mayer TU. (2005). Xenopus polo-like kinase Plx1 regulates XErp1, a novel inhibitor of APC/C activity. *Genes Dev*. **19**, 502-513

Schultz J, Pils B. (2002). Prediction of structure and functional residues for O-GlcNAcase, a divergent homologue of acetyltransferases. *FEBS Lett*. **529**, 179-182

Schwab MS, Roberts BT, Gross SD, Tunquist BJ, Taieb FE, Lewellyn AL, Maller JL. (2001). Bub1 is activated by the protein kinase p90(Rsk) during Xenopus oocyte maturation. *Curr Biol*. **11**, 141-150

© 2009 Tous droits réservés.

Seo J, Lee KJ. (2004). Post-translational modifications and their biological functions: proteomic analysis and systematic approaches. *J Biochem Mol Biol*. **37**, 35-44

Setoyama D, Yamashita M, Sagata N. (2007). Mechanism of degradation of CPEB during Xenopus oocyte maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **104**, 18001-18006

Shafi R, Iyer SP, Ellies LG, O'Donnell N, Marek KW, Chui D, Hart GW, Marth JD. (2000). The O-GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97**, 5735-5739

Shaw P, Freeman J, Bovey R, Iggo R. (1996). Regulation of specific DNA binding by p53: evidence for a role for O-glycosylation and charged residues at the carboxy-terminus. *Oncogene*. **12** 921-930

Sheets MD, Wu M, Wickens M. (1995). Polyadenylation of c-mos mRNA as a control point in Xenopus meiotic maturation. *Nature*. **374**, 511-516

Sheldon WL, Macauley MS, Taylor EJ, Robinson CE, Charnock SJ, Davies GJ, Vocadlo DJ, Black GW. (2006). Functional analysis of a group A streptococcal glycoside hydrolase Spy1600 from family 84 reveals it is a beta-N-acetylglucosaminidase and not a hyaluronidase. *Biochem J*. **399**, 241-247

Shen A, Kamp HD, Gründling A, Higgins DE. (2006). A bifunctional O-GlcNAc transferase governs flagellar motility through anti-repression. *Genes Dev*. **20**, 3283-3295

Sheng J, Kumagai A, Dunphy WG, Varshavsky A. (2002). Dissection of c-MOS degron. *EMBO J*. **21**, 6061-6071

Sheng Y, Montplaisir V, Liu XJ. (2005). Co-operation of Gsalpha and Gbetagamma in maintaining G2 arrest in Xenopus oocytes. *J Cell Physiol*. **202**, 32-40

Sheng Y, Tiberi M, Booth RA, Ma C, Liu XJ. (2001). Regulation of Xenopus oocyte meiosis arrest by G protein betagamma subunits. *Curr Biol*. **11**, 405-416

Shibuya EK, Morris J, Rapp UR, Ruderman JV. (1996). Activation of the Xenopus oocyte mitogen-activated protein kinase pathway by Mos is independent of Raf. *Cell Growth Differ*. **7**, 235-241

Shimuta K, Nakajo N, Uto K, Hayano Y, Okazaki K, Sagata N. (2002). Chk1 is activated transiently and targets Cdc25A for degradation at the Xenopus midblastula transition. *EMBO J*. **21**, 3694-3703

Silverstone AL, Tseng TS, Swain SM, Dill A, Jeong SY, Olszewski NE, Sun TP. (2007). Functional analysis of SPINDLY in gibberellin signaling in Arabidopsis. *Plant Physiol*. **143**, 987-1000

Skop AR, Liu H, Yates J 3rd, Meyer BJ, Heald R. (2004). Dissection of the mammalian midbody proteome reveals conserved cytokinesis mechanisms. *Science*. **305**, 61-66

Slawson C, Zachara NE, Vosseller K, Cheung WD, Lane MD, Hart GW. (2005). Perturbations in O-linked beta-N-acetylglucosamine protein modification cause severe defects in mitotic progression and cytokinesis. *J Biol Chem*. **280**, 32944-32956

Slawson C, Lakshmanan T, Knapp S, Hart GW. (2008). A Mitotic GlcNAcylation/Phosphorylation Signaling Complex Alters the Post-Translational State of the Cytoskeletal Protein Vimentin. *Mol Biol Cell*. Epub ahead of print

© 2009 Tous droits réservés.

Slawson C, Pidala J, Potter R. (2001). Increased N-acetyl-beta-glucosaminidase activity in primary breast carcinomas corresponds to a decrease in N-acetylglucosamine containing proteins. *Biochim Biophys Acta*. **1537**, 147-157

Smith LD. (1989). The induction of oocyte maturation: transmembrane signaling events and regulation of the cell cycle. *Development*. **107**, 685-699

Sohn KC, Do SI. (2005). Transcriptional regulation and O-GlcNAcylation activity of zebrafish OGT during embryogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. **337**, 256-263

Sohn KC, Lee KY, Park JE, Do SI. (2004). OGT functions as a catalytic chaperone under heat stress response: a unique defense role of OGT in hyperthermia. *Biochem Biophys Res Commun*. **322**, 1045-1051

Solomon MJ, Harper JW, Shuttleworth J. (1993). CAK, the p34cdc2 activating kinase, contains a protein identical or closely related to p40MO15. *EMBO J*. **12,** 3133-3142

Snow CM, Senior A, Gerace L. (1987). Monoclonal antibodies identify a group of nuclear pore complex glycoproteins. *J Cell Biol*. **104**, 1143-1156

Sohaskey ML, Ferrell JE Jr. (2002). Activation of p42 mitogen-activated protein kinase (MAPK), but not c-Jun NH(2)-terminal kinase, induces phosphorylation and stabilization of MAPK phosphatase XCL100 in Xenopus oocytes. *Mol Biol Cell*. **13**, 454-468

Song M, Kim HS, Park JM, Kim SH, Kim IH, Ryu SH, Suh PG. (2008). o-GlcNAc transferase is activated by CaMKIV-dependent phosphorylation under potassium chloride-induced depolarization in NG-108-15 cells. *Cell Signal*. **20**, 94-104

Sprung R, Nandi A, Chen Y, Kim SC, Barma D, Falck JR, Zhao Y. (2005). Tagging-via-substrate strategy for probing O-GlcNAc modified proteins. *J Proteome Res*. **4**, 950-957

Stebbins-Boaz B, Cao Q, de Moor CH, Mendez R, Richter JD. (1999). Maskin is a CPEB-associated factor that transiently interacts with elF-4E. *Mol Cell*. **4**, 1017-1027

Stebbins-Boaz B, Hake LE, Richter JD. (1996). CPEB controls the cytoplasmic polyadenylation of cyclin, Cdk2 and c-mos mRNAs and is necessary for oocyte maturation in Xenopus. *EMBO J*. **15**, 2582-2592

Stevens I, Derua R, Rondelez E, Waelkens E, Merlevede W, Goris J. (1999). Identification of cyk, a cyclin B2 kinase, as a novel calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and its role during Xenopus laevis oocyte maturation. *Exp Cell Res*. **252**, 303-318

Strausfeld U, Fernandez A, Capony JP, Girard F, Lautredou N, Derancourt J, Labbe JC, Lamb NJ. (1994). Activation of p34cdc2 protein kinase by microinjection of human cdc25C into mammalian cells. Requirement for prior phosphorylation of cdc25C by p34cdc2 on sites phosphorylated at mitosis. *J Biol Chem*. **269**, 5989-6000

Strausfeld U, Labbé JC, Fesquet D, Cavadore JC, Picard A, Sadhu K, Russell P, Dorée M. (1991). Dephosphorylation and activation of a p34cdc2/cyclin B complex in vitro by human CDC25 protein. *Nature*. **351**, 242-245

Stubbs KA, Zhang N, Vocadlo DJ. (2006). A divergent synthesis of 2-acyl derivatives of PUGNAc yields selective inhibitors of O-GlcNAcase. *Org Biomol Chem*. **4**, 839-845

© 2009 Tous droits réservés.

Sturgill TW, Ray LB, Erikson E, Maller JL. (1988). Insulin-stimulated MAP-2 kinase phosphorylates and activates ribosomal protein S6 kinase II. *Nature*. **334**, 715-718

Sukegawa J, Blobel G. (1993). A nuclear pore complex protein that contains zinc finger motifs, binds DNA, and faces the nucleoplasm. *Cell*. **72**, 29-38

Sümegi M, Hunyadi-Gulyás E, Medzihradszky KF, Udvardy A. (2003). 26S proteasome subunits are O-linked N-acetylglucosamine-modified in Drosophila melanogaster. *Biochem Biophys Res Commun*. **312,** 1284-1289

Sunkara PS, Wright DA, Rao PN. (1979). Mitotic factors from mammalian cells induce germinal vesicle breakdown and chromosome condensation in amphibian oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **76**, 2799-2802

Swain SM, Tseng TS, Thornton TM, Gopalraj M, Olszewski NE. (2002). SPINDLY is a nuclear-localized repressor of gibberellin signal transduction expressed throughout the plant. *Plant Physiol*. **129**, 605-615

Swain SM, Tseng TS, Olszewski NE. (2001). Altered expression of SPINDLY affects gibberellin response and plant development. *Plant Physiol*. **126**, 1174-1185

Swenson KI, Farrell KM, Ruderman JV. (1986). The clam embryo protein cyclin A induces entry into M phase and the resumption of meiosis in Xenopus oocytes. *Cell*. **47**, 861-870

-T-

Tai HC, Khidekel N, Ficarro SB, Peters EC, Hsieh-Wilson LC. (2004). Parallel identification of O-GlcNAc-modified proteins from cell lysates. *J Am Chem Soc*. **126**, 10500-10501

Taieb FE, Gross SD, Lewellyn AL, Maller JL. (2001). Activation of the anaphase-promoting complex and degradation of cyclin B is not required for progression from Meiosis I to II in Xenopus oocytes. *Curr Biol*. **11**, 508-513

Tang J, Neidigh JL, Cooksey RC, McClain DA. (2000). Transgenic mice with increased hexosamine flux specifically targeted to beta-cells exhibit hyperinsulinemia and peripheral insulin resistance. *Diabetes*. **49**, 1492-1499

Thibier-Fouchet C, Mulner O, Ozon R. (1976). Progesterone biosynthesis and metabolism by ovarian follicles and isolated oocytes Xenopus laevis. *Biol Reprod*. **14**, 317-326

Thornton TM, Swain SM, Olszewski NE. (1999). Gibberellin signal transduction presents ellipsisthe SPY who O-GlcNAc'd me. *Trends Plant Sci*. **4**, 424-428

Tian J, Kim S, Heilig E, Ruderman JV. (2000). Identification of XPR-1, a progesterone receptor required for Xenopus oocyte activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97**, 14358-14363

Toleman C, Paterson AJ, Kudlow JE. (2006a). Location and characterization of the O-GlcNAcase active site. *Biochim Biophys Acta*. **1760**, 829-839

Toleman CA, Paterson AJ, Kudlow JE. (2006b). The histone acetyltransferase NCOAT contains a zinc finger-like motif involved in substrate recognition. *J Biol Chem*. **281**, 3918-3925

© 2009 Tous droits réservés.

Toleman C, Paterson AJ, Whisenhunt TR, Kudlow JE. (2004). Characterization of the histone acetyltransferase (HAT) domain of a bifunctional protein with activable O-GlcNAcase and HAT activities. *J Biol Chem*. **279**, 53665-53673

Torres CR, Hart GW. (1984). Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc. *J Biol Chem*. **259**, 3308-3317

Toyoshima-Morimoto F, Taniguchi E, Nishida E. (2002). Plk1 promotes nuclear translocation of human Cdc25C during prophase. *EMBO Rep*. **3**, 341-348

Tung JJ, Jackson PK. (2005). Emi1 class of proteins regulate entry into meiosis and the meiosis I to meiosis II transition in Xenopus oocytes. *Cell Cycle*. **4**, 478-482

- U -

Uchiyama K, Kondo H. (2005). p97/p47-Mediated biogenesis of Golgi and ER. *J Biochem*. **137**, 115-119

- V -

Vasquez RJ, Gard DL, Cassimeris L. (1999). Phosphorylation by CDK1 regulates XMAP215 function in vitro. *Cell Motil Cytoskeleton*. **43**, 310-321

Vasquez RJ, Gard DL, Cassimeris L. (1994). XMAP from Xenopus eggs promotes rapid plus end assembly of microtubules and rapid microtubule polymer turnover. *J Cell Biol*. **127**, 985-993

Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di Francesco V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nusskern D, Rusch DB, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu S, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng ML, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferriera S, Garg N, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkoch C, Pratts E, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers YH, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint NN, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigó R, Campbell MJ, Sjolander KV, Karlak B, Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yooseph S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang YH, Coyne M, Dahlke C, Mays A, Dombroski M,

© 2009 Tous droits réservés.

Donnelly M, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N, Nodell M, Pan S, Peck J, Peterson M, Rowe W, Sanders R, Scott J, Simpson M, Smith T, Sprague A, Stockwell T, Turner R, Venter E, Wang M, Wen M, Wu D, Wu M, Xia A, Zandieh A, Zhu X. (2001). The sequence of the human genome. *Science*. **291**, 1304-1351

Veerababu G, Tang J, Hoffman RT, Daniels MC, Hebert LF Jr, Crook ED, Cooksey RC, McClain DA. (2000). Overexpression of glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase in the liver of transgenic mice results in enhanced glycogen storage, hyperlipidemia, obesity, and impaired glucose tolerance. *Diabetes*. **49**, 2070-2078

Vicart A, Lefebvre T, Imbert J, Fernandez A, Kahn-Perlès B. (2006). Increased chromatin association of Sp1 in interphase cells by PP2A-mediated dephosphorylations. *J Mol Biol*. **364**, 897-908

Vojtek AB, Hollenberg SM, Cooper JA. (1993). Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell*. **74**, 205-214

Vorlaufer E, Peters JM. (1998). Regulation of the cyclin B degradation system by an inhibitor of mitotic proteolysis. *Mol Biol Cell*. **9**, 1817-1831

Vosseller K, Wells L, Lane MD, Hart GW. (2002). Elevated nucleocytoplasmic glycosylation by O-GlcNAc results in insulin resistance associated with defects in Akt activation in 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **99**, 5313-5318

- W -

Wakiyama M, Imataka H, Sonenberg N. (2000). Interaction of eIF4G with poly(A)-binding protein stimulates translation and is critical for Xenopus oocyte maturation. *Curr Biol*. **10**, 1147-1150

Wahli W, Dawid IB, Wyler T, Jaggi RB, Weber R, Ryffel GU. (1979). Vitellogenin in Xenopus laevis is encoded in a small family of genes. *Cell*. **16**, 535-549

Walgren JL, Vincent TS, Schey KL, Buse MG. (2003). High glucose and insulin promote O-GlcNAc modification of proteins, including alpha-tubulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. **284**, E424-E434

Wang J, Cao WL, Liu XJ. (2006). Protein kinase A(PKA)-restrictive and PKA-permissive phases of oocyte maturation. *Cell Cycle*. **5**, 213-217

Wang J, Liu XJ. (2004). Progesterone inhibits protein kinase A (PKA) in Xenopus oocytes: demonstration of endogenous PKA activities using an expressed substrate. *J Cell Sci*. **117**, 5107-5116

Wang R, He G, Nelman-Gonzalez M, Ashorn CL, Gallick GE, Stukenberg PT, Kirschner MW, Kuang J. (2007). Regulation of Cdc25C by ERK-MAP kinases during the G2/M transition. *Cell*. **128**, 1119-11132

Wang YY, Charlesworth A, Byrd SM, Gregerson R, MacNicol MC, MacNicol AM. (2008). A novel mRNA 3' untranslated region translational control sequence regulates Xenopus Wee1 mRNA translation. *Dev Biol*. **317**, 454-466

© 2009 Tous droits réservés.

Wang Z, Pandey A, Hart GW. (2007). Dynamic interplay between O-linked N-acetylglucosaminylation and glycogen synthase kinase-3-dependent phosphorylation. *Mol Cell Proteomics*. **6**, 1365-1379

Wasserman WJ, Smith LD. (1978). The cyclic behavior of a cytoplasmic factor controlling nuclear membrane breakdown. *J Cell Biol*. **78**, R15-R22

Wasserman WJ, Masui Y. (1975). Effects of cyclohexamide on a cytoplasmic factor initiating meiotic naturation in Xenopus oocytes. *Exp Cell Res*. **91**, 381-388

Watanabe N, Broome M, Hunter T. (1995). Regulation of the human WEE1Hu CDK tyrosine 15-kinase during the cell cycle. *EMBO J*. **14**, 1878-1891

Watanabe N, Hunt T, Ikawa Y, Sagata N. (1991). Independent inactivation of MPF and cytostatic factor (Mos) upon fertilization of Xenopus eggs. *Nature*. **352**, 247-248

Weber KL, Sokac AM, Berg JS, Cheney RE, Bement WM. (2004). A microtubule-binding myosin required for nuclear anchoring and spindle assembly. *Nature*. **431**, 325-329

Wells L, Kreppel LK, Comer FI, Wadzinski BE, Hart GW. (2004). O-GlcNAc transferase is in a functional complex with protein phosphatase 1 catalytic subunits. *J Biol Chem*. **279**, 38466-38470

Wells L, Gao Y, Mahoney JA, Vosseller K, Chen C, Rosen A, Hart GW. (2002a). Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: further characterization of the nucleocytoplasmic beta-N-acetylglucosaminidase, O-GlcNAcase. *J Biol Chem*. **277**, 1755-1761

Wells L, Vosseller K, Cole RN, Cronshaw JM, Matunis MJ, Hart GW. (2002b) Mapping sites of O-GlcNAc modification using affinity tags for serine and threonine post-translational modifications. *Mol Cell Proteomics*. **1**, 791-804

Wells NJ, Watanabe N, Tokusumi T, Jiang W, Verdecia MA, Hunter T. (1999). The C-terminal domain of the Cdc2 inhibitory kinase Myt1 interacts with Cdc2 complexes and is required for inhibition of G(2)/M progression. *J Cell Sci*. **112**, 3361-3371

Whisenhunt TR, Yang X, Bowe DB, Paterson AJ, Van Tine BA, Kudlow JE. (2006). Disrupting the enzyme complex regulating O-GlcNAcylation blocks signaling and development. *Glycobiology*. **16**, 551-563

Whitford M, Faulkner P. (1992). A structural polypeptide of the baculovirus Autographa californica nuclear polyhedrosis virus contains O-linked N-acetylglucosamine. *J Virol*. **66**, 3324-3329

Wrabl JO, Grishin NV. (2001). Homology between O-linked GlcNAc transferases and proteins of the glycogen phosphorylase superfamily. *J Mol Biol*. **314**, 365-374

Wu JQ, Hansen DV, Guo Y, Wang MZ, Tang W, Freel CD, Tung JJ, Jackson PK, Kornbluth S. (2007). Control of Emi2 activity and stability through Mos-mediated recruitment of PP2A. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **104**, 16564-16569

-X-

Xing D, Feng W, Not LG, Miller AP, Zhang Y, Chen YF, Majid-Hassan E, Chatham JC, Oparil S. (2008). Increased Protein O-GlcNAc Modification Inhibits Inflammatory and Neointimal Responses to Acute Endoluminal Arterial Injury. Am J Physiol Heart Circ Physiol. **295**, H335-H342

© 2009 Tous droits réservés.

- Y -

Yang J, Winkler K, Yoshida M, Kornbluth S. (1999). Maintenance of G2 arrest in the Xenopus oocyte: a role for 14-3-3-mediated inhibition of Cdc25 nuclear import. EMBO J. **18**, 2174-2183

Yang J, Bardes ES, Moore JD, Brennan J, Powers MA, Kornbluth S. (1998). Control of cyclin B1 localization through regulated binding of the nuclear export factor CRM1. *Genes Dev*. **12**, 2131-2143

Yang S, Zou LY, Bounelis P, Chaudry I, Chatham JC, Marchase RB. (2006). Glucosamine administration during resuscitation improves organ function after trauma hemorrhage. *Shock*. **25**, 600-607

Yang WH, Kim JE, Nam HW, Ju JW, Kim HS, Kim YS, Cho JW. (2006). Modification of p53 with O-linked N-acetylglucosamine regulates p53 activity and stability. *Nat Cell Biol*. **8**, 1074-1083

Yang WH, Lutz LB, Hammes SR. (2003). Xenopus laevis ovarian CYP17 is a highly potent enzyme expressed exclusively in oocytes. Evidence that oocytes play a critical role in Xenopus ovarian androgen production. *J Biol Chem*. **278**, 9552-9559

Yang X, Ongusaha PP, Miles PD, Havstad JC, Zhang F, So WV, Kudlow JE, Michell RH, Olefsky JM, Field SJ, Evans RM. (2008). Phosphoinositide signalling links O-GlcNAc transferase to insulin resistance. *Nature*. **451**, 964-969

Yang X, Zhang F, Kudlow JE. (2002). Recruitment of O-GlcNAc transferase to promoters by corepressor mSin3A: coupling protein O-GlcNAcylation to transcriptional repression. *Cell*. **110**, 69-80

Yang X, Su K, Roos MD, Chang Q, Paterson AJ, Kudlow JE. (2001). O-linkage of N-acetylglucosamine to Sp1 activation domain inhibits its transcriptional capability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **98**, 6611-6616

Yang Y, Pham CD, Vuyyuru VB, Liu H, Arlinghaus RB, Singh B. (1998). Evidence of a functional interaction between serine 3 and serine 25 Mos phosphorylation sites. A dominant inhibitory role of serine 25 phosphorylation on Mos protein kinase. *J Biol Chem*. **273**, 15946-15953

Yang Y, Herrmann CH, Arlinghaus RB, Singh B. (1996). Inhibition of v-Mos kinase activity by protein kinase A. *Mol Cell Biol*. **16**, 800-809

Yao PJ, Coleman PD. (1998a). Reduced O-glycosylated clathrin assembly protein AP180: implication for synaptic vesicle recycling dysfunction in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. **252**, 33-36

Yao PJ, Coleman PD. (1998b). Reduction of O-linked N-acetylglucosamine-modified assembly protein-3 in Alzheimer's disease. *J Neurosci*. **18**, 2399-2411

Yew N, Mellini ML, Vande Woude GF. (1992). Meiotic initiation by the mos protein in Xenopus. *Nature*. **355**, 649-652

Yue J, Ferrell JE Jr. (2006). Mechanistic studies of the mitotic activation of Mos. *Mol Cell Biol*. **26**, 5300-5309

Yoshizaki N, Yonezawa S. (1994). Cathepsin D Activity in the Vitellogenesis of Xenopus laevis. *Dev, Growth & Differ*. **36**, 299–306

© 2009 Tous droits réservés.

Yuzwa SA, Macauley MS, Heinonen JE, Shan X, Dennis RJ, He Y, Whitworth GE, Stubbs KA, McEachern EJ, Davies GJ, Vocadlo DJ. (2008). A potent mechanism-inspired O-GlcNAcase inhibitor that blocks phosphorylation of tau in vivo. *Nat Chem Biol*. **4**, 483-490

- Z -

Zachara NE, O'Donnell N, Cheung WD, Mercer JJ, Marth JD, Hart GW. (2004). Dynamic O-GlcNAc modification of nucleocytoplasmic proteins in response to stress. A survival response of mammalian cells. *J Biol Chem*. **279**, 30133-30142

Zeng G, Nystrom FH, Ravichandran LV, Cong LN, Kirby M, Mostowski H, Quon MJ. (2000). Roles for insulin receptor, PI3-kinase, and Akt in insulin-signaling pathways related to production of nitric oxide in human vascular endothelial cells. *Circulation*. **101**, 1539-1545

Zhang F, Su K, Yang X, Bowe DB, Paterson AJ, Kudlow JE. (2003). O-GlcNAc modification is an endogenous inhibitor of the proteasome. *Cell*. **115**, 715-725

Zhang F, Strand A, Robbins D, Cobb MH, Goldsmith EJ. (1994). Atomic structure of the MAP kinase ERK2 at 2.3 A resolution. *Nature*. **367**, 704-711

Zhang J, Houston DW, King ML, Payne C, Wylie C, Heasman J. (1998). The role of maternal VegT in establishing the primary germ layers in Xenopus embryos. *Cell*. **94**, 515-524

Zhang X, Bennett V. (1996). Identification of O-linked N-acetylglucosamine modification of ankyrinG isoforms targeted to nodes of Ranvier. *J Biol Chem*. **271**, 31391-31398

Zhao Y, Haccard O, Wang R, Yu J, Kuang J, Jessus C, Goldberg ML. (2008). Roles of greatwall kinase in the regulation of cdc25 phosphatase. *Mol Biol Cell*. **19**, 1317-1327

Zheng Y. (2004). G protein control of microtubule assembly. *Annu Rev Cell Dev Biol*. **20**, 867-894

Zhivkov V, Tosheva R, Zhivkova Y. (1975). Concentration of uridine diphosphate sugars in various tissues of vertebrates. *Comp Biochem Physiol B*. **51**, 421-424

Zhu L, Ohan N, Agazie Y, Cummings C, Farah S, Liu XJ. (1998). Molecular cloning and characterization of Xenopus insulin-like growth factor-1 receptor: its role in mediating insulin-induced Xenopus oocyte maturation and expression during embryogenesis. *Endocrinology*. **139**, 949-954

Zhu W, Leber B, Andrews DW. (2001). Cytoplasmic O-glycosylation prevents cell surface transport of E-cadherin during apoptosis. *EMBO J*. **20**, 5999-6007

Zhu Y, Bond J, Thomas P. (2003). Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progestin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **100**, 2237-2242

Zou L, Yang S, Hu S, Chaudry IH, Marchase RB, Chatham JC. (2007). The protective effects of PUGNAc on cardiac function after trauma-hemorrhage are mediated via increased protein O-GlcNAc levels. *Shock*. **27**, 402-408

© 2009 Tous droits réservés.

Résumé

La *O*-N-acétylglucosaminylation, ou *O*-GlcNAc, est une modification post-traductionnelle dynamique et réversible de nombreuses protéines nucléo-cytoplasmiques. Cette glycosylation, souvent comparée à la phosphorylation avec laquelle elle peut d'ailleurs entrer en compétition, semble prendre part à la régulation de nombreux processus biologiques parmi lesquels le cycle cellulaire et l'embryogenèse.

Le cycle cellulaire est le processus par lequel une cellule-mère se divise pour former deux cellules-filles génétiquement identiques entre elles. De nombreux acteurs moléculaires contrôlent l'entrée et la progression des cellules dans les quatre phases du cycle (G1, S, G2, M) et sa dérégulation participe activement aux processus de cancérisation. Dans un premier temps, nos travaux ont porté sur l'étude de la *O*-GlcNAc dans le contrôle de la reprise méiotique de l'ovocyte de *Xenopus laevis*, un processus analogue à la transition G2/M du cycle cellulaire. Cette transition G2/M est caractérisée par l'activation simultanée du MPF, pour « M-phase promoting factor », facteur universel d'entrée en phase M, de la voie MAPK p39mos/MEK/erk2 mais aussi par une augmentation du niveau global de *O*-GlcNAc intra-ovocytaire.

Nous avons démontré que cette augmentation du niveau de *O*-GlcNAc était primordiale pour la reprise méiotique ovocytaire puisque l'inhibition de l'OGT, l'enzyme catalysant le transfert du résidu de GlcNAc sur la protéine, empêche la transition G2/M de l'ovocyte alors que sa surexpression potentialise ce phénomène. Nous avons également identifié 24 protéines dont le niveau de *O*-GlcNAc augmente au cours de la reprise méiotique et appartenant à des classes fonctionnelles différentes dont des protéines du cytosquelette (la bêta-actine et l'alpha-tubuline), la kinase erk2, la phosphatase PP2A, plusieurs enzymes de la glycolyse et encore certaines protéines ribosomales.

Dans un second temps, nous avons entrepris l'étude des variations des niveaux de *O*-GlcNAc, d'OGT et d'UDP-GlcNAc (le nucléotide-sucre donneur pour l'addition de *O*-GlcNAc) au cours de l'ovogenèse et de l'embryogenèse précoce chez *Xenopus laevis.* Nos résultats montrent que la dynamique de la *O*-GlcNAc est complexe tout au long de l'ovogenèse et de l'embryogenèse. Notamment, nous avons observé une diminution drastique et transitoire de la *O*-GlcNAc dès le début de la gastrulation suggérant une implication de la glycosylation dans les phénomènes de migration cellulaire caractéristiques de cette étape du développement qui permet la mise en place des trois feuillets embryonnaires à l'origine de tous les tissus de l'adulte. Au regard de ces résultats nous proposons que les processus de reprise méiotique mais également d'ovogenèse et d'embryogenèse sont en partie orchestrés par la *O*-GlcNAc.

Mots-clefs : cycle cellulaire, *O*-GlcNAc, OGT, embryogenèse, ovocyte, *Xenopus laevis*, méiose, transition G2/M, gastrulation, MPF, erk2.

Summary

O-linked-N-acetylglucosaminylation or *O*-GlcNAc is a dynamic and reversible post-translational modification of numerous nucleo-cytoplasmic proteins. This glycosylation, often compared to phosphorylation with which it can compete, seems to take part in the regulation of many cellular processes among which cell cycle and embryogenesis.

Cell cycle is the process by which a cell can divide to produce two daughter cells genetically identical. The entry and the progress of the cell through the four phases of the cell cycle (G1, S, G2, M) is controlled by numerous factors and its deregulation is one of the major cause of cancer. First, our works have focused on the study of *O*-GlcNAc implication in the control of *Xenopus laevis* oocyte meiotic resumption, a process analogous to the G2/M transition of the cell cycle. This G2/M transition is characterized by the simultaneous activation of the MPF (M-phase Promoting Factor), the universal regulator of the M-Phase entry and of the MAPK pathway p39mos/MEK/erk2 but also by a sudden increase in the oocyte *O*-GlcNAc content.

We have demonstrated that this *O*-GlcNAc increase was essential for meiotic resumption since the inhibition of OGT, the enzyme that catalyses the transfer of the *O*-GlcNAc moiety to the target proteins, prevents the oocyte G2/M transition whereas overexpression of the enzyme potentiates this process. We have also identified 24 functionally different proteins that *O*-GlcNAc modification increases during meiotic resumption among which cytoskeletal proteins (beta-actin and apha-tubulin), the kinase erk2, the phosphatase PP2A, several glycolysis enzymes and some ribosomal proteins.

Second, we have undertaken the study of *O*-GlcNAc, OGT and UDP-GlcNAc (the sugar-nucleotide for the *O*-GlcNAc modification) variations during the oogenesis and the early development of *Xenopus laevis.* Our results show that the *O*-GlcNAc dynamism is intricate from the Xenopus oogenesis to embryogenesis. In particular, we observed a drastic and transitory *O*-GlcNAc decrease at the onset of gastrulation, suggesting a role for *O*-GlcNAc in the regulation of cell migration. This migration is characteristic of this stage of development since it permits the generation of the three germ layers, precursors of the whole adult tissues. From the point of view of these results, we suggest that meiotic resumption, oogenesis and embryogenesis are in part orchestrated by *O*-GlcNAc.

Key-words : cell cycle, *O*-GlcNAc, OGT, embryogenesis, oocyte, *Xenopus laevis*, meiosis, G2/M transition, gastrulation, MPF, erk2.

© 2009 Tous droits réservés.