

Université des Sciences et Technologies de Lille

Thèse

Pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Lille I

Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

Présentée et soutenue publiquement par

ALI MEHDY

Le 13 décembre 2011

Impact du PUGNAc sur le catabolisme des N-glycoprotéines

Composition du jury :

Monsieur le Docteur Jean-Claude Michalski
Monsieur le Professeur Thierry Levade
Monsieur le Docteur Thierry Fontaine
Monsieur le Docteur Tarik Issad
Monsieur le Docteur François Foulquier
Madame le Docteur Sandrine Duvet

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur de thèse
Co-directrice de thèse

Université des Sciences et Technologies de Lille

Thèse

Pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Lille I

Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

Présentée et soutenue publiquement par

ALI MEHDY

Le 13 décembre 2011

Impact du PUGNAc sur le catabolisme des N-glycoprotéines

Composition du jury :

Monsieur le Docteur Jean-Claude Michalski
Monsieur le Professeur Thierry Levade
Monsieur le Docteur Thierry Fontaine
Monsieur le Docteur Tarik Issad
Monsieur le Docteur François Foulquier
Madame le Docteur Sandrine Duvet

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur de thèse
Co-directrice de thèse

Remerciements

Cette thèse a été effectuée à l'unité de glycobiologie structurale et fonctionnelle. Ces trois années de travail ont été très enrichissantes et je souhaite remercier toutes les personnes qui ont participé de près et de loin à la réalisation de ma thèse.

Je remercie tout d'abord le Pr. Thierry Levade et le Dr. Thierry Fontaine pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Je remercie également le Dr. Tarik Issad pour avoir participé à ce jury et le Dr. Jean-Claude Michalski pour l'avoir présidé.

Je remercie bien évidemment mon directeur et ma co-directrice de thèse, Dr. François Foulquier et Dr. Sandrine Duvet, pour avoir accepté de diriger cette thèse et pour m'avoir accueilli au sein de leur équipe. En entrant au C9, j'ai pu accomplir cette thèse dans de très bonnes et très agréables conditions de travail. Grâce à vous j'ai pu découvrir concrètement le monde passionnant de glycobiologie.

Je remercie également les personnes avec qui nous avons collaboré au sein du laboratoire, Pr. Willy Morelle et Pr. Tony Lefebvre pour leur disponibilité et toutes leurs réponses à mes questions.

Un énorme merci aux Dr. Ikram EL-Yazidi et Anne-Sophie Vercoutter, à Anne-Marie et à Marlène de m'avoir prêté une oreille compatissante et d'avoir supporté mes râleries durant et à la fin de ma thèse. Ceci m'a aidé à garder ma motivation et les pieds sur terre.

J'ai une pensée particulière pour Ayoub El Hassani qui a toujours pris le temps de m'aider tant pour les manips et avec qui une amitié est née.

Merci à Romain, Coralie, Stéphanie, Aurélie, Ludivine, Florent, Karine et Marie pour les nombreuses conversations scientifiques et extra-

scientifiques dans le laboratoire et durant les soirées qui m'ont permis de changer les idées.

Je tiens à remercier le personnel administratif, Martine, Gaëlle, Nadège Ivon et Fred. Sans vous le travail aurait été moins aisé. Je quitte maintenant le laboratoire avec beaucoup de nostalgie en vous souhaitant une très bonne continuation.

Je garde également une pensée à mes collègues de l'association « Cedralille », à Jad, Camille et tous mes ami(e)s à Lille, à mes ami(e)s à Lyon, à Abbas G et Farah au Liban. Je vous remercie tous pour votre bonne humeur et votre disponibilité.

Enfin, je remercie ma petite famille, mon père, ma mère, mon frère et ma sœur, qui ont toujours été un soutien sans faille. Si j'en suis là aujourd'hui c'est essentiellement grâce à vous.

Regardez, finalement j'y suis arrivé !!!

Sommaire

<u>Liste des abréviations</u>	5
<u>Etude bibliographique</u>	8
<u>Chapitre I : La glycosylation des protéines</u>	9
<u>A. Introduction</u>	9
<u>B. Les monosaccharides composant les glycoprotéines</u>	10
<u>C. Les différents types de la glycosylation</u>	10
C.1- <i>N</i> -glycosylation	10
C.2- <i>O</i> -glycosylation	12
C.3- C-glycosylation	12
C.4- L'ancrage Glycosyl-Phosphatidyl Inositol (ancrage GPI)	13
<u>D. Biosynthèse des <i>N</i>-glycoprotéines</u>	13
D.1- Initiation de la <i>N</i> -glycosylation au niveau du RE	13
D.1.a- Assemblage du précurseur glycannique	14
D.1.b- Transfert du précurseur glycannique	15
D.1.c- Contrôle qualité des glycoprotéines néosynthétisées	16
<u>D.2- Maturation des <i>N</i>-glycannes au niveau de l'appareil de Golgi</u>	19
D.2.a- Implication des mannosidases et des glycosyltransférases golgiennes	19
D.2.b- Formation du signal d'adressage des enzymes lysosomales	21

<u>E. Catabolisme des N-glycoprotéines</u>	21
E.1- Catabolisme des glycoprotéines dans le cytoplasme	22
E.2- Catabolisme lysosomal des N-glycoprotéines	25
E.2.a- Généralités	25
E.2.b- Protéolyse	25
E.2.c- Transport des glycoprotéines vers les lysosomes	26
E.2.c.1- Autophagie	26
E.2.c.2- Hétérophagie	28
E.2.d- Catabolisme lysosomal des N-glycoprotéines	28
E.2.d.1- Les β -hexosaminidases lysosomales	30
<u>Chapitre II : La modification post-traductionnelle O-GlcNAc</u>	32
<u>A. Généralités</u>	32
<u>B. Les enzymes impliquées dans la modification O-GlcNAc</u>	33
B.1- L'O-GlcNAc transférase (OGT)	34
B.2- L'O-GlcNAcase (OGA)	35
<u>C. L'étude de la modification O-GlcNAc</u>	36
<u>Chapitre III : Les oligosaccharides solubles (OS)</u>	40
<u>A. Génération des OS chez les mammifères</u>	40
A.1- Génération des OS dans les RE	40
A.2- Génération des OS dans le cytosol	41

A.3- Les transporteurs RE-Cytosol et lysosomaux des OS	42
<u>B. Les OS observés chez d'autres organismes</u>	43
B.1- Les OS chez la levure (<i>S.cerevisia</i>)	43
B.2- Les OS chez les plantes	44
<u>Exposé des travaux réalisés</u>	46
<u>A. Objectif du travail de thèse</u>	47
<u>B. Matériel Et Méthodes</u>	48
B.1- Culture cellulaire	48
B.2- Préparation des OS totaux à partir des cellules CHO	48
B.3- Séparation des OS cytosoliques et membranaires	49
B.4-Traitement des N-glycoprotéines à la PNG ^{ase} F	49
B.5- Traitement des oligosaccharides par l'endoglycosidase F2 et la β -N-Acétyleglucosaminidase	50
B.6- Perméthylation des oligosaccharides	50
B.7- Quantification relative des OS	51
B.8- Electrophorèse et western-blotting	51
<u>C. Résultats</u>	52
C.1- Le PUGNAc conduit à une augmentation du niveau de la O-GlcNAcylation des protéines dans les cellules CHO	52
C.2- Apparition d'une population anormale d'OS après traitement des cellules par le PUGNAc	53
C.3- Effet du temps d'incubation en présence de PUGNAc sur la nature des OS	55

C.4- Le PUGNAc conduit à l'accumulation d'OS membranaires possédant un seul résidu GlcNAc en position réductrice	57
C.5- Structures des N-glycannes après traitement au PUGNAc	60
C.6- Quantification relative des OS cellulaires après traitement par le PUGNAc	62
<u>D. Discussion</u>	63
<u>E. Conclusions et perspectives</u>	67
<u>Références Bibliographiques</u>	68

Liste des abréviations

ADP	Adénosine diphosphate
ADN	Acide déoxyribonucléique
ALG	Asparagine-linked glycoproteins
Ara	Arabinose
Asn	Asparagine
CHO	Chinese hamster ovary
CNX	Calnexin
CRT	Calreticulin
Cvt	Cytoplasm to vacuol targeting
Dol-P	Dolichol-Phosphate
ENGase	Endo- β -N-acétylglucosaminidase
ER	Endoplasmic Reticulum
ERAD	ER-associated degradation
F6P	Fructose-6-Phosphate
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
GFTA	Fructose-6-phosphate amido transférase
GDP	Guanosine diphosphate
Glc	Glucose

Glut 2	Glucose transporter 2
GlcNH26P	Glucosamine-6-phosphate
G6P	Glucose-6-phosphate
GlcNac	N-acétylglucosamine
GPT	N-acétylglucosaminyl-phosphate transférase
HAT	Histone Acétyl transférase
Hex	Hexose
Hex A	Hexosaminidase A
Hex B	Hexosaminidase B
Hex S	Hexosaminidase S
HexNAc	N-acétylhexosamine
HBP	Hexosamine Biosynthetic Pathway
LLO	Lipid-linked oligosaccharides
LAMP	Lysosome-associated membrane protein
LMPs	Lysosomal membrane proteins
LROs	Lysosome-related organelles
LIMP2	Lysosomal integral membrane protein type 2
MALDI-TOF-MS	Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight- Mass spectrometry
Man	Mannose
Man-6-P	Mannose-6-phosphate

MPR	Mannose-6-phosphate receptor
N-GalNAc	N-acétyl-galactosamine
NeuAc	Acide N-acétyl- α -neuraminique
Nbut-GT	1,2-dideoxy-2'-propyl- α -D-glucopyranoso-[2,1-d]- Δ 2'-thiazoline
OS	Oligosaccharides Solubles
OST	OligoSaccharylTransferase
O-GlcNAc	O-N-acétylglucosaminylation
PNGase	Peptide: N-glycanase
PUGNAc	O-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene) amino-N-phenylcarbanate
UDP	Uridine diphosphates
UNGs	Unconjugated <i>N</i> -glycans
RE	Réticulum Endoplasmique
Ser	Sérine
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl-Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
STZ	Streptozotocine
Thr	Thréonine
TSR	Thrombospondin repeat
TPR	Tetratrico Peptide Repeats
Tyr	Tyrosine
Xyl	Xylose

Etude Bibliographique

Chapitre I : La glycosylation des protéines

A. Introduction

Les protéines destinées à être secrétées, intégrées dans des membranes, ou localisées à l'intérieur d'un organite intracellulaire portent souvent des sucres attachés de façon covalente. Cet ajout de sucres nécessite l'intervention de nombreuses enzymes que l'on appelle glycosyltransférases permettant le transfert d'un monosaccharide ou d'un glycanne sur un accepteur. Ce dernier peut être une protéine ou un lipide et prendra respectivement le nom de glycoprotéine ou de glycolipide. La glycosylation est présente dans toutes les cellules eucaryotes et constitue la modification post-traductionnelle la plus importante et la plus complexe. À l'heure actuelle, on estime qu'1% du génome code pour des protéines impliquées dans le processus de glycosylation (Lowe & Marth, 2003) et que plus de la moitié des protéines répertoriées dans les bases de données seraient des glycoprotéines (Hanisch *et al.*, 2001). Le glycanne va également modifier les propriétés physicochimiques des protéines telles que la solubilité, la stabilité vis-à-vis des protéases et la mise en conformation. Ces biomolécules constituent également une large partie des protéines pharmaceutiques commercialisées (plus d'un tiers de produits pharmaceutiques en cours sont des glycoprotéines). De part l'extrême complexité et la variabilité des structures glycaniques, les sucres vont avoir un impact considérable sur de nombreux processus biologiques tels que la reconnaissance cellulaire, la reproduction, l'embryogenèse, l'inflammation et l'immunité (Varki, 1993,1999). Il apparaît donc important d'étudier la structure des glycannes associés aux glycoprotéines afin de comprendre les processus biologiques associés. Les chaînes glycaniques, une fois modifiées, peuvent être à l'origine de certaines pathologies, comme dans le cas de certains cancers où les glycannes des cellules tumorales sont profondément modifiés (Alhadeff, 1989). D'autres pathologies sont également causées par des défauts génétiques de la glycosylation : ces syndromes appelés «Congenital Disorders of Glycosylation» (CDG), sont associés à une hypoglycosylation des glycoprotéines sériques (Jaeken & Carchon, 1993). Des syndromes causés par des défauts de la glycosylation ont été caractérisés par la suite comme par exemple le syndrome progéroïde (Okajima *et al.*, 1999) et les dystrophies musculaires (Yoshida, Kobayashi *et al.*, 2001).

B. Les monosaccharides composant les glycoprotéines

Les monosaccharides représentent les unités de base des glycoconjugués et existent en grand nombre dans la nature. Cependant, seule une dizaine seront utilisés pour l'assemblage des glycoprotéines chez les mammifères. On retrouve parmi ces monosaccharides des oses neutres (galactose, glucose, mannose, fucose, et xylose), des osamines (glucosamine, galactosamine, N-acétylglucosamine et N-acétylgalactosamine), et des acides sialiques (acide N-acétylneuraminique, acide N-glycosylneuraminique). Ces monosaccharides peuvent subir des modifications et des substitutions, telles que des sulfatations, des phosphorylations ou des méthylations, augmentant considérablement l'hétérogénéité glycanique (Yu & Chen, 2007). L'agencement des monosaccharides en polysaccharides est très variable du fait de leur diversité, des nombreuses conformations adoptées et du nombre important de liaisons existant potentiellement entre chacun d'entre eux.

C. Les différents types de glycosylation

Selon la nature de la liaison covalente établie entre le glycanne et la partie peptidique, deux grandes familles de glycoprotéines ont été définies: les *N*- et les *O*-glycosylprotéines. Ces deux types de glycosylation peuvent se retrouver simultanément sur une même protéine. La *C*-glycosylation ou *C*-mannosylation, découverte il y a une quinzaine d'années, complète maintenant les exemples de glycosylation rencontrés dans la cellule.

C.1- *N*-glycosylation

La *N*-glycosylation, la mieux connue et la plus répandue des formes de glycosylation, est une modification co- et post-traductionnelle qui débute dans le réticulum endoplasmique (RE) et qui se poursuit dans l'appareil de Golgi. Elle est retrouvée chez une très large variété des eucaryotes, les organismes unicellulaires (Bangs *et al.*, 1988), les invertébrés (Endo *et al.*, 1987) et chez les plantes (Kaushal & Elbein, 1989). La liaison sucre-protéine implique la fonction hémi-acétalique d'un résidu de GlcNAc et la fonction amide d'un résidu d'asparagine (Asn) (Marshall & Neuberger 1964). Ce type de liaison est décrit pour la

première fois dans l'ovalbumine (Johansen, Marshal *et al.*, 1961). Le site de *N*-glycosylation est localisé au niveau d'une séquence consensus « Asn-X-Ser/Thr » (X désignant n'importe quel acide aminé autre que la proline), aussi appelée séquon (Kornfeld & Kornfeld, 1985 ; Gavel & von Heijne, 1990 ; Jones *et al.*, 2005). La *N*-glycosylation est un processus hautement conservé chez les eucaryotes (Kornfeld, 1985 ; Schachter, 1986). La microhétérogénéité qui existe entre les différents *N*-glycannes dépend de la nature de l'organisme, l'état développemental et physiologique de la cellule, en ce qui concerne la disponibilité des glycosidases et des glycosyltransférases et l'accessibilité des glycannes. Globalement, trois types de structures ont été décrits chez les mammifères (**Figure 1**) (Kornfeld & Kornfeld, 1985) : le type oligomannosidique, le type hybride et le type complexe. Ces structures sont toutes constituées d'un noyau identique, souvent appelé core, et diffèrent par leurs extrémités non réductrices. Les *N*-glycannes de type oligomannosidique possèdent sur le noyau des antennes exclusivement constitués de résidus α -Man, et peuvent renfermer de quatre à neuf résidus de Man. Les glycannes de type complexe, quant à eux, ne renferment que trois résidus de Man, ceux du noyau, mais présentent des antennes plus ou moins longues constituées d'une ou plusieurs unité(s) N-acétyllactosaminiques (Gal β 1,4GlcNAc), terminées par des sucres périphériques, notamment des résidus d'acides sialiques, de Fuc ou de Gal. Les *N*-glycannes de type hybride ou mixte possèdent généralement les caractéristiques des *N*-glycannes de type oligomannosidique sur une branche et ceux de type complexe sur l'autre branche.

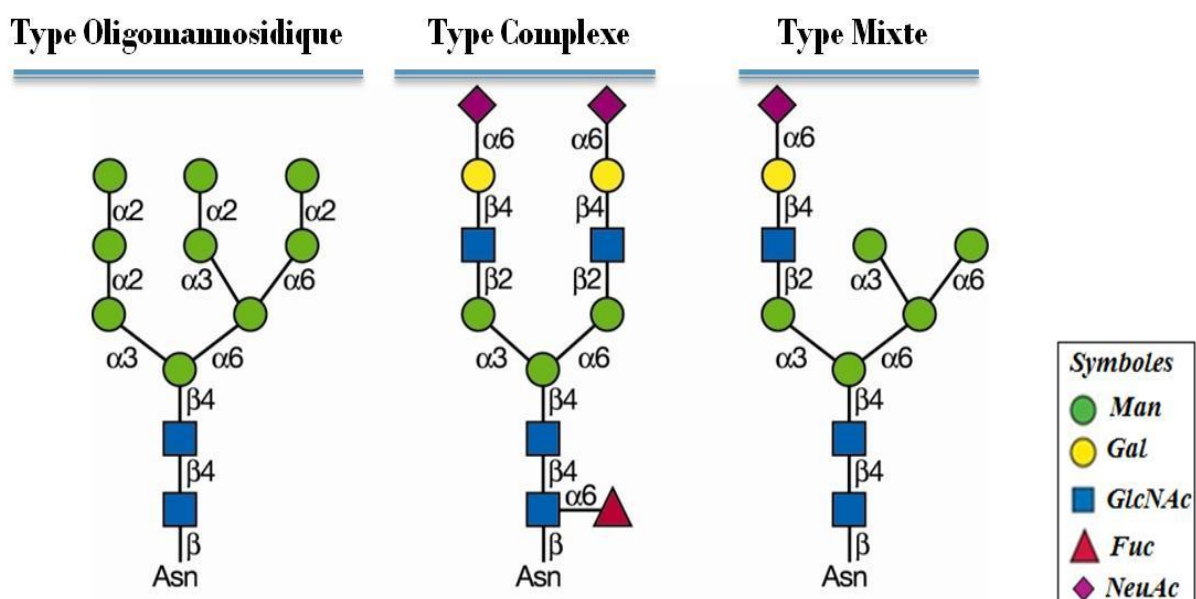


Figure 1 : Les trois types de structure des *N*-glycannes décrits chez les mammifères.

C.2- O-glycosylation

L'autre forme majeure de glycosylation est la O-glycosylation. Les O-glycannes, comparés aux N-glycannes de type complexe, avec lesquels ils partagent le quasi totalité des caractéristiques structurales, se caractérisent également par une très grande hétérogénéité. La liaison O-glycosidique se fait entre un groupement hydroxyle d'un aminoacide (sérine, thréonine, tyrosine, hydroxyproline et hydroxylysine) et la fonction hémiacétalique du monosaccharide. Les principaux monosaccharides rencontrés et constituant les O-glycannes sont le galactose, le glucose, le xylose, le mannose, le fucose et l'acide sialique, chacun étant impliqué dans une liaison particulière avec un ou plusieurs aminoacides préférentiels. En effet, différents types de O-glycosylation sont connus mais certains sont limités à des espèces, des tissus ou des polypeptides particuliers. La plus fréquente de ces modifications est la O-glycosylation dite de type mucine, qui est répandue dans tout le règne animal et dont l'existence a récemment été démontrée chez les plantes (Kishimoto *et al.*, 1999). Pour cette glycosylation, la liaison se fait entre l'hydroxyle anomérique d'un résidu de α -N-acétylgalactosamine et l'hydroxyle d'une sérine ou d'une thréonine de la protéine.

C.3- C-glycosylation

La C-glycosylation, découverte plus récemment, est une modification post-traductionnelle qui consiste en une liaison « carbone-carbone » entre l'atome de carbone en position 1 du résidu de Man et l'atome de carbone en position 2 du noyau indole d'un résidu de tryptophane (Hofsteenge *et al.*, 1994) situé dans une séquence particulière Trp-X-X-X-Trp (X est n'importe quel acide aminé). Cette forme de glycosylation qui est absente chez les insectes, levures et bactéries, est retrouvée chez diverses espèces animales exprimant une activité C-mannosyltransférase (Doucey *et al.*, 1998). L'activité enzymatique de cette transférase est retrouvée dans l'ensemble d'un même organisme, mais diffère par contre d'un organe à un autre. Un nombre limité de glycoprotéines ont été décrites comme étant C-mannosylées. La RNase 2 détectée pour la première fois dans l'urine humaine (Hofsteenge *et al.*, 1994) mais

aussi l'interleukine 12 recombinante (Doucey *et al.*, 1999) dans les cellules d'ovaires de Hamster Chinois (CHO). D'autres glycoprotéines avec des domaines répétés de type TSR ou « thrombospondin repeat », comme la thrombospondine de type 1 ont été décrites plus tard comme étant C-mannosylées (Hofsteenge *et al.*, 2001).

C.4- L'ancrage Glycosyl-Phosphatidyl Inositol (ancrage GPI)

L'ancrage GPI est constitué par l'assemblage d'une protéine, d'un oligosaccharide et d'un lipide, le phosphatidylinositol, aboutissant à la liaison de la protéine à une membrane *via* la partie lipidique. Ces structures se retrouvent à la fois chez les eucaryotes et chez de nombreux protozoaires (Ferguson & Williams, 1988 ; Ferguson, 1999).

Le noyau commun est constitué d'un tétrasaccharide comprenant trois résidus de Man et un résidu de GlcNAc, et d'une phosphoéthanolamine. Ce noyau est lié à un groupement phosphate par l'intermédiaire d'un myo-inositol et entouré par divers substituants, y compris des chaînes lipidiques supplémentaires dont la structure varie selon les espèces ou les tissus. La modification par ancre GPI est réversible, car certaines protéines liées à la membrane *via* un GPI pourraient être libérées par l'action d'une phospholipase spécifique. Ce type d'ancrage membranaire permet ainsi à de nombreux parasites d'éliminer rapidement leurs antigènes de surface et d'échapper au système immunitaire.

D. Biosynthèse des N-glycoprotéines

Chez les eucaryotes, la voie de la N-glycosylation débute par l'assemblage du Dolichol-PP-oligosaccharide dans la membrane du RE et son transfert dans un deuxième temps sur des résidus Asn spécifiques, présents dans des polypeptides en cours de synthèse.

D.1 Initiation de la N-glycosylation au niveau du RE

Les premières étapes de la N-glycosylation se réalisent au sein du RE. On retrouve 3 étapes-clés : l'assemblage du précurseur oligosaccharidique, son transfert co-translationnel sur une protéine en voie de synthèse et le contrôle qualité de la glycoprotéine nouvellement synthétisée.

D.1.a- Assemblage du précurseur glycanique

L'assemblage du précurseur tétradécasaccharidique ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) est réalisé de part et d'autre de la membrane du RE par l'action d'une série de glycosyltransférases membranaires (ALG), au cours d'un processus extrêmement conservé dans les cellules eucaryotes, appelé cycle de dolichol (**Figure 2**) (Burda & Aebi, 1999). Les réactions initiales se déroulent du côté cytoplasmique du RE et débutent par l'activation du dolichol par addition d'un résidu de phosphate au niveau de sa fonction hydroxyle par la dolichol kinase, suivie de l'addition du premier résidu de GlcNAc-1-P, par la N-acétylglucosaminyl-phosphate transférase (GPT), codée par le locus *ALG7* (Barnes *et al.*, 1984) et à partir d'un donneur de nucléotide-sucré, l'UDP-GlcNAc. La formation du GlcNAc-PP-Dol est suivie de l'addition séquentielle d'un résidu de GlcNAc et de cinq résidus de Man, respectivement à partir d'UDP-GlcNAc et de GDP-Man, de telle sorte à former le $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{PP-Dol}$. Le transfert du premier résidu Man catalysé par une β 1,4-mannosyltransférase codée par le locus *ALG1* (Huffaker & Robbins 1982), est suivi par l'addition d'un deuxième résidu de Man en α 1,3 réalisée par une α 1,3-mannosyltransférase, codée par le locus *ALG2* (Jackson *et al.*, 1993). Le troisième résidu de Man est transféré par une α 1,6-mannosyltransférase. Les deux derniers résidus de Man sont transférés par une α 1,2-mannosyltransférase codée par le locus *ALG11* (Cipollo, Trimble *et al.*, 2001). Cet intermédiaire de synthèse, le $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$, poursuit son élongation au niveau de la face luminale du RE, après sa translocation par une flippase appelée « RFT1 » (Helenius & Aebi, 2004 ; Helenius *et al.*, 2002). Cette translocation est ATP-dépendante, et un déficit de l'activité de la protéine RFT1 cause à la fois chez l'homme et la levure une accumulation de l'intermédiaire glycanique $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ dans la cellule. Dans la lumière du RE, quatre mannosyltransférases et trois glycosyltransférases permettent l'assemblage final du précurseur glycanique, $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$, par l'ajout de quatre résidus de Man et trois résidus de Glc à partir de donneurs lipidiques de sucre activé, le Dol-P-Man et le Dol-P-Glc.

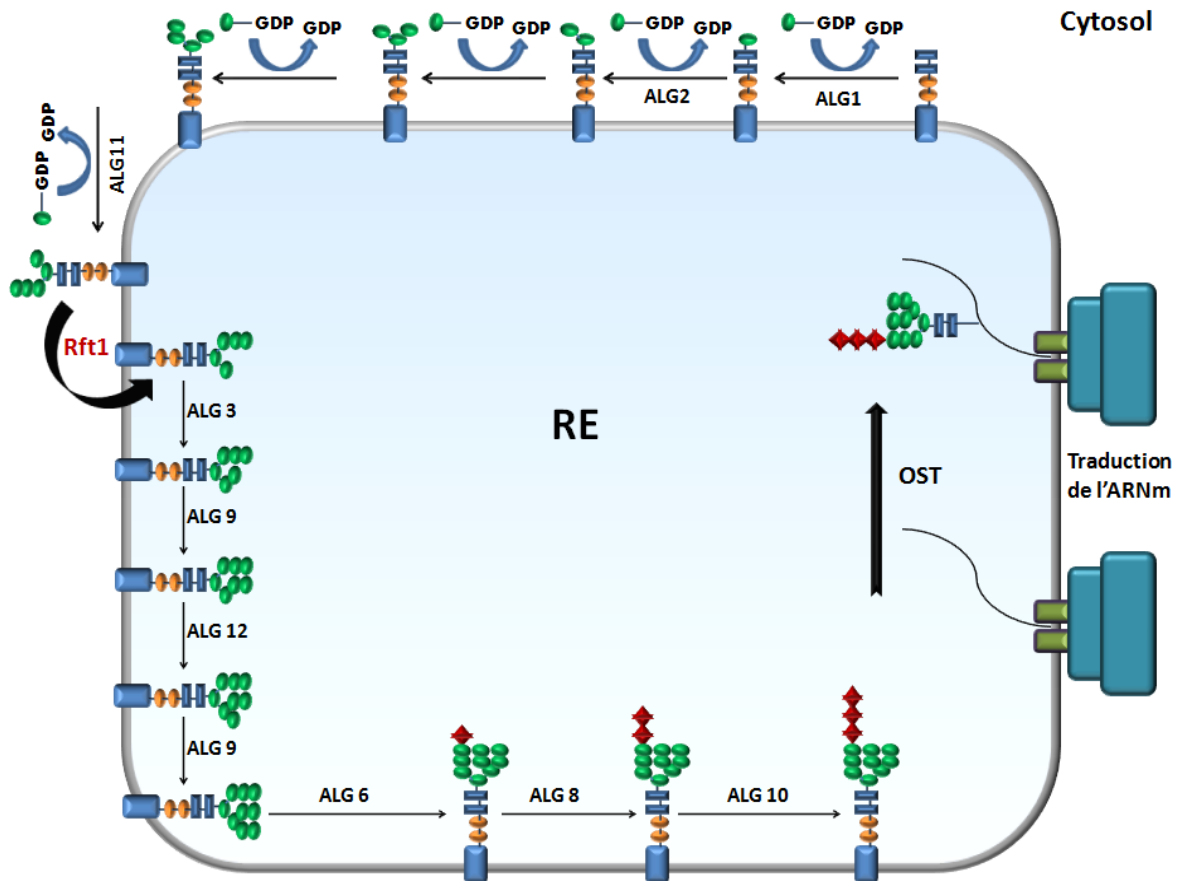


Figure 2 : Biosynthèse de l'oligosaccharide-précurseur dans le RE.

Le processus de biosynthèse du précurseur glycanique débute au niveau de la face cytosolique de la membrane du RE afin de synthétiser une structure intermédiaire, $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, à partir des donneurs UDP-GlcNAc et GDP-Man. Cette structure intermédiaire est ensuite transloquée vers la face luminale de la membrane et la synthèse continue en ajoutant des résidus de Man et de Glc respectivement à partir de résidus Dol-P-Man et Dol-P-Glc. Le précurseur final, $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, est transféré finalement sur des résidus Asn spécifiques de la protéine par l'action de l'OST. ● Man; ■ GlcNAc; ◆ Glc; □ P-Dol.

D.1.b- Transfert du précurseur glycanique

L'étape essentielle de la *N*-glycosylation des protéines est le transfert co-translationnel et « en bloc » de l'intermédiaire tétradécasaccharidique sur un site consensus «Asn-X-Ser/Thr» de la chaîne protéique naissante. Cette étape est réalisée par un complexe membranaire multiprotéique, l'oligosaccharyltransférase (OST) (Yan & Lennarz, 1999). La plupart des travaux consacrés à l'étude de ce complexe ont été réalisés sur le modèle de la levure

Saccharomyces Cerevisiae (*S. Cerevisiae*) et ont contribué à une meilleure compréhension concernant la nature et l'organisation structurale des sous-unités du complexe ainsi que leur rôle au sein de ce complexe (Silberstein & Gilmore, 1996). Ainsi, chez la levure, le complexe serait constitué d'au moins neuf sous-unités organisées en trois sous-domaines : Ost1p/Ost-5p, Ost-2p/Swp-1p/Wbp-1p et Stt-3p/Ost-4p/Ost-3p/Ost-6p. Par ailleurs, le précurseur oligosaccharidique doit être sous forme triglucosylée afin d'être transféré par l'OST avec un maximum d'efficacité. La reconnaissance du résidu de Glc terminal est fondamentale puisqu'elle induirait un changement conformationnel au niveau du site actif de l'OST, et influencerait, de fait, son association avec ses substrats protéiques (Helenius & Aebi, 2004). La variation dans le taux d'occupation des sites de *N*-glycosylation dépend fortement des flux métaboliques associés au cycle des dolichols, d'une part, et, d'autre part, de l'efficacité de transfert du précurseur oligosaccharidique sur la chaîne protéique naissante par l'OST. En effet, l'efficacité de la glycosylation par l'OST peut être affectée par un certain nombre de facteurs liés à la configuration structurale du site de *N*-glycosylation comme la nature de l'acide aminé hydroxylé (Ser ou Thr), la nature de l'acide aminé X, la nature des acides aminés encadrant le tripeptide « Asn-X-Ser/Thr », la localisation du site par rapport à la séquence protéique et la conformation de la région peptidique portant le site de glycosylation (Jones *et al.*, 2005).

D.1.c- Contrôle qualité des glycoprotéines néosynthétisées

L'étape qui suit le transfert co-translationnel de l'oligosaccharide précurseur ($\text{Gl}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) est la mise en conformation de la glycoprotéine néosynthétisée au sein du RE (**Figure 3**). La lumière du RE constitue, contrairement au cytosol, un environnement oxydant favorisant la formation des ponts disulfures et dans lequel existent de multiples chaperonnes et enzymes qui empêchent l'agrégation des polypeptides en complexes protéiques homo- et hétéro-oligomériques et favorisant par la suite la mise en conformation des glycoprotéines. Deux systèmes de chaperonnes sont essentiellement impliqués dans l'étape de contrôle qualité dans le RE : la chaperonne BiP et le complexe des lectines chaperonnes. BiP, également connue sous le nom de « glucose-regulated protein 78 kDa » (Grp78) est une chaperonne très abondante de la lumière du RE permettant la mise en conformation des protéines glycosylées ou non-glycosylées. Son rôle majeur est de prévenir d'éventuelles interactions entre les domaines hydrophobes qui engendreraient leur agrégation

au niveau du RE. Le système de lectines chaperonnes est par contre spécifique de la mise en conformation des glycoprotéines (Kleizen & Braakman, 2004).

Après transfert de l'oligosaccharide triglucosylé sur la protéine naissante, les deux résidus de Glc terminaux liés en (α 1,2) et (α 1,3) sont très rapidement éliminés respectivement par la glucosidase I et la glucosidase II. Chez les eucaryotes, deux lectines, la calnexine (CNX) et la calréticuline (CRT), sont capables d'interagir avec l'oligosaccharide $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ tout en empêchant l'agrégation de la partie protéique. Chez la levure, un homologue de la CNX, nommé Cne1p, a été décrit (Xu *et al.*, 2004). La CNX et la CRT sont également associées à une thiol-disulfure oxydoréductase, ERp57, catalysant la formation des ponts disulfures (Ellgaard & Helenius, 2001). La glycoprotéine néosynthétisée est ensuite libérée du système chaperonne CNX/CRT suite à une déglucosylation du Glc terminal par l'action de la glucosidase II. Cette dernière joue donc un double rôle au cours du processus de la mise en conformation en permettant à la glycoprotéine de s'associer au système chaperonne CNX/CRT et en induisant ensuite sa libération. À ce stade, les glycoprotéines demeurant mal conformées sont reconnues par l'UDP-Glc : glycoprotéine glucosyltransférase (UGGT) qui catalyse la reglucosylation de leur chaîne glycanique en utilisant comme donneur l'UDP-Glc. Ceci permet leur rétention dans la lumière du RE pour rentrer dans des cycles de mise en conformation ou cycles « gluco/dégluco ». La délétion de l'UGGT n'affecte pas la majorité des glycoprotéines néosynthétisées suggérant que la plupart d'entre elles requiert un seul cycle de mise en conformation en s'associant aux CNX/CRT pour acquérir leur conformation native (Ellgaard & Helenius, 2001). De plus, cette reglucosylation catalysé par l'UGGT n'est pas présente chez *S. Cerevisiae*. Des études *in vitro* ont montré que l'hydrolyse de un à quatre résidus de Man permet de réduire la capacité de rétention du $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ jusqu'à 65%. En effet, ces études suggèrent que l'élimination de résidus de Man est non seulement capable d'inhiber la réassociation aux chaperonnes mais permet également d'empêcher la glycoprotéine néosynthétisée de réintégrer les cycles « gluco-dégluco » (Ware *et al.*, 1995, Spiro *et al.*, 1996). Les glycoprotéines qui échouent à cette étape de mise en conformation sont alors éliminées du RE au cours d'un processus appelé « ER-associated degradation » ou ERAD, comme on le verra plus tard dans la partie « Catabolisme des glycoprotéines dans le cytoplasme ». Les glycoprotéines correctement repliées subissent l'action de la ER-alpha mannosidase I permettant la poursuite du transit de ces glycoprotéines vers l'appareil de Golgi.

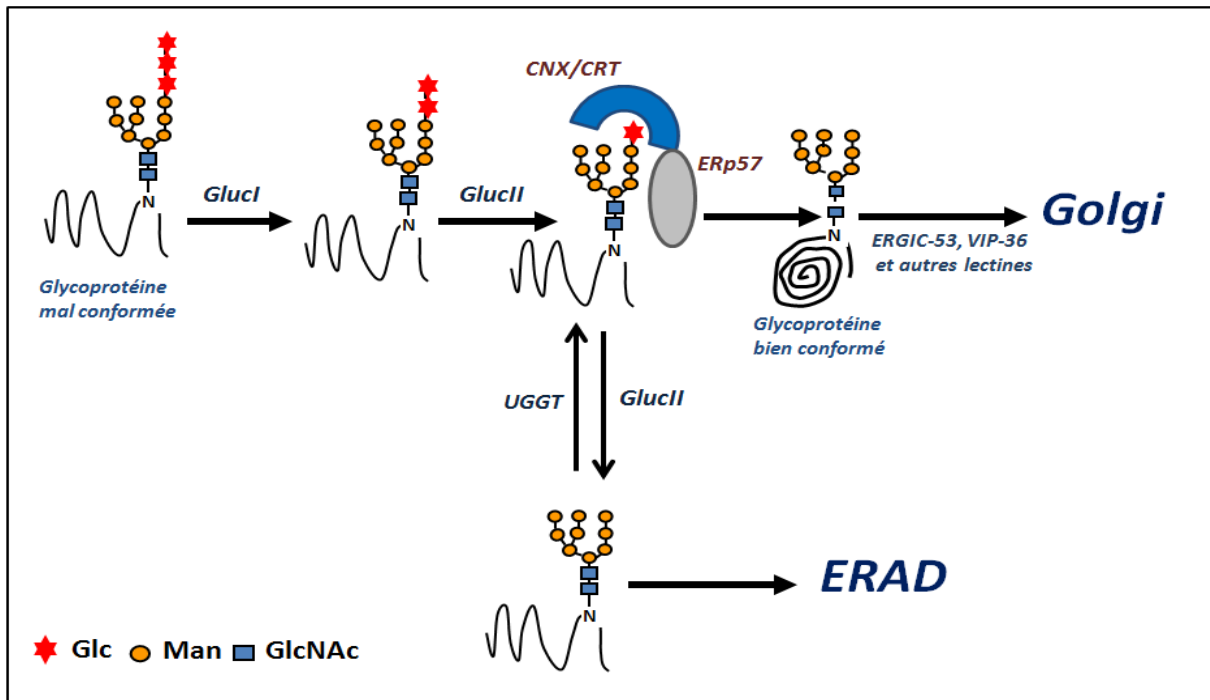


Figure 3: Le contrôle qualité des N-glycoprotéines dans le RE.

Les glycannes monoglucosylés générés par l'action des glucosidases I et II, entrent en interaction avec les chaperonnes (CNX, CRT). La glucosidase II permet la libération de la glycoprotéine correctement repliée des chaperonnes afin de quitter le RE pour s'engager dans l'appareil de Golgi. Dans le cas d'une mise en conformation incorrecte, les glycoprotéines peuvent être re-monoglucosylées par l'UGGT permettant une réassociation aux chaperonnes.

Les α -(1,2) mannosidases, essentielles pour produire les N-glycannes de type complexe, hybride et oligomannosidique, génèrent une série d'oligomannosides dans le RE et l'appareil de Golgi. Parmi ces α -mannosidases, la ER mannosidase II qui permet d'éliminer un résidu α (1,2) Man spécifique pour former à partir du $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ la structure $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ ou isomère C (Gonzalez *et al.*, 1999). Le RE contient une autre α -mannosidase, la ER mannosidase I, qui génère une structure de type $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ ou isomère B en hydrolysant le résidu Man de la branche du milieu de ce glycanne. Il est à noter que chez certains organismes, une endo- α -mannosidase génère l'isomère A ($\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$) à partir du $\text{Glc}_{1-3}\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (Weng & Spiro, 1996). Cette enzyme est présente dans le cis-Golgi et hydrolyse préférentiellement les oligosaccharides monoglucosylés (Lubas & Spiro, 1988 ; Zuber *et al.*, 2000).

D.2- Maturation des *N*-glycannes au niveau de l'appareil de Golgi

L'étape finale de la biosynthèse des *N*-glycoprotéines correspond à l'étape de la maturation golgienne des *N*-glycannes. Ceci va engendrer l'extrême diversité des chaînes glycaniques portées par les glycoprotéines matures. Chez les mammifères, cette étape correspond à l'addition séquentielle de monosaccharides catalysée par une diversité de **glycosyltransférases** localisées dans l'appareil de Golgi (**Figure 4**).

D.2.a- Implication des mannosidases et des glycosyltransférases golgiennes

C'est avant tout, l'action des mannosidases golgiennes qui vont orienter l'élaboration des structures de type oligomannosidique, complexe ou hybride. En effet, les α -(1,2) mannosidases golgiennes, IA, IB, et IC, permettent de générer une structure de type $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ à partir du $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ (Tremblay & Herscovics, 2000 ; Lal *et al.*, 1998). L'apparition de l'intermédiaire glycanique, $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, est suivie par le transfert d'un résidu de GlcNAc, à partir d'UDP-GlcNAc, sur le résidu $\alpha(1,3)$ Man par l'action de la *N*-acétylglucosaminyltransférase I (GnT I) (Lal *et al.*, 1998 ; Schachter, 2000). La réaction catalysée par GnT I est la première étape qui permet l'addition d'un résidu de sucre à l'intermédiaire glycanique dans le processus de biosynthèse des *N*-glycannes de type complexe dans l'appareil de Golgi. Deux enzymes participeront ensuite à la modification du $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$. Dans le cas des mammifères, le résidu GlcNAc lié au résidu Asn est modifié par l'ajout d'un résidu $\alpha(1,6)$ Fuc catalysée par l' $\alpha(1,6)$ -fucosyltransférase nommée aussi FucT8 (Wilson *et al.*, 1976 ; Longmore & Schachter, 1982). La seconde modification du $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ (fucosylé ou non) est catalysée par l' α -mannosidase II golgienne (Moremen, 2002) qui requiert l'action préalable de la GnT I. Cette enzyme élimine les résidus $\alpha(1,6)$ et $\alpha(1,3)$ -Man terminaux du $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ (fucosylé ou non) pour former le $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$. Cette mannosidase, purifiée et caractérisée à partir du foie du rat, forme un complexe homodimérique d'environ 136 kDa (Moremen *et al.*, 1991; Tulsiani *et al.*, 1977). Le gène codant pour l' α -mannosidase II a été cloné chez l'homme, la souris, et chez *Drosophila melanogaster* (Misago *et al.*, 1995 ; Moremen 1989). D'autres α -mannosidases ont été ainsi décrites comme étant impliquées dans une voie alternative de maturation des *N*-glycannes dont l' α -mannosidase III qui est capable de convertir le $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ en $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ (Chui *et al.*, 1997) ainsi que l' α -mannosidase Iix clonée chez l'homme

possédant la même activité que l' α -mannosidase II (Misago *et al.*, 1995). Chez les mammifères, le $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ constitue ensuite le substrat de la N-acétylglucosaminetransférase II (GnT II) qui catalyse l'addition d'un second résidu GlcNAc au niveau du résidu $\alpha(1,6)$ Man pour former un N-glycane de type complexe biantenné possédant deux résidus $\beta(1,2)$ GlcNAc terminaux. Le gène codant pour la GnT II a été cloné chez l'homme et le rat (Tan *et al.*, 1995 ; D'Agostaro, 1995). Trois autres N-acétylglucosaminyltransférases ont été ainsi décrites, GnT IV, V, VI catalysant l'ajout des résidus de GlcNAc additionnels au niveau des résidus $\alpha(1,3)$ et $\alpha(1,6)$ Man pour générer un N-glycane multiantenné. Les résidus GlcNAc terminaux attachés aux $\alpha(1,3)$ et $\alpha(1,6)$ Man sont ensuite modifiés par l'ajout d'un résidu $\beta(1,4)$ Gal par l'action de la $\beta(1,4)$ -galactosyltransférase ($\beta(4)\text{GalT}$). Plusieurs $\beta(4)\text{GalT}$ s ont été retrouvées chez l'homme et la souris (Furukawa & Sato, 1999 ; Hennet, 2002). Chez l'homme, des résidus de $\alpha(2,6)$ et $\alpha(2,3)$ NeuAc peuvent être transférés à la chaîne N-glycannique sous l'action de sialyltransférases.

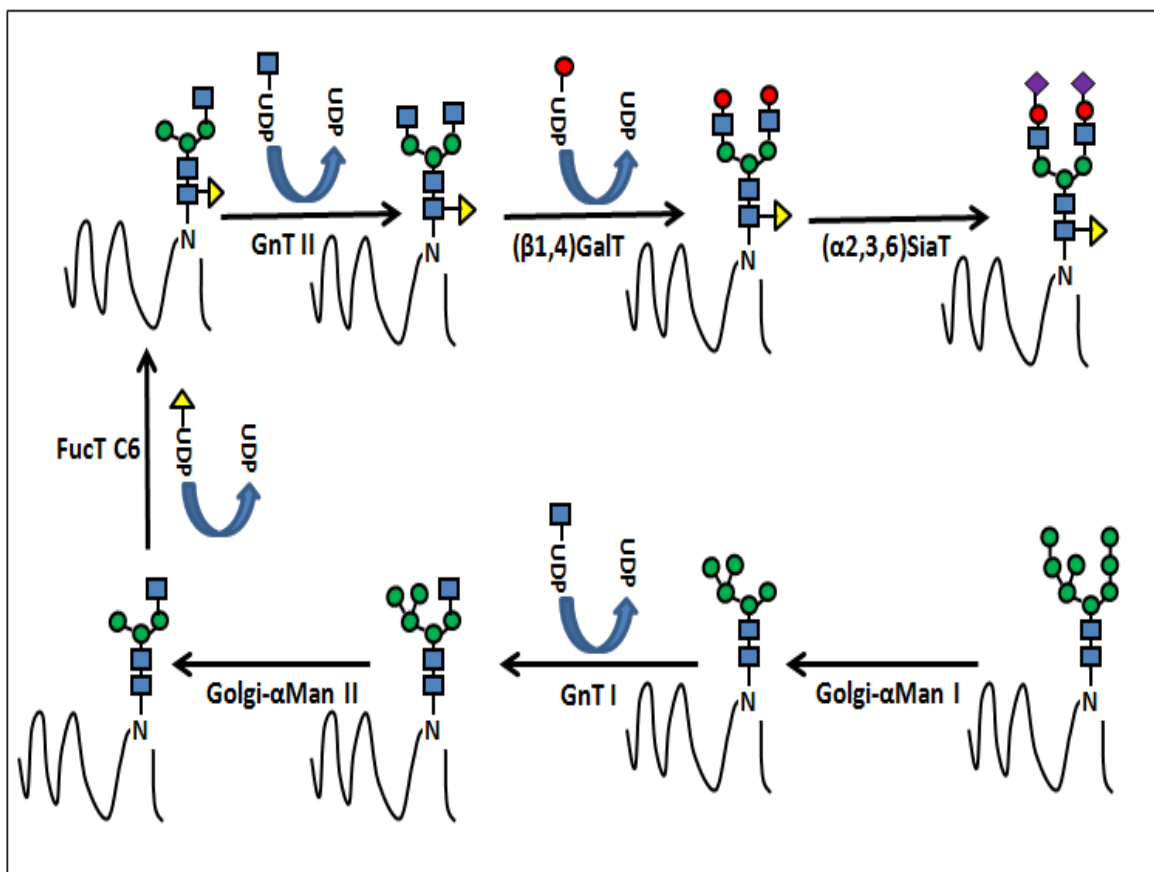


Figure 4: Les étapes de la maturation des N-glycannes dans l'appareil de Golgi catalysées par les différentes glycosyltransférases.

α -Man I, α -mannosidase I golgienne ; GnT I, N-acétylglucosaminyltransférase I ; α -Man II, α -mannosidase II golgienne ; GnT II, N-acétylglucosaminyltransférase II ; GalT, galactosyltransférase ; FucT C6, $\alpha(1,6)$ -fucosyltransférase ; SiaT, sialyltransférase.

Man ● ; GlcNAc ■ ; Gal ● ; Fuc ▲ ; NeuAc ◆.

D.2.b - Formation du signal d'adressage des enzymes lysosomales

La majorité des enzymes lysosomales sont envoyées aux lysosomes par le biais d'un marqueur glycanique spécifique, le mannose-6-phosphate (Man-6-P), au niveau des compartiments cis/médian golgiens. Ce marqueur résulte de la modification, au sein de l'appareil de Golgi, des résidus de Man des chaînes glycaniques. La formation des résidus Man-6-P est catalysée par l'action séquentielle de deux enzymes. La N-acétylglucosaminyl-1-phosphotransférase (GlcNAc-1-phosphotransférase) transfère un résidu GlcNAc-1-P à partir de l'UDP-GlcNAc aux carbones 6 des résidus Man liés en α 1,6 et α 1,3 (Lazzarino & Gabel, 1989). Cette enzyme représente un complexe hétéromérique constitué de trois sous-unités ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$) codées par deux gènes différents (Raas-Rothschild *et al.*, 2000 ; Kudo *et al.*, 2005 ; Lee *et al.*, 2007). L'autre enzyme impliquée dans la formation du résidu Man-6-P est la N-acétylglucosamine-1-phosphodiester α -N-acétylglucosaminidase (UCE). Chez l'homme, l'UCE est une protéine membranaire de type I qui se localise dans le réseau trans-golgien et qui est recyclée d'une manière constitutive vers la membrane plasmique (Kornfeld *et al.*, 1999 ; Rohrer & Kornfeld, 2001). Les résidus Man-6-P portés par les hydrolases lysosomales sont reconnus par des récepteurs spécifiques (MPR). Deux distincts MPR, le « Cation-dependent MPR » ou MPR46 et le « Cation-independent MPR » ou MPR300 ont été identifiés avec des poids moléculaires respectivement de 46 et 300 kDa (Ghosh *et al.*, 2003). Ces récepteurs se retrouvent dans les membranes des compartiments trans-golgiens, des endosomes et dans la membrane plasmique. Les vésicules de transport qui comportent les complexes MPR-ligand bourgeonnent au sein du réseau *trans*-golgien et fusionnent avec les endosomes dans lesquels les complexes se dissocient grâce au pH acide. Les hydrolases sont ensuite délivrées aux lysosomes et les MPR sont recyclés et dirigés vers le réseau trans-golgien. La mucopolidose de type II se caractérise par l'absence de résidus Man-6-P due à un déficit de l'enzyme GlcNAc-1-phosphotransférase.

E. Catabolisme des N-glycoprotéines

Les glycoprotéines intracellulaires qui résident dans les principaux organites cellulaires, ainsi que les glycoprotéines de la membrane plasmique sont dégradées par la voie lysosomale (Winchester, 2005). Par contre, les glycoprotéines à demi-vie courte telles que les

glycoprotéines nouvellement synthétisées mal conformées en provenance du RE sont ubiquitinylées pour être dégradées par le protéasome (Hilt & Wolf, 2004). Le catabolisme des glycoprotéines mal conformées est assuré par une coopération entre les deux systèmes ubiquitine-protéasome et lysosome (Hirsch *et al.*, 2003; Suzuki & Lennarz, 2003).

E.1- Catabolisme des glycoprotéines dans le cytoplasme

Comme nous l'avons mentionné, le système ubiquitine-protéasome est responsable de la dégradation des protéines cytosoliques à demie-vie courte. Les glycoprotéines nouvellement synthétisées n'arrivant pas à atteindre une conformation correcte sont envoyées vers la voie de dégradation associée au RE appelée ERAD. L'existence de la voie ERAD a été la première fois décrite par l'équipe de Klausner en 1988, lors d'une étude de la voie de dégradation du complexe heptamérique TCR (T-cell receptor). En effet, ils ont montré que les sous-unités α et μ de ce complexe sont dégradées dans un compartiment non-lysosomal avant de parvenir à l'appareil de Golgi. De nombreux composants associés au processus ERAD ont été ensuite identifiés grâce à des études génétiques et biochimiques (Sayeed & Ng, 2005 ; Nakatsukasa & Brodsky, 2008). En se basant sur l'ensemble de données fournies par les différentes études, le processus ERAD (**Figure 5**) peut être divisé en trois étapes majeures:

1- La reconnaissance de la glycoprotéine mal conformée : la distinction entre la glycoprotéine correctement et mal conformée a lieu dans un intervalle de temps qui détermine la destination de la glycoprotéine qui sera soit dégradée ou retenue dans l'ER pour poursuivre ensuite son transit vers l'appareil de Golgi. Pour ce faire, les glycoprotéines mal conformées subissent l'action de l' α -mannosidase réticulaire I (ER Man I) pour générer une séquence signal de dégradation ou l'isomère oligomannosidique B ($\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$). La surexpression de l'ER Man I entraîne des hydrolyses additionnelles de résidus de Man permettant d'accélérer le processus ERAD (Hosokawa *et al.*, 2003 ; Wu *et al.*, 2003). L'ER Man I pourrait hydrolyser trois à quatre résidus de Man pour former d'autres signaux de dégradation : le $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ ou le $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ (Ermonval *et al.*, 2001; Frenkel *et al.*, 2003; Lederkremer & Glickman, 2005). De plus, d'autres mannosidases semblent être impliquées également dans ce processus. La surexpression des $\alpha 1,2$ -mannosidases golgiennes permettrait d'accélérer également la dégradation d'un modèle de glycoprotéine mal conformée : la glycoprotéine NHK $\alpha 1$ -antitrypsin (Hosokawa *et al.*, 2007) via le processus

ERAD. Les glycoprotéines mal conformées comportant un signal de dégradation sont ensuite reconnues par une famille de lectines, les « ER degradation-enhancing α -mannosidase-like » (EDEMs) catalysant des réactions de démannosylation pour générer des structures $\text{Man}_5\text{-}_6\text{GlcNAc}_2$ induisant par la suite la rétrotranslocation de la glycoprotéine destinée à être dégradée. Il est à noter que la surexpression *in vivo* des isoformes EDEM1 et EDEM3 permet également d'accélérer le processus ERAD (Olivari *et al.*, 2006). De plus, une étude réalisée par Clerc *et al.* en 2009 a montré qu'un homologue de la protéine EDEM chez la levure, Htm1p, possède une activité α 1,2 mannosidase générant une structure de type $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ ou isomère C représentant un autre signal de dégradation autre que l'isomère B $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$.

2- La rétrotranslocation dans le cytoplasme : le mécanisme de rétrotranslocation de la glycoprotéine à éliminer vers le cytosol demeure assez mal connu. Chez les mammifères et la levure, la rétrotranslocation des glycoprotéines mal conformées est ATP-dépendante et dépend de la présence du complexe formant le translocon, le canal formé par Sec61. D'autres protéines sont impliquées dans ce mécanisme telles que la protéine membranaire Derlin-1 chez les mammifères et son homologue Der1p chez la levure (Knop *et al.*, 1996 ; Lilley & Ploegh, 2004). De plus, Derlin-1 peut entrer en interaction avec les protéines EDEM (Oda *et al.*, 2003). Les glycoprotéines sont poly-ubiquitinylées par l'action d'une ubiquitine ligase au niveau de leur extrémité N-terminale durant leur rétrotranslocation. Chez la levure, deux ubiquitines ligases, Doa10 et Hrd1, sont impliquées dans le processus ERAD. Doa10 et Hrd1 sont associées respectivement aux E2 ubiquitines ligases Ubc6 et Ubc7 (Bays *et al.*, 2001).

3- La dégradation par le système ubiquitine-protéasome : une fois dans le cytosol, la dégradation des glycoprotéines mal conformées est initiée par une réaction de déglycosylation catalysée par une peptide-N-glycanase cytosolique (PNGase), tandis que la partie protéique poly-ubiquitinylée est dégradée par le complexe protéasomal 26S (Suzuki *et al.*, 2002). L'oligosaccharide libre est ensuite séquentiellement dégradé par une série de glycosidases cytosoliques. L'endo- β -N-acétylglucosaminidase ou ENGase catalyse l'hydrolyse du résidu GlcNAc terminal au niveau de l'extrémité réductrice pour générer le $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_1$. Chez les mammifères, ce dernier va ensuite subir une démannosylation catalysée par une alpha-mannosidase cytosolique, la Man2C1, pour donner une structure linéaire de $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_1$. Ce dernier est ensuite transporté dans les lysosomes afin d'être complètement dégradé en monosaccharides.

Chez la levure, des protéines possédant des domaines mal conformés constituent des substrats de différents complexes ERAD. En effet, d'après Vashist et Ng, le domaine protéique mal replié constitue le principal déterminant pour induire le type de processus ERAD adéquat (Vashist & Ng, 2004). En effet, il existe deux systèmes de surveillance, selon le type du domaine mal replié, l'un permet de vérifier l'état de repliement dans la lumière du RE (ERAD-L) et l'autre vérifiant l'état des domaines cytoplasmiques (ERAD-C). Les complexes protéiques responsables de ces deux voies ont été identifiés grâce à des études biochimiques chez la levure (Carvalho *et al.*, 2006 ; Denic *et al.*, 2006).

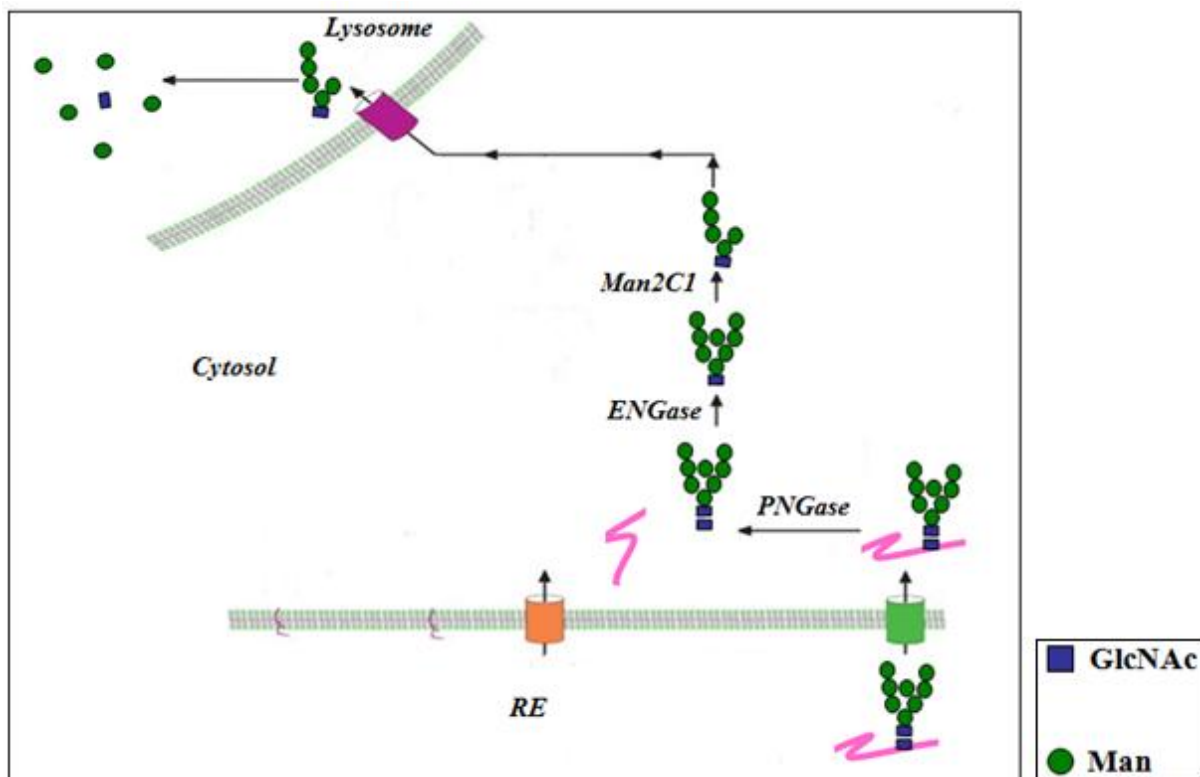


Figure 5: Le processus ERAD.

Les glycoprotéines mal conformées et destinées à être dégradées sont « rétro-transloquées » vers le cytosol à travers la membrane du RE. Dans le cytosol, elles subissent l'action successive de la PNGase, l'ENGase et de la Man2C1 pour générer une structure particulière de Man₅GlcNAc₁ qui est transportée dans les lysosomes où elle subit sa dégradation finale en monosaccharide

E.2- Catabolisme lysosomal des N-glycoprotéines

E.2.a- Généralités

Le catabolisme lysosomal des glycoprotéines constitue une part principale de l'homéostasie des processus de la glycosylation des protéines au sein de la cellule. Les lysosomes sont des organites ubiquitaires représentant les compartiments de dégradation primaire de la cellule. Les substrats destinés à être dégradés sont amenés aux lysosomes via la voie d'endocytose, ou via autophagie. La fonction catabolique des lysosomes est complétée par l'existence d'organites associés aux lysosomes nommés LROs ou « Lysosome-related organelles » comme les mélanosomes et des granules lytiques (Dell'Angelica *et al.*, 2000). Les lysosomes sont caractérisés par un pH acide (5,2 à 5,5) entretenu par une pompe membranaire à protons ATP-dépendante de type vacuolaire (type V) (Forgac, 1989). Deux classes de protéines sont essentielles pour le fonctionnement des lysosomes : les hydrolases solubles et les protéines membranaires lysosomales pour « Lysosomal membrane proteins » (LMPs). Une cinquantaine d'hydrolases lysosomales ont été décrites, chacune présentant une activité spécifique. Chez les mammifères, les lysosomes contiennent environ vingt cinq LMPs (Connus & Simon, 2008). Elles présentent diverses fonctions comme l'acidification de la lumière lysosomale, l'importation des protéines du cytosol, la fusion membranaire et le transport des produits de dégradation jusqu'au cytoplasme (Eskelinen *et al.*, 2003). Les LMPs les plus abondantes sont les protéines LAMP1 et LAMP2 pour « lysosome-associated membrane protein », les protéines LIMP2 pour « lysosomal integral membrane protein type 2 » et la tétraspanine CD63.

La chaîne polypeptidique est hydrolysée par l'action des protéases et la partie glycanique par des glycosidases. Le pH acide qui caractérise le compartiment lysosomal, assure les conditions optimales pour l'activité catalytique des enzymes et facilite partiellement la dénaturation des glycoprotéines.

E.2.b- Protéolyse

La protéolyse met en jeu une classe d'endo- et d'exo-peptidases ou protéases, appelées cathepsines, agissant de manière concertée sur les glycoprotéines pour conduire à la libération d'acides aminés et de dipeptides (Barrett *et al.*, 1998). Les cathepsines sont classées en fonction de la nature de l'acide aminé du site actif impliqué dans l'activité catalytique de ces

enzymes : les cathepsines à sérine (A et G), les cathepsines à cystéine (B, C, F, H, K, L, O, S, et W) et les cathepsines à acide aspartique (D et E). La spécificité des cathepsines est déterminée par l'ensemble des interactions entre le substrat et les résidus d'acides aminés dans le site actif de l'enzyme (Barrett, 1994). Elles sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs, pré-pro-enzymes, qui sont transportés aux lysosomes via la voie Man-6-P. Un bon nombre d'entre elles sont ubiquitaires telles que les cathepsines B, H et L, tandis que d'autres se trouvent exprimées uniquement dans certains tissus comme par exemple la cathepsine S exprimée dans les tissus lymphatiques où elle interviendrait dans la régulation du trafic intracellulaire des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II ainsi que la cathepsine K hautement exprimée dans les ostéoclastes.

E.2.c- Transport des glycoprotéines vers les lysosomes

La localisation et la fonction des glycoprotéines déterminent la voie empruntée afin d'être acheminées aux lysosomes. Les glycoprotéines sont généralement transportées par deux voies distinctes : l'autophagie et l'hétérophagie ou endocytose.

E.2.c.1- Autophagie

L'autophagie est un processus catabolique permettant aux glycoprotéines intracellulaires en fin de vie présentes dans les organites cellulaires d'être amenées vers les lysosomes au sein desquels elles sont dégradées. L'autophagie ne représente pas uniquement un mécanisme important de dégradation cellulaire (Mizushima & Klionsky, 2007), mais peut être impliquée également dans le développement, le cancer, les réponses immunitaires et l'apoptose (Mizushima *et al.*, 2008). Cette voie peut être induite ou réprimée dans des conditions de privation en acides aminés ainsi qu'elle peut être activée dans des conditions de stress du RE (Bernales *et al.*, 2006; Ogata *et al.*, 2006).

Trois différents types d'autophagie ont été décrits chez les mammifères selon le mécanisme par lequel les glycoprotéines sont amenées aux lysosomes :

- **La macroautophagie**- La macroautophagie est caractérisée par une séquestration d'un matériel cytosolique dans une vacuole, appelée autophagosome, suivie de sa fusion avec le lysosome et aboutissant par suite à la dégradation lysosomale non sélective d'organites et de

macromolécules séquestrés (Dunn, 1994). Un ensemble de gènes, appelé «autophagy-related genes» (Atg) participe aux différentes étapes du processus de macroautophagie (Klionsky *et al.*, 2003). En effet, des études ont montré que le «Knock out» (KO) des gènes Atg5 ou Atg7 chez les souris, causerait la mort de ces dernières quelques heures après leur naissance, ceci est dû au rôle indispensable de la macroautophagie comme étant une source de nutriments jusqu'au début de la période de lactation (Kuma *et al.*, 2004). De plus, le KO conduisant à l'absence d'expression des protéines Atg5 ou Atg7 dans le cerveau, le foie ou le cœur chez les souris montre l'implication de la macroautophagie dans l'homéostasie cellulaire et dans la dégradation des protéines anormales qui s'accumulent dans ces conditions (Komatsu *et al.*, 2005, 2006 ; Hara *et al.*, 2006).

- **La microautophagie**- Au cours de ce processus, des portions du cytoplasme sont directement «phagocytées» par invagination membranaire des lysosomes et les microautophagosomes formés dans les lysosomes sont alors rapidement dégradés. Le processus de microautophagie est considéré comme un processus lent, constitutif, ATP-dépendant et qui permet la dégradation non-sélective des protéines cytosoliques, y inclus des glycoprotéines (Ahlberg & Glaumann, 1985).

- **La voie « chaperone-mediated autophagy » ou CMA** (Cuervo, 2004)- Au cours de la voie CMA, des protéines cytosoliques possédant un signal d'adressage, le motif KFERQ ou KFERQ-like, sont reconnues sélectivement grâce à une protéine chaperonne cytosolique, la protéine hsp73, qui permet leur acheminement vers la membrane lysosomale (Massey *et al.*, 2006b). Après interaction avec LAMP-2A, une protéine membranaire lysosomale, agissant comme un récepteur au cours de ce processus, la protéine est « transloquée » dans la lumière du lysosome assistée par l'action de la protéine chaperonne hsc73, pour être dégradée. La cathepsine A, une sérine protéase, qui possède un rôle protecteur de certaines hydrolases lysosomales, permet d'induire la dégradation du récepteur, LAMP-2A, pour assurer une régulation de la voie CMA (Cuervo *et al.*, 2003). Environ 30% des protéines cytosoliques sont dégradées via la voie CMA sous différentes conditions physiologiques. Ainsi, des fragments glycaniques provenant de la dégradation de glycoprotéines malconformées du RE ou du cytosol sont également envoyés aux lysosomes via cette voie pour finaliser leur dégradation. Il est à noter que la macroautophagie et la voie CMA deviennent très actives sous certaines conditions de stress comme la privation d'acides aminés, le stress oxydatif ou des conditions

contribuant à augmenter le taux des protéines malconformées (Cuervo *et al.*, 1995 ; Kiffin *et al.*, 2004 ; Mizushima *et al.*, 2004).

E.2.c.2- Hétérophagie

L'hétérophagie ou endocytose représente la voie la mieux connue. Elle assure le transport des protéines et des glycoprotéines extracellulaires exogènes et membranaires vers les lysosomes (Mellman, 1996). Les glycoprotéines exogènes telles que les hormones, les facteurs de croissance ou encore les glycoprotéines du plasma sanguin peuvent être internalisées via 2 processus d'endocytose: un processus spécifique et régulé dans lequel interviennent des récepteurs membranaires spécifiques et des vésicules recouvertes de clathrine, et un second processus non spécifique et constitutif encore appelé pinocytose. Ces 2 processus impliquent la formation des endosomes précoces ou phagosomes par invagination de la membrane plasmique. La digestion des substrats endocytés peut commencer dans l'endosome, sachant que leur dégradation totale se déroulera dans un second temps suite à la fusion avec les lysosomes.

E.2.d- Catabolisme lysosomal des N-glycoprotéines

Les voies de dégradation des N-glycoprotéines de type complexe, hybride et oligomannosidique ont été mises en évidence grâce à la caractérisation des structures glycaniques qui s'accumulent dans les cellules et dans les urines de patients souffrant de glycoprotéinoses. Le mécanisme de dégradation des N-glycoprotéines dans les lysosomes est bidirectionnel impliquant une dégradation de la chaîne peptidique par les cathepsines simultanément à l'hydrolyse séquentielle des monosaccharides à partir de l'extrémité non réductrice de la partie glycanique par l'action d'exoglycosidases. Une aspartyl-N- β -glucosaminidase (encore appelée la chitobiase) catalyse l'hydrolyse du résidu Asn à condition que les fonctions amine et carboxylique du résidu d'asparagine soient libres (Aronson, 1999). Cette réaction nécessite l'élimination par l' α -fucosidase, des résidus de Fuc liés en (α 1,6) sur le résidu GlcNAc du point d'attache. Le résidu de GlcNAc proximal est hydrolysé par une N,N'-diacétylchitobiase lysosomale exprimée chez l'homme et le rongeur (Abraham *et al.*, 1983).

Le catabolisme des *N*-glycannes de type oligomannosidique est relativement simple puisque, exceptée l'activité de la chitobiase, il ne fait intervenir que des mannosidases. On retrouve la LAMAN (Al Daher *et al.*, 1991), une α -mannosidase de classe II (famille GH38) qui agit sur des structures de type $\text{Man}_{5-9}\text{GlcNAc}_{1-2}$ pour générer la structure $\text{Man}(\alpha 1,6)\text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$ (chez l'homme et le rongeur). L' α -(1,6) mannosidase retire le résidu de Man lié en $\alpha 1,6$ du noyau. La dernière enzyme à intervenir est la β -mannosidase qui libère un Man et un GlcNAc. Le catabolisme des *N*-glycannes de type hybride et de type complexe (**Figure 6**) fait intervenir un plus grand nombre d'exoglycosidases. L'hydrolyse séquentielle des résidus d'acides sialiques, de β -Gal et de β -GlcNAc des antennes est catalysée respectivement par les α -sialidases, la β -galactosidase et diverses N-acétyl- β -hexosaminidases. Un noyau pentasaccharidique ($\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$) ou tétrasaccharidique chez l'homme et le rongeur exprimant une N,N'-diacétylchitobiase est formé suite à l'action séquentielle de ces enzymes. Ces produits constituent ensuite les substrats de l'enzyme LAMAN et de l' $(\alpha 1-6)$ -mannosidase chez l'homme pour former une structure commune aux trois classes de *N*-glycannes, $\text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$ ou $\text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$. Chez l'homme, la dernière étape du catabolisme des *N*-glycannes de type hybride et de type complexe est la formation du Man et de la GlcNAc par l'action d'une β -mannosidase.

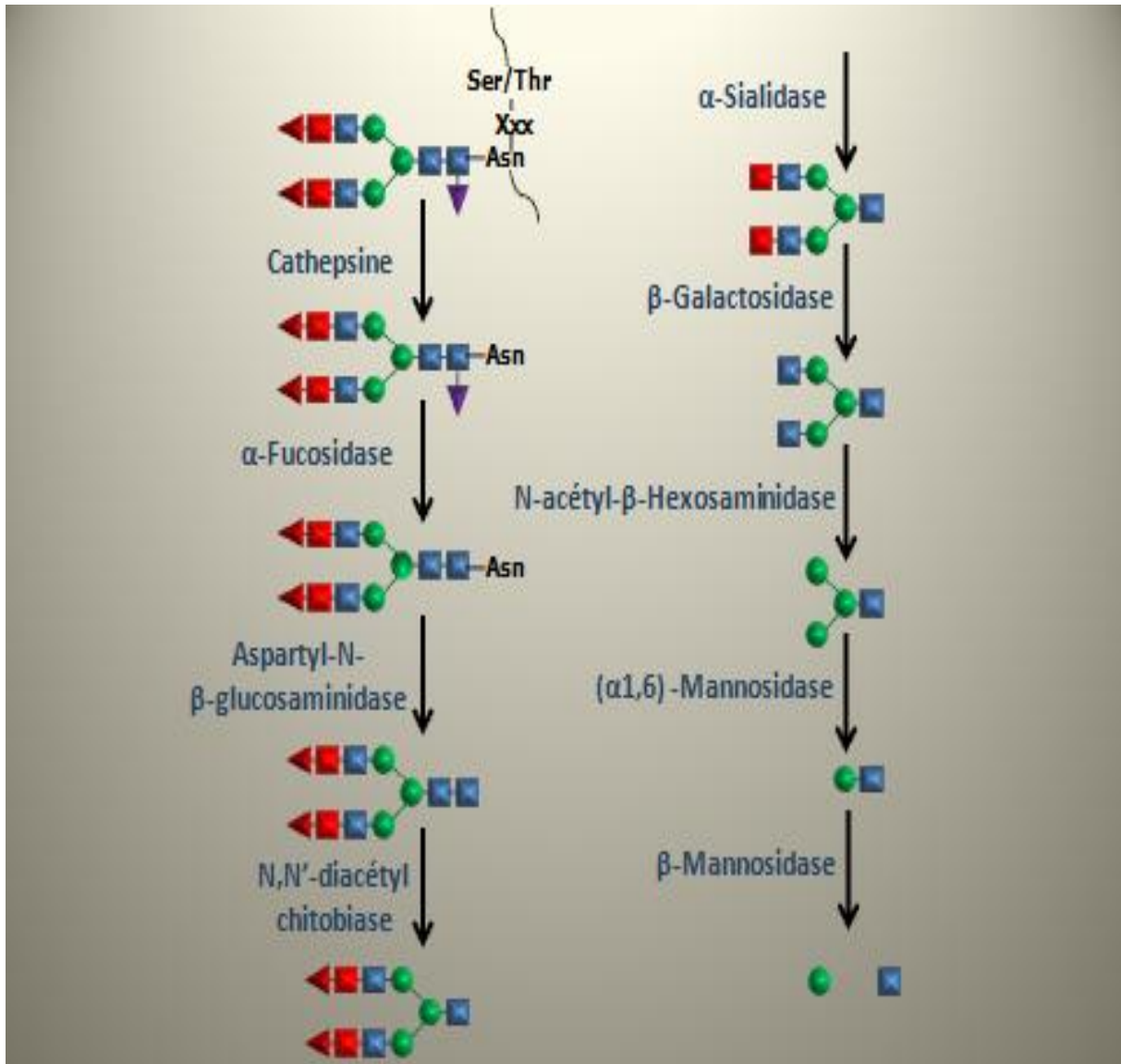


Figure 6: Schéma illustrant le catabolisme lysosomal bidirectionnel des *N*-glycoprotéines chez l'homme.

Man ● ; GlcNAc ■ ; Gal ■ ; NeuAc ▲ ; Fuc ▼ .

E.2.d.1- Les β -hexosaminidases lysosomales

L'existence d'une N-acétylglucosaminidase a été premièrement décrite par Watanabe en 1936. Il a été montré plus tard que cette enzyme était également capable d'hydrolyser des résidus GalNAc, d'où le terme général d'hexosaminidase. Trois différentes isoformes dimériques des hexosaminidases sont connues : la β -hexosaminidase A (Hex A) qui représente la forme hétérodimérique, possède les deux sous-unités α et β , l'hexosaminidase B (Hex B, $\beta\beta$) et l'hexosaminidase S (Hex S, $\alpha\alpha$) représentent les formes homodimériques.

Les β -hexosaminidases sont particulièrement importantes dans le catabolisme lysosomal des glycosphingolipides qui sont des composés essentiels de la membrane plasmique des cellules eucaryotes. Les sous-unités α et β possèdent 60% de similarité au niveau de leur structures primaires (Proia *et al.*, 1988) et chacune des ces trois isoenzymes contient deux sites actifs avec des spécificités distinctes vis-à-vis des substrats (Kytzia & Sandhoff, 1985). Les deux sites actifs de l'homodimère Hex B ($\beta\beta$) peuvent hydrolyser des substrats neutres alors que la sous-unité α des Hex A ($\alpha\beta$) et des Hex S ($\alpha\alpha$) sont également capables d'hydrolyser des substrats ou des glycoconjugués chargés négativement.

Ces trois isoenzymes requièrent une structure dimérique pour assurer leur activité enzymatique. Seule l'Hex A est capable de dégrader le substrat physiologique le plus important, le ganglioside GM2. La dégradation du ganglioside GM2 par l'Hex A requiert la présence de la glycoprotéine GM2AP (GM2-activator protein) qui joue le rôle d'un cofacteur (Conzelmann & Sandhoff, 1979). Au cours du processus de dégradation lysosomal du ganglioside GM2, ce cofacteur, décrit comme étant une « liftase », permet de reconnaître les substrats lipidiques à l'intérieur des membranes et de les libérer de la bicouche lipidique pour les présenter à l'enzyme afin de les dégrader (Furst & Sandhoff, 1992).

Le déficit génétique en l'une et/ou l'autre des deux isoenzymes A et B affecte les patients souffrant de diverses GM2-gangliosidoses dont la GM2-gangliosidose variant O également appelé maladie de Sandhoff (Sandhoff & Christomanou, 1979). La maladie de Sandhoff résulte d'une mutation de la sous-unité β des deux isoenzymes et s'accompagne d'une importante surcharge lysosomale en N- et O-glycannes, et en gangliosides à GM2.

Chapitre II : La modification post-traductionnelle

O-GlcNAc

A.Généralités

La O-N-acétylglucosaminylation ou O-GlcNAc est une modification post-traductionnelle dynamique et réversible constituant la forme majeure de glycosylation des protéines cytosoliques et nucléaires. Cette glycosylation, découverte par Torres et Hart en 1984, consiste en l'addition d'un résidu unique de N-acétylglucosamine (GlcNAc) sur des résidus de sérine (Ser) ou de thréonine (Thr) des protéines. Des centaines de protéines impliquées dans une grande variété de processus cellulaires sont modifiées par la O-GlcNAc, comprenant des facteurs de transcription tels que les facteurs Sp1, p53, c-myc (Jackson & Tijan, 1988 ; Chou *et al.*, 1995), des protéines du cytosquelette comme par exemple l' α -tubuline et les protéines filamenteuses (Walgren *et al.*, 2003 ; Dong *et al.*, 1993), ainsi que des protéines chaperonnes comme l'HSP70 (Walgren *et al.*, 2003). Au niveau cellulaire, cette modification intervient dans des processus de transport et ou/de rétention nucléaire (Lefebvre *et al.*, 2002), dans la régulation du cycle cellulaire (Slawson *et al.*, 2005), dans la dégradation des protéines (Zachara & Hart, 2004), dans l'apoptose (O'Donnell *et al.*, 2004), dans les processus de transcription et de traduction (Gao *et al.*, 2003), dans l'interaction protéine-protéine (Guinez *et al.*, 2006), dans le métabolisme (Cieniewski-Bernard *et al.*, 2004), et dans les voies de signalisation (Whisenhunt *et al.*, 2006). Etant donné le grand nombre de processus moléculaires dépendant des protéines O-GlcNAcylées, un dysfonctionnement de la labilité de la O-GlcNAc conduit à des perturbations de ce processus au sein de la cellule, au niveau du tissu voire de l'organisme tout entier. De nombreuses maladies associées à des dysfonctionnements des mécanismes de O-GlcNAcylation ont été mises en évidence. Parmi ces dernières figurent le diabète de type II, les maladies neurodégénératives, et certains cancers.

Autre point non négligeable, la O-GlcNAc entre directement en compétition avec la phosphorylation de certaines protéines. Cette compétition peut se faire indépendamment sur le même résidu Ser ou Thr d'une protéine telle que le proto-oncogène c-myc (Kamemura *et al.*,

2002) ou en compétition sur les résidus adjacents ou espacés de quelques acides aminés comme dans le cas du facteur transcriptionnel p53 (Yang *et al.*, 2006). La régulation des processus biologiques dans lesquels la *O*-GlcNAc est impliquée se fait via des interactions protéiques en compétition directe ou non avec la phosphorylation (Hiromura *et al.*, 2003 ; Gewinner *et al.*, 2004). La balance entre la phosphorylation et la *O*-N-Acétylglucosaminylation est associée avec la localisation nucléaire de la protéine Tau (Arnold *et al.*, 1996) dont on connaît l'implication dans le développement de la maladie d'Alzheimer. En effet, durant cette pathologie, la protéine tau se retrouve hyperphosphorylée et s'agrège sous forme de filaments intracellulaires (Liu *et al.*, 2004).

B. Les enzymes impliquées dans la modification O-GlcNAc

Le dynamisme de la *O*-GlcNAc est régulé par un seul couple d'enzymes hautement conservées et n'ayant aucune séquence consensus évidente : la *O*-N-Acétylglucosaminyltransférase (*O*-GlcNAc transférase ou **OGT**) qui catalyse le transfert du résidu GlcNAc sur les protéines cibles par le biais du nucléotide-sucré UDP-GlcNAc et la *O*-N-Acétylglucosaminidase (*O*-GlcNAc^{ase} ou **OGA**) hydrolysant ce résidu (**Figure 7**).

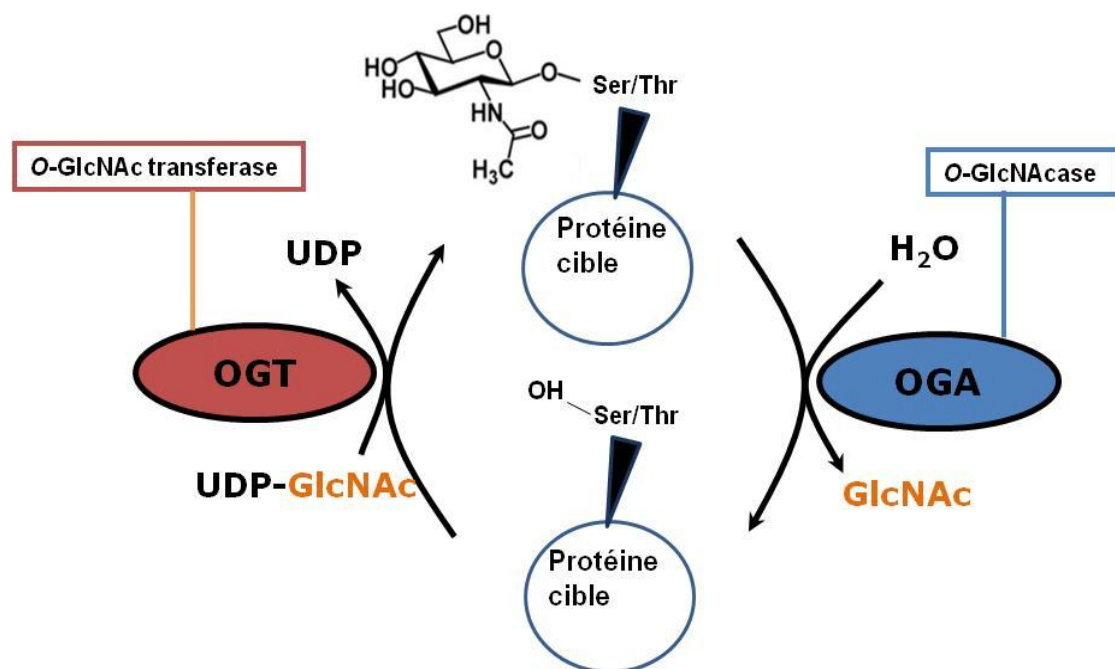


Figure 7: Le dynamisme de la O-GlcNAcylation.

La modification *O*-GlcNAc est une modification post-traductionnelle réversible qui consiste en l'addition d'un résidu de β -GlcNAc sur les résidus Ser ou Thr d'une protéine cible par l'action de l'*O*-GlcNAc transférase (OGT). La modification *O*-GlcNAc peut être hydrolysée grâce à l'action de la *O*-N-Acétyleglucosaminidase (OGA).

B.1- La *O*-GlcNAc transférase (OGT)

L'OGT a été purifiée à partir du foie de rat et est décrite comme étant un complexe hétérotrimérique constitué de deux sous-unités de 110 kDa et une autre de 78 kDa (Haltiwanger *et al.*, 1992). Elle a été clonée chez le rat, l'homme et *C.elegans* dans lesquels elle existe préférentiellement sous forme d'un homotrimère constitué de trois sous-unités identiques de 110 kDa (Lubas *et al.*, 1997). L'OGT, exprimée dans tous les tissus, existe sous forme d'au moins quatre isoformes dont l'expression de certaines est restreinte à certains tissus (Kreppel *et al.*, 1997). Les isoformes de 110 kDa et 78 kDa nommées respectivement ncOGT pour « nuclear and cytoplasmic OGT » et sOGT pour « small OGT » sont localisées dans le cytoplasme et le noyau, tandis que l'isoforme de 103 kDa nommé mOGT pour « mitochondrial OGT » est retrouvée exclusivement dans la mitochondrie (Hanover *et al.*, 2003). L'OGT comporte 2 domaines distincts : un domaine N-terminal composé de 13,5 motifs de tétratricopeptides TPR (Tetratricopeptide repeats) et un domaine C-terminal à activité glycosyltransférase (**Figure 8**) (Kreppel *et al.*, 1999 ; Haltiwanger *et al.*, 1992). Le domaine TPR interagit avec une grande variété de protéines et est ainsi impliqué dans la régulation des interactions protéine-protéine au cours de certains processus cellulaires tels que le transport des protéines, la transcription et le contrôle du cycle cellulaire (Lamb *et al.*, 1995 ; Blatch & Lassle, 1999).



Figure 8 : Structure de l'*O*-GlcNAc transférase (OGT).

L'OGT possède un domaine contenant des répétitions de motifs de tétratricopeptides (TPR), et deux sous-domaines qui confèrent à l'enzyme son activité catalytique.

La délétion d'un certain nombre de domaines « TPR » de la partie N-terminale de l'OGT montre que certains d'entre eux sont indispensables dans la réaction de transfert des résidus *O*-GlcNAc sur les protéines (Lubas & Hanover, 2000). Le domaine C-terminal de l'OGT est divisé en deux domaines conservés similaires à ceux retrouvés chez la GalNAc transférase (Lazarus *et al.*, 2005). Des délétions du domaine C-terminal vont causer une perte totale de l'activité enzymatique de l'OGT suggérant que le site catalytique de l'enzyme est bien situé dans cette partie (Lubas & Hanover, 2000).

B.2- L'O-GlcNAcase (OGA)

L'O-GlcNAcase a été décrite avant tout comme étant une hexosaminidase de type C (Poenaru *et al.*, 1973 ; Braidman *et al.*, 1974 ; Overdijk *et al.*, 1981). Elle a été isolée et caractérisée avant même que la modification *O*-GlcNAc sur les protéines ne soit élucidée. Elle fut ensuite purifiée à partir du cerveau humain, séquencée et surexprimée. La séquence de l'OGA clonée était similaire de celle du gène MGEA5 pour «Meningioma over-expressed antigen 5» codant pour une hyaluronidase (Heckel *et al.*, 1998). L'activité de l'O-GlcNAcase a été retrouvée à la fois dans le noyau et le cytoplasme, elle possède un pH optimum neutre contrairement aux hexosaminidases A et B résidentes des lysosomes (Gao *et al.*, 2001). Elle est exprimée dans tous les tissus, mais plus particulièrement dans le cerveau, le placenta et dans le pancréas (Gao *et al.*, 2001). Deux isoformes ont été identifiées chez l'homme: une isoforme de 130 KDa (916 acides aminés) interagissant avec de nombreuses protéines, et une isoforme de 75 kDa (Gao *et al.*, 2001). Une étude sur l'OGA chez la souris montre que son activité est médiée par la présence d'un polypeptide correspondant à la région N-terminale entre les résidus 63 et 283 (Toleman *et al.*, 2006 ; Kim *et al.*, 2006). Des expériences de séquençage ont indiqué que la région C-terminale possédait une séquence d'acides aminés similaire à celle des acétyltransférases (Comtesse *et al.*, 2001) et par la suite une activité HAT (Histone Acétyl transférase) a été attribuée à l'OGA (**Figure 9**) (Toleman *et al.*, 2004). L'OGA comprend un site de clivage pour la caspase-3 possédant un rôle *in vitro* et *in vivo* dans l'apoptose (Butkinaree *et al.*, 2008). Des études structurales aux rayons X des homologues de l'OGA exprimés chez la bactérie *Clostridium perfringens* (Macauley *et al.*, 2009) et la bactérie *Bacteroides thetaiotamicron* (Toleman *et al.*, 2004) ont permis de mieux caractériser le site actif de l'OGA. D'ailleurs, ces études structurales de l'OGA sont actuellement une

source d'informations essentielles pour la synthèse d'inhibiteurs sélectifs et efficaces de l'OGA.



Figure 9: Structure de l'OGA.

L'OGA comprend un sous-domaine à activité O-GlcNAcase de 280 acides aminés situé sur la partie N-terminale, et un sous-domaine à activité acétyltransférase situé sur la partie C-terminale.

C. L'étude de la modification O-GlcNAc

Diverses fonctions ont été attribuées à la modification O-GlcNAc grâce aux études visant à perturber le niveau de O-GlcNAcylation des protéines dans la cellule.

-Modification du niveau de l'UDP-GlcNAc :

La synthèse du nucléotide donneur pour le transfert de O-GlcNAc sur les protéines, l'UDP-GlcNAc, est réalisée par la voie de biosynthèse des hexosamines ou HPB « *Hexosamine Biosynthetic Pathway* » à partir du glucose extracellulaire. Le glucose est immédiatement transformé en glucose-6-phosphate (G6P) après phosphorylation par l'hexokinase. Selon les conditions énergétiques cellulaires, le G6P est destiné à participer à la synthèse du glycogène, ou à entrer dans la voie des pentoses phosphates, ou encore à être transformé en fructose-6-phosphate (F6P) par la phosphoglucose isomérase. Ce F6P sera ensuite converti en glucosamine-6-phosphate (GlcNH₂6P) par l'enzyme GFAT ou fructose-6-phosphate amido transférase. Une autre enzyme de la voie HBP, l'acétyltransférase Emeg32, utilise l'acétyl-coenzyme A (AcétylCoA) pour convertir le GlcNH₂6P en N-acétylglucosamine-6-Phosphate (GlcNAc6P) qui sera rapidement métabolisé en N-acétylglucosamine (GlcNAc) puis en UDP-GlcNAc. Ce dernier peut être également généré à partir de la glucosamine en court-circuitant l'action de la GFAT.

Plusieurs stratégies ont été utilisées pour augmenter le niveau de l'UDP-GlcNAc :

L'augmentation de la disponibilité du taux de Glc dans le milieu de culture (c'est le cas des adipocytes en culture, chez lesquels un effet maximal d'augmentation d'UDP-GlcNAc a été observé après 3h de traitement avec une concentration de 10 mM en Glc), l'addition de glucosamine ou encore la surexpression de l'enzyme GFAT (Walgren *et al.*, 2003 ; Hazel *et al.*, 2004 ; Marshall *et al.*, 2004).

Bien que l'utilisation de ces trois stratégies ont conduit à une légère augmentation du niveau de O-GlcNAc dans la cellule, l'augmentation de la concentration en glucosamine permet aussi d'induire des effets additionnels, tels que l'inhibition des hexokinases (Marshall *et al.*, 2005), le stress du réticulum endoplasmique (Matthews *et al.*, 2007) et la déplétion en ATP dans la cellule (Hresko *et al.*, 1998).

- Surexpression de l'OGT :

La surexpression de l'OGT par la génération de modèles animaux transgéniques (McClain *et al.*, 2002), après transfection de cellules en culture (Kreppel *et al.*, 1997) , ou en infectant des cellules ou des tissus par des virus (Clark, *et al.*, 2003) constitue théoriquement une méthode directe afin d'augmenter le niveau de O-GlcNAc dans la cellule. Cependant, l'utilisation de ces techniques n'a pas permis d'obtenir l'effet escompté étant donné le caractère réversible et dynamique de cette modification. L'augmentation du niveau de O-GlcNAc par surexpression de l'OGT est associée à une augmentation de l'activité de l'OGA entraînant de ce fait une diminution du taux de O-GlcNAc dans la cellule. Plusieurs effets peuvent donc apparaître dans la cellule suite à la surexpression de l'OGT.

Inhibition de l'OGA :

La surexpression de l'OGT n'ayant pas permis d'étudier précisément le rôle de la O-GlcNAcylation, une autre stratégie a été adoptée par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de l'OGA. Environ une centaine d'études visant à augmenter le niveau de O-GlcNAc ont utilisé cette stratégie. Haltiwanger *et al.* (1998) sont les premiers à avoir montré que l'inhibition de l'OGA cause une augmentation significative du niveau de O-GlcNAc. L'inhibition de l'OGA est maintenant couramment utilisée pour étudier l'effet de l'augmentation du niveau de O-GlcNAc dans des cellules en culture (Macauley *et al.*, 2008 ; Vosseller *et al.*, 2002) et plus récemment *in vivo* (Yuzwa *et al.*, 2008 ; Zou *et al.*, 2007). Plusieurs inhibiteurs de l'OGA ont

été décrits, leur efficacité et leur sélectivité vis-à-vis l'OGA a été mises en évidence dans de nombreuses études visant à déterminer plus précisément le(s) rôle(s) de la modification O-GlcNAc au sein de la cellule. Parmi ces inhibiteurs nous pouvons citer :

Streptozotocine (STZ) : la STZ a été utilisé à la base pour établir des modèles animales diabétiques (Junod *et al.*, 1967). Ce composant rentre à l'intérieur des cellules β pancréatiques via le transporteur de glucose GLUT2 (Schnedl *et al.*, 1994) entraînant des effets toxiques dans la cellule dont l'alkylation de l'ADN (Bennett *et al.*, 1981), la production de l'oxyde nitrique, la rupture des brins d'ADN et l'activation de la poly (ADP-ribose) polymérase qui cause la déplétion en NAD⁺ cellulaire (Yamamoto *et al.*, 1981). Ces effets, à l'origine de la résistance à l'insuline chez les rongeurs, provoquent la mort des cellules β pancréatiques. Il a été montré que STZ conduisait à une légère diminution de l'activité de l'OGA (Macauley *et al.*, 2005), qui de plus, paraissait irréversible (Lee *et al.*, 2006). De plus, l'inhibition de l'OGA n'était pas à l'origine des effets toxiques induits par STZ dans les cellules β (Gao *et al.*, 2000 ; Okuyama & Yachi, 2001). Malgré que tous ces effets aient été bien documentés dans la littérature, des études plus récentes utilisant le STZ ont décrit un rôle de la O-GlcNAc lié à l'apoptose (Kawauchi *et al.*, 2009 ; Yang *et al.*, 2006).

-PUGNAc et LOGNAc : ces composants étaient considérés après leur première synthèse par l'équipe de Vasella en 1991 comme étant des inhibiteurs puissants des β -N-acétylglucosaminidases qui existent chez les eucaryotes, les plantes et la levure (Horsch *et al.*, 1991). Ainsi, Dong et Hart en 1994 ont montré que ces deux inhibiteurs peuvent inhiber l'OGA purifié à partir de la rate du rat avec des K₁ équivalents à 0,052 et 1,7 μ M. Il a été montré par la suite que le PUGNAc peut également inhiber à la fois l'OGA en augmentant le niveau de O-GlcNAc dans la cellule et les β -hexosaminidases lysosomales avec des K₁ respectivement équivalents à 46 et 36 nM (Gao *et al.*, 2001). PUGNAc permet ainsi d'augmenter le niveau de GM2 dans des cellules neuronales en culture suite à l'inhibition des β -hexosaminidases lysosomales (Stubbs *et al.*, 2009).

D'autres inhibiteurs de l'OGA (**tableau 1**) ont également été décrits dans la littérature, nous pouvons citer :

-L'alloxane : un analogue à l'uracile qui est également capable d'inhiber l'OGT (Lee *et al.*, 2006), mais comme dans le cas du STZ, des effets toxiques sont associés à cette inhibition (Lenzen, 2008).

-**Le NAG-thiazoline** : Synthétisé par Knapp *et al.* en 1996, cet inhibiteur est capable d'inhiber, à la fois, l'OGA et les β -hexosaminidases avec autant d'efficacité.

- **Le Nbut-GT**: 700 fois plus spécifique de l'OGA que de l'Hex B. Contrairement au NAG-thiazoline, cet inhibiteur montre une inhibition très sélective et plus efficace de l'OGA. Il cause une augmentation significative du niveau de O-GlcNAc dans les cellules Cos-7 sans être accompagnée par des effets toxiques même avec des traitements de longue durée et avec des concentrations élevées (Macauley *et al.*, 2005).

- **Le Thiamet-G** : Plus Stable que le Nbut-GT, cet inhibiteur est 35000 fois plus spécifique pour l'inhibition de l'OGA que de l'Hex B. Le thiamet-G, capable de traverser la barrière hémato-encéphalique pour atteindre le système nerveux central, a été utilisé dans des études visant à bloquer la phosphorylation de la protéine Tau *in vivo* (Yuzwa *et al.*, 2008 ; Gutternigg *et al.*, 2009).

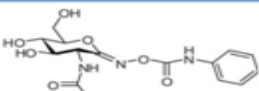
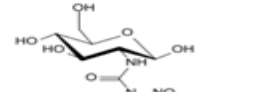
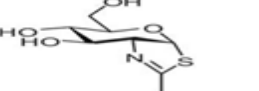
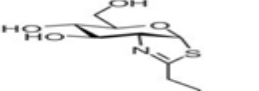
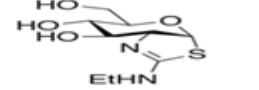
Inhibiteur	K_i	K_i OGA/ K_i HexB
 PUGNAc	50 nM	1
 Streptozotocine	1,5 mM	30
 NAG-Thiazoline	80 nM	1
 Nbut-GT	600 nM	600
 Thiamet-G	21 nM	35000

Tableau 1 : Les structures chimiques et les constantes d'inhibition (KI) de certains inhibiteurs de l'OGA (Macauley *et al.*, 2008 ; Konrad *et al.*, 2001; Pathak *et al.*, 2008 ; Slawson *et al.*, 2008 ; Mathiew *et al.*, 2007 ; Yuzwa *et al.*, 2008)

Chapitre III : Les oligosaccharides solubles (OS)

A.Génération des OS chez les mammifères

Chez les mammifères, de grandes quantités d'oligosaccharides solubles (OS) sont générées durant le processus de la *N*-glycosylation. Une partie de ces OS est libérée dans la lumière du RE par un mécanisme qui demeure à être élucidé. Une autre partie des OS est formée dans le cytosol au cours du processus ERAD suite à la déglycosylation des glycoprotéines nouvellement synthétisées mal conformées. Il faut également noter qu'une quantité non négligeable d'OS peuvent également exister sous forme de métabolites intermédiaires issus de la dégradation lysosomale des glycoprotéines matures qui sont adressées aux lysosomes selon la voie de « turn-over » des glycoprotéines.

A.1-Génération des OS dans le RE

Bien que les mécanismes de biosynthèse des LLO et des *N*-glycannes soient maintenant bien connus et caractérisés, certains aspects des phénomènes qui ont lieu durant le processus de *N*-glycosylation restent encore à élucider. L'une des questions qui demeure sans réponse est comment les OS sont générés dans le RE (Cacan *et al.*, 1980). La libération des OS dans la lumière du RE à partir des LLO peut se réaliser sous certaines conditions grâce à l'action de l'OST (**Figure 10**). Dans le cas d'un défaut d'accepteur peptidique, il a été proposé que l'OST, normalement impliquée dans le transfert du précurseur $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ sur la protéine, aurait également une activité hydrolytique permettant de libérer le précurseur oligosaccharidique du Dol-PP sur la face luminale de la membrane du RE sous forme d'OS neutre ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$). En effet, ce processus a été considéré comme un mécanisme qui permettrait de contrôler la quantité de LLO dans la cellule (Anumula & Spiro 1983. De plus, Gao *et al.*, (2005) avaient observé que l'introduction d'accepteurs lipidiques exogènes de l'OST permettait de réduire la quantité d'OS libres dans la cellule suggérant que les OS

observés provenaient des Dol-PP-OS. Dans des conditions physiologiques normales, le niveau de Man-6-P dans la cellule ne permet pas d'induire l'activité catalytique de l'OST. Par contre, lors de pathologies métaboliques, le Man-6-P atteint un niveau élevé dans les cellules et s'accompagne d'une augmentation du taux d'OS libérés (Gao *et al.*, 2005). Les OS générés par l'activité hydrolytique de l'OST sont sous forme d'oligosaccharides possédant deux résidus GlcNAc au sein de leur séquence réductrice (OSGn2) (Duvet *et al.*, 2004). Pourtant, l'importance physiologique de ce processus et sa régulation par des facteurs tels que le Man-6-P et l'augmentation de la disponibilité en accepteurs peptidiques restent encore à clarifier. Cependant, il est à signaler que d'autres études estiment que les OS formés dans la lumière du RE auraient pour origine l'action d'une activité PNGase ou N-glycanase (Moore, 1995 ; Chantret *et al.*, 2003 ; Duvet *et al.*, 2004)..

A.2- Génération des OS dans le cytosol

Divers travaux ont montré qu'en inhibant le transport des OS formés dans le RE vers le cytosol, on observe tout de même la présence d'OS dans le cytosol (**Figure 10**), ce qui suggère que les OS ne sont pas strictement générés dans le RE. En effet, les OS peuvent également être formés dans le cytosol suite à la déglycosylation par l'action de la PNGase des glycoprotéines mal conformées destinées à être dégradées durant le processus ERAD. Les OS cytosoliques générés suite à l'action de la PNGase sont sous forme d'OSGn2. La PNGase est exprimée chez les mammifères et la levure (Suzuki *et al.*, 1993 ; Suzuki *et al.*, 2002) et son gène a été identifié (Suzuki *et al.*, 2000 ; Suzuki *et al.*, 2003). Une fois générés, les OSGn2 sont ensuite séquentiellement hydrolysés par des enzymes cytosoliques. L'ENGase génère, en premier temps, des OSGn1 qui deviennent par la suite les substrats de l' α -mannosidase cytosolique ou Man2C1. L'ENGase, exprimée chez l'homme et chez *C. elegans* (Suzuki *et al.*, 2002), est absente chez la levure telle que *S.cerevisiae* ou *S. pombe* (Suzuki *et al.*, 1998). La Man2C1 est, quand à elle, exprimée dans de nombreuses cellules animales (Yamashiro *et al.*, 1997) et possède des propriétés différentes de ceux des α -mannosidases réticulaires et golgiennes telles que son activation par le Co^{2+} et son inhibition par différents inhibiteurs. Cette enzyme qui hydrolyse préférentiellement les OSGn1 (Oku *et al.*, 1991), génère la structure linéaire $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_1$ à partir du $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_1$ en hydrolysant des résidus $\alpha(1-$

2,3,6) Man. La structure Man_5Gn_1 ainsi générée par l'action de la Man2C1 diffère de celle formée par l'action de l' α -mannosidase I golgienne au cours du processus de maturation des *N*-glycannes au sein de l'appareil de Golgi. De plus, il a été montré que la Man2C1 hydrolyse les résidus de Man que les mannosidases lysosomales n'arrivent pas à éliminer (Tulsiani & Touster, 1987). La structure $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_1$, une fois générée, sera ensuite transportée dans les lysosomes au sein desquels elle sera dégradée en monosaccharides par l'action de l' α -mannosidase et la β -mannosidase lysosomales.

A.3-Les transporteurs RE-Cytosol et lysosomaux des OS

Bien que les fonctions précises des OS ne soient pas élucidées, des études biochimiques montrent que la cellule requiert un processus qui permet l'élimination des OS de la lumière du RE. L'accumulation des OS dans la lumière du RE peut interférer avec le système du contrôle qualité du RE, ainsi qu'avec l'exportation des glycoprotéines mal repliées vers le cytosol et leur dégradation par le protéasome 26S (Helenius & Aebi, 2004 ; Cabral *et al.*, 2001 ; Yoshida *et al.*, 2003). Le gène codant pour le transporteur membranaire du RE n'a pas été encore identifié, mais des études biochimiques montrent que ce transport est ATP et Ca^{2+} dépendant. Inhibé par l'addition dans le milieu de culture de concentrations relativement basses en Man et en benzylmannose, suggère que ce système de transport reconnaisse spécifiquement les résidus de Man situés au niveau de l'extrémité non-réductrice (Saint-Paul *et al.*, 1999). Par ailleurs, le ou les transporteurs des OS au niveau de la membrane lysosomale sont ATP-dépendants inhibés par l'introduction de résidus de GlcNAc. Ceci montre que la présence de résidus GlcNAc au niveau de l'extrémité réductrice est essentielle pour le transport lysosomal des OS. Ce dernier est spécifique de la structure $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_1$ qui représente le produit final de l'ENGase et de la Man2C1 durant le processus ERAD (Cacan *et al.*, 1995).

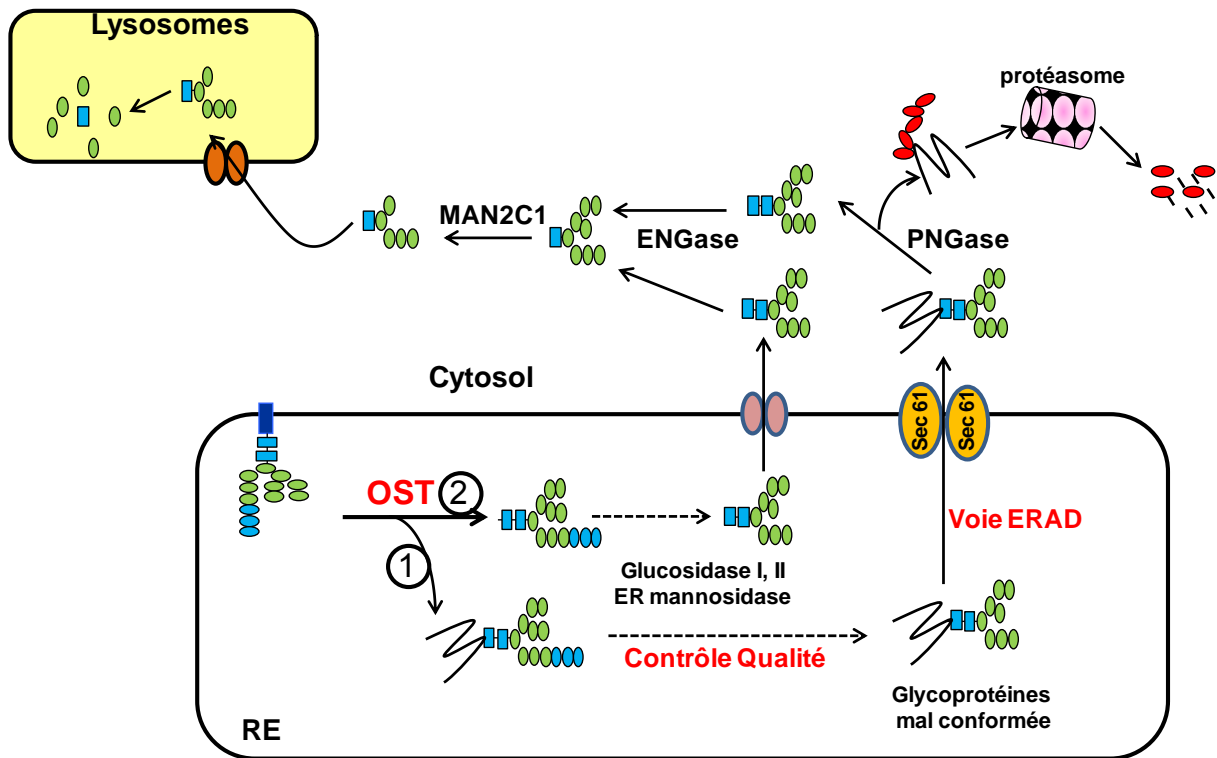


Figure 10: Génération et catabolisme des OS chez les mammifères. (1) OS générés au cours de la voie ERAD ; (2) OS générés par l'activité hydrolytique de l'OST.

B. Les OS observés chez d'autres organismes

B.1- Les OS chez la levure *S. Cerevisiae*

Chez la levure, *S. Cerevisiae*, l'origine et le sort des OS a été également étudié (Chantret *et al.*, 2003). Il a été montré que chez *S.cerevisiae*, 70 à 80% des OS sont générés par l'action de la PNGase cytoplasmique appelé Png1p, alors que la source des 20% restants n'est toujours pas connue. Après la libération des OS dans le cytosol, une seule enzyme a été décrite comme étant impliquée dans le catabolisme des OS cytosoliques, l' α -mannosidase vacuolaire ou Asm1p. Cette dernière est une enzyme vacuolaire ne possédant pas de signal d'adressage mais capable d'atteindre la vacuole indépendamment de la voie de sécrétion utilisée par la levure (Yoshihisa & Anraku, 1990). De plus, il a été montré plus récemment que cette enzyme est adressée du cytosol à la vacuole via un mécanisme appelé la voie Cvt ou « Cytoplasm to

vacuol targeting » (Hutchins & Klionsky, 2001). D'ailleurs, il n'est toujours pas connu si les OS doivent être adressés à la vacuole ou peuvent subir leur catabolisme dans le cytosol par l'action de l'Ams1p.

B.2- Les OS chez les plantes

Chez les plantes, il a été longtemps proposé que les *N*-glycannes non-conjugués ou «unconjugated *N*-glycans» (UNGs) (Priem *et al.*, 1994) interviennent dans les processus de développement, de différenciation et de sénescence (Yunovitz *et al.*, 1994 ; Priem *et al.*, 1990). Les UNGs sont classés, selon leur structure, en deux catégories (**Figure 11**) se localisant majoritairement dans le cytosol (Kimura *et al.*, 2002) :

-Des oligomannosides de type Gn1 comprenant uniquement de résidus de Man et un seul résidu de GlcNAc.

- Des glycannes de type complexe contenant des résidus de Xyl, Gal, Ara, et un résidu de $\alpha(1,3)$ Fuc attaché au résidu GlcNAc distal.

La déglycosylation est catalysée par l'action de deux enzymes connues chez les plantes: une PNGase (Lhernould *et al.*, 1992 ; Chang, 2000) et une ENGase cytoplasmique (Kimura *et al.*, 1998). La PNGase, impliquée dans le processus ERAD chez les plantes, est responsable de la libération des glycannes de type complexe, tandis que l'ENGase est impliquée dans la génération d'oligomannoses de type Gn1 qui peuvent provenir des glycoprotéines et/ou des Dol-PP-OS comme dans le cas des OS chez les mammifères.

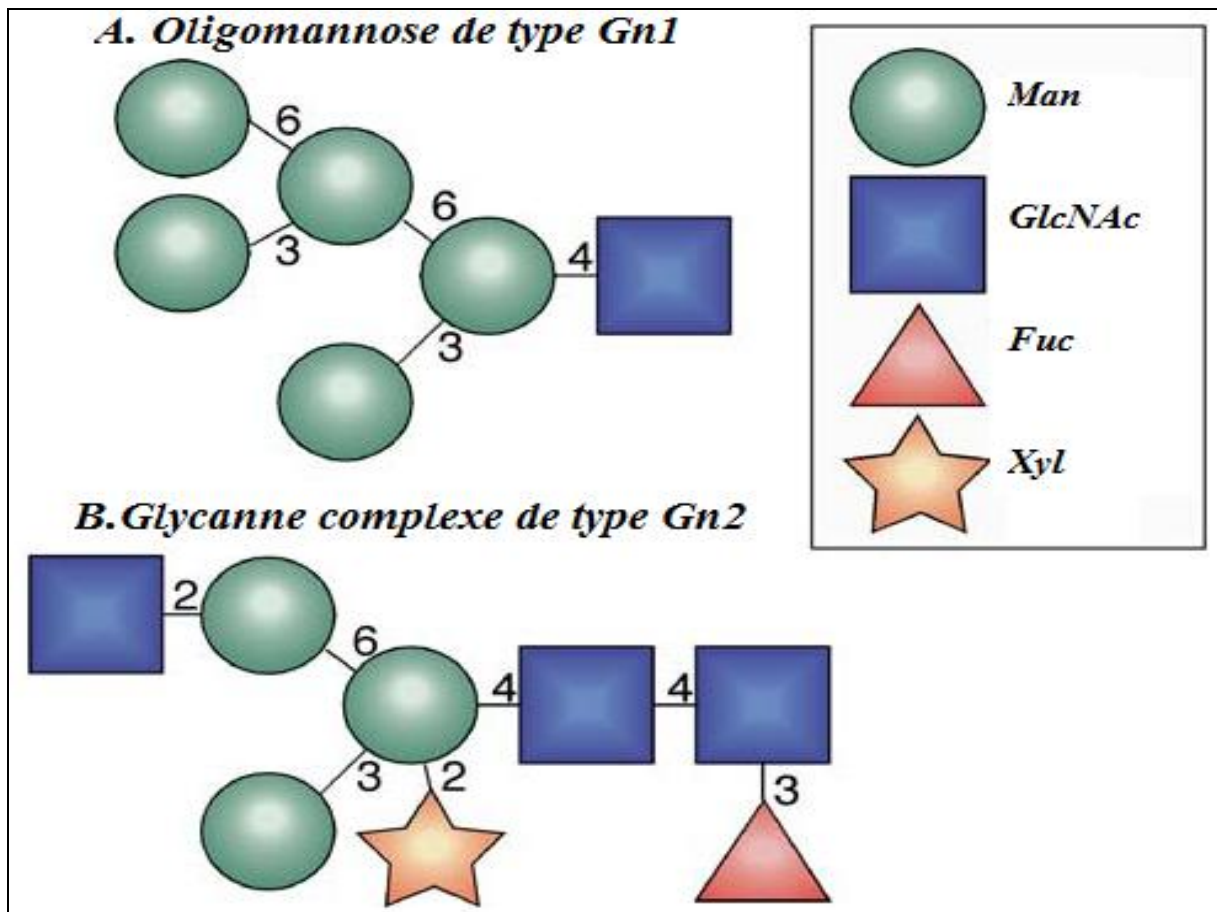


Figure 11: Exemples de structures d'oligosaccharides solubles retrouvées chez les plantes.

Le type Gn1 (A), et provenant de glycannes de type complexe Gn2 (B). Ces OS ont été retrouvés chez la tomate et le compagnon blanc (Priem *et al.*, 1994).

Exposé des travaux réalisés

A. Objectif du travail de thèse

Depuis sa découverte par Gerald W. Hart en 1984 comme étant une glycosylation très originale à l'époque, la liste des protéines modifiées par la *O*-GlcNAc ne cesse de s'allonger. Il semblait donc que la *O*-GlcNAc avait un caractère crucial dans la régulation de nombreux processus biologiques. Diverses fonctions ont été par la suite attribuées à la *O*-GlcNAc dans des études visant à augmenter le niveau de *O*-GlcNAc dans la cellule en utilisant des inhibiteurs de l'*O*-GlcNAcase ou OGA. L'étude du mécanisme et de la structure de l'OGA et de ses homologues bactériens ont offert une source importante d'information dans le but de synthétiser des inhibiteurs efficaces et sélectifs. Parmi les inhibiteurs couramment utilisés de l'OGA, le PUGNAc, a été utilisé dans de nombreuses études de façon à étudier l'effet de l'augmentation du niveau de *O*-GlcNAc cellulaire dans une variété de lignées cellulaires et plus particulièrement pour induire un effet de résistance à l'insuline.

Des études sur la génération, le métabolisme, le trafic ainsi que le sort des oligosaccharides solubles (OS), sous différentes conditions, ont contribué à une meilleure compréhension des voies de glycosylation et de leur topologie dans les cellules de mammifères.

Comme nous l'avons mentionné, la modification *O*-GlcNAc touche une grande variété de glycoprotéines cytosoliques. Dans le cytosol, de grandes quantités d'OS notamment sont générées via la voie ERAD.

D'autre part, le protéasome étant impliqué, en coordination avec le processus ERAD, dans la dégradation des glycoprotéines nouvellement synthétisées et malconformées dans le cytosol, est de même modulé par la modification *O*-GlcNAc.

Dans notre travail, nous avons voulu examiner un éventuel rôle de la *O*-GlcNAc dans le processus de dégradation des *N*-glycoprotéines impliquant la libération de quantités d'OS dans plusieurs compartiments intracellulaires tels que le cytosol et les lysosomes.

Pour cela, nous avons choisi comme stratégie l'inhibition de l'enzyme OGA par le PUGNAc afin d'étudier l'effet d'une augmentation du niveau de *O*-GlcNAc sur l'ensemble des OS dans la cellule par MALDI-TOF-MS.

B. Matériel et Méthodes

B.1- Culture cellulaire

Les cellules CHO (Pro⁻⁵) sont cultivées dans le milieu α -MEM (GIBCO) ou « alpha-minimal essential medium » supplémenté par 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF) (v/v), 2,5 mM de L-glutamine à 37°C sous une atmosphère humide enrichie à 5 % de CO₂. Dans le cas de traitements, le PUGNAc (Sigma Aldrich, St. Quentin Fallavier) et le Nbut-GT (généreusement fourni par le Dr David Vocadlo) sont ajoutés à une concentration finale de 100 μ M.

B.2- Préparation des OS totaux à partir des cellules CHO

Les cellules CHO contrôles et traitées sont lavées 2 fois au PBS (Phosphate-Buffered Saline) avant d'être grattées à 4°C dans le tampon KMH (110 mM potassium acetate, 2 mM magnesium acetate, 20 mM HEPES, pH 7,2) contenant un mélange d'inhibiteurs de protéases (cOmplete; Roche Diagnostics). Les cellules sont ensuite centrifugées à 4°C à 3200 rpm. Le culot cellulaire est soumis à une extraction de Folch. L'extraction de Folch est réalisée selon une variante du protocole mis au point par Cacan & Verbert (1995). Pour cela, le culot cellulaire est repris par une solution dont les rapports volumiques sont les suivants : CHCl₃/méthanol/H₂O, 3/2/1, v/v/v). Après 5 min de centrifugation à 14 000 rpm (Fisher, Bioblock Scientific), la phase aqueuse supérieure et la crêpe protéique sont récupérées et lyophilisées. La phase supérieure contient les oligosaccharides solubles totaux et la crêpe protéique, les N-glycoprotéines (voir **Figure 12**).

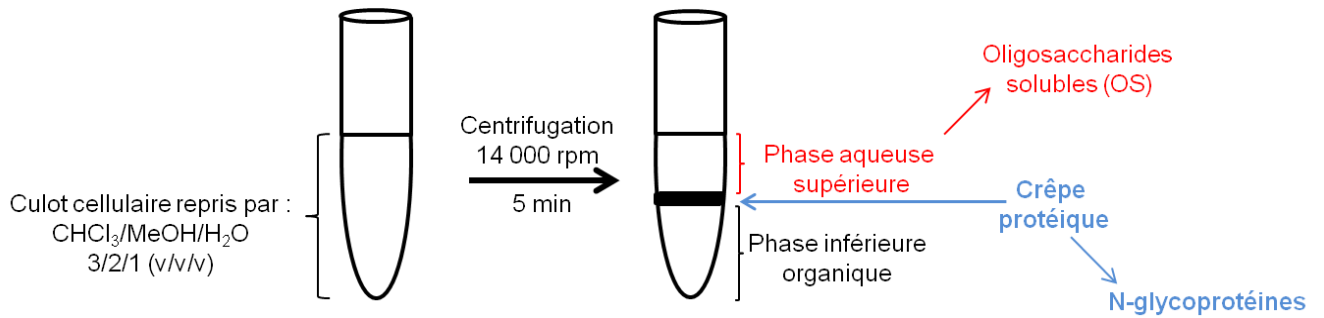


Figure 12 : Extraction séquentielle de Folch permettant de séparer les oligosaccharides solubles des N-glycoprotéines.

(d'après et modifiée Cacan & Verbert (1995))

B.3- Séparation des OS cytosoliques et membranaires

Les cellules sont lavées 2 fois au PBS et grattées avec du tampon KMH contenant un mélange d'inhibiteurs de protéases à 4°C. Après sonication, les cellules sont ultracentrifugées pendant 5 min à 20 psi (Beckman AIRFUGE). Après ultracentrifugation, le surnageant, correspondant à la fraction cytosolique et le culot, représentant la fraction membranaire, subissent une extraction de Folch.

B.4- Traitement des N-glycoprotéines à la PNG^{ase} F

Après l'extraction de Folch, la crêpe protéique lyophilisée contenant les N-glycoprotéines est reprise par 200 µl de tampon bicarbonate d'ammonium 50 mM, pH 7,5 contenant 0,25% SDS (v/v) et 0,25% de β-mercaptoéthanol (v/v). Les glycoprotéines sont ensuite dénaturées à 100°C pendant 20 minutes. Après addition de 200 µl de tampon bicarbonate d'ammonium 50 mM, 20 µl de 10% de Nonidet P40 (v/v) et 3 unités de PNG^{ase} F (Sigma Aldrich) sont ajoutés à l'échantillon qui est ensuite incubé à 37°C pendant 18 heures. L'échantillon est ensuite lyophilisé et repris par 1 ml d'ATFA à 0,1% (v/v). Les N-glycannes sont ensuite purifiés sur une colonne de graphite (Alltech, Deerfield, IL, USA). La colonne est équilibrée par 5 ml de méthanol, puis 10 ml d'ATFA 0,1% (v/v). Après avoir déposé l'échantillon sur la colonne, 3 lavages (3 x 5 ml) sont effectués avec l'ATFA à 0,1%. Les oligosaccharides sont finalement

élués par 5 ml d'une solution d'ATFA à 0,1% contenant 25% d'acétonitrile. L'éluat est évaporé sous azote puis lyophilisé et perméthylé en vue d'une analyse MALDI-TOF-MS.

B.5-Traitement des oligosaccharides par l'endoglycosidase F2 et la β -N-Acétyleglucosaminidase

Les échantillons lyophilisés contenant les OS (OS totaux, OS cytosoliques et OS membranaires) des cellules CHO traitées par le PUGNAc sont divisés en 3 aliquots avant la perméthylation. Deux aliquots sont séparément traités à 37°C par 0,3 U d'endoglycosidase F2 (Sigma Aldrich) et par 50 U/ml de β -N-Acétyleglucosaminidase (from *Canavalia ensiformis*, Sigma Aldrich) pendant 48 heures. Après traitements enzymatiques, les échantillons sont lyophilisés en vue d'être perméthylés.

B.6- Perméthylation des oligosaccharides

La perméthylation des oligosaccharides (Ciucanu & Kerek, 1984) des différents échantillons lyophilisés est réalisée pendant 40 minutes en présence de 200 μ l de diméthylsulfoxyde (DMSO), une pointe de spatule de soude et 300 μ l d'iodure de méthyle (ICH_3) dans une atmosphère saturée en argon. La réaction est arrêtée par l'ajout de 1ml d'acide acétique à 5% (v/v). L'extraction du matériel perméthylé est réalisée par 3 x 500 μ l de CHCl_3 . La phase chloroformique est lavée 8 fois avec de l'eau désionisée puis évaporée sous flux d'azote. Les oligosaccharides sont repris par 200 μ l de méthanol. Ensuite, une étape de purification est réalisée sur colonne C18 (Sep-Pak, Waters). Après avoir déposé les oligosaccharides, 3 lavages (3 x 5 ml) avec de l'eau désionisée sont réalisés, puis 2 lavages (2 x 2 ml) avec de l'acétonitrile à 10%. Les oligosaccharides sont ensuite élués par 3 ml d'acétonitrile à 80%. Après lyophilisation, les oligosaccharides perméthylés sont repris dans un mélange méthanol/ H_2O (1/1, v/v) et sont mélangés à une matrice d'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB) (10 mg/ml) en vue d'une analyse MALDI-TOF. L'analyse structurale a été menée sur le Voyager Elite DE-STR Pro Instrument (PerSeptive Biosystem, Framingham, MA). Les spectres sont obtenus par 300 tirs laser en mode réflectron positif sur une gamme m/z (masse/charge) allant de 500 à 3000.

B.7-Quantification relative des OS

Les OS totaux obtenus à partir des cellules contrôles et traitées par le PUGNAc, sont dilués selon le dosage de protéines effectué au cours de la préparation des OS pour obtenir une concentration à 6 mg/ml. Les échantillons sont alors repris dans 30 µl d'un mélange méthanol/eau (1/1, v/v). Avant le dépôt sur la cible pour l'analyse MALDI-TOF, 2 µl d'échantillon sont mélangés à 2 µl de disaccharide deuthérométhylé (standard interne m=542) et à 4 µl de matrice DHB. Chaque échantillon est déposé en triple exemplaire sur la cible. Les spectres sont obtenus par 600 tirs laser en mode réflectron positif sur une gamme m/z allant de 400 à 3000.

B.8-Electrophorèse et western-blotting

Les cellules Pro-5 sont lysées dans un tampon NET (50 mM Tris/HCl, pH 7,2 ; 1% Triton X100 ; 0,1% SDS ; 5 mM EDTA; 150 mM NaCl) puis centrifugés à 14000 rpm pendant 10 minutes. 20 µg de protéines sont déposés pour migration sur gel d'acrylamide (10%) à ampérage constant (25 mA pour le gel de séparation et 35 mA pour le gel de concentration). Après l'électrophorèse, un électrotransfert est réalisé sur une membrane de nitrocellulose à 100 V pendant 2 heures. Les membranes sont lavées avec du TBS (Tris-Buffered-Saline)-Tween (20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0,05% Tween20 (v/v), pH 8,0) puis saturées avec du lait à 5% dans du TBS-Tween sous agitation. Les anticorps primaires anti-*O*-GlcNAc (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology) et anti- α -tubuline (Santa Cruz Biotechnology) sont incubés sur la nuit à 4°C dans la solution de saturation. Puis les membranes sont lavées avec du TBS-Tween et sont incubées avec l'anticorps secondaire anti-Ig de souris (1:10000) couplé à la peroxydase de Raifort (Amersham) pendant 1 heure. La révélation est effectuée par chimioluminescence avec l'ECL (Amersham ECLTM Advance Western Blotting Detection Kit).

C. Résultats

C.1- Le PUGNAc conduit à une augmentation du niveau de la O-GlcNAcylation des protéines dans les cellules CHO

Afin de confirmer l'efficacité de l'inhibition de l'OGA par le PUGNAc dans les cellules CHO, le niveau des protéines O-GlcNAcylées a été évalué par Western blot (**Figure 13**). Comme le montre le Western blot ci-dessous, le niveau des protéines O-GlcNAcylées augmente suite au traitement des cellules CHO par le PUGNAc.

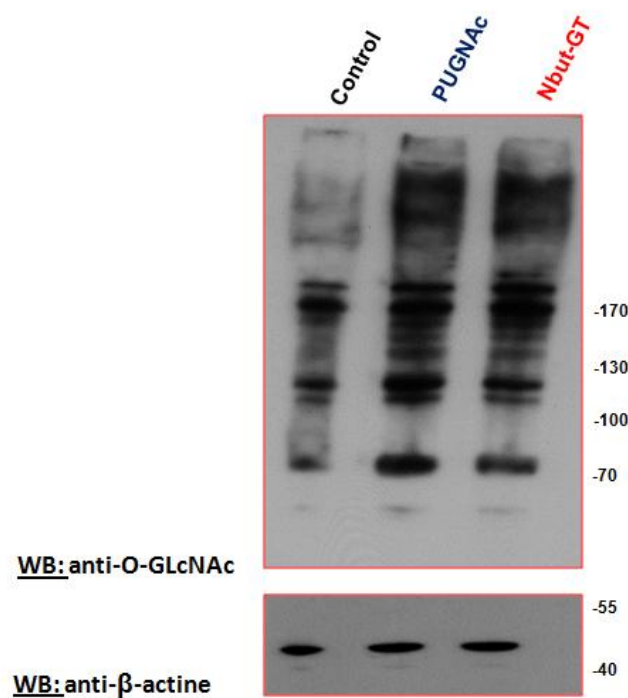


Figure 13 : Western-blot traduisant le niveau de protéines O-GlcNAcylées après traitement des cellules CHO au PUGNAc (100 μ M) et au Nbut-GT (100 μ M).

C.2- Apparition d'une population anormale d'OS après traitement des cellules par le PUGNAc.

Afin de déterminer l'impact des protéines O-GlcNAcylées sur le processus de dégradation des *N*-glycoprotéines, les oligosaccharides solubles totaux des cellules CHO ont été analysés par spectrométrie de masse (**Figure 14**). Le spectre de masse MALDI-MS des oligosaccharides solubles totaux des cellules CHO (**Figure 14.A**) contrôles et traitées par 100µM de PUGNAc montre la présence de structures oligosaccharidiques avec un seul résidu HexNAc correspondant aux m/z 518 (Hex1HexNAc1), m/z 722 (Hex2HexNAc1), m/z 926 (Hex3HexNAc1), m/z 1130 (Hex4HexNAc1), m/z 1334 (Hex5HexNAc1), m/z 1538 (Hex6HexNAc1). Ce spectre est dominé par un signal intense à m/z 518. Comparé à un spectre de masse MALDI-MS des cellules CHO contrôles, le spectre des OS totaux après traitement par le PUGNAc (**Figure 14.B**) est caractérisé par l'apparition significative d'ions à m/z 967, 1171, 1416, 1662, 1907 correspondant respectivement aux structures Hex2HexNAc2, Hex3HexNAc2, Hex3HexNAc3, Hex3HexNAc4, et Hex3HexNAc5.

Afin de tester la spécificité d'inhibition du PUGNAc vis-à-vis de l'OGA, un autre inhibiteur, le Nbut-GT, fût utilisé. L'interprétation du spectre MALDI-MS des OS totaux après traitement des cellules par le Nbut-GT (100µM) (**Figure 15.A**) montre que ce dernier, contrairement au PUGNAc, n'induit aucun changement. De plus, le traitement simultané par le PUGNAc et le N-ButGT des cellules CHO (**Figure 15.B**), ne permet pas d'induire des effets additionnels par rapport aux cellules traitées uniquement par le PUGNAc.

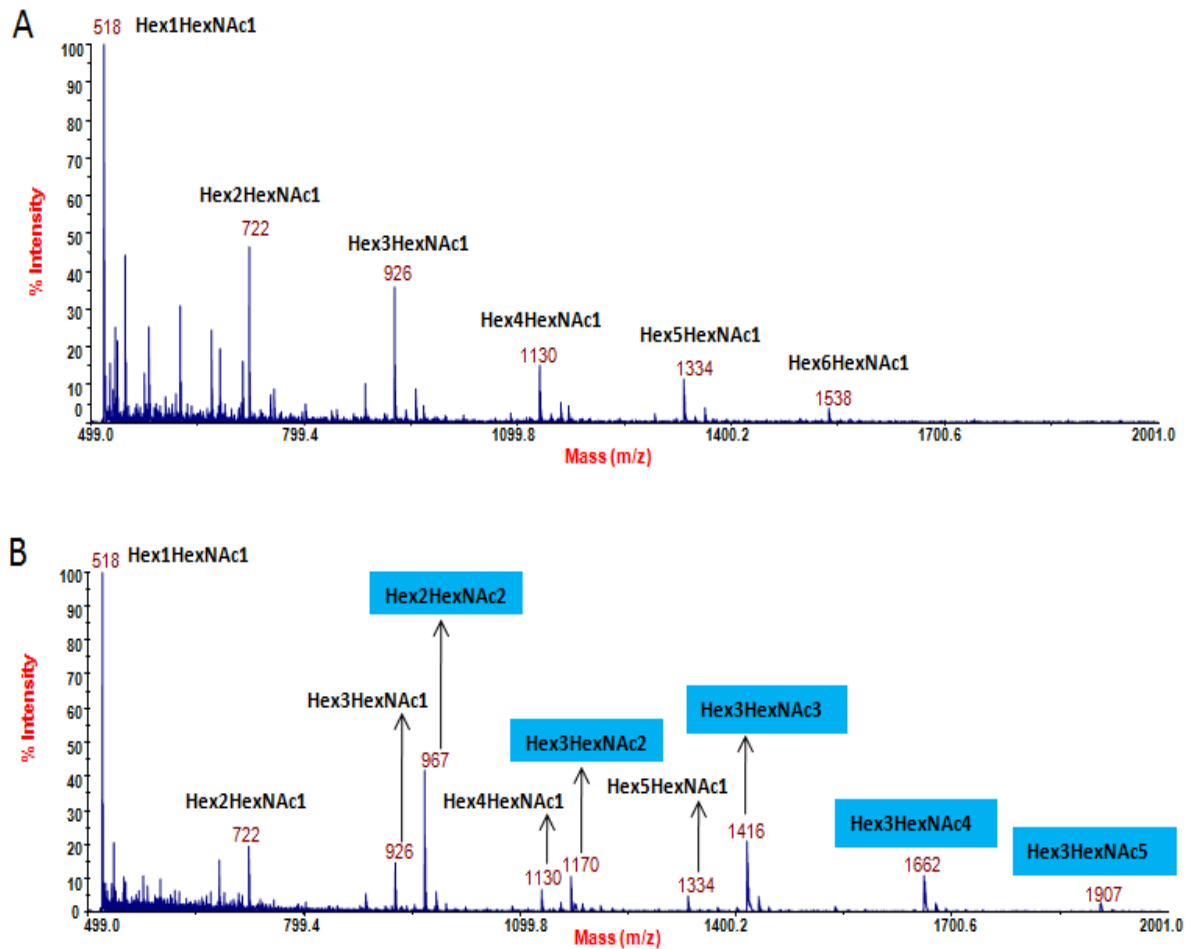


Figure 14: Analyse MALDI-MS des OS totaux des cellules CHO contrôles (**A**), et traitées par le PUGNAc (100µM) pendant 16h (**B**). La perméthylation a été réalisée sur des aliquots d'OS lyophilisés, suivie d'une purification des dérivés méthylés sur cartouche Sep-Pak C18. L'analyse des OS perméthylés, détectés sous la forme d'ions pseudomoléculaires monochargés $[M+Na]^+$, a été réalisée en mode réflectron positif.

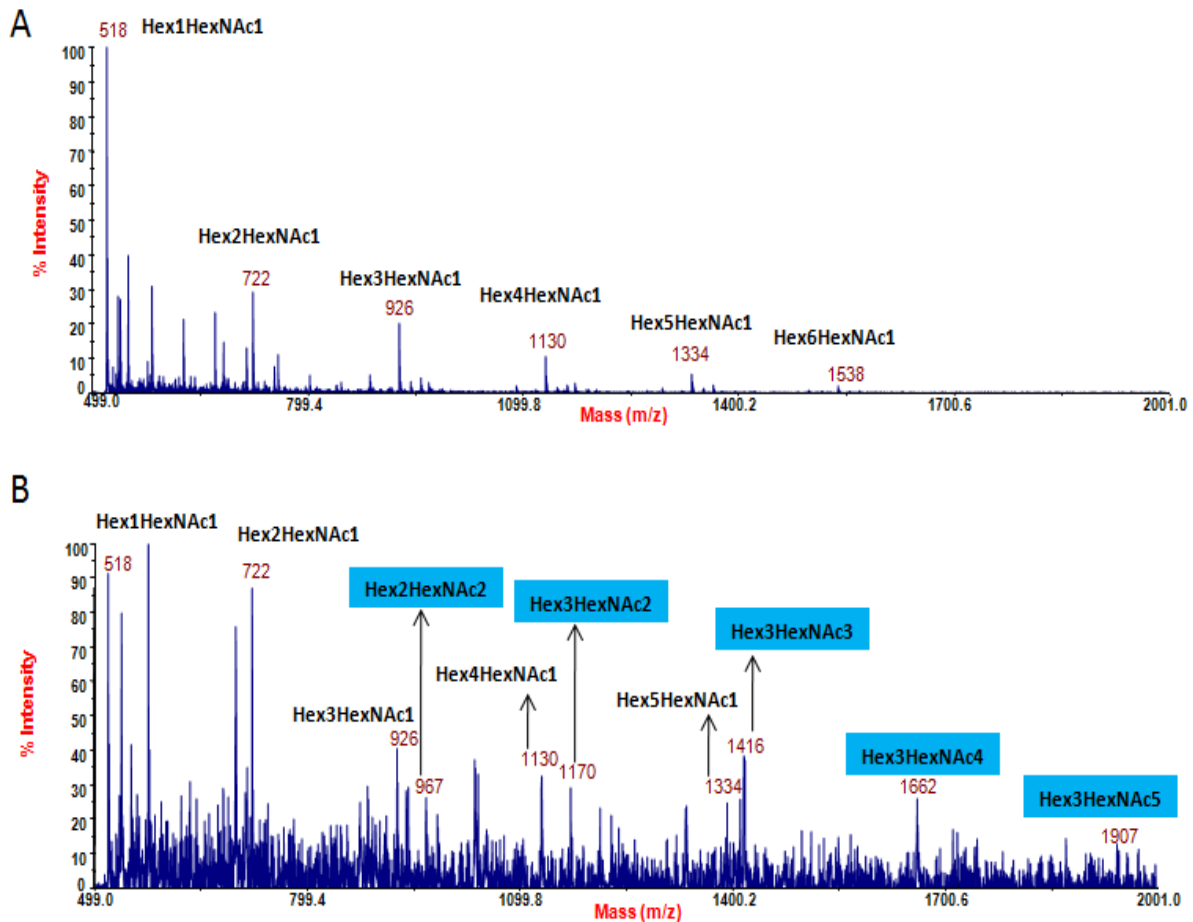


Figure 15: Spectre de masse MALDI-TOF-MS des OS totaux des cellules CHO traitées par le NBut-GT (100µM) (A), et par, à la fois, le PUGNAc (100µM) et le NBut-GT (100µM) (B).

C.3- Effet du temps d'incubation en présence de PUGNAc sur la nature des OS

Les cellules CHO sont traitées séparément par le PUGNAc (100µM) pour une durée de 16 h et pour une durée de 24 h. La comparaison des spectres de masse MALDI-TOF-MS des OS totaux perméthylés dans le cas d'un traitement de 16h (**Figure 16.A**) et de 24h (**Figure 16.B**) montre que les ions pseudomoléculaires aux m/z 967(Hex2HexNAc2), 1171(Hex3HexNAc2), 1416(Hex3HexNAc3), 1662(Hex3HexNAc4), 1907(Hex3HexNAc5) semblent s'accumuler avec des quantités relatives plus importantes après un traitement de 24h par le PUGNAc.

Contrairement au PUGNAc, un traitement de durée plus longue (24h) par l'inhibiteur Nbut-GT (**Figure 16.C**) n'aboutit à aucun changement comparé avec celui obtenu après un traitement de 16h.

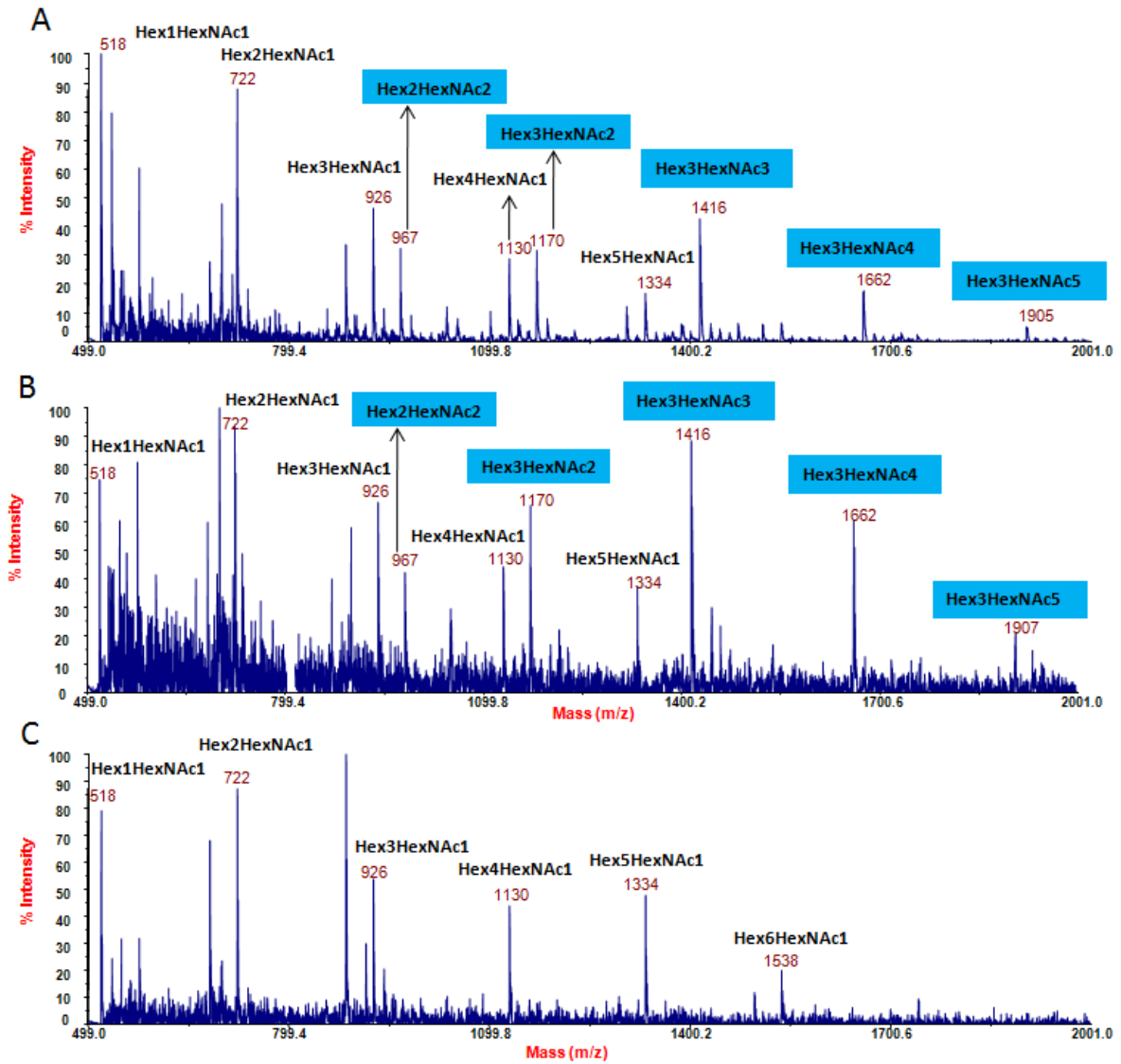


Figure 16 : Analyses MALDI-TOF-MS des OS totaux :

Les cellules CHO ont été traitées par le PUGNAc (100 μ M) durant 16h (A), pour une durée de 24h (B), et par l'inhibiteur Nbut-GT (100 μ M) durant 24h (C).

C.4- Le PUGNAc conduit à l'accumulation d'OS membranaires possédant un seul résidu de GlcNAc en position réductrice

Afin d'évaluer la distribution subcellulaire de la population rencontrée en présence de PUGNAc, les OS membranaires et les OS cytosoliques ont été séparés par ultracentrifugation. Les spectres de masse MALDI-MS des OS membranaires et cytosoliques sont présentés dans la figure 17. La comparaison entre les spectres correspondant à la fraction contenant les OS cytosoliques des cellules contrôles (**Figure 17.A**) et celle des OS cytosoliques des cellules traitées par le PUGNAc (**Figure 17.C**) montre des profils très similaires. La population des OS avec un seul résidu HexNAc est observée dans les spectres correspondant aux fractions cytosoliques et membranaires, à la fois, des cellules contrôles et des cellules traitées par le PUGNAc. Cependant, la population des OS comportant un à cinq résidus HexNAc est uniquement observée dans les OS de la fraction membranaire des cellules CHO traitées par le PUGNAc (**Figure 17.D**). Ceci démontre clairement que le PUGNAc n'a aucun effet sur les OS cytosoliques mais perturbe fortement les OS membranaires.

Nous avons ensuite cherché à caractériser structurellement cette population d'OS membranaires. Pour cela, la population d'OS obtenue après traitement au PUGNAc a été caractérisée par l'utilisation d'une exoglycosidase, la β -hexosaminidase, et une endoglycosidase, l'endo-F2 (**Figure 18**). Cette dernière catalyse l'hydrolyse de la liaison entre les deux GlcNAc de la séquence réductrice libérant des structures oligosaccharidiques comportant un seul résidu GlcNAc à partir de *N*-glycoprotéines, d'oligosaccharides solubles de type oligomannosidique ou des structures *N*-glycanniques biantennées de type complexe. Après traitement par la β -hexosaminidase des OS des cellules CHO traitées préalablement par le PUGNAc, le spectre de masse MALDI-MS correspondant montre une augmentation significative de l'intensité du signal de l'ion pseudomoléculaire à m/z 926 (Hex3HexNAc1). Cette augmentation du signal de l'ion à m/z 926 s'accompagne par la disparition complète des ions à m/z 967(Hex2HexNAc2), 1171(Hex3HexNAc2), 1416(Hex3HexNAc3), 1662(Hex3HexNAc4), et 1907(Hex3HexNAc5). Ceci montre clairement que l'utilisation de la β -hexosaminidase qui permet l'hydrolyse des résidus GlcNAc de la séquence non-réductrice convertit les structures Hex3HexNAc2, Hex3HexNAc3, Hex3HexNAc4, et Hex3HexNAc5 en Hex3HexNAc1. Ces observations indiquent donc que les OS observés après traitement par le PUGNAc comportent un seul résidu GlcNAc au niveau de leur extrémité réductrice.

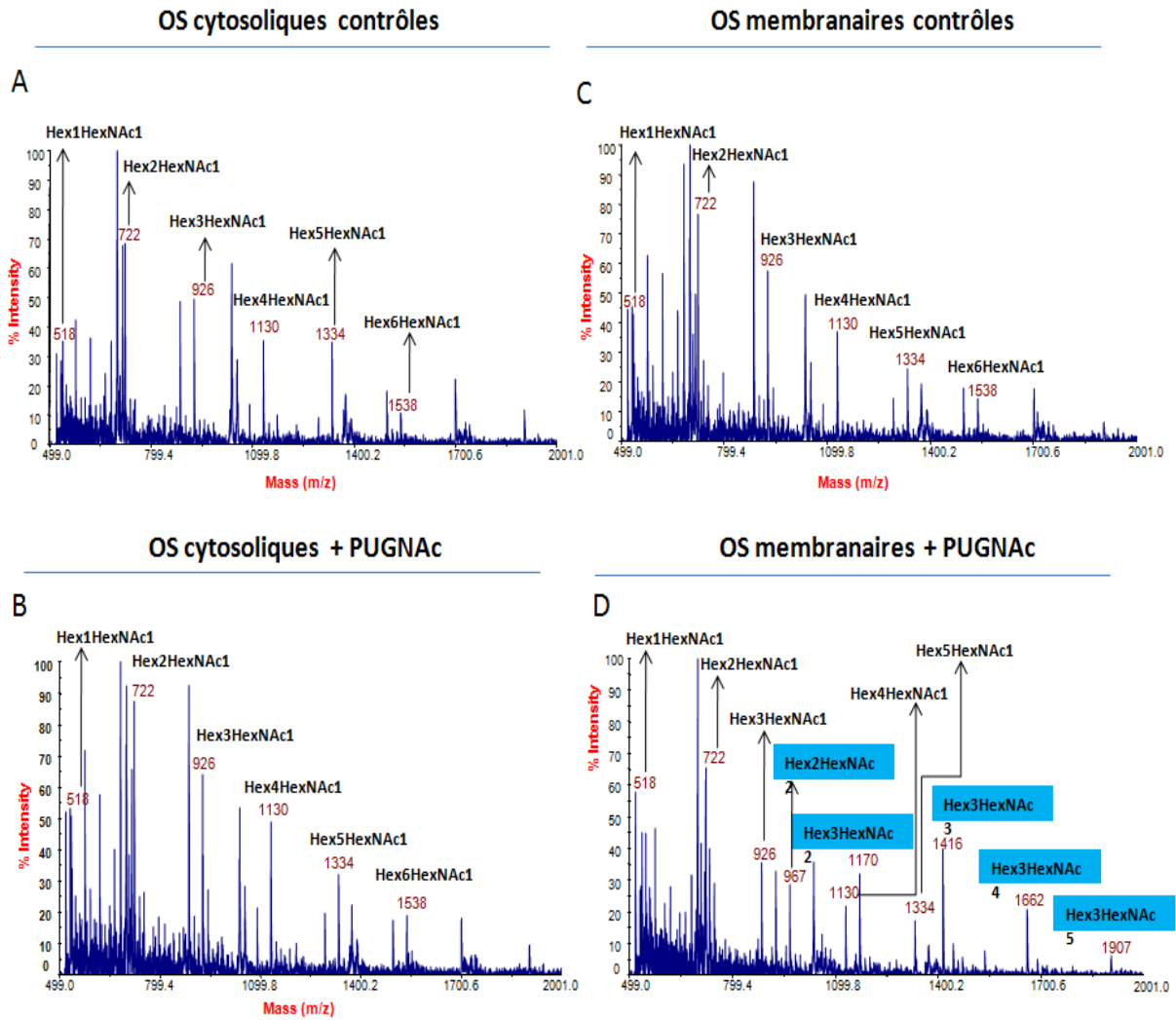


Figure 17: Analyses MALDI-MS des OS cytosoliques des cellules CHO contrôles (A) et traitées par 100 μ M de PUGNAc (B), et des OS membranaires des cellules CHO contrôles (C) et traitées par 100 μ M de PUGNAc (D).

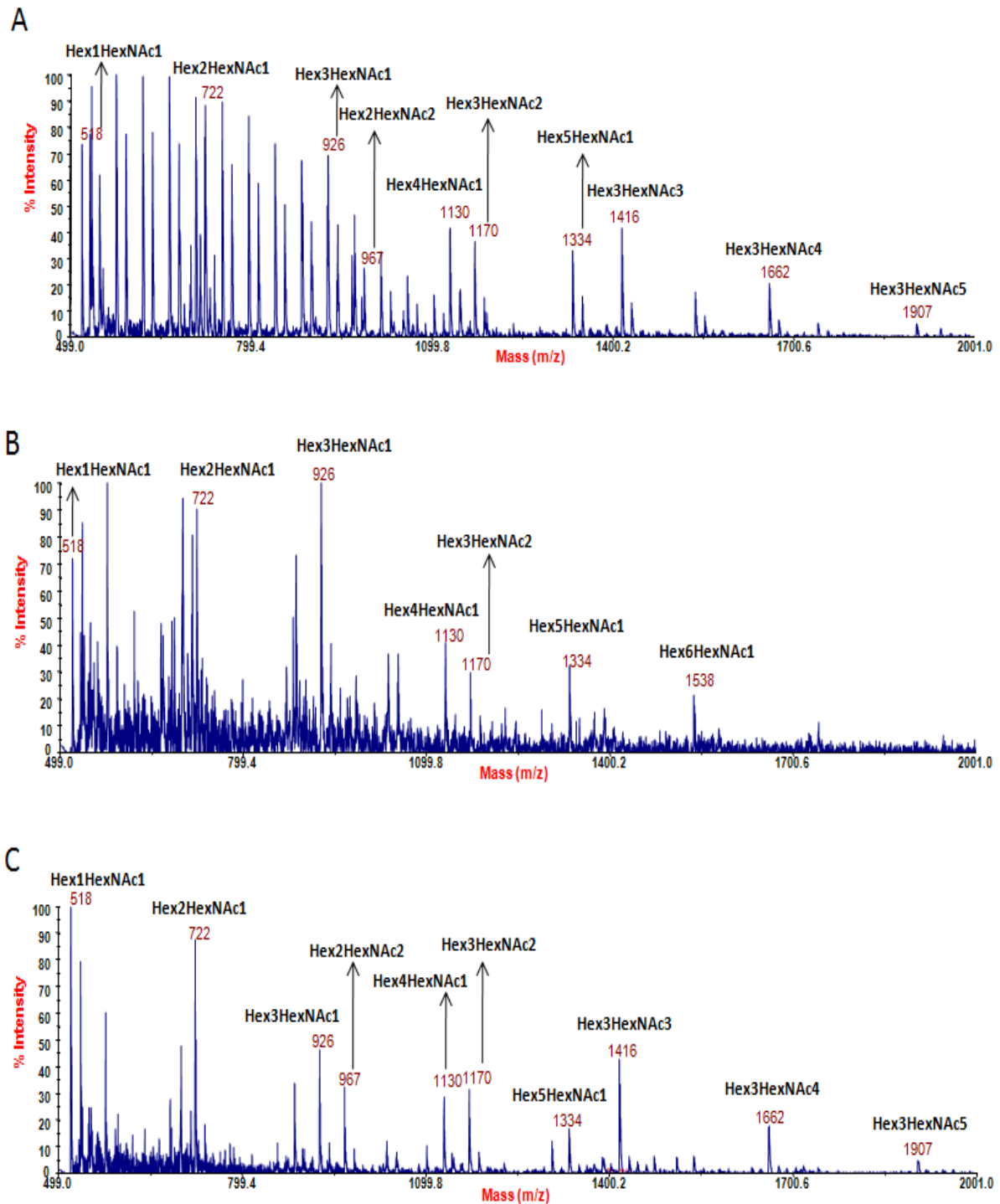


Figure 18: Spectres de masse MALDI-MS des OS provenant des CHO traitées par le PUGNAc (A), après traitement par une β -N-acétyl-hexosaminidase (B) ou par l'enzyme Endo-F2 (C).

C.5- Structures des N-glycannes après traitement au PUGNAc

Les structures anormales des OS détectées lorsque les cellules sont traitées par du PUGNAc ressemblent étrangement aux structures rencontrées au niveau des glycoprotéines golgiennes. Afin de vérifier l'impact du PUGNAc sur la structure glycanique des glycoprotéines, une analyse par MALDI-TOF des chaînes glycaniques portées par les *N*-glycoprotéines totales a été réalisée dans les cellules CHO en absence ou en présence du PUGNAc. Les données obtenues des analyses de MALDI-TOF-MS des *N*-glycannes perméthylés des cellules CHO contrôles et traitées par 100 μ M de PUGNAc sont montrées respectivement dans les figures 19.A et 19.B. Les structures rencontrées consistent en des structures de type oligomannosidique correspondant aux ions pseudomoléculaires aux m/z 1580, 1784, 2193, et 2397, ainsi que des structures bi-, tri-, et tétra-antennées de type complexe avec des compositions de type $\text{Fuc}_{0-1}\text{Hex}_{5-9}\text{HexNAc}_{2-6}$ observées aux m/z 2071, 2245, 2520, 2694, et 3144. Des structures glycaniques identiques ont été retrouvées dans les deux spectres des cellules contrôles et traitées par le PUGNAc. Aucune différence significative au niveau de la quantité relative de chaque structure glycanique n'a été observée après traitement des cellules au PUGNAc montrant que cette drogue n'affecte pas la structure des chaînes glycaniques des *N*-glycoprotéines.

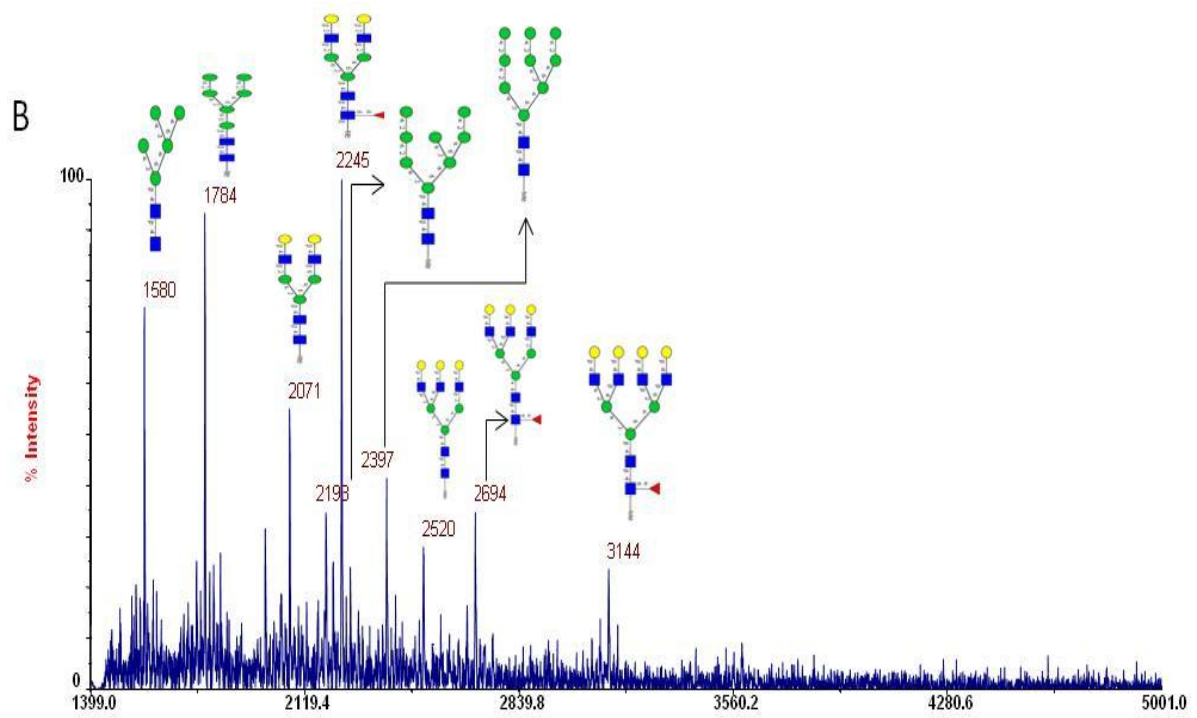
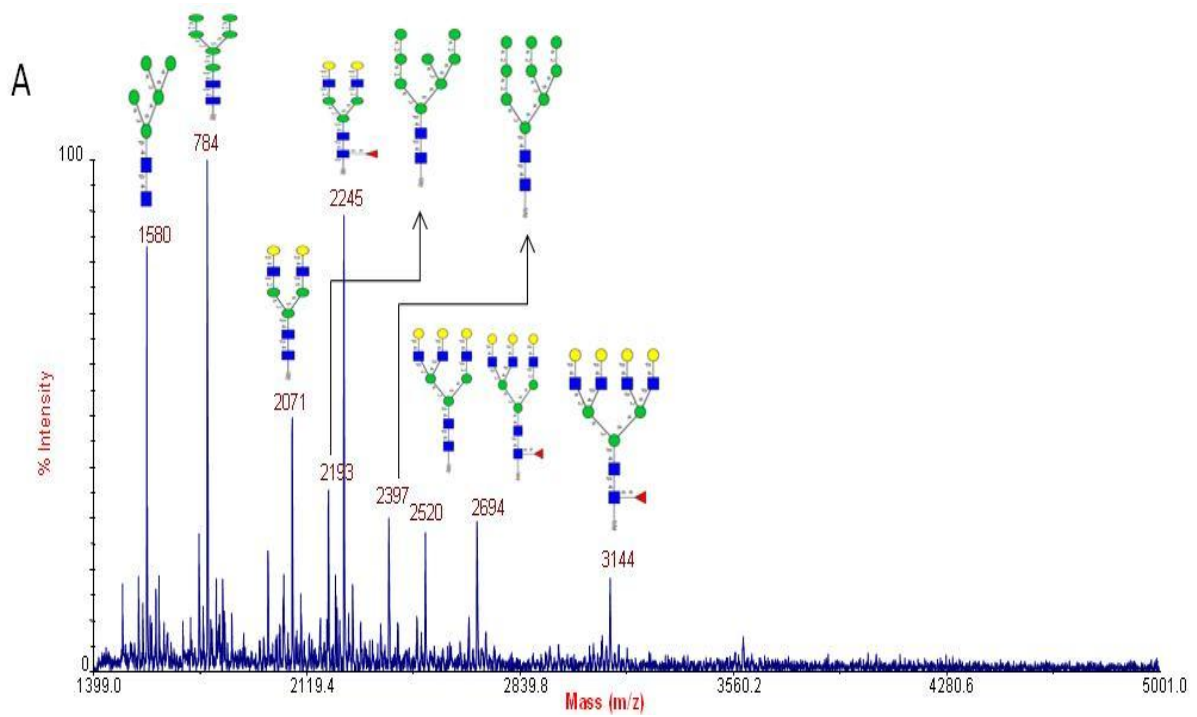


Figure 19: Spectres MALDI-MS des *N*-glycannes des cellules contrôles (A) et traitées par le

PUGNAc (B). ● Man ■ GlcNAc ● Gal ► Fuc

C.6- Quantification relative des OS cellulaires après traitement par le PUGNAc

Afin de confirmer et de déterminer le taux d'accumulation induit par l'effet du PUGNAc dans la cellule, nous avons réalisé une quantification relative des OS totaux en absence de PUGNAc et après un traitement d'une durée de 16h et de 24h (**Figure 20**). La quantification a été réalisée en ajoutant une quantité connue d'un standard interne (disaccharide de m/z 542) dans chacun des échantillons contenant les OS totaux. Après analyse MALDI-TOF, nous avons traduit l'accumulation relative de chaque oligosaccharide en déterminant le rapport massique et en tenant compte de la quantité de protéines contenue dans chaque échantillon. Après un traitement de 16h par le PUGNAc, nous avons observé une nette accumulation des OS de type M2Gn2, M3Gn2, M3Gn3, M3Gn4 et M3Gn5 et comme attendu, aucune accumulation des ces OS n'a été détectée dans les cellules contrôles. Les OS de type M₁₋₅Gn₁ sont présents avec des proportions qui varient entre 0,3 et 2,3 et dont l'ion majoritaire est le M1Gn1. Cette population est présente également dans le cas des cellules traitées par le PUGNAc (24h) et dans laquelle les OS de type M2Gn2, M3Gn2, M3Gn3, M3Gn4 et M3Gn5 semblent avoir une accumulation importante dans des proportions qui varient entre 0,8 et 4 et dont l'ion majoritaire est le M3Gn3. Un traitement pour une durée de 24h par le PUGNAc cause donc une accumulation plus importante des OS de type M2Gn2, M3Gn2, M3Gn3, M3Gn4 et M3Gn5 variant dans des proportions respectivement de 1,5, 2,9, 4,5, 2, et 1,6 fois supérieure par rapport à celle des cellules traitées par le PUGNAc pour un durée de 16h.

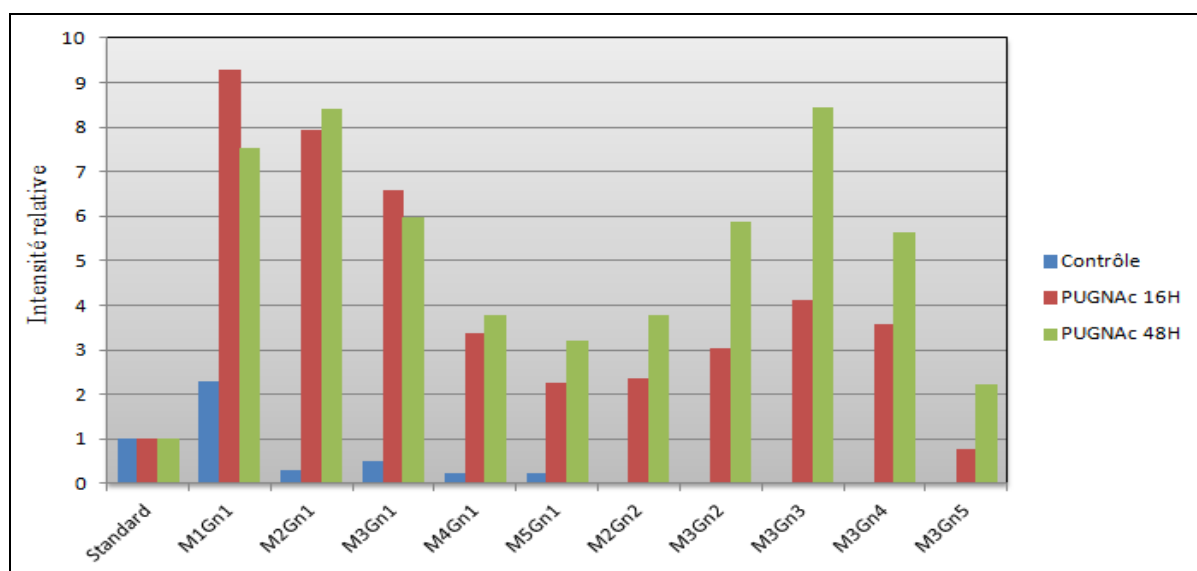


Figure 20 : Quantification relative des OS totaux des cellules CHO contrôles et après un traitement de 16h et 24h par le PUGNAc

D. Discussion

Notre travail de thèse a consisté en l'étude des oligosaccharides solubles après traitement des cellules CHO par le PUGNAc afin d'examiner un rôle possible de la modification *O*-GlcNAc dans le processus de dégradation des *N*-glycoprotéines.

Nous avons commencé à examiner l'effet d'une inhibition de l'OGA sur l'ensemble des oligosaccharides totaux après traitement des cellules CHO par le PUGNAc. L'analyse des OS totaux provenant des cellules traitées par le PUGNAc par MALDI-TOF révèle la présence de structures d'OS anormaux qui diffèrent des OS totaux des cellules contrôles par la présence de plus d'un résidu HexNAc (jusqu'à cinq résidus) dans leurs structures.

Afin de vérifier si l'apparition de ces structures est spécifiquement due à une inhibition de l'OGA par le PUGNAc, nous avons testé en parallèle et comme dans le cas du PUGNAc, l'effet de l'inhibiteur Nbut-GT sur l'ensemble des OS totaux des CHO. Le traitement (16h) avec le N-butGT ne permet pas de reproduire les mêmes effets observés dans le cas d'un traitement avec le PUGNAc et le même profil d'OS totaux a été observé sans ou en présence du Nbut-GT. De plus un co-traitement (Nbut-GT + PUGNAc) ne permet pas de restaurer le profil des OS totaux observés dans le cas des cellules CHO contrôles.

L'élévation du niveau de *O*-GlcNAc engendré par l'utilisation du PUGNAc dans nos cellules et qui a été déjà confirmé par Western blot n'est pas donc à l'origine de l'apparition de ces structures d'OS, ainsi la spécificité de l'inhibiteur Nbut-GT pour l'OGA en comparaison avec le PUGNAc a été confirmé.

Dans un second temps, nous avons voulu déterminer si un traitement de plus longue durée (24h), d'un part avec le Nbut-GT et d'autre part par le PUGNAc, pourrait avoir un effet cumulatif sur les oligosaccharides solubles. Un traitement avec le NBut-GT ne produit pas de changement par rapport aux cellules contrôles, tandis qu'une accumulation plus importante d'OS de structures anormales a été observée. Cette accumulation d'OS a été ensuite confirmée par une approche semi-quantitative des OS totaux dans les cellules CHO en présence et en absence du PUGNAc.

L'observation de la population oligosaccharidique observé après traitement par le PUGNAc dans la fraction des OS membranaires et le fait que les OS cytosoliques restaient intacts suite

au traitement par le PUGNAc nous indique que le processus catabolique des glycoprotéines de la voie « turn-over », à l'origine de l'apparition des OS de structures anormales détectés, est fortement perturbé par le PUGNAc. Cependant, la dégradation cytosolique des glycoprotéines nouvellement synthétisées et mal conformées, via ERAD, n'est pas affectée par le PUGNAc. La perturbation de la voie du turn-over aboutissant à la dégradation des glycoprotéines matures dans les lysosomes a été ensuite confirmée par l'étude de la structure et la détermination du taux d'accumulation des OS qui apparaissent après traitement des cellules CHO par le PUGNAc.

L'analyse des structures de ces OS par MALDI-TOF après digestions enzymatiques montre qu'il s'agit d'OS possédant un seul résidu GlcNAc au niveau de leur extrémité réductrice. Cette observation signifie donc que le traitement des cellules CHO par le PUGNAc n'affecte pas l'activité de l'enzyme N,N'-diacétylchitobiase lysosomale agissant entre les deux GlcNAc de l'extrémité réductrice au cours du processus de dégradation lysosomale des *N*-glycoprotéines afin de libérer des structures oligosaccharidiques possédant un seul résidu GlcNAc lié en β 1,4 au sein de l'extrémité réductrice. D'autre part, l'élucidation de la structure de ces OS montre la présence de plus d'un résidu GlcNAc (**Figure 21**) contrairement à ceux rencontrés dans la voie ERAD qui correspondent à des oligomannoses de type Gn1.

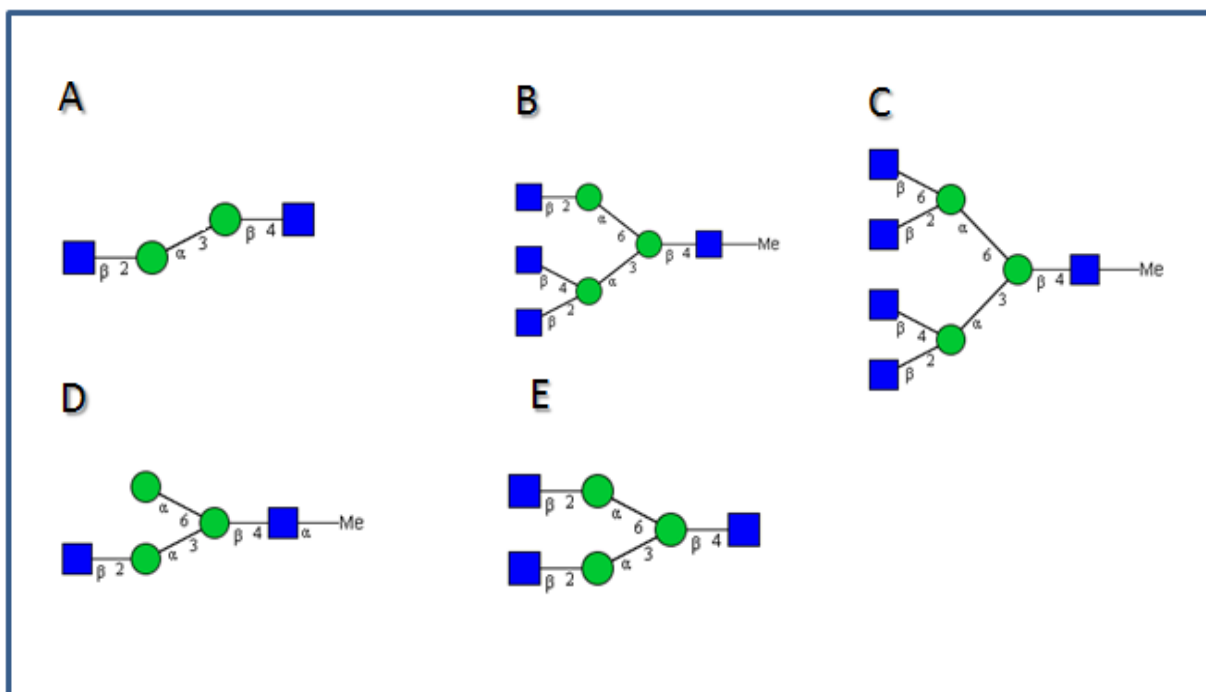


Figure 21 : Schéma représentant les structures d'OS s'accumulant suite au traitement des cellules CHO par le PUGNAc. ● Man ■ GlcNAc

Dans notre étude, l'effet du traitement par le PUGNAc s'est manifesté par l'apparition d'OS ayant des structures de type $\text{Man}_{2-3}\text{GlcNAc}_{2-5}$. Etant donné que le PUGNAc pourrait affecter d'autres familles d'enzymes dans la cellule telles que des glycosyltransférases (Lugemwa & Esko, 1991), une analyse de l'ensemble des *N*-glycoprotéines a été réalisée afin de vérifier si la voie de biosynthèse des *N*-glycoprotéines était perturbée suite au traitement des cellules CHO par le PUGNAc. L'observation des spectres MALDI-TOF des *N*-glycoprotéines en présence ou en absence du PUGNAc montre des profils similaires indiquant que les structures oligosaccharidiques qui s'accumulent ne correspondent pas à des structures glycaniques intermédiaires provenant d'une éventuelle perturbation de la voie de biosynthèse des *N*-glycoprotéines. De plus, l'interprétation des spectres MALDI-TOF-MS des *N*-glycoprotéines en présence ou en absence du PUGNAc montre la présence de structures glycaniques fucosylées de type $\text{Fuc}_1\text{Hex}_{5-8}\text{HexNAc}_{2-6}$ aux m/z 22445, m/z 2694 et m/z 3144 et le résidu de Fuc étant lié en $\alpha(1,6)$ sur le résidu $\beta 1,4$ GlcNAc lié au résidu Asn. L'action de l'enzyme N, N'-diacétylchitobiase lysosomale requiert, comme nous l'avons déjà mentionné, l'hydrolyse des résidus Fuc liés en $\alpha(1,6)$ par l'action de l'enzyme α -L-fucosidase. L'action de l'enzyme N, N'-diacétylchitobiase lysosomale n'étant pas affecté par le PUGNAc, ceci montre également que l' α -L-fucosidase, quand à elle, n'est pas inhibée ou affecté par le PUGNAc.

L'analyse MALDI-TOF des OS nous permet d'avoir une analyse relativement quantitative de ces OS. L'observation des spectres MALDI-TOF-MS des OS totaux des cellules CHO traitées par le PUGNAc montre que les structures possédant plus d'un résidu GlcNAc s'accumulent d'une façon significative. Cette observation a été ensuite confirmée après une quantification relative, en utilisant un standard interne, des OS des cellules contrôles et traitées par le PUGNAc (16h et 24h).

L'ensemble de nos résultats nous ont donc amené à découvrir un autre effet secondaire causé par l'utilisation du PUGNAc. Ce dernier est en effet connu comme un inhibiteur non-spécifique de l'OGA qui peut également inhiber les hexosaminidases lysosomales. Il permet également, par différents mécanismes catalytiques, l'inhibition de glycosidases d'autres familles telles que les β -N-acétylglucosaminidases de la famille GH3 (Stubbs *et al.*, 2007) et les α -N-acétylglucosaminidases de la famille GH89 (Ficko-Blean *et al.*, 2008). De plus, le PUGNAc possède dans sa structure un composé aromatique ou aglycone qui peut se présenter comme un substrat des glycosyltransférases (Lugemwa & Esko, 1991), ce qui peut aboutir à des perturbations au niveau du processus de glycosylation des protéines.

Le PUGNAc a été utilisé dans plus de cinquante études afin de relier l'effet d'une augmentation du niveau de *O*-GlcNAc dans la cellule à un processus biologique tel que la résistance à l'insuline. 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 & Hart, 1999). La 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.

De nombreuses études sur des cellules en culture telles que les 3T3-L1 adipocytes (Arias *et al.*, 2004 ; Park *et al.*, 2005 ; Vosseller *et al.*, 2002) et *in vivo* (Dentin *et al.*, 2008 ; Mc Clain *et al.*, 2002 ; Yang *et al.*, 2008) avait reporté qu'une augmentation du niveau de *O*-GlcNAc dans la cellule après inhibition de l'OGA par le PUGNAc pourrait être la cause principale de la résistance à l'insuline. Cet effet est accompagné d'une perturbation de la voie Akt en inhibant la phosphorylation de cette dernière (Vosseller *et al.*, 2002). L'utilisation du PUGNAc dans ces études est donc à la base du fondement de cette hypothèse qui affirme qu'une augmentation du niveau de *O*-GlcNAc dans la cellule est à l'origine de l'effet de résistance à l'insuline.

Cependant, les travaux réalisés par Vocadlo *et al.* (2008) ont montré que l'utilisation du Nbut-GT, un autre inhibiteur de l'OGA, sur les adipocytes 3T3-3 considérés comme un modèle standard pour l'étude du diabète, ne provoquait pas de résistance à l'insuline. Ce résultat a été confirmé par la suite puisqu'il a été montré que le N-butGT n'entraînait pas d'inhibition de la phosphorylation de la kinase Akt comme dans le cas du PUGNAc (Matthews *et al.*, 2007). Ces résultats suggèrent donc que les effets observés par le PUGNAc n'étaient pas dûs à une inhibition spécifique de l'OGA par le PUGNAc.

Pourtant, le PUGNAc continue à l'heure actuelle à être largement utilisé dans l'étude du rôle de la *O*-GlcNAc dans différents processus cellulaires. Par exemple, des études récentes sur la *O*-GlcNAc ont été réalisées, l'impact de la *O*-GlcNAc dans le cancer du sein (Caldwell *et al.*, 2010) et l'implication de la *O*-GlcNAc dans la glycolyse, la lipogenèse hépatique et le stress oxydatif (Gong *et al.*, 2011 ; Ngoh *et al.*, 2011) ont été reportées.

E. Conclusions et perspectives

L'utilisation du PUGNAc dans les cellules CHO afin d'étudier un éventuel rôle de la modification post-traductionnelle *O*-GlcNAc dans les processus de dégradation des *N*-glycoprotéines nous a permis de découvrir un autre aspect des effets secondaires causés par le PUGNAc. Nous avons démontré que les conséquences d'un traitement par le PUGNAc se manifestaient dans nos cellules par une nette accumulation d'OS provenant de l'inhibition des β -hexosaminidases lysosomales.

L'ensemble de nos résultats sont en accord avec des études précédentes réalisées par l'équipe de Vocadlo (2008) soulignant la nécessité d'une réinterprétation des données obtenues dans divers travaux ayant été réalisés dans le but d'étudier les conséquences d'une augmentation du niveau de *O*-GlcNAc dans les cellules engendrée par le PUGNAc. D'autre part, nos données soulignent l'importance de l'utilisation d'inhibiteurs, à la fois, puissants et spécifiques de l'OGA afin d'éviter les effets secondaires comme ceux observés dans le cas du PUGNAc.

Nos résultats suggèrent donc que l'utilisation du PUGNAc mime, par l'accumulation d'OS lysosomaux, une maladie de surcharges lysosomales. Il convient donc d'être extrêmement prudent sur les effets physiologiques observés lors de l'utilisation d'une telle drogue.

Néanmoins, pour l'étude du métabolisme des OS, l'utilisation du PUGNAc paraît être un bon outil afin de différencier et de quantifier les OS provenant de la voie ERAD de ceux provenant du *turn-over* des glycoprotéines matures.

De nombreuses études ont décrit l'effet d'une perturbation du métabolisme des OS pouvant affecter la durée de vie et la morphologie cellulaire et contribuer à de nouveaux phénotypes chez certains organismes comme *C. elegans* (Suzuki *et al.*, 2000; Kuranda & Robbins, 1987). Nos résultats montrent clairement la perturbation de la voie « *turn-over* » des glycoprotéines matures, suite au traitement des cellules par le PUGNAc.

Le traitement de cellules CHO par le PUGNAc peut constituer un modèle d'étude des perturbations dans le métabolisme des OS. Ce modèle pourrait contribuer par la suite à l'étude du rôle de ces molécules dans l'homéostasie cellulaire d'une part, et à la découverte de nouvelles maladies associées à des défauts de régulation du métabolisme des OS, d'autre part.



Draft Manuscript For Review

PUGNAc treatment leads to an unusual accumulation of free oligosaccharides in CHO cells

Journal:	<i>The Journal of Biochemistry</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Regular Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	MEHDY, ali; CNRS, UMR8576 Laboratoire de Glycobiologie structurale et fonctionnelle MORELLE, willy; CNRS, UMR8576 Laboratoire de Glycobiologie structurale et fonctionnelle PEANNE, romain; CNRS, UMR8576 Laboratoire de Glycobiologie structurale et fonctionnelle ROSNOBLET, claire; CNRS, UMR8576 Laboratoire de Glycobiologie structurale et fonctionnelle LEGRAND, dominique; CNRS, UMR8576 Laboratoire de Glycobiologie structurale et fonctionnelle LEFEBVRE, tony; CNRS, UMR8576 Laboratoire de Glycobiologie structurale et fonctionnelle DUVET, sandrine; CNRS, UMR8576 Laboratoire de Glycobiologie structurale et fonctionnelle FOULQUIER, François; CNRS, UMR8576 Laboratoire de Glycobiologie structurale et fonctionnelle
Keywords:	Oligosaccharide < Metabolism, Glycoproteins, Mass Spectrometry < Methods, Degradation < Protein, Lysosomes < Subcellular Organelles
Topics:	06 Glycobiology and Carbohydrate Biochemistry < BIOCHEMISTRY

SCHOLARONE™
Manuscripts

PUGNAc treatment leads to an unusual accumulation of free oligosaccharides in CHO cells.

Ali Mehdy¹, Willy Morelle¹, Romain Peanne¹, Claire Rosnoblet¹, Dominique Legrand¹, Tony Lefebvre¹, Sandrine Duvet¹ and François Foulquier¹

1 IFR147, UMR8576 CNRS Laboratoire de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, USTL, Villeneuve D'Ascq, France

Running Title: Impact of PUGNAc on free oligosaccharides

Corresponding author : Dr. François Foulquier, UMR8576 CNRS, Glycobiologie Structurale et fonctionnelle, IFR 114, Bâtiment C9, USTL, 59655 Villeneuve D'Ascq Cedex, France. Mail : francois.foulquier@univ-lille1.fr, Tel : 0033320434430, Fax : 0033320436555

Abbreviations : fOS (free oligosaccharides), PUGNAc (O-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene) amino-N-phenylcarbanate), CHO (Chinese Hamster Ovaries), ERAD (Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation).

Summary

Free oligosaccharides (fOS) are generated as a result of glycoproteins catabolism that occurs in two principal distinct pathways: the endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) of misfolded newly synthesized *N*-glycoproteins and the mature *N*-glycoproteins turnover pathway. The O-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene) amino-N-phenylcarbanate (PUGNAc) is a potent inhibitor of the O-GlcNAcase (OGA) catalyzing the cleavage of β -O-linked 2-acetamido-2-deoxy-beta-D-glucopyranoside (O-GlcNAc) from serine and threonine residues of post-translationally modified proteins. In order to estimate the impact of O-GlcNAc modification on *N*-glycoproteins metabolism, fOS were analyzed by mass spectrometry.

Mass spectrometry (MS) analysis revealed the appearance of an unusual population of fOS after PUGNAc treatment. The structures representing this population have been identified as containing non-reducing end GlcNAc residues resulting from incomplete lysosomal fOS degradation. Only observed after PUGNAc treatment, the NButGt, another OGA inhibitor, did not lead to the appearance of the population. These structures have clearly been shown to accumulate in membrane fractions as the consequence of lysosomal β -hexosaminidases inhibition by PUGNAc. As Lysosomal Storage Disorders (LSD) are characterized by the accumulation of fOS in various tissues, our study evokes that PUGNAc mimics a LSD and shows another off target effects that needs to be taken into account in the use of this drug.

Introduction

N-Glycosylation can be considered as one of the most important post-translational modification of secreted and membrane proteins. Starting in the ER lumen by the transfer of an oligosaccharide precursor Glc3Man9GlcNAc2-PP-Dol, the glycan structure will serve as recognition tags for protein folding, degradation and secretion. Associated to the N-glycosylation process, soluble free oligosaccharides (fOS) can be found in several types of animal cells. Their origin is still a debate but two pathways have been clearly identified. First, fOS can arise from the ER degradation pathway of newly synthesized glycoproteins named ERAD. This pathway leads to the release of cytosolic fOS by peptide:*N*-glycanase (PNGase). The resulting fOS bearing the di-*N*-acetylchitobiose (fOSGN2) are then subsequently hydrolyzed by a cytosolic endo-*B-N*-acetylglucosaminidase (ENGase) to produce fOS with a single GlcNAc residue (fOSGN1). They are further trimmed by the cytosolic mannosidase Man2C1 to give rise to a specific Man5 isomer structure before being transported to the lysosomes by the ATP-dependent, high-affinity oligosaccharide transporter (*I*). Second, fOS can appear as digestion intermediates in the lysosomal catabolic pathway of all mature natural glycoproteins turned over. Indeed, once in lysosomes, glycoproteins are broken down bidirectionally to their constituents' amino acids (and some dipeptides) and glycans. The degradation process of these lysosomal free oligosaccharides involves series of reactions for the sequential release of monosaccharides from the non reducing ends of the oligosaccharide chains by specific exoglycosidases, while the set of hydrolytic events digests polypeptide and the protein-carbohydrate linkage region by a glycosyl asparaginase that first requires the removal of fucose residue by α -L-fucosidase. The release of the *N*-acetylglucosamine residue of the chitobiose and the hydrolysis of Man β 1 \rightarrow 4GlcNAc linkage at the reducing end is respectively achieved by an endo- β -*N*-acetylglucosaminidase or lysosomal di-*N*-chitobiobiase present both in humans and rodents, and β -mannosidases. The breakdown of the oligosaccharide from non reducing end requires the presence of *N*-acetyl- β -D-hexosaminidase (lysosomal β -hexosaminidases) that catalyzes the removal of *N*-acetylglucosamine residues. Other

specific exoglycosidases are also required such α -Neuraminidase and α -Mannosidase catalyzing the cleavage of α 1 \rightarrow 3 and α 1 \rightarrow 6 linked mannose residues.

Besides the N-glycosylation process, a large number of cytoplasmic and nuclear proteins have been reported to be modulated by posttranslational modification of specific serines/threonines with *N*-acetylglucosamine (*O*-GlcNAc). This highly dynamic modification is catalyzed by an *O*-GlcNAc transferase (OGT), and removed by the antagonistic enzyme β -*N*-acetylglucosaminidase (*O*-GlcNAcase). For the past decade, PUGNAc, human *O*-GlcNAcase inhibitor, has been widely used to increase cellular *O*-GlcNAc levels and to evaluate the cellular function(s) played by the post-translational modification *O*-GlcNAc. It later became apparent that PUGNAc shows weak selectivity for OGA while the *N*-butyl thiazoline (NbutGT) and very likely other inhibitors have greater selectivity to OGA.

In our current study, we looked for evidences implicating *O*-GlcNAc modification in the glycoproteins' degradation pathways. In order to examine this relationship, fOS were studied in PUGNAc CHO treated cells. Mass spectrometry (MS) analysis revealed the appearance of an unusual population of fOS after PUGNAc treatment. The structures representing this population have been identified as containing non-reducing end GlcNAc residues resulting from incomplete lysosomal fOS degradation in Pro-5 CHO cells. These structures clearly accumulate in membrane fractions as the consequence of lysosomal β -hexosaminidases inhibition by PUGNAc.

Methods:**Cell culture**

Pro-5 CHO cell line was cultured in alpha-minimal essential medium (Gibco) supplemented with 10% (V/V) fetal bovine serum and 2.5 mM L-Glutamine at 37°C under 5% CO₂ and plated in 175-cm² dishes. CHO cells, grown until confluence, were incubated or not, before analysis, with 100µM of PUGNAc (Sigma Aldrich, St. Quentin Fallavier) or with NbutGT inhibitor (100µM) that was kindly provided by Dr. David J. Vocadlo.

Immunoblotting

20 µg of proteins were analyzed by SDS-Page and immunoblotted with Anti-O-GlcNAc (1:10000) and anti- α -tubulin obtained both from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). Cells were washed twice on ice (Santa Cruz Biotechnology) with cold PBS (phosphate-buffered saline) and then lysed for 5 min on ice in cell lysis buffer (25 mM Tris-HCL, 150 mM NaCl, pH 7.6, supplemented with 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate and 0.1% SDS); Proteins were quantified by using the Micro BSA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Brebieres, France). Signals were detected using the ECL plus detection Kit (Amersham Biosciences, UK) according to the manufacturer's instructions. Signal detection was visualized and quantified with the GS800 calibrated Imaging Densitometer (Bio-Rad laboratories, UK), using the quantity one software for image acquisition and analysis.

Preparation of cytosolic and membrane fractions

Cells were washed twice on ice (Santa Cruz Biotechnology) with cold PBS (phosphate-buffered saline) and then scraped in KMH buffer (110 mM potassium acetate, 2 mM magnesium acetate, 20 mM HEPES, pH 7.2) containing protease inhibitor cocktail (cOmplete; Roche Diagnostics). After sonication, cells were centrifuged for 1h at 105,000 × g. The resulting supernatant is referred to, below, as the cell cytosolic fraction and the pellet as the cell membrane fraction. Both fractions were submitted to lipid extraction by addition of CHCl₃/MeOH/H₂O (3/2/1, v/v/v). The aqueous phases

resulting from lipid extraction were then lyophilized. The remaining glycoproteins pellet was dried in a vacuum centrifuge.

Release of the *N*-linked oligosaccharides and clean-up procedure of the PNGase F-released *N*-glycans

The dried protein pellet was dissolved in 200 μ L of 50 mM ammonium bicarbonate containing 0.25% w/v SDS and 0.25% v/v β -mercaptoethanol and subsequently heated for 20 min at 100°C. After adding 200 μ L of 50 mM ammonium bicarbonate in the cooled samples, 20 μ L of 10% v/v Nonidet P40 and 3 U of PNGase F were successively added and the deglycosylation was incubated at 37°C for 18 h. The PNGase F digestion was terminated by drying *in vacuo*. The *N*-glycans were desalted on a column of 150 mg of nonporous graphitized carbon (Alltech, Deerfield, IL, USA). The column was sequentially washed with 5 ml methanol and 10 mL 0.1% v/v TFA. The *N*-glycans were dissolved in 1 mL of 0.1% v/v TFA, applied to the column and washed with 3X5 mL of 0.1% v/v TFA. The elution of *N*-glycans was conducted with the application of 5 mL of 25% v/v ACN in water containing 0.1% v/v TFA. The fraction was freeze-dried. Endo-F2 and β -hexosaminidase digestion was carried out at 37°C respectively overnight at (0,3U) in 10 mM sodium acetate, 25 mM NaCl, pH 4.5 and for 48h at 50U/ml and in 50mM ammonium formate pH 4.6. The samples were lyophilized and then permethylated before MALDI-TOF analysis.

Permethylation of the glycans

Permethylation of the freeze-dried PNGase F-released *N*-glycans and soluble oligosaccharides) was performed according to the procedure developed by Ciucanu and Kerek (2). The reaction was terminated by adding 1 mL of cold 5% v/v acetic acid followed by three extractions with 500 μ L of chloroform. The pooled chloroform phases (1.5 mL) were then washed eight times with ultra-pure water. The methylated derivatives-containing chloroform phase was finally dried under a stream of nitrogen and the extracted products were further purified on a C18 Sep-Pak. The C18 Sep-Pak was sequentially conditioned with methanol (5 mL), and water (2X5 mL). The derivatized glycans dissolved in methanol were applied on the cartridge, washed with 3 X5 mL water, 2 mL of 10% v/v

ACN in water and eluted with 3 mL of 80% v/v ACN in water. ACN was evaporated under a stream of nitrogen and the samples were freeze-dried.

MALDI -TOF analysis of permethylated glycans

MALDI-TOF-MS experiments were carried out on voyager Elite DE-STR Pro instrument (PersSeptive Biosystem, Fanningham, MA, USA) equipped with a pulsed nitrogen laser (337nm) and a gridless delayed extraction ion source. The spectrometer was operated in positive reflectron mode by delayed extraction with an accelerating voltage of 20 kV and a pulse time of 200 ns and grid voltage of 66%. All the spectra shown represent accumulated spectra obtained by 400-500 laser shots. Sample was prepared by mixing a 1µl aliquot (5-10 picomoles) with 1µl of matrix solution, on the MALDI sample plate. The matrix solution was prepared by saturating a methanol-water (1:1) with DHB (10 mg/ml).

Relative quantification

Relative quantification analysis of permethylated glycans was performed as previously described (3).

Results

PUGNAc inhibitor causes an increase of O-GlcNAc modified proteins level and the appearance of an unusual fOS accumulation in CHO cells.

PUGNAc is known to be a potent inhibitor of OGA (O-GlcNAcase). In order to assess the inhibitory efficacy of PUGNAc, in hand, toward OGA, the O-GlcNAc modified proteins level was determined by western blot. In contrast to untreated CHO cells, cells treated with PUGNAc inhibitor showed a marked increase of O-GlcNAc modified proteins level stemming by the continuing action of OGT, while O-GlcNAcase function is hindered (Fig. 1). In order to determine the impact of O-GlcNAc modified proteins in N-glycoprotein degradation process, free oligosaccharides (fOS) have been analyzed by Mass spectrometry. MS profiling of permethylated fOS representing the total soluble oligosaccharides isolated from CHO control cells (A) and from CHO treated separately with PUGNAc (B) and with NbutGT inhibitor (C) was shown in Fig. 2. The structures shown in the annotations were assigned from compositional information provided by the MALDI data. The representative MS profile of total fOS from CHO control cells in Fig. 2A shows a population of Hex1→5HexNAc1 type *N*-glycans with one single HexNAc residue at m/z 518 (Hex1HexNAc1), m/z 722(Hex2HexNAc1), m/z 926(Hex3HexNAc1), m/z 1130 (Hex4HexNAc1), m/z 1334(Hex5HexNAc1), and m/z 1538 (Hex6HexNAc1), the major ion was observed at m/z 518. The MALDI-TOF-MS of total fOS from CHO-PUGNAc-treated cells (Fig. 2B) consists of a heterogeneous mixture of fOS comparing to the spectrum of total fOS from CHO control cells. The most notable features of the data presented in Fig. 1B indicate the presence in CHO-PUGNAc-treated cells of either the species with one single HexNAc residue, as was already observed in the fOS CHO control cells spectrum, of fOS bearing two to five HexNAc residues observed at m/z 967 (Hex2HexNAc2), m/z 1170 (Hex3HexNAc2), m/z 1416 (Hex3HexNAc3), m/z 1662 (Hex3HexNAc4), and m/z 1907 (Hex3HexNAc5). The MALDI-TOF-MS spectrum of the total fOS from CHO cells treated with Nbut-GT inhibitor is depicted in Fig. 1D. An important consideration in interpreting the MS spectrum of fOS of both CHO-control and CHO- Nbut-GT treated cells was the fact that, in contrast to PUGNAc, any changes due to Nbut-GT treatment were observed and the species with one single HexNAc residue at m/z 518, 722, 926, 1130 and 1538

were only observed as was the case for the total fOS of CHO control cells MS profile. These data indicate that the appearance of such population of fOS with two to five HexNAc residues associated with PUGNAc treatment was not due to a selective inhibitory effect on OGA which is consistent with the absence of this population in case of Nbut-GT treatment.

fOS's accumulating in CHO cells-PUGNAc treated are located in the membrane fraction and bear only one GlcNAc residues at their reducing end.

In order to evaluate the subcellular distribution of fOS in PUGNAc CHO treated cells, cytosolic fOS and fOS located in the membrane fraction were separated by ultracentrifugation (Fig. 3). MS analysis of permethylated cytosolic and membrane fOS fraction derived from control and PUGNAc-treated CHO cells was performed. The MALDI-TOF-MS profiles of permethylated cytosolic oligosaccharides from CHO control and from CHO cells treated with PUGNAc were depicted respectively in Fig 3.A and Fig. 3C. The cytosolic fOS of CHO cells treated or not with PUGNAc remain unchanged and appear to have the same MS profile. As was the case for the total fOS derived from control cells in Fig. 1A, the MALDI-TOF-MS spectrum of fOS cytosolic fractions in or without treatment with PUGNAc show the same molecular ions corresponding to the population of Hex1→5HexNAc1. The MS profiles of membrane fOS fraction derived from control and from PUGNAc-treated CHO cells were shown respectively in Fig. 3B and Fig. 3D. The MALDI-TOF-MS spectrum of cytosolic and membrane fOS fractions in CHO control cells shows the same profile. In contrast, comparison of MS profiles of cytosolic and membrane fOS after PUGNAc treatment revealed the presence, in addition of the population of Hex1→5HexNAc1, of Hex2HexNAc2, Hex3HexNAc2, Hex3HexNAc3, Hex3HexNAc4, and Hex3HexNAc5 species within the membrane fraction. These findings demonstrate clearly that, in the absence of any effect on the cytosolic fOS, PUGNAc strongly affects the fOS located in the membrane fraction. To determine whether these oligosaccharides are containing one or two intact GlcNAc residues at their reducing end, fOS population followed PUGNAc treatment was characterized structurally using β -hexosaminidase and Endo-F2 digestion. The sample, after treatment with PUGNAc, was divided into 3 aliquots before permethylation for mass spectrometry. Two aliquots were subjected respectively to β -hexosaminidase and Endo-F2 treatment and the other

remained untreated. After β -hexosaminidase treatment (Fig. 4B), the $[M+Na]^+$ ions at m/z 967(Hex2HexNAc2), 1171(Hex3HexNAc2), 1416(Hex3HexNAc3), 1661(Hex3HexNAc4), and m/z 1906 (Hex3HexNAc5) disappeared, concomitant with the appearance of a major ion at m/z 926 (Hex3HexNAc1). These data indicated that, as expected, non reducing GlcNAc residues were fully trimmed to form the Hex3HexNAc1 structure possessing an intact single GlcNAc residue at the reducing end. To confirm the structural data obtained after β -hexosaminidase treatment, an Endo- β -N-acetylglucosaminidase F2 (Endo F2) digestion was carried out. This enzyme cleaves at the chitobiose core of asparagine-linked or free oligomannose, and biantennary complex oligosaccharides leaving behind a single *N*-acetylglucosamine residue remaining on the asparagine. Comparison of the MALDI-TOF spectra for CHO-PUGNAc (Fig. 4A) and CHO-PUGNAc-Endo F2 (Fig 4.C) treated cells indicated that the fOS population only detected after PUGNAc treatment was still observed at m/z 967, 1171, 1416, 1661, and m/z 1906 with any change in their relative amounts. As positive control, *N*-glycans-PNGase F released from CHO cells were subjected to Endo-F2 treatment (Result not shown).

PUGNAc has no effect on N-linked glycans structure.

In order to verify whether the structure of the glycan moiety on glycoproteins was changed by PUGNAc inhibitor, we characterized the structure of *N*-glycans released from CHO global glycoproteins in presence or not of PUGNAc. Data from MALDI-TOF-MS analyses of permethylated *N*-glycans released from global glycoproteins by PNGase F from CHO cells control and CHO treated with PUGNAc are shown in Fig 5.A and Fig 5.B respectively. The *N*-glycans were reduced, tryptically digested to facilitate deglycosylation with PNGase F, separated from peptides and were analyzed by MALDI-MS after permethylation and Sep-Pak C18 purification. Based on the MALDI-TOF-MS data and currently accepted models of eukaryotic *N*-glycan biosynthesis, the *N*-glycans have compositions consistent with complex type bi-, tri-, and tetra-antennary glycans with (Fuc0–1Hex5–9HexNAc2–7). The same molecular ions were observed in the spectrum of global permethylated PNGase F released *N*-Glycans from both untreated and PUGNAc treated CHO.

Relative Quantification analysis of fOS

In order to establish a relative quantitative profiling fOS in both control and PUGNAc-treated samples were analyzed for their relative abundances (Fig. 6). The permethylated glycans were mixed with a known amount of deuterated methyl iodide as an internal standard, and freeze-dried before MALDI-TOF analysis. The amount of each oligosaccharide was relatively quantified and estimated by calculating the ratio of the relative amount of these oligosaccharides and the internal standard observed at m/z 542 in the MALDI-TOF MS spectrum of both control and PUGNAc-treated CHO cells. The species with one single GlcNAc residue ranged from 2% to 23% and from 5% to 92% respectively in CHO control and CHO PUGNAc-treated cells. The Hex1HexNAc1 was the most abundant in the total oligosaccharides with a much higher amount in cells treated with PUGNAc. Interestingly, the population of oligosaccharides with two to five GlcNAc residues appears to strongly accumulate in significant amounts in CHO-PUGNAc treated cells, and in which the major accumulated oligosaccharide was the Hex3HexNAc3 and the Hex3HexNAc5 was observed to have the lower level. The relative levels of this population were within the range of 8% to 41% of total fOS in CHO-PUGNAc-treated cells.

Discussion

N- and O-linked beta -N-acetylglucosaminylation glycosylations are two major posttranslational modifications occurring for the first one on membrane and secreted proteins and for the second one, on cytosolic and nuclear proteins. In our current study, we looked for evidences implicating O-GlcNAc modification in the metabolism of N-glycoproteins and more particularly on its catabolism. Insights into fOS metabolism is a powerful way to rapidly obtain a complete and comprehensive source of information highlighting the N-glycoprotein degradation pathway. The presence of free oligosaccharides has been reported in several types of animal cells either in the cytosol or in lysosomes (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12). Changes and/or differences in their structures are generally the result of differences in their biosynthetic pathways. In several lysosomal storage disorders (LSD), the accumulated fOS have been structurally characterized and allowed to delineate the defective enzyme(s) or pathways.

MALDI-TOF-MS technique was used to characterize the total fOS extracted from untreated and PUGNAc CHO treated cells. When cells were exposed to PUGNAc, a significant amount of an unusual fOS population was observed in addition to the population of Hex(1-7)HexNAc1 already observed in absence of PUGNAc. To elucidate the structures of these fOS, specific and targeted exoglycosidase and endoglycosidase digestions were carried out and the products were monitored with MALDI-MS. Such analysis demonstrated the presence of structures containing non reducing GlcNAc residues with a single GlcNAc residue at the reducing end. These structures are in accordance with an incomplete degradation of free oligosaccharides in lysosomes due to β -lysosomal hexosaminidases inhibition. In contrast to PUGNAc, we observed that Nbut-GT did not lead to such population demonstrating that this population was not due to a selective inhibitory effect on OGA. As expected, these species were not found cytosolic, but in the membrane fraction where they accumulate. In addition, mass spectrometric *N*-glycan profiling revealed no significant changes of the total *N*-glycan pattern after PUGNAc treatment demonstrating that the biosynthetic pathway of *N*-glycoproteins was not affected by PUGNAc.

PUGNAc has been used in over 50 studies in order to investigate the effect of increased O-GlcNAc levels in variety of cell lines, and most particularly to induce insulin resistance (13, 14, 15). The 3T3-L1 adipocytes cells which are considered as a standard model cell line for diabetes research, showed an insulin resistance after PUGNAc treatment associated with an impaired akt phosphorylation (15). Surprisingly, Vocadlo and collaborators showed that the selective O-GlcNAcase inhibitor N-butGT was unable to replicate the insulin resistance effects of PUGNAc on cultured 3T3-L1 adipocyte (16). Regarding these observations, it has been suggested that elevated O-GlcNAc levels are not correlated with PUGNAc phenotype in these experiments, so that the lack of selectivity or other potential off-target effects of PUGNAc should be considered in studies making use of PUGNAc to reproduce increases in O-GlcNAc levels. PUGNAc is an inhibitor of both lysosomal beta-hexosaminidase alpha and beta subunits that are members of family 20 of glycosyl hydrolases and OGA. HEXA and HEXB are localized in lysosomes and hydrolyze terminal N-acetylglucosamine and N-acetylgalactosamine residues of glycosphingolipids and N-linked oligosaccharides. Vocadlo and collaborators have reported that the use of PUGNAc increased accumulation of the glycolipids GM2 (17). Our works demonstrate that PUGNAc also affects the structure of free oligosaccharides resulting from the mature N-glycoproteins turnover pathway. Altogether the As Lysosomal Storage Disorders (LSD) are characterized by the accumulation of fOS in various tissues, our study evokes that PUGNAc mimics a LSD and shows another off target effects that need to be taken into account in the use of this drug. While annoying for people working in the field of O-GlcNAc, this side effect of PUGNAc could be used to investigate the quantitative importance of the catabolic turn over pathway versus ERAD pathway.

Acknowledgments

This work was supported by the Centre National de la Recherche scientifique (Unité Mixte de Recherche CNRS/USTL 8576 ; Director : Dr Jean-Claude Michalski), the Agence Nationale de la Recherche (ANR). The Mass Spectrometry facility used in this study was funded by the European Community (FEDER), the Région Nord pas de Calais (France) and the Université des Sciences et Technologies de Lille 1.

For Peer Review

References

1. Saint-Pol, A., Codogno, P., Moore, S.E.H. (1999) Cytosol-to-lysosome transport of free polymannose-type oligosaccharides. Kinetic and specificity studies using rat liver lysosomes. *J. Biol. Chem.* **274**, 13547–55.
2. Ciucanu, I., Kerek, F., *Carbohydr. Res.* (1984) A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydr. Res.* **131**, 209-217.
3. Alvarez-Manilla, G.; Warren, N. L.; Abney, T.; Atwood, J.; Azadi, P.; York, W. S.; Pierce, M.; Orlando, R. (2007) Tools for glycomics: relative quantitation of glycans by isotopic permethylation using $^{13}\text{CH}_3\text{I}$. *Glycobiology*, **17** (7), 677–87.
4. Anumula, K.R., Spiro, R.G (1983) Release of glucose-containing polymannose oligosaccharides during glycoprotein biosynthesis. Studies with thyroid microsomal enzymes and slices. *J. Biol. Chem.* **258**, 15274–82.
5. Cacan, R., Hoflack, B., Verbert, A. (1980) Fate of oligosaccharide-lipid intermediates synthesized by resting rat-spleen lymphocytes. *EurJ Biochem.* **106**, 473–9
6. Cacan, R. and Verbert, A. (1999) Free and N-linked oligomannosides as markers of the quality control of newly synthesized glycoproteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **258**, 1–5.
7. Cacan, R. and Verbert, A. (2000) Transport of free and N-linked oligomannoside species across the rough endoplasmic reticulum membranes. *Glycobiology*, **10**, 645–648.
8. Iwai, K., Mega, T., and Hase, S. (1999) Detection of Man5GlcNAc and related free oligomannosides in the cytosol fraction of hen oviduct. *J. Biochem.*, **125**, 70–74.

9. Kmiecik, D., Herman, V., Stroop, C.J.M., Michalsky, J.-C., Mir, A.-M., Labiau, O., Verbert, A., and Cacan, R. (1995) Catabolism of glycan moieties of lipid intermediates leads to a single Man5GlcNAc oligosaccharide isomer: a study with permeabilized CHO cells. *Glycobiology*, **5**, 483–494.
10. Moore, S.E.H. and Spiro, R.G. (1994) Intracellular compartmentalization and degradation of free polymannose oligosaccharides released during glycoprotein biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, **269**, 12715–12721.
11. Ohashi, S., Iwai, K., Mega, T., and Hase, S. (1999) Quantitation and isomeric structure analysis of free oligosaccharides present in the cytosol fraction of mouse liver: detection of a free disialobiantennary oligosaccharide and glucosylated oligomannosides. *J. Biochem.* **126**, 852–858.
12. Spiro, R.G. (2004) Role of N-linked polymannose oligosaccharides in targeting glycoproteins for endoplasmic reticulum-associated degradation. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**, 1025–1041.
13. E.B. Arias, J. Kim, G.D. Cartee (2004) Prolonged incubation in PUGNAc results in increased protein O-Linked glycosylation and insulin resistance in rat skeletal muscle. *Diabetes* **53**, 921–930.
14. X. Yang, P.P. Ongusaha, P.D. Miles, J.C. Havstad, F. Zhang, W.V. So, J.E. Kudlow, R.H. Michell, J.M. Olefsky, S.J. Field, R.M. Evans (2008) Phosphoinositide signalling links OGlcNAc transferase to insulin resistance. *Nature* **451**, 964–969.
15. K. Vosseller, L. Wells, M.D. Lane, G.W. Hart (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. USA* **99** 5313–5318.

16. M.S. Macauley, A.K. Bubb, C. Martinez-Fleites, G.J. Davies, D.J. Vocadlo (2008) Elevation of global O-GlcNAc levels in 3T3-L1 adipocytes by selective inhibition of O-GlcNAcase does not induce insulin resistance. *J. Biol. Chem.* **283**, 34687–34695.

17. K.A. Stubbs, M.S. Macauley, D.J. Vocadlo (2009). A selective inhibitor Gal-PUGNAc of human lysosomal beta-hexosaminidases modulates levels of the ganglioside GM2 in neuroblastoma cells. *Angew Chem., Int. Ed.* **48**, 1300–1303.

For Peer Review

Legends

Figure 1. Pro-5 CHO cells were treated over night with 100 μ M of PUGNAc and analyzed for the levels of O-GlcNAc modified protein by Western blot (upper panel). Western blot analysis of cellular α -tubulin levels shows equal loading for the two lanes (lower panel).

Figure 2. MALDI-TOF Mass spectrum of permethylated total oligosaccharides from CHO controls cells (A), CHO treated separately with 100 μ M of PUGNAc (B) and with 100 μ M of Nbut-GT(C). *N*-glycans are derived from the 50 % (v/v) acetonitrile fraction from a C18 Sep-Pak. All molecular ions are [M+Na]⁺, and nominal masses of ¹²C isotope are shown.

Figure 3. Cytosolic fraction from CHO control (A) and from CHO-PUGNAc treated (B), membrane fraction from CHO control (C) and from CHO-PUGNAc treated of fOS were obtained by ultracentrifugation. The permethylated fOS of each fraction was analyzed by MALDI-TOF.

Figure 4. MALDI-TOF-MS spectra of permethylated fOS from CHO-PUGNAc cells (A), after treatment with β -*N*-acetylhexosaminidase (B), and after treatment with Endo-F2 (C). After purification on a nonporous graphitized carbon SPE cartridge, the *N*-glycans were analyzed in positive ion reflective mode after on-target exoglycosidase digestions, as [M+Na]⁺ pseudomolecular ions.

Figure 5. MALDI-MS spectra of PNGase F-released *N*-glycans from CHO control (A) and CHO-PUGNAc treated cells (B). Glycans were released from the resulting peptides/glycoproteins by digestion with PNGase F. PNGase F-released *N*-glycans were separated from peptides using a C18 Sep-Pak. The glycans were permethylated and then analyzed in positive reflective mode as [M+Na]⁺ pseudomolecular ions. Galactose (open circles); mannose (closed circles); GlcNAc (closed squares); fucose (open triangles); GalNAc (open squares).

Figure 6. Relative quantities of oligosaccharides calculated according to the peaks intensity in the MALDI-TOF MS spectrum of permethylated oligosaccharides of CHO control and CHO-PUGNAc-treated cells mixed, according to the protein quantification, with a known quantity of deuterated

methyl iodide as an internal standard, and of matrix solution, on the MALDI sample plate standard for relative quantification

For Peer Review

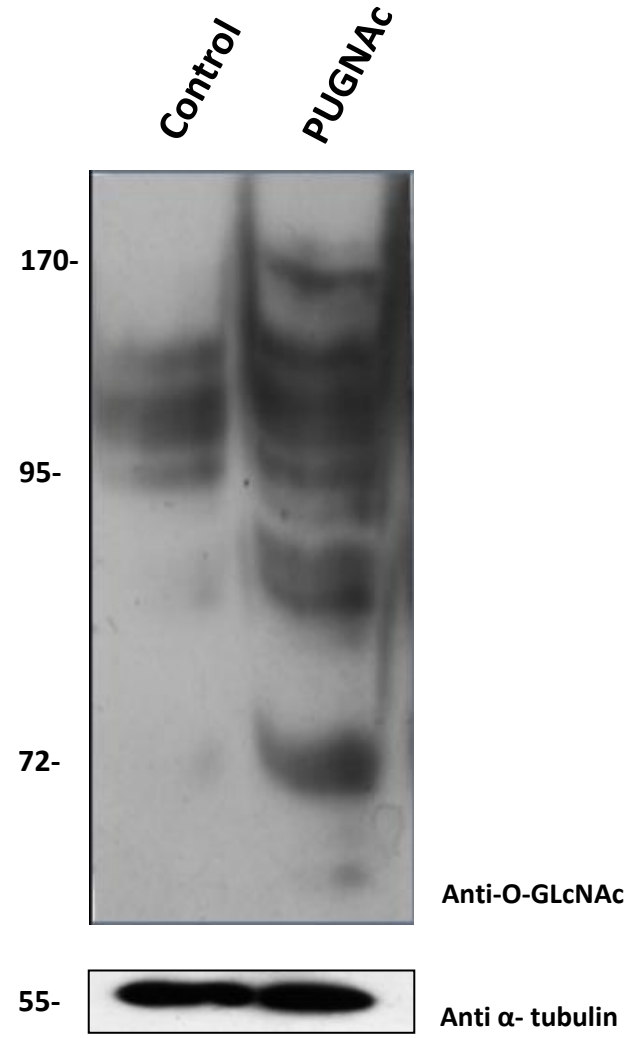
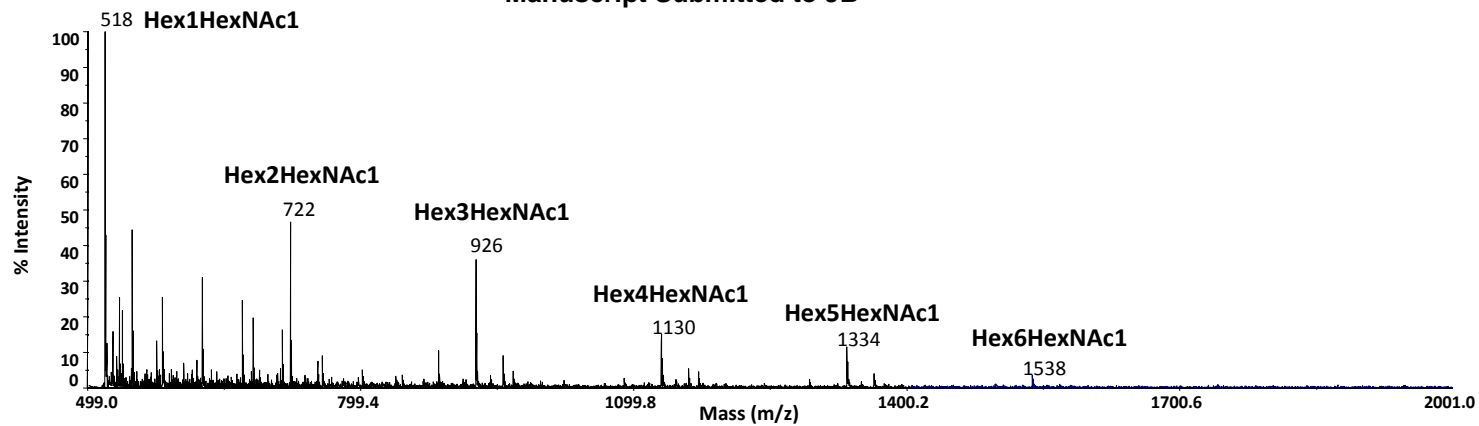
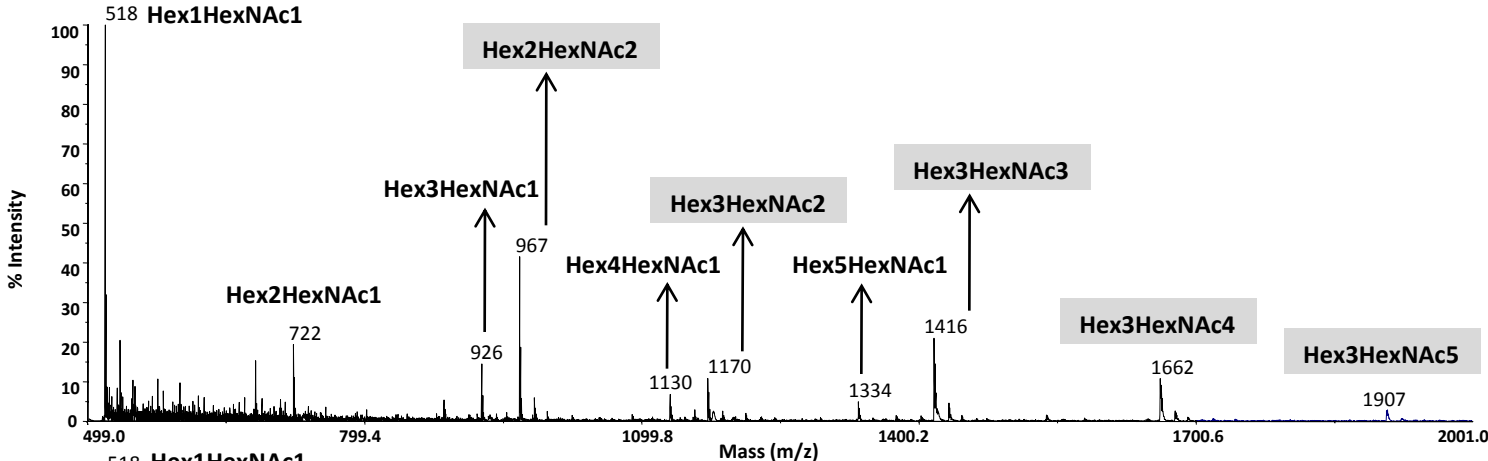


Fig. 1

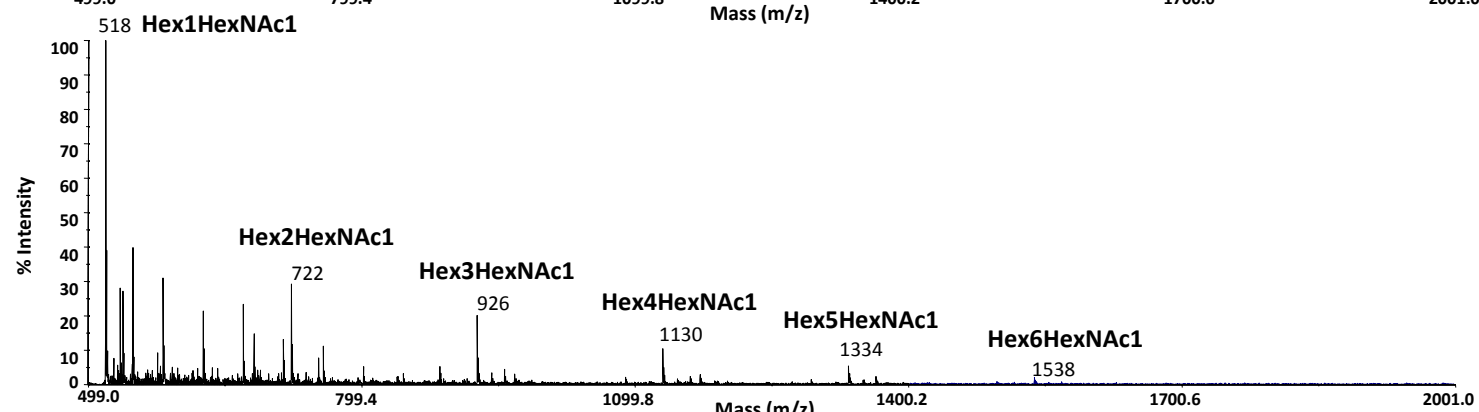
A



B



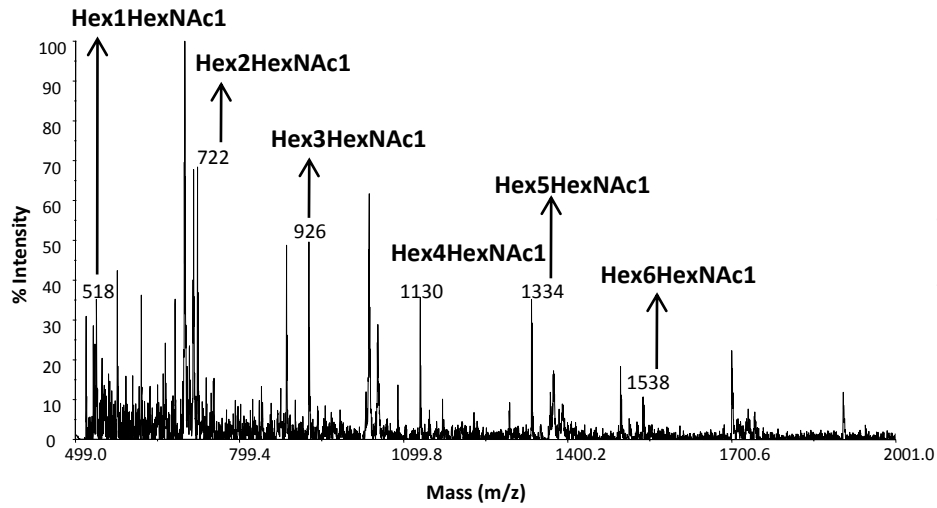
C



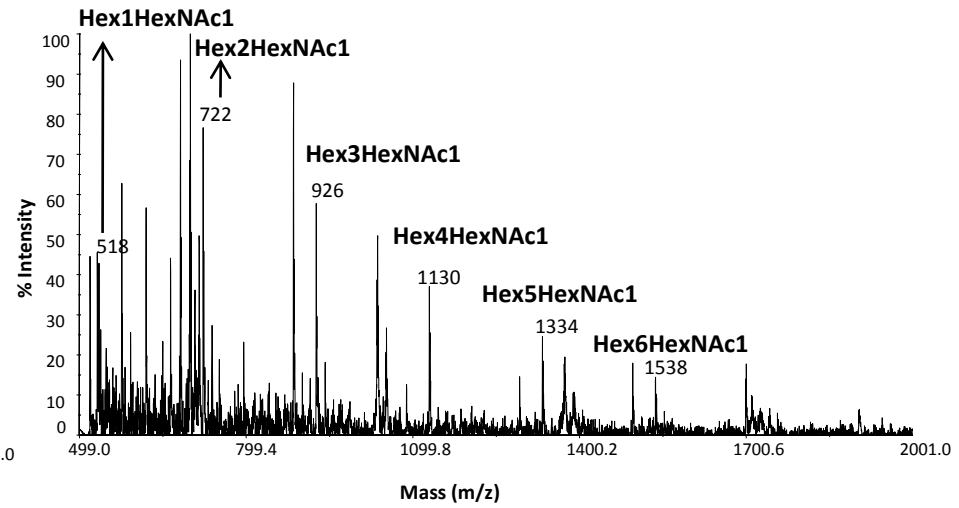
<http://mc.manuscriptcentral.com/oup/jb>

Fig.2

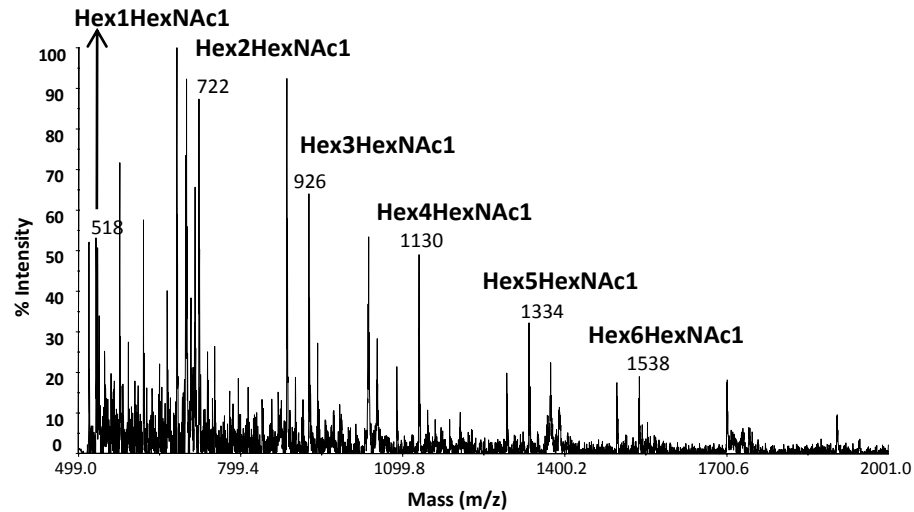
A



C



B



D

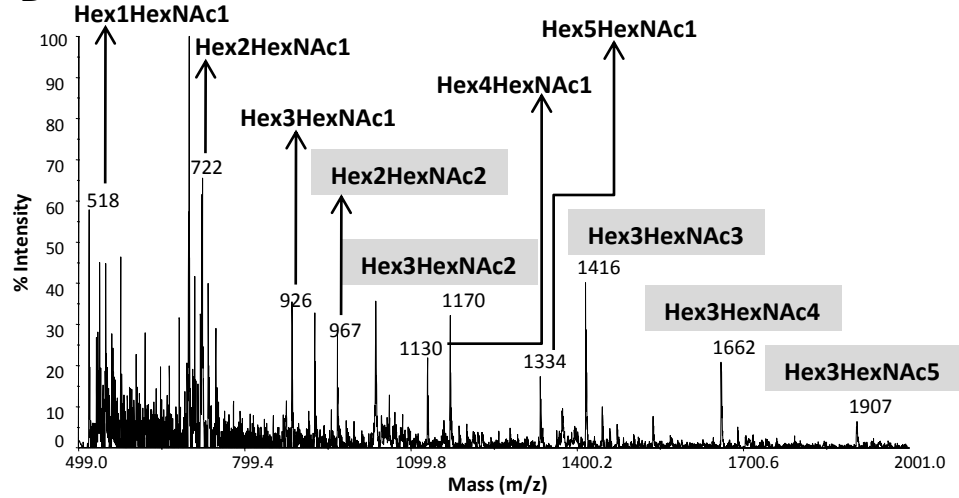
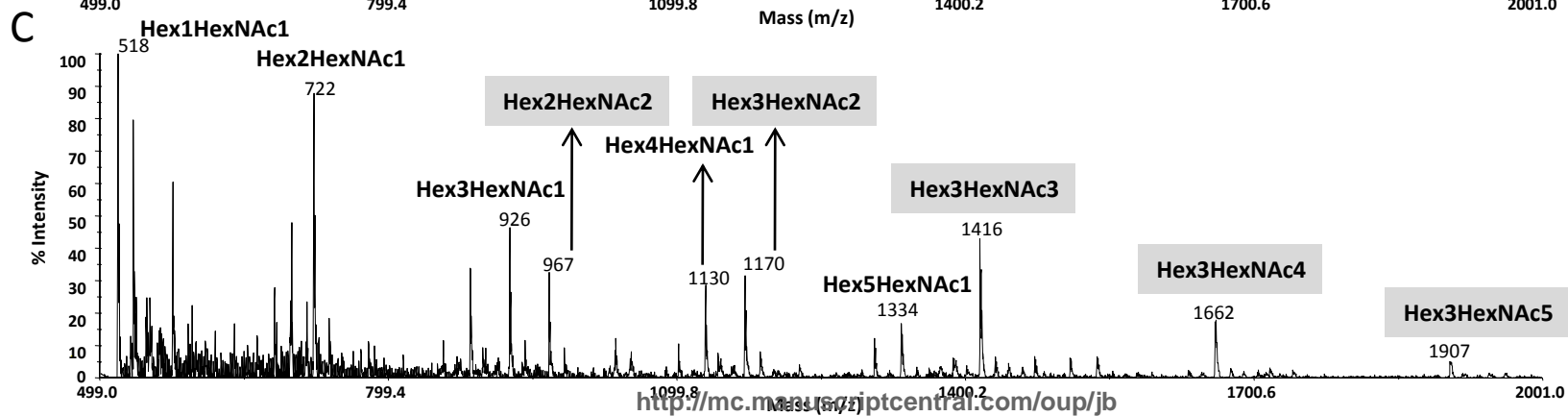
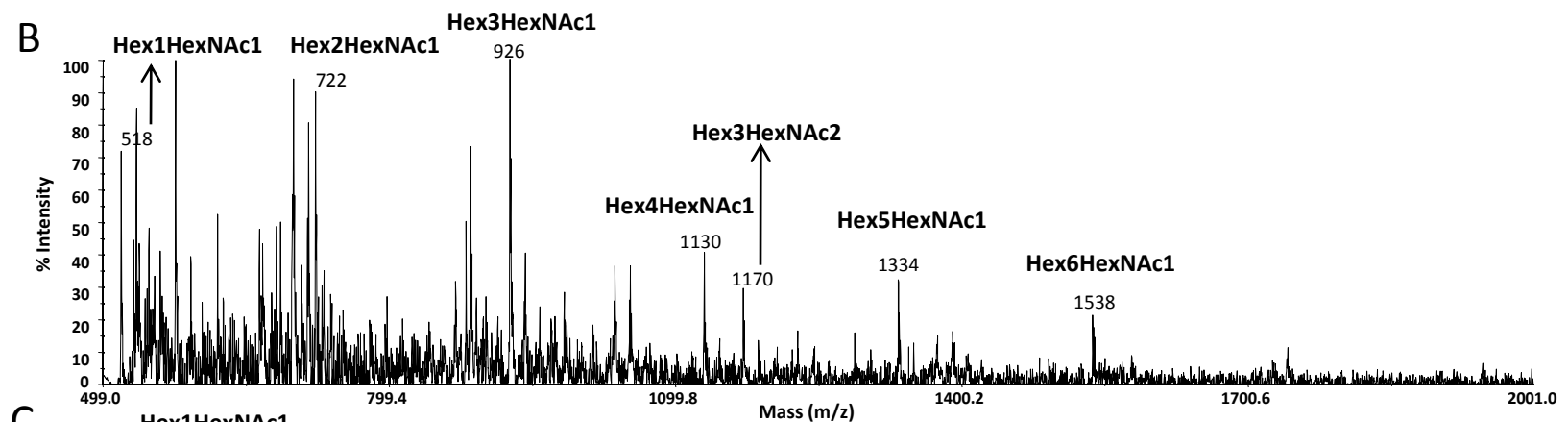
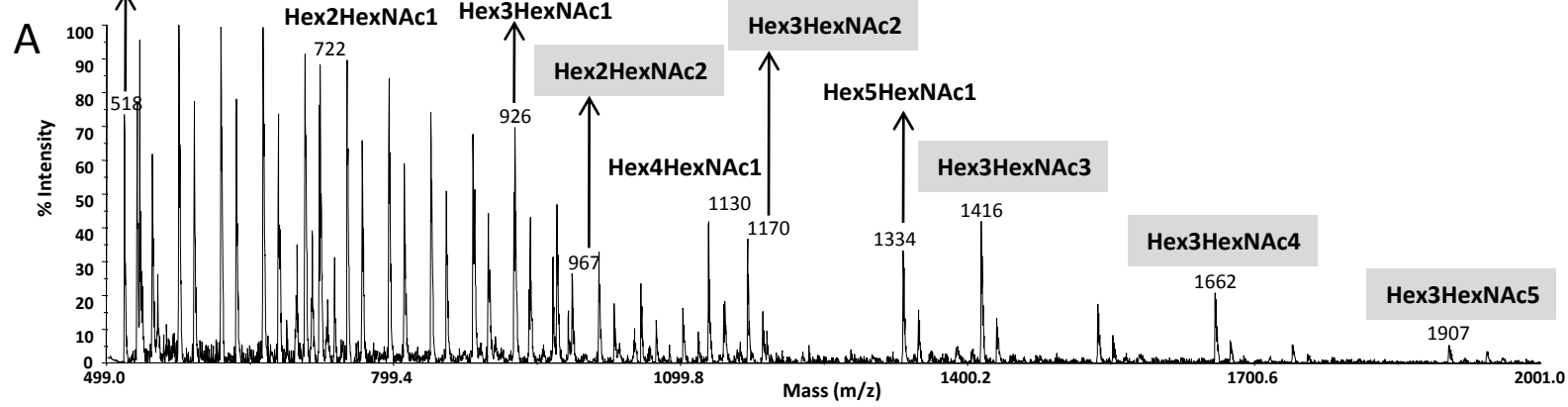


Fig.3



<http://mc.manuscriptcentral.com/oup/jb>

Fig.4

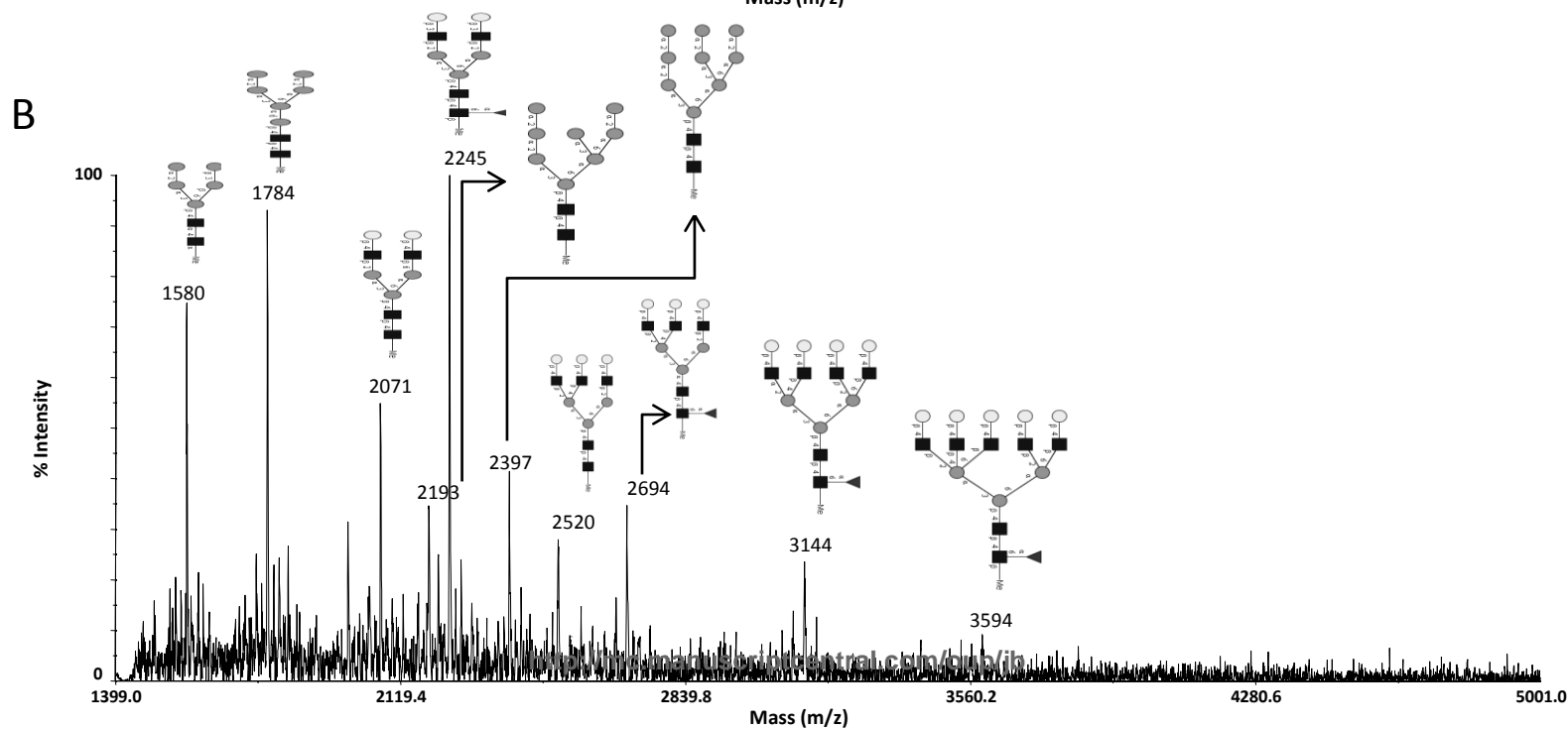
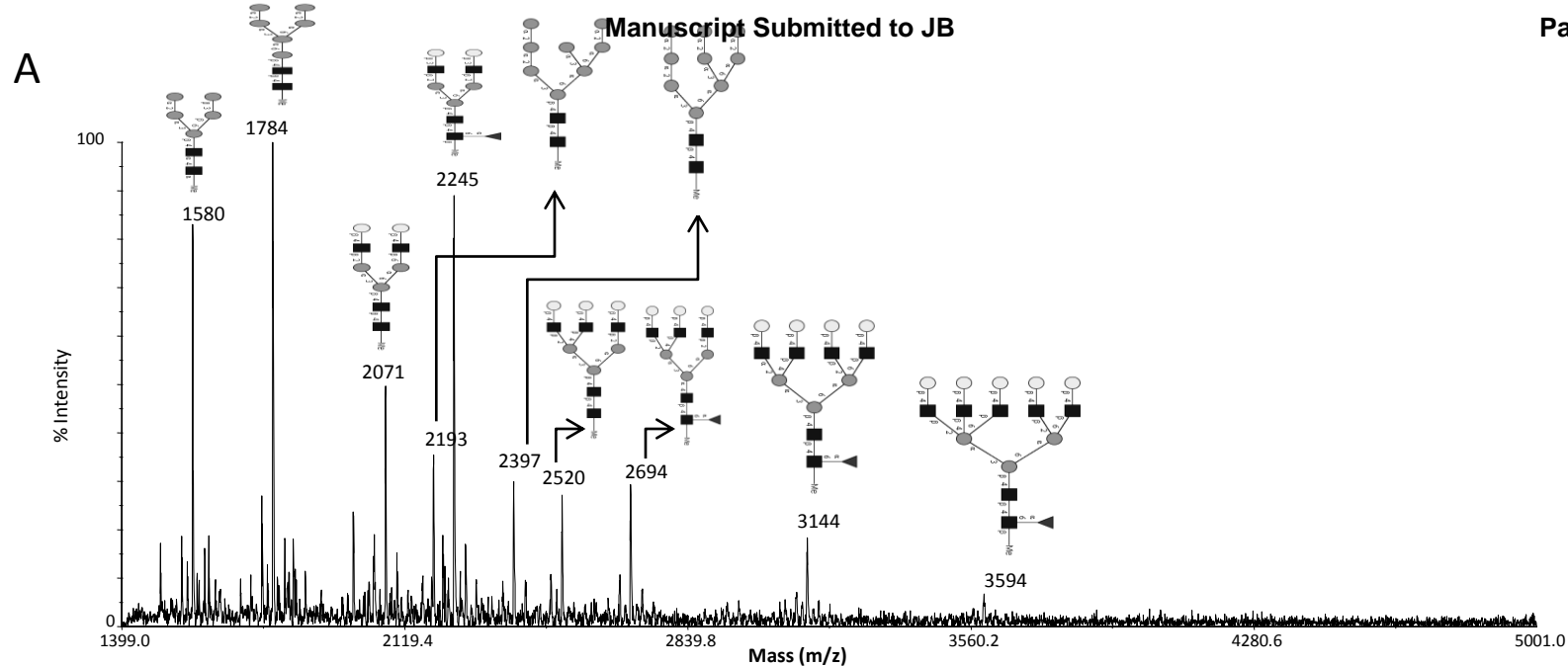


Fig.5

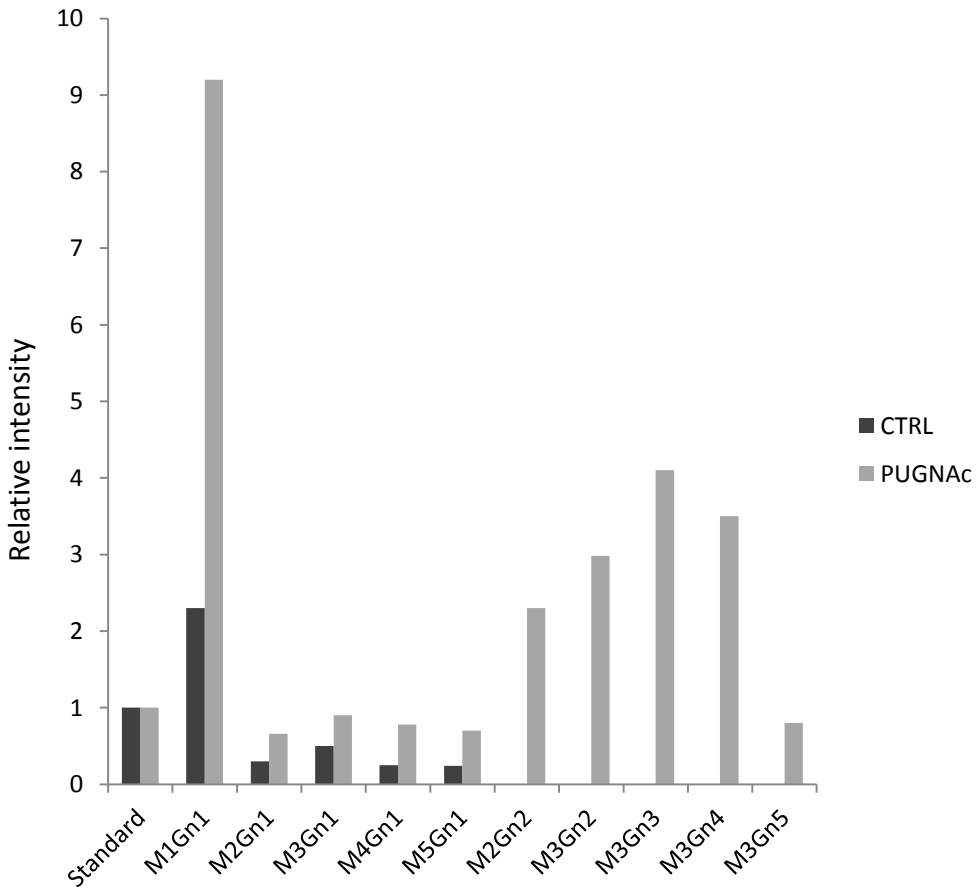


Fig.6

Références Bibliographiques

- Abraham D, Blakemore W.F, Jolly RD, Sidebotham R, and Winchester B. The catabolism of mammalian glycoproteins. Comparison of the storage products in bovine, feline and human mannosidoses. *Biochem. J.* 1983; 215: 573–579.
- Alhadeff J A. Malignant cell glycoproteins and glycolipids. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 1989; 9(1): 37-107.
- Ahlberg J, Glaumann H. Uptake--microautophagy--and degradation of exogenous proteins by isolated rat liver lysosomes. Effects of pH, ATP, and inhibitors of proteolysis. *Exp Mol Pathol.* 42(1):78-88. 1985;
- Anumula KR. & Spiro RG. Release of glucose-containing polymannose oligosaccharides during glycoprotein biosynthesis. Studies with thyroid microsomal enzymes and slices. *J. Biol. Chem.* 1983; 258: 15274–82.
- Arnold CS, Johnson GV, Cole RN, Dong DL, Lee M, Hart GW. The Microtubule-associated Protein Tau Is Extensively Modified with O-linked N-acetylglucosamine, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 28741-28744.. The Microtubule-associated Protein Tau Is Extensively Modified with O-linked N-acetylglucosamine, *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 28741-28744.
- Arias EB, Kim J., Cartee GD. Prolonged incubation in PUGNAc results in increased protein O-Linked glycosylation and insulin resistance in rat skeletal muscle, *Diabetes.* 2004; 53: 921–930.
- Aronson NN Jr. Aspartylglycosaminuria: biochemistry and molecular biology. *Biochim. Biophys. Acta.* 1999; 1455: 139–154.
- Bangs JD, Doering TL, Englund J'T and Hart GW. Biosynthesis of a variant surface glycoprotein of *Trypanosoma brucei*. Processing of the glycolipid membrane anchor and N-linked oligosaccharides. *BioL Chem.* 1988; 263: 17697-17705.
- Barrett AJ. Classification of peptidases. *Methods Enzymol.* 1994; 244, 1–18.
- Barrett AJ., Rawlings, N.D., and Woessner, J.F. Jr. (eds). Academic Press, London. 1998.
- Barnes G, Hansen WJ, et al. "Asparagine-linked glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae*: genetic analysis of an early step." *Mol. Cell. Biol.* 1984; 4(11): 2381-2388.
- Bays NW, Gardner R G, Seelig L P, Joazeiro C A, Hampton R Y. Hrd1p/Der3p is a membrane-anchored ubiquitin ligase required for ER-associated degradation. *Nature Cell Biol.* 2001; 3: 24–29.
- Bennett RA & Pegg AE. Alkylation of DNA in rat tissues following administration of streptozotocin. *Cancer Res.* 1981; 41: 2786-90.
- Bernales S, McDonald K L., Walter P. Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response. 2006; *PLoS Biol* 4, e423.
- Bischoff J, Moremen K, Lodish HF. Isolation, characterization, and expression of cDNA encoding a rat liver endoplasmic reticulum α -mannosidase. *J. Biol. Chem.* 1990; 265: 17110–7.

- Blatch GL & Lassle M. The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interaction. *Bioessays*. 1999; 21: 932-9.
- Burda P, Aebi M. The dolichol pathway of N-linked glycosylation. *Biochim Biophys Acta*. 1999 1426(2): 239-57.
- Butkinaree C, Cheung WD, Park S, Park K, Barber M, Hart GW. Characterization of beta-N-acetylglucosaminidase cleavage by caspase-3 during apoptosis. *J Biol Chem*. 2008; 283(35):23557-66.
- Braidman I, Carroll M, Dance N et al. Characterization of human N-acetyl-beta-hexosaminidase C. *FEBS Lett*. 1974; 41: 181-4.
- Cabral CM, Liu Y, Sifers RN. Dissecting glycoprotein quality control in the secretory pathway. *Trends Biochem. Sci*. 2001; 26, 619–24.
- Cacan R, Hoflack B, Verbert A. Fate of oligosaccharide-lipid intermediates synthesized by resting rat-spleen lymphocytes. *EurJ Biochem*. 1980; 106, 473–9.
- Cacan R & Verbert A. Metabolic labelling of animal cell culture. In *Methods on Glycoconjugates - a laboratory manual*. 1995; pp. 179-183. Harwood academic publishers.
- Carvalho P, Goder V, Rapoport TA. Distinct ubiquitine-ligase complexes define convergent pathways for the degradation of ER proteins. *Cell*. 2006; 126, 361-373.
- Caldwell SA, Jackson SR, Shahriari KS, Lynch TP, Sethi G, Walker S, Vosseller K, Reginato MJ. Nutrient sensor O-GlcNAc transferase regulates breast cancer tumorigenesis through targeting of the oncogenic transcription factor FoxM1. *Oncogene*. 2010; M 13; 29(19):2831-42.
- Chantret I, Frenoy JP, Moore SHE. Free-oligosaccharide control in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Roles for peptide:N-glycanase (Png1p) and vacuolar mannosidase (Ams1p). *Biochem. J*. 2003; 373, 901–8.
- Chang T, Kuo MC, Khoo K.H, Inoue S, Inoue Y. Developmentally regulated expression of a peptide:N-glycanase during germination of rice seeds (*Oryza sativa*) and its purification and characterization. *J. Biol. Chem*. 2000; 275, 129–34.
- Chui D, Oh-Eda M, Liao YF, Panneerselvam K, Lal A, MarekKW, Freeze HH, Moremen KW, Fukuda MN, Marth JD. Alphanmannosidase-II deficiency results in dyserythropoiesis and unveils an alternate pathway in oligosaccharide biosynthesis. *Cell*90. 1997; 157–67.
- Chou TY, Dang CV, Hart GW. Glycosylation of the c-Myc transactivation domain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92: 4417-21.
- Cipollo, JF, Trimble RB, et al. The yeast ALG11 gene specifies addition of the terminal alpha 1,2-Man to the Man5GlcNAc2-PP-dolichol N-glycosylation intermediate formed on the cytosolic side of the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem*. 2001; 276(24): 21828-21840.
- Ciucanu I & Kerek F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydr. Res*. 1984; 131: 209-217.

- Cieniewski-Bernard C, Bastide B, Lefebvre T, Lemoine J, Mounier Y and Michalski JC. Identification of *O*-linked N-acetylglucosamine proteins in rat skeletal muscle using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics*. 2004; 3, 577-585.
- Clark RJ, McDonough PM, Swanson E, Trost SU, Suzuki M, Fukuda M, Dillmann WH. Diabetes and the accompanying hyperglycemia impair cardiomyocyte calcium cycling through increased nuclear O-GlcNAcylation, *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 44230–44237.
- Clerc S, Hirsch C, Oggier DM, Deprez P, Jakob C, Sommer T, Aebi M. Htm1 protein generates the N-glycan signal for glycoprotein degradation in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.* 2009; 184:159-72.
- Conzelmann E & Sandhoff K.: Purification and characterization of an activator protein for the degradation of glycolipids GM2 and GA2 by hexosaminidase A. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 1979; 360, 1837–1849.
- Comtesse N, Maldener E, Meese E. Identification of a nuclear variant of MGEA5, a cytoplasmic hyaluronidase and a beta-N-acetylglucosaminidase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 283: 634-40.
- Connus S & Simon HU. Cathepsins: key modulators of cell death and inflammatory responses. *Biochem. Pharmacol.* 2008; 76, 1374–1382.
- Cuervo A M., Knecht E, Terlecky S, Dice JF. Activation of a selective pathway of lysosomal proteolysis in rat liver by prolonged starvation. *Am. J. Physiol.* 1995; 269, C1200–C1208.
- Cuervo AM. Autophagy: many paths to the same end. *Mol Cell Biochem.* 2004; 263(1-2):55-72.
- Cuervo A M, Mann L, Bonten E, d’Azzo A, Dice J. Cathepsin A regulates chaperone-mediated autophagy through cleavage of the lysosomal receptor. *EMBO J.* 2003; 22, 12-19.
- Denic V, Quan EM, Weissman JS. Hepatic glucose sensing via the CREB coactivator CRT2, *Science* 2008; 319: 1402–1405.
- Denic V, Quan EM, Weissman JS. A luminal surveillance complex that selects misfolded glycoproteins for ER-associated degradation. *Cell.* 2006; 126: 349-359.
- Dell’Angelica EC, Mullins C, Caplan S, Bonifacino JS. Lysosome-related organelles. *FASEB J.* 2000; 14: 1265–1278.
- Dong DL, Xu ZS, Chevrier MR, et al. Glycosylation of mammalian neurofilaments. Localization of multiple *O*-linked N-acetylglucosamine moieties on neurofilament polypeptides L and M. *J Biol Chem.* 1993; 268: 16679-87.
- Dong DL & Hart GW. Purification and characterization of an O-GlcNAc selective N-acetyl-beta-D-glucosaminidase from rat spleen cytosol, *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 19321–19330.

- Doucey MA, Hess D, Blommers MJ, Hofsteenge J. Protein C-mannosylation is enzyme-catalysed and uses dolichyl-phosphate-mannose as a precursor. *Mol Biol Cell*. 1998; 9: 291-300.
- Doucey MA, Hess D, Blommers MJ, Hofsteenge J. Recombinant human interleukin-12 is the second example of a C-mannosylated protein. *Glycobiology*. 1999; 9(5): 435-41.
- Duvet S, Foulquier S, Mir A, Chirat F, Cacan R. Discrimination between luminal and cytosolic sites of deglycosylation in endoplasmic reticulum-associated degradation of glycoproteins by using benzyl mannose in CHO cell lines. *Glycobiology*. 2004; 14: 841–9.
- Dunn WA Jr. Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation. *Trends Cell Biol*. 1994; 4: 139-43.
- D'Agostaro GA, Zingoni A, Moritz RL, Simpson RJ, Schachter H, Bendiak B. Molecular cloning and expression of cDNA encoding the rat UDP-N-acetylglucosamine: alpha-6-D mannoside beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase II, *J Biol Chem*. 1995; 270: 15211–21.
- Ellgaard L & Helenius A. ER quality control: towards an understanding at the molecular level. *Curr Opin Cell Biol*. 2001; 13: 431-437.
- Endo T, Hoshi M, Endo S, Arata Y, Kobata A. Structures of the sugar chains of a major glycoprotein present in the egg jelly coat of a starfish, *Asterias amurensis*. *Arch. Biochem. Biophys*. 1987; 252: 105-112
- Ermonval M, Kitzmuller C, Mir A. M., Cacan R, Ivessa NE. N-glycan structure of a short-lived variant of ribophorin I expressed in the MadIA214 glycosylation-defective cell line reveals the role of a mannosidase that is not ER mannosidase I in the process of glycoprotein degradation. *Glycobiology*. 2001; 11: 565–576.
- Eskelinen EL, Tanaka Y, Saftig P. At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell Biol*. 2003; 13: 137–145.
- Ferguson MA. The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. *J Cell Sci*. 1999; 112:2799-809.
- Ferguson MA & Williams AF. Cell-surface anchoring of proteins via glycosylphosphatidylinositol structures. *Annu Rev Biochem*. 1988; 57: 285-320.
- Forgac M. Structure and function of vacuolar class of ATP-driven proton pumps. *Physiol Rev*. 1989; 69(3):765-96.
- Furst W & Sandhoff K. Activator proteins and topology of lysosomal sphingolipid catabolism. *Biochim. Biophys. Acta*. 1992; 1126: 1–16.
- Furukawa K & Sato T. Beta-1,4-galactosylation of N-glycans is a complex process, *Biochim Biophys Acta*. 1999; 1473: 54–66.
- Frenkel Z, Gregory W, Kornfeld S, Lederkremer GZ. Endoplasmic reticulum-associated degradation of mammalian glycoproteins involves sugar chain trimming to Man6–5GlcNAc2. *J. Biol. Chem*. 2003; 278: 34119– 34124.

- Gao Y, Wells L, Comer FI, Parker GJ, Hart GW. Dynamic Oglycosylation of nuclear and cytosolic proteins: cloning and characterization of a neutral, cytosolic beta-N-acetylglucosaminidase from human brain. *J Biol Chem.* 2001; 276: 9838-45.
- Gao Y, Parker GJ, Hart GW. Streptozotocin-induced beta-cell death is independent of its inhibition of O-GlcNAcase in pancreatic Min6 cells, *Arch. Biochem. Biophys.* 2000; 383: 296–302.
- Gao Y, Shang J, Lehrman MA. Analysis of glycosylation in CDG-Ia fibroblasts by fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis: Implications for extracellular glucose and intracellular mannose 6-phosphate. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 17901–9.
- Gavel, von Heijne G. Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. *Protein Eng.* 1990; 3(5):433-42.
- Gewinner C, Hart G, Zachara N, Cole R, Beisenherz-Huss C and Groner B. The coactivator of transcription CREB binding protein interacts preferentially with the glycosylated form of Stat5. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 3563-3572.
- Ghosh P, Dahms NM, Kornfeld S. Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003; 4: 202–212.
- Gonzalez DS, Karaveg K, Vandersall-Nairn AS, Lal A, Moremen KW. Identification, expression, and characterization of a cDNA encoding human endoplasmic reticulum mannosidase I, the enzyme that catalyzes the first mannose trimming step in mammalian Asn-linked oligosaccharide biosynthesis, *J Biol Chem.* 1999; 274: 21375–86.
- Gong J & Jing L. Glutamine induces heat shock protein 70 expression via O-GlcNAc modification and subsequent increased expression and transcriptional activity of heat shock factor-1. *Minerva Anesthesiol.* 2011; 77(5):488-95.
- Gutternigg M, Rendic D, Voglauer T, Iskratsch IB, Wilson. Mammalian cells contain a second nucleocytoplasmic hexosaminidase. *Biochem. J.* 2009; 419: 83–90.
- Guinez C, Losfeld ME, Cacan R, Michalski JC, Lefebvre T. Modulation of HSP70 GlcNAc-directed lectin activity by glucose availability and utilization. *Glycobiology.* 2006; 16(1): 22-8.
- Haltiwanger RS, Blomberg MA, Hart GW. Glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins. Purification and characterization of a uridine diphospho-N-acetylglucosamine:polypeptide beta-Nacetylglucosaminyltransferase. *J Biol Chem.* 1992; 267: 9005-13.
- Hannover JA, Yu S, Lubas WB, Shin SH, Ragano-Caracciola M, Kochran J, Love DC. Mitochondrial and nucleocytoplasmic isoforms of O-linked GlcNAc transferase encoded by a single mammalian gene. *Arch. Biochem. Biophys.* 2003; 409: 287-297.
- Hanisch FG. O-glycosylation of the mucin type. *Biol Chem.* 2001; 382(2): 143-9.

- Hara T et al. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*. 2006; 441: 885–889.
- Haltiwanger RS, Grove K, Philipsberg GA. 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.* 1998; 273: 3611–3617.
- Hazel M, Cooksey RC, Jones D, Parker G, Neidigh JL, Witherbee B, Gulve EA, McClain DA. Activation of the hexosamine signaling pathway in adipose tissue results in decreased serum adiponectin and skeletal muscle insulin resistance. *Endocrinology*. 2004; 145: 2118–2128.
- Hennet T. The galactosyltransferase family, *Cell Mol Life Sci.* 2002; 59: 1081–95.
- He Y, Martinez-Fleites C, Bubb A, Gloster TM, Davies GJ. Davies, Structural insight into the mechanism of streptozotocin inhibition of O-GlcNAcase. 2008; *Carbohydr. Res.* 340; 627–631.
- Herscovics A & Orlean P. Glycoprotein biosynthesis in yeast. *FASEB J.* 1993; 7: 540-550.
- Heckel D, Comtesse N, Brass N, et al. Novel immunogenic antigen homologous to hyaluronidase in meningioma. *Hum Mol Genet.* 1998; 7: 1859-72.
- Helenius A & Aebi M. Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem.* 2004; 73:1019-49.
- Helenius J, Ng DT, Marolda CL, Walter P, Valvano MA, Aebi M. Translocation of lipid-linked oligosaccharides across the ER membrane requires Rft1 protein. *Nature*. 2002; 415(6870):447-50.
- Hiromura M, Choi CH, Sabourin NA, Jones H, Bachvarov D, Usheva A. YY1 is regulated by O-linked N-acetylglucosaminylation (O-GlcNAcylation). *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 14046-14052.
- Hirsch C, Blom D, Ploegh HL. A role for N-glycanase in the cytosolic turnover of glycoproteins. *EMBO J.* 2003; 22: 1036–1046.
- Hilt W & Wolf DH. A field guide to ubiquitylation. *Cell. Mol. Life Sci.* 2004; 61: 1546–1561.
- Hosokawa N, You Z, Tremblay LO, Nagata K, Herscovics A. Stimulation of ERAD of misfolded null Hong Kong alpha1-antitrypsin by Golgi alpha1,2-mannosidases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007; 362: 626–632.
- Hosokawa N, Tremblay LO, You Z, Herscovics A, Wada I, Nagata K. Enhancement of endoplasmic reticulum (ER) degradation of misfolded Null Hong Kong alpha1-antitrypsin by human ER mannosidase I. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 26287–26294.
- Hofsteenge J, Ullrich DR, de Beer T, Löffler A, Richter WJ, Vliegthart JF. New type of linkage between a carbohydrate and a protein: C-glycosylation of a specific tryptophan residue in human RNase U. *Biochemistry*. 1994; 33(46):13524-30.

- Hofsteenge J, Hwiler KG, Macek B, Hess D, Lawler J, Masher DF, Peter-Katalinic J. C-mannosylation and O-fucosylation of the thrombospondin type 1 module. *J Biol Chem.* 2001; 276(9):6485-98.
- Horsch M, Hoesch L, Vasella A, Rast DM. N-acetylglucosaminono-1,5-lactone oxime and the corresponding (phenylcarbamoyl) oxime. Novel and potent inhibitors of beta-N-acetylglucosaminidase. *Eur J Biochem.* 1991; 197: 815-8.
- Hresko RC, Heimberg H, Chi NM, Mueckler M. Glucosamine-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is caused by depletion of intracellular ATP, *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 20658–20668.
- Huffaker TC & Robbins PW. Temperature-sensitive yeast mutants deficient in asparagine-linked glycosylation. *J. Biol. Chem.* 1982; 257(6): 3203-3210.
- Hutchins MU & Klionsky DJ: Vacuolar localization of oligomeric α -mannosidase requires the cytoplasm to vacuole targeting and autophagy pathway components in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 20491–8.
- Jackson SP & Tjian R. O-glycosylation of eukaryotic transcription factors: implications for mechanisms of transcriptional regulation. *Cell.* 1988; 55: 125-33.
- Jackson BJ, Kukuruzinska MA et al. "Biosynthesis of asparagine-linked oligosaccharides in *Saccharomyces cerevisiae*: the *alg2* mutation." *Glycobiology.* 1993; 3(4): 357-364.
- Jaeken J & Carchon H. The carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes: An overview. *J Inherit Metab Dis.* 1993; 16:813–820.
- Johansen PG, Marshal RD, et al. Carbohydrates in protein. The preparation and some of the properties of a glycopeptide from hen egg ovalbumin. *Biochem.* 1961; J. 78: 518-527.
- Jones J, Krag SS, Betenbaugh MJ. Controlling N-linked glycan site occupancy. *Biochim Biophys Acta.* 2005; 1726(2):121-37.
- Junod, Lambert AE, Orci L, Pictet R, Gonet AE, Renold AE. Studies of the diabetogenic action of streptozotocin, *Proc. Soc. Exp. Biol.Med.* 1967; 126: 201–205.
- Kaushal GP & Elbein AD. Glycoprotein processing enzymes of plants. *Methods Enzymol.* 1989; 179: 452-75.
- Kamemura K, Hayes BK, Comer FI, Hart GW. 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.* 2002; 277: 19229-35.
- Kawauchi K, Araki K, Tobiume K, Tanaka N. Loss of p53 enhances catalytic activity of IKK {beta} through O-linked {beta}-N-acetyl glucosamine modification, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009; 106: 3431–3436.

- Kimura Y & Ohno A. A new peptide-N4-(acetyl- β -glucosaminy) asparagine amidase from soybean (*Glycine max*) seeds: purification and substrate specificity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1998; 62: 412–8.
- Kimura Y, Matsuo S, Tsurusaki S, Kimura M, Hara-Nishimura I, Nishimura M. Subcellular localization of endo- β - N-acetylglucosaminidase and high-mannose type free N-glycans in plant cell. *Biochim. Biophys. Acta.* 2002; 1570: 38–46.
- Kmićecik D, Herman V, Stroop CJ, Michalski JC, Mir AM, Labiau O, Verbert A, Cacan R. Catabolism of glycan moieties of lipid intermediates leads to a single Man5GlcNAc oligosaccharide isomer: a study with permeabilized CHO cells. *Glycobiology.* 1995; 5: 483–94.
- Kiffin R, Christian C, Knecht E, Cuervo A. Activation of chaperone-mediated autophagy during oxidative stress. *Mol. Biol. Cell.* 2004; 15: 4829–4840.
- Kim EJ, Kang DO, Love DC, Hanover JA. Enzymatic characterization of O-GlcNAcase isoforms using a fluorogenic GlcNAc substrate. *Carbohydr Res.* 2006; 341: 971-82.
- Kishimoto T, Watanabe M, Mitsui T, Hori H. Glutelin basic subunits have a mammalian mucin-type O-linked disaccharide side chain. *Arch Biochem Biophys.* 1999; 370(2): 271-7.
- Kleizen B & Braakman I. Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Current Opinion in Cell Biology.* 2004; 16: 343-349.
- Knapp S, Vocadlo DJ, Gao Z, et al. NAG-thiazoline, an N-acetyl- β -hexosaminidase inhibitor that implicates acetamido participation. *J Am Chem Soc.* 1996; 118: 6804-5.
- Knop M, Finger A, Braun T, Hellmuth K, Wolf DH. Der1, a novel protein specifically required for endoplasmic reticulum degradation in yeast. *Embo J.* 1996; 15: 753-763.
- Komatsu M et al. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J. Cell Biol.* 2005; 169: 425–434.
- Komatsu M et al. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature.* 2006; 441: 880–884.
- Konrad RJ, Mikolaenko I, Tolar JF, Liu K, Kudlow JE. The potential mechanism of the diabetogenic action of streptozotocin: inhibition of pancreatic beta-cell OGlcNAc selective N-acetyl-beta-D-glucosaminidase. *Biochem. J.* 2001; 356: 31–41.
- Kornfeld R, Bao M, Brewer K, Noll C, Canfield WM. Molecular cloning and functional expression of two splice forms of human N-acetylglucosamine-1-phosphodiester alpha-N-acetylglucosaminidase, *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 32778–32785.
- Kornfeld R & Kornfeld S. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem.* 1985; 54: 631-64.
- Kudo M, Bao M, D'Souza A, Ying F, Pan H, Roe BA, Canfield WM. The α - and β - subunits of the human UPD-N-acetylglucosamine: lysosomal enzyme Nacetylglucosamine- 1-phosphotransferase are encoded by a single cDNA, *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 36141–36149.

- Kuma A, Hatano M, Matsui, M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, Ohsumi Y, Tokuhiya T. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature*. 2004; 432: 1032–1036.
- Kuranda MJ & Robbins PW. Cloning and heterologous expression of glycosidase genes from *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987; 84:2585–2589.
- 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.* 1997; 272: 9308–9315.
- Kreppel LK & Hart GW. Regulation of a cytosolic and nuclear O-GlcNAc transferase. Role of the tetratricopeptide repeats. *J Biol Chem*. 1999; 274: 32015-22.
- Kytzia HJ & Sandhoff K. Evidence for two different active sites on human beta-hexosaminidase A. Interaction of GM2 activator protein with beta-hexosaminidase A. *J. Biol. Chem.* 1985; 260: 7568–7572.
- Lal A, Pang P, Kalelkar S, Romero PA, Herscovics A, Moremen KW. Substrate specificities of recombinant murine Golgi alpha1, 2-mannosidases IA and IB and comparison with endoplasmic reticulum and Golgi processing alpha1,2-mannosidases, *Glycobiology*. 1998; 8: 981–95.
- Lamb JR, Tugendreich S, Hieter P. Tetratricopeptide repeat interactions: to TPR or not to TPR? *Trends Biochem Sci*. 1995; 20: 257-9.
- Lazarus BD, Roos MD, Hanover JA. Mutational analysis of the catalytic domain of O-linked N-acetylglucosaminyl transferase. *J Biol Chem*. 2005; 280: 35537-44.
- Lazzarino & Gabel C. Mannose processing is an important determinant in the assembly of phosphorylated high mannose-type oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* 1989; 264: 5015–5023.
- Lefebvre, T, Planque N, Leleu D, Bailly M, Caillet-Boudin ML, Saule S, Michalski JC. O-glycosylation of the nuclear forms of Pax-6 products in quail neurotina cells. *J. Cell. Biochem*. 2002; 85: 208-218.
- Lederkremer GZ & Glickman MH. A window of opportunity: timing protein degradation by trimming of sugars and ubiquitins. *Trends Biochem. Sci.* 2005; 30: 297–303.
- Lee TN, Alborn WE, Knierman MD, Konrad RJ. Alloxan is an inhibitor of O-GlcNAc-selective N-acetyl-beta-D-glucosaminidase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 350: 1038-43.
- Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 2008; 51: 216-26.
- Lee W, Payne B, Gelfman C, Vogel P, Kornfeld S. Murine UDP-GlcNAc: lysosomal enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase lacking the gamma-subunit retains substantial activity toward acid hydrolases, *J. Biol. Chem*. 2007; 282: 27198–27203.

- Lhernould S, Karamanos Y, Bourgerie S, Strecker G, Julien R, Morvan H. Peptide-N4-(N-acetylglucosaminyl) asparagine amidase (PNGase) activity could explain the occurrence of extracellular xylomannosides in a plant cell suspension. *Glycoconjugate J.* 1992; 9: 191–7.
- Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Hart GW, Gong CX. O-GlcNAcylation regulates phosphorylation of tau: a mechanism involved in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101: 10804-9.
- Lippincott-Schwartz J, Bonifacino JS, Yuan LC, Klausner RD. Degradation from the endoplasmic reticulum: disposing of newly synthesized proteins *Cell.* 1988; 54: 209–220.
- Lilley BN & ploegh HL. A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER. *Nature.* 2004; 429: 834-840.
- Longmore GD & Schachter H. Product-identification and substrate-specificity studies of the GDP-L-fucose: 2-acetamido- 2-deoxy-beta-D-glucoside (FUC goes to Asn-linked GlcNAc) 6-alpha-L-fucosyltransferase in a Golgi-rich fraction from porcine liver, *Carbohydr Res.* 1982; 100: 365–92.
- Lowe JB & Marth JD. A genetic approach to Mammalian glycan function. *Annu Rev Biochem.* 2003; 72:643-91.
- Lubas WA & Spiro RG. Evaluation of the role of rat liver Golgi endo-alpha-D-mannosidase in processing N-linked oligosaccharides. *J Biol Chem.* 1988; 263, 3990–8.
- Lubas WA & Hanover JA. Functional expression of O-linked GlcNAc transferase. Domain structure and substrate specificity. *J Biol Chem.* 2000; 275: 10983-8.
- Lubas WA, Frank DW, Krause M, Hanover JA. O-Linked GlcNAc transferase is a conserved nucleocytoplasmic protein containing tetratricopeptide repeats. *J Biol Chem.* 1997; 272: 9316-24.
- Macauley MS & Vocadlo DJ. Enzymatic characterization and inhibition of the nuclear variant of human O-GlcNAcase. *Carbohydr Res.* 2009; 344: 1079-84.
- Macauley, Whitworth GE, Debowski AW, Chin D, Vocadlo DJ. OGlcNAcase uses substrate-assisted catalysis: kinetic analysis and development of highly selective mechanism-inspired inhibitors, *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 25313–25322.
- Macauley MS, Bubb AK, Martinez-Fleites C, Davies GJ, Vocadlo DJ. Elevation of global O-GlcNAc levels in 3T3-L1 adipocytes by selective inhibition of O-GlcNAcase does not induce insulin resistance, *J. Biol. Chem.* 2008; 283: 34687–34695.
- Matthews JA, Belof JL, Acevedo-Duncan M, Potter RL. Glucosamine-induced increase in Akt phosphorylation corresponds to increased endoplasmic reticulum stress in astroglial cells, *Mol. Cell. Biochem.* 2007; 298: 109–123.
- Marshall RD & Neuberger A. *Carbohydrates in protein*; 8. The isolation of 2-acetamido-1-(1-beta-aspartamido)-1,2-dideoxy-beta-d-glucose from hen's egg albumin. *Biochemistry.* 1964; 20 (1596-1600).

- Marshall S, Nadeau O, Yamasaki K. Dynamic actions of glucose and glucosamine on hexosamine biosynthesis in isolated adipocytes: differential effects on glucosamine 6-phosphate, UDP-N-acetylglucosamine, and ATP levels, *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 35313–35319.
- Marshall S, Yamasaki K, Okuyama R. Glucosamine induces rapid desensitization of glucose transport in isolated adipocytes by increasing GlcN-6-P levels, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005; 329: 1155–1161.
- Massey A, Zhang C, Cuervo A. Chaperone-mediated autophagy in aging and disease. *Curr. Top Dev. Biol.* 2006b; 73: 205–235.
- McClain DA, Lubas WA, Cooksey RC, Hazel M, Parker GJ, Love DC, Hanover JA. Altered glycan-dependent signaling induces insulin resistance and hyperleptinemia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002; 99: 10695–10699.
- Mellman I. Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1996; 12:575-625.
- Misago M, Liao YF, Kudo S, Eto S, Mattei MG, Moremen KW, Fukuda MN. Molecular cloning and expression of cDNAs encoding human alpha-mannosidase II and a previously unrecognized alpha-mannosidase IIx isozyme. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92: 11766–70.
- Mizushima N & Klionsky DJ. Protein turnover via autophagy: Implications for metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 2007; 27: 19–40.
- Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature.* 2008; 451: 1069–75.
- Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol. Biol. Cell.* 2004; 15: 1101–1111.
- Moremen KW. Isolation of a rat liver Golgi mannosidase II clone by mixed oligonucleotide-primed amplification of cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989; 86: 5276–80.
- Moremen KW. Golgi alpha-mannosidase II deficiency in vertebrate systems: Implications for asparagine-linked oligosaccharide processing in mammals, *Biochim Biophys Acta.* 2002; 1573, 225–35.
- Moremen KW, Touster O, Robbins PW. Novel purification of the catalytic domain of Golgi alpha-mannosidase II. Characterization and comparison with the intact enzyme, *J Biol Chem.* 1991; 266: 16876– 85.
- Moore SEH. Transport of free polymannose-type oligosaccharides from the endoplasmic reticulum into the cytosol is inhibited by mannosides and requires a thapsigargin-sensitive calcium store. *Glycobiology.* 1998; 8: 373–81.
- Moore SEH, Bauvy C, Codogno P. Endoplasmic reticulumto- cytosol transport of free polymannose oligosaccharides in permeabilized HepG2 cells. *EMBO J.* 1995; 14: 6034–42.

- Nakatsukasa K & Brodsky JL. The recognition and retrotranslocation of misfolded proteins from the endoplasmic reticulum. *Traffic*. 2008; 9: 861–870.
- Ngoh GA, Watson LJ, Facundo HT, Jones SP. Augmented O-GlcNAc signaling attenuates oxidative stress and calcium overload in cardiomyocytes. *Amino Acids*. 2011; 40(3):895-911.
- Oda Y, Hosoiwa N, Wada I, Nagata K. EDEM as an acceptor of terminally misfolded glycoproteins released from calnexin. *Science*. 2003; 299: 1394-1397.
- Ogata M, Hino S, Saito A, Morikawa K, Kondo S, Kanemoto S, Murakami T, Taniguchi M, Tani I, Yoshinaga K, Shiosaka S, Hammarback JA., Urano F and Imaizumi K. Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol. Cell Biol*. 2006; 26: 9220–31.
- Okajima T, Fukumoto S, et al. "Molecular basis for the progeroid variant of Ehlers–Danlos syndrome. Identification and characterization of two mutations in galactosyltransferase I gene." *J. Biol. Chem*. 1999; 274: 28841–28844.
- Okuyama R & Yachi M. Cytosolic O-GlcNAc accumulation is not involved in betacell death in HIT-T15 or Min6, *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2001; 287: 366–371.
- Oku H & Hase S. Studies on the substrate specificity of neutral α -mannosidase purified from Japanese quail oviduct by using sugar chains from glycoproteins. *J. Biochem. (Tokyo)*. 1991; 110, 982–9.
- Olivari S, Cali T, Salo KE, Paganetti P, Ruddock LW, Molinari M. EDEM1 regulates ER-associated degradation by accelerating de-mannosylation of folding-defective polypeptides and by inhibiting their covalent aggregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2006; 349: 1278–1284.
- Overdijk B, van der Kroef WM, van Steijn GJ, Lisman JJ. Isolation and further characterization of bovine brain hexosaminidase C. *Biochim Biophys Acta*. 1981; 659: 255-66.
- O'Donnell N, Zachara NE, Hart GW, Marth JD. Ogt-dependent X-chromosome-linked protein glycosylation is a requisite modification in somatic cell function and embryo viability. *Mol Cell Biol*. 2004; 24: 1680–1690.
- Park SY, Ryu J, Lee W. O-GlcNAc modification on IRS-1 and Akt2 by PUGNAc inhibits their phosphorylation and induces insulin resistance in rat primary adipocytes. *Exp. Mol. Med*. 2005; 37: 220–229.
- Pathak S, Dorfmüller HC, Borodkin VS, van Aalten DM. Chemical dissection of the link between streptozotocin, O-GlcNAc, and pancreatic cell death. *Chem. Biol*. 2008; 15: 799–807.
- Pilon M, Schekman R, Romisch K. Sec6 mediates export of a misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum to the cytosol for degradation. *Embo J*. 1997; 16: 45-40-4548.
- Poenaru L & Dreyfus JC. Electrophoretic study of hexosaminidases. Hexosaminidase C. *Clin Chim Acta*. 1973; 43: 439-42.

- Proia RL. Gene encoding the human beta-hexosaminidase beta chain: extensive homology of intron placement in the alpha-and beta chain genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1988; 85: 1883–1887.
- Priem B, Morvan H, Gross KC. Unconjugated N-glycans as a new class of plant oligosaccharins. *Biochem. Soc. Trans.* 1994; 22: 398–402.
- Priem B, Solo Kwan J, Wieruszeski JM, Strecker G, Nazih H, Morvan H. Isolation and characterization of free glycans of the oligomannose type from the extracellular medium of a plant cell suspension. *Glycoconjugate J.* 1990; 7: 121–32.
- Raas-Rothschild A, Cormier-Daire V, Bao M, Genin E, Salomon R, Brewer K, Zeigler M, Mandel H, Toth S, Roe B, Munnich A, Canfield WM.. Molecular basis of variant pseudo-Hurler polydystrophy (mucopolidosis IIIC), *J. Clin. Invest.* 2000; 105: 673–681.
- Rao FV, Dorfmueller HC, Villa F, Allwood M, Eggleston IM, van Aalten DM. Structural insights into the mechanism and inhibition of eukaryotic O-GlcNAc hydrolysis. *EMBO J.* 2006; 25: 1569–1578.
- Rohrer J & Kornfeld R. Lysosomal hydrolase mannose 6-phosphate uncovering enzyme resides in the trans-Golgi network, *Mol. Biol. Cell.* 2001; 12: 1623–1631.
- Saint-Pol A, Codogno P, Moore SEH. Cytosol-to-lysosome transport of free polymannose-type oligosaccharides. Kinetic and specificity studies using rat liver lysosomes. *J. Biol. Chem.* 1999; 274:13547–55.
- Sayeed A & Ng DT. Search and destroy: ER quality control and ER-associated protein degradation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2005; 40: 75–91.
- Sandhoff K & Christomanou H. Biochemistry and genetics of gangliosidoses. *Hum.Genet.* 1979; 50: 107-43.
- Schachter H. Biosynthetic controls that determine the branching and microheterogeneity of protein-bound oligosaccharides. *Biochem Cell Biol.* 1986; 64(3):163-81.
- Schnedl WJ, Ferber S, Johnson JH, Newgard CB. STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells, *Diabetes* 1994; 43: 1326–1333.
- Schachter H. The joys of HexNAc. The synthesis and function of N- and O-glycan branches. *Glycoconj J.* 2000; 17: 465–83.
- Silberstein S & Gilmore R. Biochemistry, molecular biology, and genetics of the oligosaccharyltransferase. *FASEB J.* 1996; 10: 849–858.
- Slawson C, Zachara NE, Vosseller K, Cheung WD, Lane MD, Hart GW. Perturbations in O-linked beta-N-acetylglucosamine protein modification cause severe defects in mitotic progression and cytokinesis, *J. Biol. Chem.* 280. 2005; 32944–32956.
- Slawson C, Lakshmanan T, Knapp S, Hart GW. A mitotic GlcNAcylation/phosphorylation signaling complex alters the posttranslational state of the cytoskeletal protein vimentin. *Mol. Biol. Cell.* 2008; 19: 4130–4140.

- Spiro RG, Zhu Q, Bhoyroo V, Soling HD. Definition of the lectine-like properties of the molecular chaperone, calreticulin, and demonstration of its copurification with endomannosidase from rat liver Golgi. *J Biol Chem.* 1996; 271: 11588-11594.
- Suzuki T, Park H, Lennarz WJ. Cytoplasmic peptide: N-glycanase (PNGase) in eukaryotic cells: occurrence, primary structure, and potential functions. *FASEB J.* 2002; 16(7):635-41.
- Suzuki T, Park H, Hollingsworth NM, Sternglanz R, Lennarz WJ. PNG1, a yeast gene encoding a highly conserved peptide: N-glycanase. *J Cell Biol.* 2000; 149: 1039–1052.
- Suzuki T & Lennarz WJ. Hypothesis: a glycoprotein-degradation complex formed by protein–protein interaction involves cytoplasmic peptide: N-glycanase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003; 302: 1–5.
- Suzuki T, Seko A, Kitajima K, Inoue Y, Inoue S. Identification of peptide: N-glycanase activity in mammalian-derived cultured cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993; 194: 1124–30.
- Suzuki T, Yano K, Sugimoto S, Kitajima K, Lennarz WJ, Inoue S, Inoue Y, Emori Y. Endo- β -N-acetylglucosaminidase, an enzyme involved in processing of free oligosaccharides in the cytosol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002; 99, 9691–6.
- Suzuki T, Park H, Kitajima K, Lennarz WJ. Peptides glycosylated in the endoplasmic reticulum of yeast are subsequently deglycosylated by a soluble peptide: N-glycanase activity. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 21526–30.
- Stubbs KA, Macauley MS, Vocadlo DJ. A selective inhibitor Gal-PUGNAc of human lysosomal beta-hexosaminidases modulates levels of the ganglioside GM2 in neuroblastoma cells, *Angew Chem., Int. Ed.* 2009; 48: 1300–1303.
- Tan J, D'Agostaro AF, Bendiak B, Reck F, Sarkar M, Squire JA, Leong P, Schachter H. The human UDP-N-acetylglucosamine: α -6-D-mannoside-beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase II gene (MGAT2). Cloning of genomic DNA, localization to chromosome 14q21, expression in insect cells and purification of the recombinant protein, *Eur J Biochem.* 1995; 231: 317–28.
- 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.* 2004; 279: 53665-73.
- Toleman C, Paterson AJ, Kudlow JE. Location and characterization of the O-GlcNAcase active site. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1760: 829-39.
- Torres CR & Hart GW. Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc. *J Biol Chem.* 1984; 259: 3308-17.

- Tucker KA, Reggiori F, Dunn WA Jr, Klionsky DJ. Atg23 is essential for the cytoplasm to vacuole targeting pathway and efficient autophagy but not pexophagy. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 48445-48452.
- Tulsiani DR & Touster O. Substrate specificities of rat kidney lysosomal and cytosolic α -D-mannosidases and effects of swainsonine suggest a role of the cytosolic enzyme in glycoprotein catabolism. *J. Biol. Chem.* 1987; 262: 6506–14.
- Tulsiani DR, Opheim DJ, Touster O. Purification and characterization of alpha-D-mannosidase from rat liver golgi membranes, *J Biol Chem.* 1977; 252: 3227–33.
- Tremblay LO & Herscovics A. Characterization of a cDNA encoding a novel human Golgi alpha 1, 2-mannosidase (IC) involved in N-glycan biosynthesis, *J Biol Chem.* 2000; 275: 31655–60.
- Varki A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiologie.* 1993; 3(2):97-130.
- Varki A, Cummings R, Esko J, Freeze H, Hart G, Marth J. *Essentials of glycobiology.* Cold Spring Harbor-New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1999.
- Vashist S & Ng DT. Misfolded proteins are sorted by a sequential checkpoint mechanism of ER quality control. *J Cell Biol.* 2004; 165: 41-52.
- Vosseller K, Wells L, Lane MD, Hart GW. Elevated nucleocytoplasmic glycosylation by O-GlcNAc results in insulin resistance associated with defects in Akt activation in 3T3-L1 adipocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002; 99: 5313–5318.
- Watanabe K. Biochemical studies on carbohydrates: XXII. On animal β -N-Monoacetylglucosaminidase. *J. Biochem. (Tokyo)* 1936; 24: 297–303.
- Walgren JL, Vincent TS, Schey KL, Buse MG. High glucose and insulin promote O-GlcNAc modification of proteins, including alpha-tubulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003; 284: E424-34.
- Ware FE, Vassilakos A, Peterson PA, Jackson MR, Lehrman MA, Williams DB. The molecular chaperone calnexin binds Glc1Man9GlcNAc2 oligosaccharide as an initial step in recognizing unfolded glycoproteins. *J Biol Chem.* 1995; 270: 4697-4704.
- Weng S & Spiro RG. Evaluation of the early processing routes of N-linked oligosaccharides of glycoproteins through the characterization of Man8GlcNAc2 isomers: evidence that endomannosidase functions in vivo in the absence of a glucosidase blockade. *Glycobiology.* 1996; 6: 861–8.
- Weng S & Spiro RG. Demonstration that a kifunensine-resistant α -mannosidase with a unique processing action on N-linked oligosaccharides occurs in rat liver endoplasmic reticulum and various cultured cells. *J. Biol. Chem.* 1993; 268, 25656–63.

- Weng S & Spiro RG. Endoplasmic reticulum kifunensine resistant α -mannosidase is enzymatically and immunologically related to the cytosolic α -mannosidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 1996; 325: 113–23.
- Whisenhunt TR, Yang X, Bowe DB, Paterson AJ, Van Tine BA, Kudlow JE. Disrupting the enzyme complex regulating O-GlcNAcylation blocks signaling and development. *Glycobiology.* 2006; 16: 551-563.
- Whitworth GE, Macauley MS, Stubbs KA, Dennis RJ, Taylor EJ, Davies GJ, Greig IR, Vocadlo DJ. Analysis of PUGNAc and NAG-thiazoline as transition state analogues for human O-GlcNAcase: mechanistic and structural insights into inhibitor selectivity and transition state poise. *J. Am. Chem. Soc.* 2007; 129: 635–644.
- Winchester B. Lysosomal metabolism of glycoproteins. *Glycobiology.* 2005; 15(6):1R-15R.
- Wilson JR, Williams D, Schachter H. The control of glycoprotein synthesis: N-acetylglucosamine linkage to a mannose residue as a signal for the attachment of L-fucose to the asparagine-linked N-acetylglucosamine residue of glycopeptide from alpha1-acid glycoprotein, *Biochem Biophys Res Commun.* 1976; 72: 909–16.
- Wu Y, Swulius MT, Moremen KW, Sifers RN. Elucidation of the molecular logic by which misfolded alpha 1-antitrypsin is preferentially selected for degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003; 100: 8229–8234.
- Xu X, Kanbara K, Azakami H, Kato A. Expression and characterization of *Saccharomyces Cne1p*, a calnexin homologue. *J Biochem.* 2004; 135: 615-618.
- Yan Q & Lennarz WJ. Oligosaccharyltransferase: a complex multisubunit enzyme of the endoplasmic reticulum. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 266(3): 684-9.
- Yang WH, Kim JE, Nam HW, Ju JW, Kim HS, Kim YS, Cho JW. Modification of p53 with O-linked N-acetylglucosamine regulates p53 activity and stability. *Nat. Cell Biol.* 2006; 8: 1074–1083.
- Yang X, Ongusaha PP, Miles PD, Havstad JC, Zhang F, So WV, Kudlow JE, Michell RH, Olefsky JM, Field SJ, Evans RM. Phosphoinositide signalling links O-GlcNAc transferase to insulin resistance. *Nature.* 2008; 451: 964–969.
- Yamamoto, Uchigata Y, Okamoto H. Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly (ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets, *Nature.* 1981; 294: 284–286.
- Yamashiro K, Itoh H, Yamagishi M, Natsuka S, Mega T, Hase S. Purification and characterization of neutral α -mannosidase from hen oviduct: studies on the activation mechanism of Co^{2+} . *J. Biochem. (Tokyo).* 1997; 122: 1174–81.
- Yoshida A, Kobayashi K, et al. Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase, POMGnT1. *Dev. Cell.* 2001; 1: 717-724.
- Yoshida Y. A novel role for N-glycans in the ERAD system. *J. Biochem. (Tokyo).* 2003; 134: 183–90.

- Yoshihisa T & Anraku Y. A novel pathway of import of α -mannosidase, a marker enzyme of vacuolar membrane, in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 1990; 265, 22418–25.
- Yunovitz H, Gross, KC. Delay of tomato fruit ripening by an oligosaccharide N-glycan. Interactions with IAA, galactose and lectins. *Physiol. Plant.* 1994; 90: 152–6.
- Yu H & Chen X. Carbohydrate post-glycosylational modifications. *Org Biomol Chem.* 2007; 5(6): 865-72.
- Yuzwa SA, Macauley MS, Heinonen JE, Shan X, Dennis RJ, He Y, Whitworth GE, Stubbs KA, McEachern EJ, Davies GJ, Vocadlo DJ. A potent mechanism-inspired O-GlcNAcase inhibitor that blocks phosphorylation of tau in vivo, *Nat. Chem. Biol.* 2008; 4: 483–490.
- Zachara NE & Hart GW. O-GlcNAc modification: a nutritional sensor that modulates proteasome function. *Trends Cell Biol.* 2004; 14(5): 218-21.
- Zou L, Yang S, Hu S, Chaudry IH, Marchase RB, Chatham JC. The protective effects of PUGNAc on cardiac function after trauma–hemorrhage are mediated via increased protein O-GlcNAc levels. *Shock.* 2007; 27: 402–408.
- Zuber C, Spiro MJ, Guhl B, Spiro RG, Roth J. Golgi apparatus immunolocalization of endomannosidase suggests postendoplasmic reticulum glucose trimming: implications for quality control, *Mol Biol Cell.* 2000; 11: 4227–40.

Abstract

Free oligosaccharides (fOS) are generated as a result of glycoproteins catabolism that occurs in two principal distinct pathways: the endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) of misfolded newly synthesized *N*-glycoproteins and the mature *N*-glycoproteins turnover pathway. We analyzed fOS by Mass spectrometry in PUGNAc CHO treated cells in order to investigate whether *O*-GlcNAc modified proteins were involved in *N*-glycoprotein degradation process. The O-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene) amino-N-phenylcarbanate (PUGNAc) is a potent inhibitor of the O-GlcNAcase (OGA) catalyzing the cleavage of β -O-linked 2-acetamido-2-deoxy-beta-D-glucopyranoside (O-GlcNAc) from serine and threonine residues of post-translationally modified proteins.

Mass spectrometry (MS) analysis revealed the appearance of an unusual population of fOS after PUGNAc treatment. The structures representing this population have been identified as containing non-reducing end GlcNAc residues resulting from incomplete lysosomal fOS degradation. Only observed after PUGNAc treatment, the NButGt, another OGA inhibitor, did not lead to the appearance of the population. These structures have clearly been shown to accumulate in membrane fractions as the consequence of lysosomal β -hexosaminidases inhibition by PUGNAc. As Lysosomal Storage Disorders (LSD) are characterized by the accumulation of fOS in various tissues, our study evokes that PUGNAc mimics a LSD and shows another off target effects that needs to be taken into account in the use of this drug.

Key words: *O*-GlcNAc, fOS, PUGNAc, OGA, lysosomal β -hexosaminidases.

Résumé

Les oligosaccharides solubles (OS) sont essentiellement générés durant le processus de dégradation des *N*-glycoprotéines nouvellement synthétisées et mal conformées (ERAD) et durant la voie « turn-over » des glycoprotéines matures. Dans le but de déterminer si la modification post-traductionnelle *O*-GlcNAc est impliquée dans le processus de dégradation des *N*-glycoprotéines, nous avons analysé par spectrométrie de masse les OS provenant des cellules CHO après traitement par l'inhibiteur PUGNAc. Le PUGNAc ou « O-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene) amino-N-phenylcarbanate » est un inhibiteur puissant de l'*O*-GlcNAcase (OGA) qui catalyse l'hydrolyse du résidu GlcNAc des résidus sérine et thréonine des protéines *O*-GlcNAcylées.

L'analyse par spectrométrie de masse révèle l'apparition d'une population d'OS anormale dans les cellules CHO suite au traitement par le PUGNAc. Cette population oligosaccharidique a été identifiée comme comportant des structures possédant des résidus GlcNAc au niveau de leur extrémité non-réductrice issues d'une dégradation lysosomale incomplète des *N*-glycoprotéines. Contrairement au PUGNAc, le NBut-GT, un autre inhibiteur de l'OGA, n'aboutit pas à l'apparition de cette population oligosaccharidique. Ainsi, nous avons démontré que ces structures s'accumulent exclusivement dans la fraction membranaire, conséquence de l'inhibition des β -hexosaminidases lysosomales par le PUGNAc. Notre étude a permis, d'une part, de mettre en évidence la capacité du PUGNAc à mimer une maladie de surcharges lysosomales et, d'autre part, de montrer un autre aspect des effets secondaires induits par le PUGNAc et qui nécessite d'être pris en considération lors de l'utilisation de cet inhibiteur.

Mots clés : O-GlcNAc, OS, PUGNAc, OGA, β -hexosaminidases.