



Ecole Doctorale Biologie-Santé de Lille

## THÈSE

En vue de l'obtention du titre de

**Docteur de l'Université de Lille 1**

Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

Présentée et soutenue le 11 mai 2012 par

**Yobana PÉREZ CERVERA**

**Etude des relations**

**"O-GlcNAcylation et microdomaines lipidiques"**

**Jury :**

**Président :** Dr. Jean Claude MICHALSKI

**Rapporteurs :** Pr. Ralph SCHWARZ

Dr. Tarik ISSAD

**Examineurs :** Pr. Edgar ZENTENO

Dr. Ikram EL YAZIDI-BELKOURA

**Directeur de thèse :** Pr. Tony LEFEBVRE

*A*

*Mi familia: Lucero, Edgar y Jefferson y  
A mis Amig@s, ¡este logro es dedicado a ellos!*

## REMERCIEMENTS

## AGRADECIMIENTOS

### *Au Pr. Tony LEFEBVRE*

*Mes grands remerciements vont tout d'abord au Pr. Tony Lefebvre, mon directeur de thèse. Merci pour sa grande patience, enthousiasme, dynamisme, pour m'avoir donné l'opportunité de travailler avec toi, et pour m'avoir confié ce sujet aussi passionnant et sur tout pour ton soutien sans lequel cette thèse n'aura lieu. Je suis vraiment heureuse d'avoir partagé ces trois années avec toi et Je voudrais que cette expérience puisse être le commencement d'une grande collaboration.*

### *Au Pr. Edgar ZENTENO*

*No tengo palabras para agradecer el gran apoyo que me ha brindado en toda mi carrera de postgrado (Maestría y Doctorado), he cumplido mis dos sueños propuestos al salir de Colombia, la maestría en la UNAM (México) y el Doctorado en Europa y usted ha sido co-autor de estos sueños.*

### *Au Dr. Jean-Claude MICHALSKI*

*Je voudrais aussi vous remercier pour m'avoir accueilli dans votre laboratoire, d'avoir accepté de présider mon jury de thèse et pour avoir partagé vos différentes connaissances culturelles lorsqu'on a eu l'opportunité.*

### *Au Honorable Jury*

*Je tiens vivement à remercier les personnes ayant accepté de faire partie de mon jury de thèse. Merci donc au Pr. Tarik ISSAD et au Pr. Ralph SCHWARZ qui ont accepté la tâche d'être rapporteurs de ce manuscrit. Au Dr. Ikram EL YAZIDI-BELKOURA et au Pr. Edgar ZENTENO d'avoir accepté d'être examinateurs de mes travaux.*

### *Au Dr. Annick Pierce*

*Je tiens à remercier pour sa collaboration, son soutien et ses conseils avisés dans les différents échanges que nous avons eu.*

### *A la Dra. Carmen Ferragut*

*Sinceramente agradezco a Dios, por haber permitido conocerte, agradezco tanto, todo tu apoyo y la ayuda en mi adaptación en Francia, gracias por cada palabra, por cada gesto, por cada acción que me han hecho crecer tanto emocional como profesionalmente, nunca olvidare, las navidades cálidas y llenas de amor que pase en tu casa.*

### **Au C9**

*Je voudrais remercier plusieurs personnes du C9 par les échanges scientifiques, administratifs et culturels : Florence Delplace, Isabel, Martine, Nadège, Gaëlle, Céline (Merci pour la lecture de mon manuscrit), Anne Sophie-Vercoutter, Marlène, Ivon, Stéphanie, Anne Marie, Vanessa.*

### **A Mis amigos**

*Por todos los buenos momentos, por sus consejos y el apoyo brindado en estos años de tesis: Brenda, German, Temis, Alberto, Beatriz, Sophie, Mayeline, Angela, Marisol, Laura, Paulina Doc, Pau, Eddy, Maribel, Socorro, Carlos, Diego Quiroga, Rossy, Alejandra, Marisol, Betsy, Nicolas, Juan Carlos, Ludivine, Briggite Marie B, Agatha, Aurèlie, Florent, Esthelle, Adelma, Adeline, Romain, Jennifer, Dra. Cecilia de Plata, Rossy (Ciencias Químicas, UNAM), Katia (bonne continuation avec les rafts !!),*

### **A mi Familia**

*Muchas gracias por apoyarme siempre en las decisiones que tomo, por ser mi punto de equilibrio por brindarme su amor incondicional y por soportar mis largas ausencias, ¡los quiero mucho!*

*Ces travaux ont été réalisés sous la direction du Pr. **Tony LEFEBVRE** au sein de l'équipe "Glycobiologie de la signalisation cellulaire et pathologies associées à la O-GlcNAcylation" dans l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UMR CNRS 8576) dirigée par le Dr. **Jean Claude MICHALSKI**. Ces expériences ont été effectuées de fin mars 2009 à fin septembre 2011.*

*Cette étude a été financée par le « Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal » (ICTyDF), Ville du Mexique, sous la forme d'une bourse « **Rosalind Franklin** », l'**Université Lille 1** et **ECOS NORD** No.M09S02*

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

- **PUBLICATIONS**

1. **Yobana PEREZ-CERVERA**, Stéphanie OLIVIER, Carlos Josué SOLORZANO MATA, Jean- Claude MICHALSKI, François FOULQUIER and Tony LEFEBVRE. "*Insulin signaling controls the expression of O-GlcNAc transferase and its interaction with lipid microdomains*". Journal of Biological Chemistry. In preparation.
2. **PEREZ-CERVERA Y**, HARICHAUX G, SCHMIDT J, DEBIERRE-GROCKIEGO F, DEHENNAUT V, BIEKER U, Meurice E, LEFEBVRE T, SCHWARZ RT. "*Direct evidence of O-GlcNAcylation in the apicomplexan Toxoplasma gondii: a biochemical and bioinformatic study*". Amino Acids. 2011 Mar; 40(3):847-56.
3. Stéphanie OLIVIER, Céline GUINEZ, Anne-Marie MIR, **Yobana PEREZ-CERVERA**, Chunming LIU, Jean-Claude MICHALSKI, Tony LEFEBVRE. "*The hexosamine biosynthetic pathway and O-GlcNAcylation drive the expression of  $\beta$ -catenin and cell proliferation*". Am J Physiol Endocrinol Metab. 2011 Nov. 22.

- **COMMUNICATIONS ORALES**

1. **Yobana PEREZ-CERVERA**, Carlos Josué SOLORZANO MATA, Jean- Claude MICHALSKI, François FOULQUIER and Tony LEFEBVRE. "Spatiotemporal organization of OGT and O-GlcNAcylated proteins in lipid rafts for effective insulin signaling pathway". 21 International Symposium on Glycoconjugates. August 21-26, 2011, **Vienna, Austria**.
2. **Yobana PEREZ-CERVERA**, Jean- Claude MICHALSKI, and Tony LEFEBVRE. "Regulación de la señalización por la interacción de O-GlcNAcificación con Microdominios Lipídicos". **Invited speaker**. Department of Biochemistry, Universidad Nacional Autónoma de México. August 16, 2010, **Mexico city, Mexico**.
3. **Yobana PEREZ-CERVERA**, Jean- Claude MICHALSKI, and Tony LEFEBVRE. "Journée *André Verbert 2010*". « La O-GlcNAcylation : une modification post-traductionnelle à l'interface des microdomaines lipidiques et de la voie PI3-KINASE/AKT? Septembre 15, 2010, **Lille, France**.

- **COMMUNICATIONS PAR AFFICHE**

1. **Yobana PEREZ-CERVERA**, Carlos Josué SOLORZANO MATA, Jean- Claude MICHALSKI, François FOULQUIER and Tony LEFEBVRE. “Spatiotemporal organization of OGT and O-GlcNAcylated proteins in lipid rafts for effective insulin signalling pathway”. 21 International Symposium on Glycoconjugates. August 21-26, 2011, **Vienna, Austria**.
2. **Yobana PEREZ-CERVERA**, Jennifer STALLARS, Jean- Claude MICHALSKI, François FOULQUIER and Tony LEFEBVRE. 21th Joint Glycobiology Meeting 2010. **Poster**. The O-GlcNAcylation: a post-translational modification at the lipid microdomains-PI3K/Akt pathway interface? November 7-8, **Ghent, Belgium**.
3. **PEREZ-CERVERA Y**, HARICHAUX G, SCHMIDT J, DEBIERRE-GROCKIEGO F, DEHENNAUT V, BIEKER U, MEURICE E, LEFEBVRE T, SCHWARZ RT. “Direct evidence of O-GlcNAcylation in the apicomplexan *Toxoplasma gondii*: a biochemical and bioinformatic study” XXIIIÈME JOURNÉES DU GFG 2010 » and to the « XXIIIèmes journées de la Chimie et de la Biochimie des Glucides ». 17 au 20 May, **Cap Hornu, France**.

## Résumé

La O-GlcNAcylation est une modification post-traductionnelle appartenant au groupe des glycosylations. C'est une modification dynamique, analogue à la phosphorylation, dont la réversibilité est contrôlée par un couple d'enzymes, la O-GlcNAc transférase (OGT) et la O-GlcNAcase (OGA). Bien que les fonctions de la O-GlcNAcylation aient été étudiées à différents niveaux de régulation cellulaire, aucune étude n'a porté jusqu'ici sur sa localisation potentielle au niveau des radeaux lipidiques (rafts). Or, il a été récemment démontré que l'élévation des niveaux de O-GlcNAcylation participait activement au phénomène de résistance à l'insuline et un nombre important de preuves a également été apporté sur le rôle critique des microdomaines lipidiques dans ce phénomène de résistance. On sait également depuis peu qu'après stimulation par l'insuline, l'OGT est recrutée à la membrane plasmique par l'intermédiaire de son domaine PPO (PIP-binding activity of OGT), et que cette relocalisation inactive la voie de signalisation PI3-kinase/Akt par antagonisme vis-à-vis de la phosphorylation. Ces trois observations suggèrent que l'OGT puisse constituer un relai essentiel permettant de transmettre l'information portée par des stimuli externes au travers de la membrane plasmique, et plus particulièrement des rafts, par le biais d'une régulation des voies de signalisation. Au cours de cette thèse, nous avons adapté une technique permettant de purifier les microdomaines lipidiques, en procédant par une extraction par le détergent CHAPSO suivi d'une étape d'ultracentrifugation. Nos expériences ont montré pour la première fois la localisation de l'OGT et de protéines O-GlcNAcylées, parmi lesquelles nous avons identifié la chaîne bêta du récepteur de l'insuline et Hsp70, au niveau des microdomaines lipidiques. Le recrutement de ces éléments est contrôlé par l'insuline: nous avons en effet observé une association progressive de la glycosyltransférase aux microdomaines lipidiques après stimulation par cette hormone.

Nous avons démontré que, en réponse à l'insuline, l'OGT est recrutée au niveau des lipides rafts, ce qui suggère une régulation négative de la voie PI3-Kinase/Akt par O-GlcNAcylation, au niveau des microdomaines lipidiques. Cette étude est la première suggérant une relation directe entre la O-GlcNAcylation des protéines associées aux rafts et la régulation de la signalisation cellulaire par l'insuline.

En marge de ces travaux, nous avons mis en évidence l'existence de la O-GlcNAcylation chez les deux parasites apicomplexes *Toxoplasma gondii* et *Plasmodium falciparum*. Une approche biochimique et bioinformatique a également permis de prouver l'existence propre de l'OGT chez le toxoplasme.

**Mots Clés:** Microdomaines lipidiques, O-GlcNAc, OGT, voie de signalisation PI3-Kinase/AKT, *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii*



## Abstract

The attachment of O-linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) to proteins is a post-translational modification belonging to the group of glycosylations. This is a dynamic modification, analogous to phosphorylation, which reversibility is controlled by a couple of enzymes, namely the O-GlcNAc transferase (OGT) and the O-GlcNAcase (OGA). Although the functions of O-GlcNAcylation have been studied at different levels of cell regulation, until now none study refers its potential location at the level of lipids microdomains (rafts). Nevertheless, it has been recently shown that an elevation of the O-GlcNAcylation levels are actively involved in the phenomenon of insulin resistance and a significant number of publications also reports the critical role of lipid microdomains in this phenomenon of resistance. Little while ago, we know that after stimulation with insulin, the OGT is recruited to the plasma membrane through its PPO domain (PIP-binding activity of OGT), and that this relocation inactivates the PI3-kinase/Akt signaling pathway by exerting an antagonistic effect on its phosphorylation. These three observations suggest that OGT may play an essential role in signal transmission through its interaction with the plasma membrane and more particularly with the lipid microdomains. During my thesis, we first adapted a technique to purify lipid microdomains, using a method combining an extraction with the detergent CHAPSO followed by an ultracentrifugation step. Our experiments show for the first time that OGT and some O-GlcNAcylated proteins, among which we identified the insulin receptor beta-chain and Hsp70, are located in lipid rafts. The recruitment of these elements is controlled by insulin: we indeed observed a progressive association of the glycosyltransferase to the lipid microdomains after stimulation by this hormone.

We demonstrated that in response to insulin, the OGT is recruited to lipid rafts, suggesting a down-regulation of the PI3-Kinase/Akt pathway by O-GlcNAcylation at the level of the lipid microdomains. This study is the very first suggesting a direct relationship between the O-GlcNAcylation of the lipid rafts-associated proteins and the regulation of cell signaling by insulin.

Parallel to this work, we have brought to the fore O-GlcNAcylation in the two apicomplexan parasites *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*. A biochemical and bioinformatics study led us to prove that toxoplasma possesses its own OGT.

**Key-words:** Lipid rafts, O-GlcNAc, OGT, PI3-Kinase/AKT signaling pathway, *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii*

## ABREVIATIONS

<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>AMPK</b>	AMP-activated protein kinase
<b>βCDs</b>	β-cyclodextrines
<b>βMCDs</b>	β-méthylcyclodextrines
<b>CD</b>	Cyclodextrines
<b>CtxB :</b>	Cholera toxin subunit B (sous-unité B de la toxine cholérique)
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle's medium
<b>DMSO</b>	Diméthylsulfoxyde
<b>DRMs</b>	Detergent-resistant membranes
<b>ER</b>	Endoplasmic reticulum
<b>ERK1/2</b>	Extracellular signal-regulated kinase
<b>FBS</b>	Fetal bovine serum
<b>FRET</b>	Fluorescent-resonance energy transfer
<b>FITC</b>	Fluoroisothiocyanate
<b>F6P</b>	Fructose-6-Phosphate
<b>GDP</b>	Guanosine Diphosphate
<b>Gln</b>	Glutamine
<b>GLUT</b>	Glucose transporter
<b>GPCR</b>	G protein-coupled receptor
<b>GPI</b>	Glycosylphosphatidylinositol
<b>GSK3</b>	Glycogen synthase kinase 3
<b>GSL</b>	Glycosphingolipide
<b>HBP</b>	Hexosamine Biosynthetic Pathway
<b>HMG-CoA</b>	Hydroxyméthylglutaryl coenzyme A
<b>HRP</b>	Horseradish peroxidase

<b>IRS-1</b>	Insulin receptor substrate 1
<b>Ld</b>	Liquid-disordered
<b>Lo</b>	Liquid-ordered
<b>MAPKs</b>	Mitogen activated protein kinases
<b>MAPKK</b>	Mitogen Activated Protein Kinase Kinase
<b>MAPKKK</b>	Mitogen activated Protein Kinase Kinase Kinase
<b>MGEA5</b>	Meningioma Expressed Antigen 5
<b>NRPTK</b>	Non-receptor phospho-tyrosine kinase
<b>OGA</b>	N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminidase ou O-GlcNAcase
<b>O-GlcNAc</b>	O-N-acétylglucosaminylation
<b>OGT</b>	Polypeptide $\beta$ -N-acétylglucosaminyltransférase ou O-GlcNAc transférase
<b>PBS</b>	Phosphate buffer saline
<b>PC</b>	Phosphatidylcholine
<b>PDK1</b>	Phosphatidylinositol Dependent protein Kinase 1
<b>PE</b>	Phosphatidyléthanolamine
<b>PHB</b>	Prohibitin
<b>PI(3,4,5)P3</b>	Phosphatidylinositol-3, 4,5 triphosphate
<b>PI(4,5)P2</b>	Phosphatidylinositol-4,5 bisphosphate
<b>PI3K</b>	Phosphatidyl inositol-3 kinase
<b>PKA</b>	Protéine Kinase dépendante de l'AMPc
<b>PKB/AKT</b>	Protein kinase B/RAC (Related to the A and C kinases)-alpha Ser/Thr protein kinase
<b>RI</b>	Récepteur de l'insuline
<b>RI<math>\beta</math></b>	Sous-unité $\beta$ du récepteur de l'insuline
<b>SPFH</b>	Stomatin, Prohibitin, Flotillin and HflK/C
<b>SRE</b>	Sterol response element

<b>SREBP</b>	SRE-binding proteins
<b>TBS</b>	Tris buffer saline
<b>WCL</b>	Whole cell lysates
<b>WB</b>	Western-Blot
<b>YY 1</b>	Ying Yang-1

# SOMMAIRE

<b>CHAPITRE I- LA MEMBRANE PLASMIQUE .....</b>	<b>3</b>
<b>1. LA MEMBRANE PLASMIQUE.....</b>	<b>4</b>
1.1 Structure basique et composants.....	5
1.1.1 Les Glycérophospholipides.....	6
1.1.2 Les sphingolipides .....	8
1.1.3 Le cholestérol .....	9
1.1.4 Protéines associées à la membrane cellulaire .....	11
<b>CHAPITRE II- LES RADEAUX LIPIDIQUES.....</b>	<b>14</b>
<b>2. NOUVEAU MODELE MEMBRANAIRE.....</b>	<b>15</b>
2.1 Mise en Evidence des microdomaines lipidiques enrichis en cholestérol : « Lipid Rafts ».....	15
2.2 Les protéines associées aux radeaux lipidiques .....	18
2.2.1 Propriétés communes.....	18
2.2.2 Les Cavéolines .....	20
2.2.3 Reggie-1/ Flotilline-2 et Reggie-2/ Flotilline-1.....	20
2.3 Méthodes et techniques d'étude des microdomaines lipidiques.....	22
2.3.1 Les radeaux lipidiques et la résistance membranaire aux détergents.....	22
2.4 Rôle des radeaux lipidiques dans les processus cellulaires .....	25
<b>CHAPITRE III- LA VOIE DE 'INSULINE.....</b>	<b>26</b>
<b>3. LE RECEPTEUR DE L'INSULINE ET SA VOIE DE SIGNALISATION .....</b>	<b>27</b>
3.1 Tissus cibles de l'insuline.....	27
3.2 Le récepteur de l'insuline .....	28
3.3 Voies de signalisation associées à l'insuline .....	29
3.4 Cavéoles et radeaux lipidiques dans la signalisation de l'insuline .....	33
<b>CHAPITRE IV- LA O-N-ACETYLGLUCOSAMINYLATION.....</b>	<b>36</b>
<b>4. LA O-N-ACETYLGLUCOSAMINYLATION .....</b>	<b>37</b>
4.1 Les enzymes de la GlcNAcylation .....	38
4.1.1 La O-N-acétylglucosaminyltransférase (OGT).....	39
4.1.2. La O-N-acétylglucosaminidase (OGA) .....	42

4.2.	L'UDP-GlcNAc.....	44
4.3.1	"Cross talk" entre O-GlcNAcylation et phosphorylation.....	45
4.4	Interaction de la O-GlcNAc avec d'autres modifications post-traductionnelles ...	46
4.5	Rôles de la O-GlcNAc.....	48
4.6	La GlcNAcylation et le diabète de type II .....	51
<b>CHAPITRE V. TRAVAUX PERSONNELS (partie 1).....</b>		<b>54</b>
<b>5. LA O-GlcNAc: UN ELEMENT REGULATEUR DE LA COMMUNICATION ENTRE LES LIPIDES RAFTS ET LA VOIE DE L'INSULINE ?.....</b>		<b>55</b>
5.1	Discussion.....	82
5.1.1	Préparation des « Detergent-resistant Membranes » à partir des cellules HepG2. ....	82
5.1.2	Protéines associées aux microdomaines lipidiques des cellules HepG2 .....	86
5.1.3	Le recrutement de l'OGT et du récepteur de l'insuline aux radeaux lipidiques est contrôlé par la voie PI3K.....	89
5.1.4	La voie PI3K régule le "clustering" des protéines membranaires à la surface cellulaire .....	92
<b>CHAPITRE V. TRAVAUX PERSONNELS (partie 2).....</b>		<b>96</b>
<b>6. MISE EN EVIDENCE DE LA O-GLCNAC CHEZ <i>Toxoplasma gondii</i> ET <i>Plasmodium falciparum</i> .....</b>		<b>97</b>
6.1	<i>Toxoplasma gondii</i> ( <i>T. gondii</i> ) .....	97
6.2	<i>Plasmodium falciparum</i> .....	98
6.3	Les modifications post-traductionnelles: cible thérapeutique potentielle ? .....	99
<b>Direct evidence of O-GlcNAcylation in the apicomplexan <i>Toxoplasma gondii</i>: a biochemical and bioinformatic study ...</b>		<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
6.4	Discussion.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>Annexe: The hexosamine biosynthetic pathway and O-GlcNAcylation drive the expression of <math>\beta</math>-catenin and cell proliferation .....</b>		<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>Bibliographie.....</b>		<b>122</b>

# *Chapitre I*

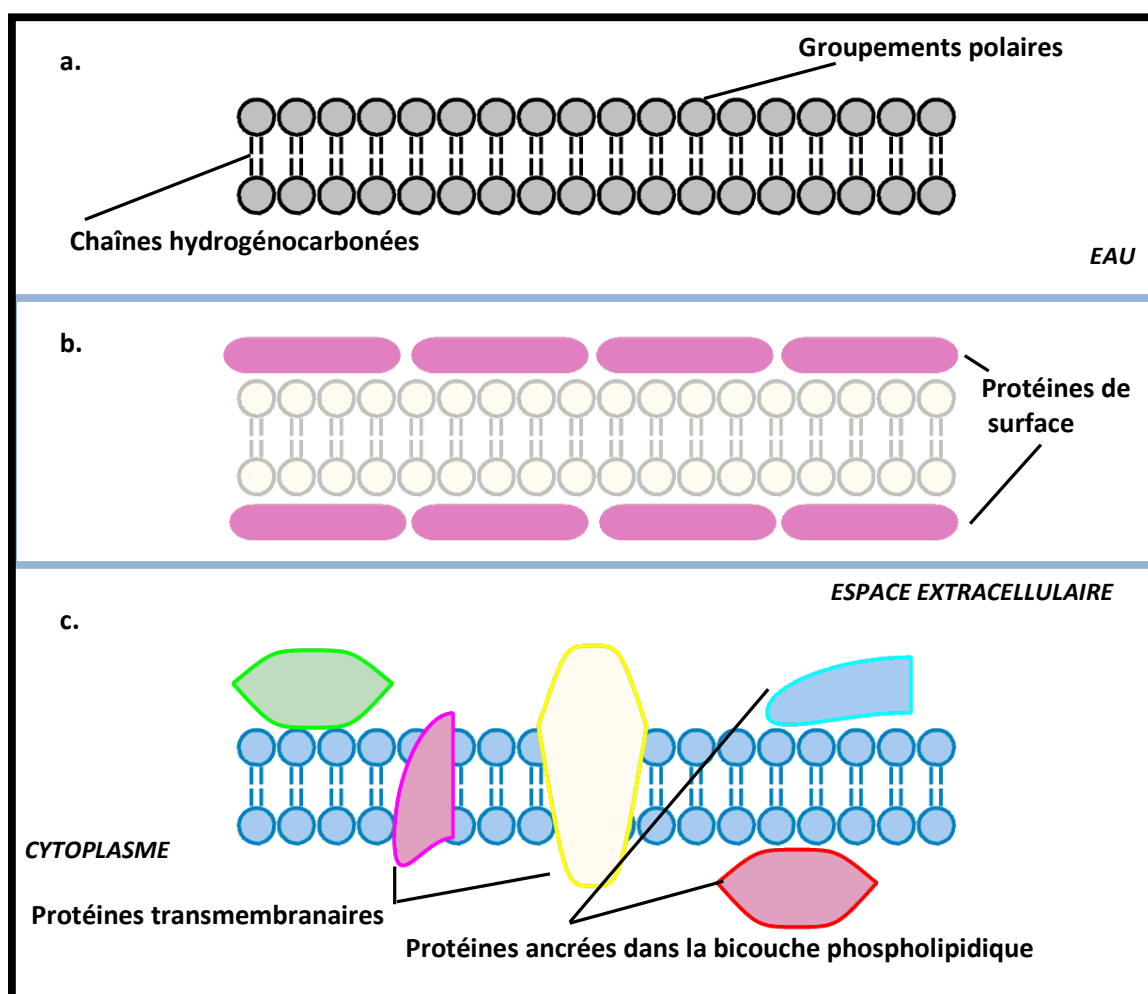
## *I. La Membrane Plasmique*

## 1. LA MEMBRANE PLASMIQUE

Les connaissances actuelles concernant la structure membranaire ont émergé au cours des années 1920-1930 puisqu'on sait depuis que les membranes cellulaires sont constituées de bicouches lipidiques (1) (**Fig. 1.a**). Mais par la suite, les biologistes cellulaires ont constaté qu'une simple bicouche lipidique ne permettait pas d'expliquer les propriétés mécaniques de la membrane plasmique ; ils ont donc avancé l'hypothèse que la bicouche était recouverte de protéines pour renforcer entre autres sa résistance (2) (**Fig. 1.b**). Les premières images de microscopie électronique ont étayé cette hypothèse car, vues en coupe, toutes les membranes comportent deux lignes foncées (assimilées à la présence de protéines et de glucides en surface) séparées par un espace clair (assimilé à la bicouche lipidique). Au début des années 1970, deux techniques complémentaires ont permis de démontrer que les protéines traversent de part en part la bicouche lipidique.

Tout d'abord, des images de microscopie électronique de membranes clivées par cryofracture ont montré la présence de particules protéiques au sein de la bicouche lipidique. Ultérieurement, le marquage chimique de protéines membranaires a montré que de nombreuses protéines traversent la bicouche, ce qui expose différentes parties du polypeptide à la phase aqueuse située de part et d'autre de la membrane. La microscopie par fluorescence a montré que les lipides et certaines protéines membranaires diffusaient dans la membrane. Des études spectroscopiques quantitatives ont montré que la diffusion latérale des lipides est un processus rapide, alors que le basculement d'un côté de la bicouche à l'autre est plus lent et moins probable. Le modèle de mosaïque fluide de la membrane (**Fig. 1.c**) intègre ces données et montre que les protéines transmembranaires « flottent dans une mer fluide de lipides » (2).





**Figure 1. Evolution des concepts sur la structure membranaire.** a. Modèle de Gorter et Grendel de 1926. b. Modèle de Davson et Danielli de 1943. c. Modèle de la mosaïque fluide de Singer et Nicholson de 1972.

## 1.1 Structure basique et composants

Les membranes participent à l'organisation des processus biologiques en les compartimentant. De fait, l'unité de base de la vie qu'est la cellule se définit essentiellement par la membrane plasmique qui l'entoure et la délimite, lui permettant de se singulariser. Ces membranes sont des assemblages de lipides et de protéines dans lesquels les composants sont unis en un mince feuillet par des liaisons non covalentes.

Les principales composantes lipidiques des membranes sont les *glycérophospholipides*, les *sphingolipides* et le *cholestérol*.

### 1.1.1 Les Glycérophospholipides

Les glycérophospholipides sont les principaux constituants des bicouches membranaires (**Fig. 2**). Les glycérophospholipides comportent trois éléments: un squelette de glycérol estérifié par deux chaînes d'acides gras plus ou moins longues au niveau des atomes de carbone 1 et 2 (esters organiques) et estérifié par l'acide phosphorique au niveau du C3 (ester minéral). Les cellules peuvent synthétiser plus d'une centaine de glycérophospholipides différant par la nature de leurs acides gras (**Tableau 1**) ou par les cinq principaux alcools estérifiant le phosphate.

---

**Tableau 1.**

**ACIDES GRAS LES PLUS FREQUEMMENT RETROUVES AU NIVEAU DES  
LIPIDES MEMBRANAIRES**

<b>Nom</b>	<b>Nombre d'atomes de carbone</b>	<b>Doubles liaisons (positions)</b>
Myristate	14	0
Palmitate	16	0
Palmitoléate	16	1( $\Delta$ 9)
Stéarate	18	0
Oléate	18	1( $\Delta$ 9)
Linoléate	18	2( $\Delta$ 9, $\Delta$ 12)
Linoléate	18	3( $\Delta$ 9, $\Delta$ 12, $\Delta$ 15)
Arachidonate	20	4( $\Delta$ 5, $\Delta$ 8, $\Delta$ 11, $\Delta$ 14)

---

D'une manière générale, les acides gras en  $C_1$  sont saturés ou monoinsaturés alors que les acides gras en  $C_2$  sont polyinsaturés, c'est-à-dire qu'ils comportent deux doubles liaisons ou plus. Chaque double liaison entraîne une courbure stable de la chaîne hydrogencarbonée. Les glycérophospholipides portent le nom des groupements alcooliques de la tête polaire plutôt que des acides gras qui les constituent : Acide phosphatidique (AP), Phosphatidylglycérol (PG), Phosphatidyléthanolamine (PE), Phosphatidylcholine (PC), Phosphatidylsérine (PS) et Phosphatidylinositol (PI).

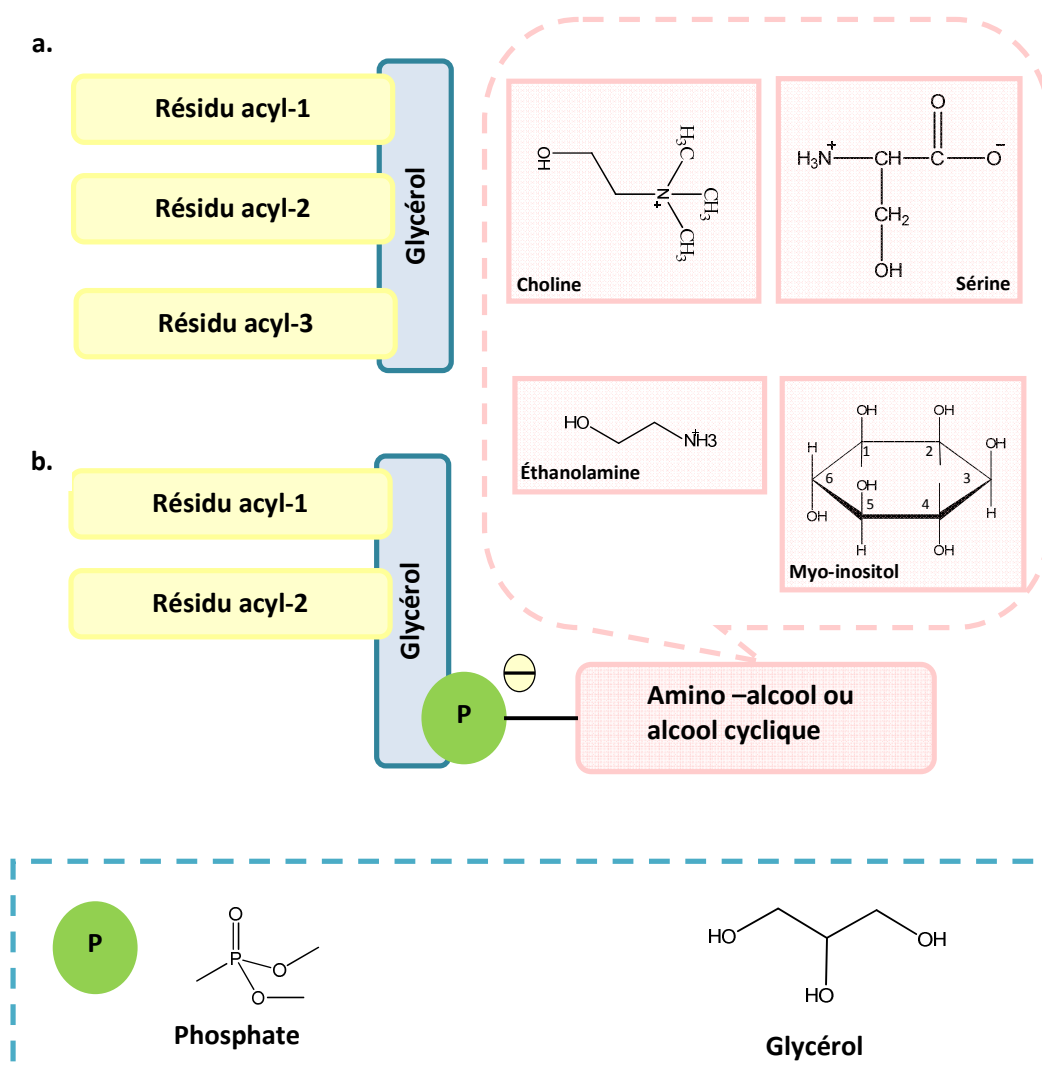


Figure 2. Glycérophospholipides. a. Schéma d'un triester de glycérol ou triacylglycérol

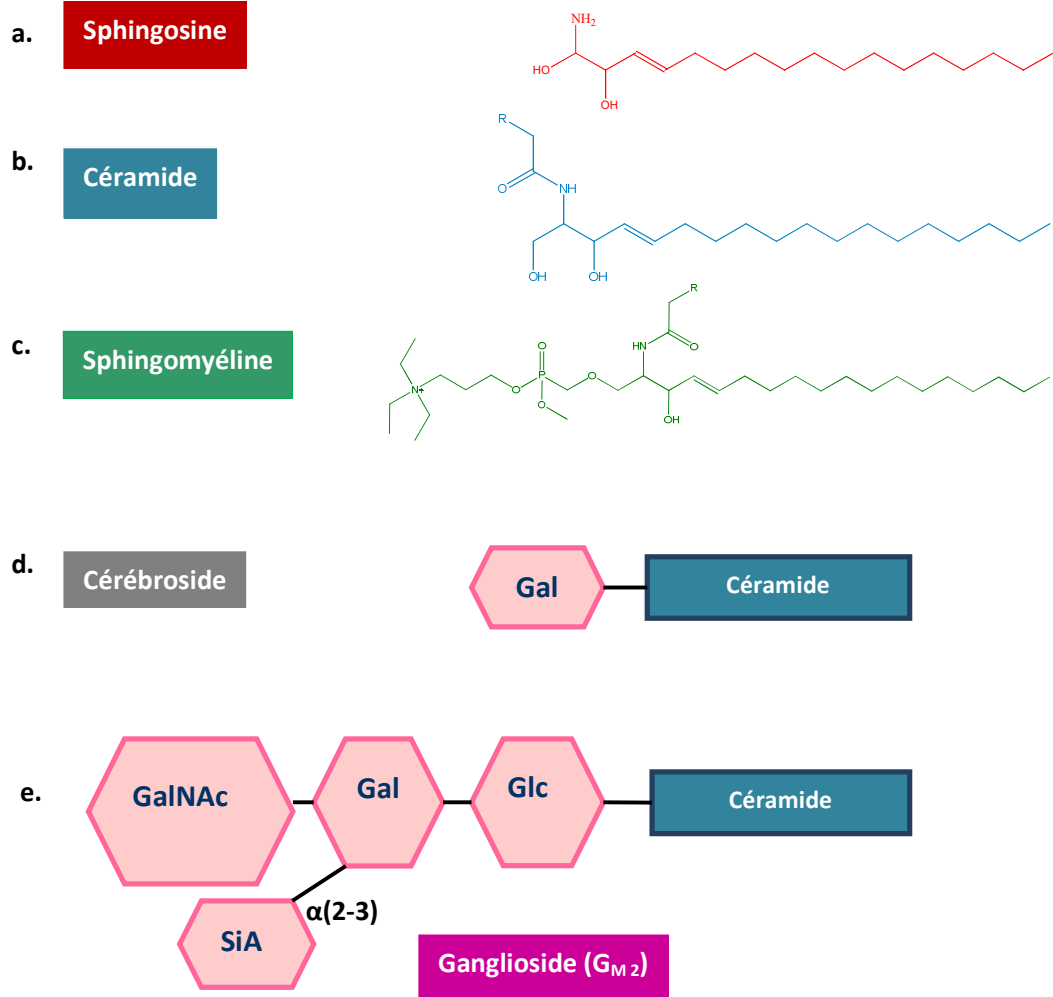
(trois acides gras), non membranaire (source énergétique). **b.** Schéma d'un glycérophospholipide avec sur la droite la structure linéaire des fonctions alcools des têtes polaires.

**Où sont-ils synthétisés ?** La plupart des lipides cellulaires sont synthétisés dans le *reticulum* endoplasmique (RE) et l'appareil de Golgi. La synthèse des *glycérophospholipides*, qui s'effectue dans le RE, est en elle-même une tâche énorme. Un hépatocyte contient  $10^{12}$  à  $10^{13}$  molécules de glycérophospholipides synthétisées à une vitesse de  $10^7$  molécules par seconde. Cette synthèse vertigineuse est indispensable pour répondre aux besoins de la voie d'exocytose, et assurer les nombreuses fonctions cellulaires qui dépendent des membranes et des molécules de signalisation lipidique.

### 1.1.2 Les sphingolipides

Les sphingolipides forment une famille de lipides caractérisée par la présence d'un squelette de base sphingosine, un amino-alcool possédant une longue chaîne hydrogénocarbonée insaturée (C18:1). Au niveau de la partie apolaire, un acide gras saturé (ou plus rarement insaturé) à longue chaîne (le plus souvent de 18 à 24 carbones chez les mammifères) est greffé sur la fonction amine par une liaison amide, formant un céramide. Les sphingolipides constituent une famille très complexe en raison de la diversité des groupements polaires (**Fig. 3**). La plupart des lipides des membranes biologiques contenant des glucides sont des sphingolipides appelés glycosphingolipides constitués d'un ou plusieurs oses neutres ou acides conférant une ou plusieurs charges négatives au lipide. Ces têtes polaires peuvent servir de récepteur (point d'ancrage) à certains pathogènes tels que les virus ou les bactéries. Il convient de souligner l'absence de groupement phosphate au niveau des glycosphingolipides. Les propriétés physicochimiques des sphingolipides sont comparables à celles des glycérophospholipides et ces molécules sont retrouvées conjointement dans les membranes biologiques. La queue hydrogénocarbonée de la sphingosine et l'acide gras participent à la formation de la bicouche hydrophobe, les têtes polaires étant rejetées à la surface.

**Où sont-ils synthétisés ?** Tandis que la plupart des glycérophospholipides sont synthétisés dans le RE, la synthèse des sphingolipides se déroule essentiellement dans l'appareil de Golgi.



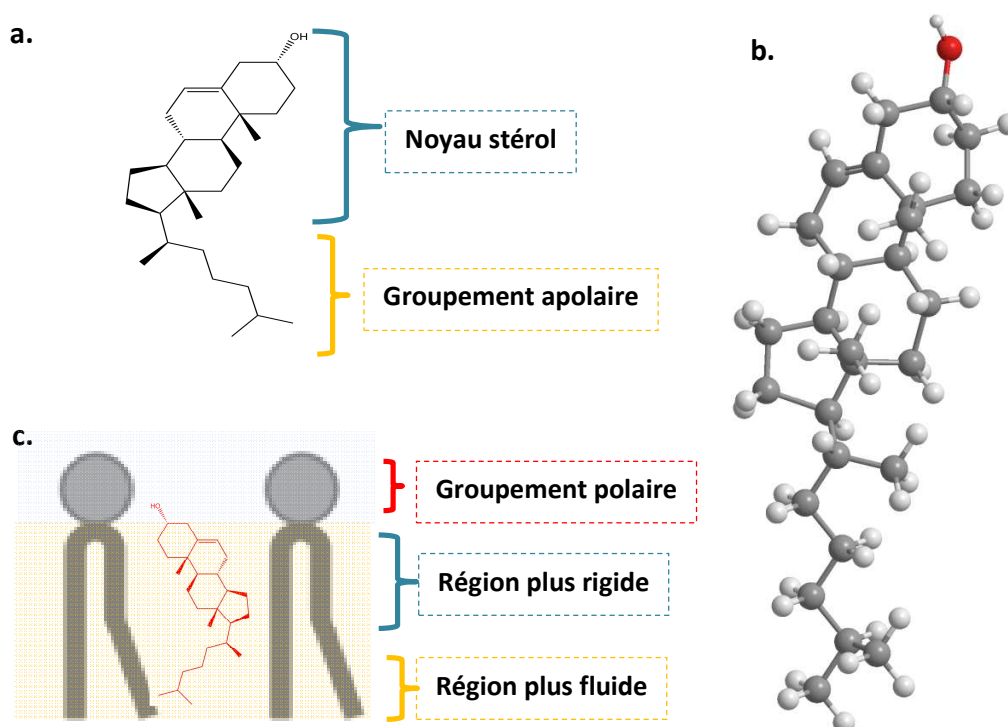
**Figure 3. Sphingolipides.** Représentation linéaire **a.** de la Sphingosine. **b.** d'un Céramide. **c.** de la Sphingomyéline. **d.** d'un Cérébroside. **e.** d'un Ganglioside. Gal: galactose, Glc: glucose, GalNAc: N-acétylgalactosamine, SiA: acide sialique.

### 1.1.3 Le cholestérol

Le cholestérol et ses dérivés constituent une autre catégorie importante de lipides membranaires: les stérols (3). Le cholestérol est la forme la plus

représentée des stérols chez les vertébrés. La structure de base du cholestérol est un squelette hydrogénocarboné de quatre cycles rigides et plans, présentant un groupement hydroxyle qui constitue la seule partie polaire de la molécule lui conférant un léger caractère amphiphile (**Fig. 4a et 4b**). « Le noyau stérol » (en fait le cyclopentanoperhydrophénanthrène ou stérane) se poursuit par une chaîne ramifiée de 8 carbones.

L'insertion du cholestérol entre les phospholipides au niveau des membranes se fait de telle façon que la partie hydrophile est au contact des têtes polaires des phospholipides, et la partie hydrophobe au niveau des chaînes d'acides gras dans le cœur hydrophobe de la bicouche (4-6) (**Fig. 4c**). Elle permet à la membrane d'acquérir une structure relativement rigide tout en autorisant une certaine mobilité aux composants membranaires. Grâce aux interactions ainsi mises en jeu avec les phospholipides avoisinants, le cholestérol module profondément les propriétés physiques, structurales et dynamiques des membranes qui le contiennent.



**Figure 4. Le cholestérol.** **a.** Structure linéaire. **b.** Modèle tridimensionnel. **c.** Disposition du cholestérol dans une bicouche lipidique, avec la fonction hydroxyle orientée vers la surface. Le noyau stérol rigide stabilise les bicouches fluides dans la région située entre le C1 et le C10 des acides gras mais, en raison de sa configuration contournée, il favorise le mouvement des chaînes grasses situées en profondeur.

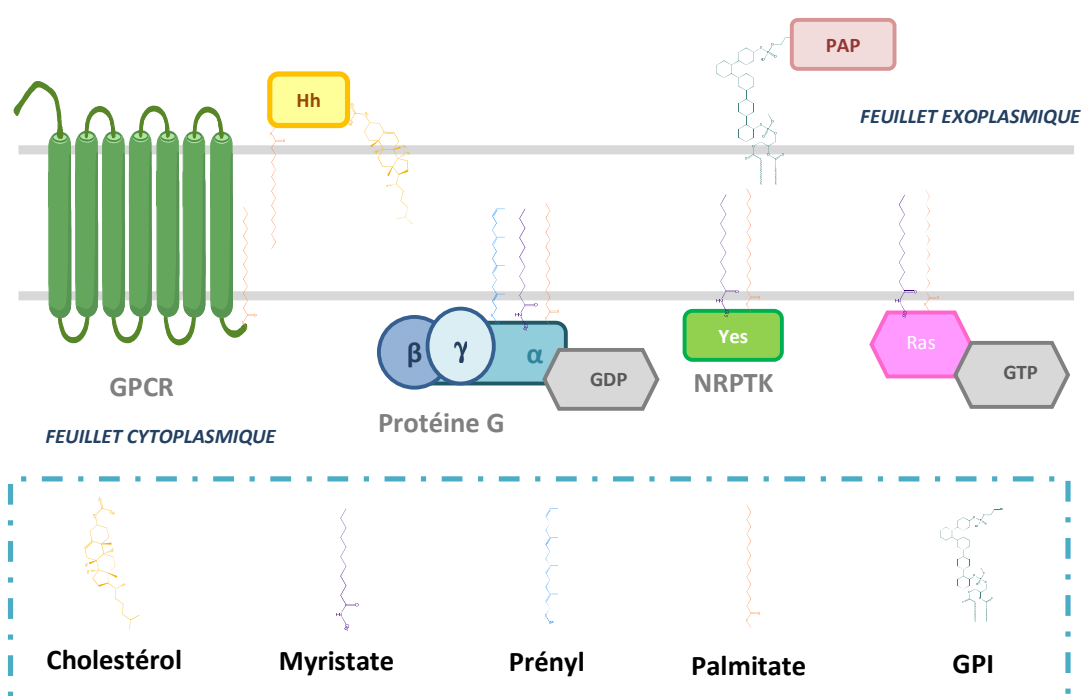
Le cholestérol est un élément essentiel du métabolisme, car il se situe au carrefour de nombreuses voies métaboliques comprenant la synthèse des hormones stéroïdes (telles que les œstrogènes, la testostérone et le cortisol), de la vitamine D et des acides et sels biliaires synthétisés et sécrétés par le foie. La synthèse du cholestérol à partir de l'acétylcoenzyme A (acétyl-CoA) dans le cytoplasme et le RE comporte 22 étapes enzymatiques successives. Les étapes initiales sont catalysées par des enzymes du cytosol et produisent du farnésylpyrophosphate (farnésyl-PP) à partir d'acétyl-CoA. L'étape de conversion du 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA (HMG-CoA) en mévalonate est limitante et catalysée par une protéine transmembranaire du RE, la *HMG-CoA réductase*. Cette enzyme est inhibée par les statines, classe de molécules hypocholestérolémiantes. Bien que les étapes finales de la synthèse du cholestérol se déroulent au niveau du RE, il n'est pas un lipide résident de ce compartiment et il est rapidement exporté vers d'autres membranes post-RE, parmi lesquelles la membrane plasmique où il représente jusqu' à 50% des lipides totaux de la bicouche.

#### **1.1.4 Protéines associées à la membrane cellulaire**

En plus des lipides, les membranes cellulaires contiennent une large variété de protéines. Les protéines transmembranaires (intégrales ou intrinsèques) traversent la bicouche lipidique tandis que les protéines membranaires périphériques (périphériques ou extrinsèques) sont associées à la surface externe ou interne de la bicouche.

**Les protéines transmembranaires :** Les segments transmembranaires des protéines intrinsèques possèdent de nombreux groupements hydrophobes qui interagissent avec les chaînes hydrogénocarbonées de la bicouche lipidique. Les protéines transmembranaires ne présentant qu'un seul segment peptidique en hélice  $\alpha$  sont les plus communes.

**Les protéines membranaires périphériques :** il existe huit modes de fixation des protéines périphériques à la surface membranaire. Cinq types de structures lipidiques peuvent ancrer une protéine à la membrane par insertion dans la bicouche lipidique. D'autres protéines se fixent par des liaisons électrostatiques aux lipides membranaires et certaines s'insèrent partiellement dans la bicouche lipidique. Beaucoup de protéines périphériques se lient directement ou indirectement aux protéines transmembranaires (**Fig. 5**).



**Figure 5. Quelques exemples de lipidations.** Palmitoylation (orange), récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs), sous-unité  $\alpha$  des protéines G hétérotrimériques, morphogène Hedgehog (Hh), kinase Yes (NRPTK) et GTPase N/H-Ras; myristoylation (violet), kinase Yes et sous-unité  $\alpha$  des protéines G hétérotrimériques; farnésylation ou géranylgeranylation (prénylation) (bleu), GTPase Ras et sous-unité  $\gamma$  des protéines G hétérotrimériques; glypiation ou ancre GPI (glycosyl phosphatidylinositol) (vert), phosphatase alcaline placentaire (PAP); cholestérolylation (jaune), Hh. Il est à noter que plusieurs de ces protéines de signalisation sont doublement lipidées. Adapté de (7). GPCR, G protein-coupled receptor; NRPTK, non-receptor phospho-tyrosine kinase.



## *La Membrane Plasmique*

Enfin, une partie du cytosquelette d'actine (microfilaments), appelée cytosquelette membranaire, se localise au niveau de la bicouche membranaire. Il a plusieurs rôles importants, comme le fait d'offrir un support mécanique à la membrane, de participer à des événements de remodelage membranaire et de relier l'intérieur des cellules à la matrice extracellulaire.

# *Chapitre II*

## *Les Radeaux lipidiques*

## **2. NOUVEAU MODELE MEMBRANAIRE**

### **2.1 Mise en Evidence des microdomaines lipidiques enrichis en cholestérol : « Lipid Rafts »**

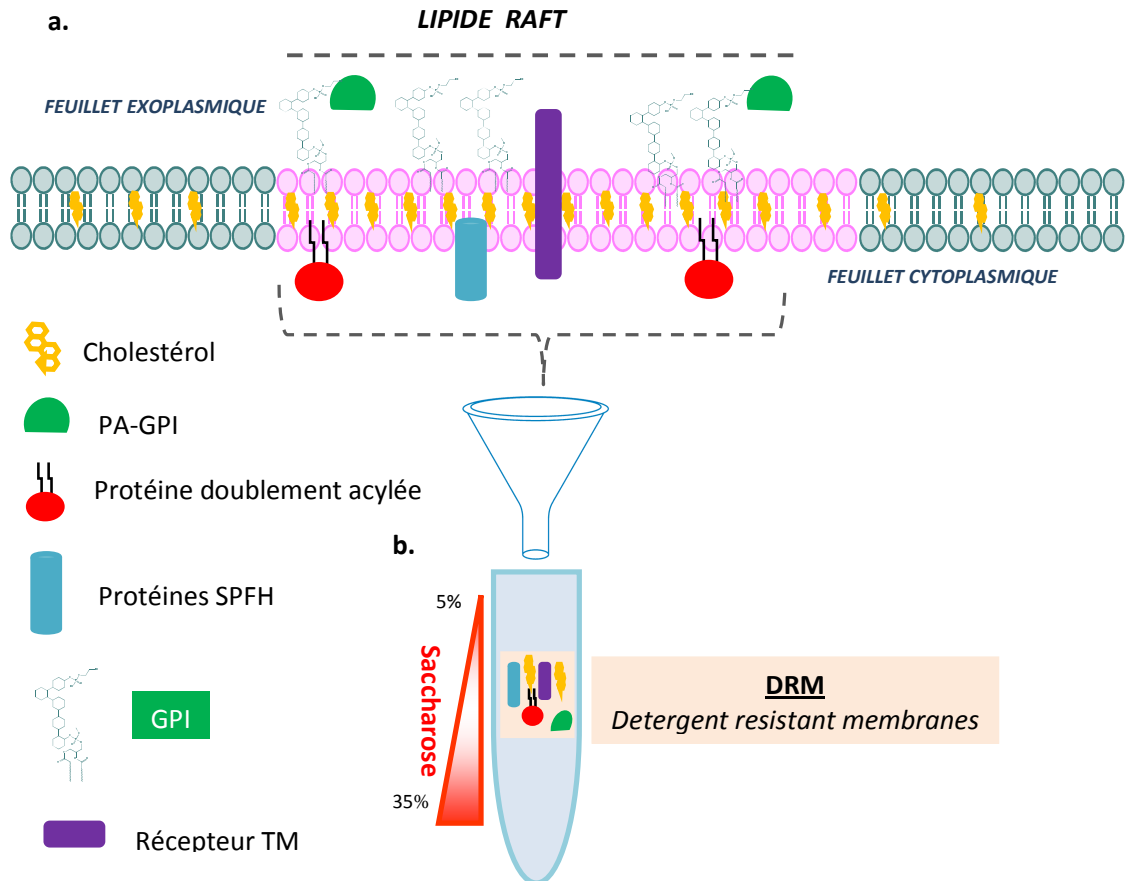
Comme nous venons de le voir, les membranes cellulaires ne sont pas des bicouches uniformes de lipides et de protéines mais elles sont au contraire très hétérogènes en termes de composition. La compréhension de l'organisation de ces membranes a énormément évolué au cours des dernières décennies. Dans les années 1950 des études en microscopie électronique ont révélé de petites invaginations en forme de flacon dans la membrane plasmique (MP), apportant la première preuve de l'existence de microdomaines membranaires. Ces invaginations de 50 à 100 nm de diamètre ont été nommées cavéoles (*caveolae*, « petites grottes ») (8). Plusieurs décennies plus tard, il a été découvert que les cavéoles doivent leur forme distinctive à une couche de protéines recouvrant la face cytosolique de ces microdomaines et plus particulièrement à une protéine appelée cavéoline (9-11).

Un autre type d'hétérogénéité de membrane a été découvert dans les cellules épithéliales polarisées, dans lesquelles la composition des protéines et des lipides de la membrane apicale est distincte de la membrane basolatérale. Les protéines ancrées par un GPI et les glycosphingolipides (GSL) se localisent exclusivement à la membrane apicale (12). Les mécanismes d'adressage des protéines à la membrane apicale ne sont pas clairement définis mais Simons et collaborateurs ont proposé un modèle dans lequel les GSL et les protéines ancrées GPI (telle que la phosphatase alcaline, PA) forment des grappes dans le feuillet exoplasmique des membranes de l'appareil de Golgi. Ces complexes seraient ensuite transportés dans des vésicules vers la membrane apicale (13). En 1992, Brown et Rose ont découvert que les lipides et les protéines destinés à la membrane apicale pouvaient être distingués des composants de la membrane basolatérale grâce à leur insolubilité dans des détergents non ioniques, comme le Triton X-100, utilisés à froid. Ce type d'extraction leur confère une certaine flottabilité lorsqu'ils sont soumis à une ultracentrifugation en gradient de saccharose (14). La PA-GPI acquiert ses propriétés de « résistance aux détergents » après son transit par l'appareil de Golgi (14): l'empaquetage des protéines ancrées GPI au niveau des « membranes résistantes aux détergents »

(DRM, *Detergent Resistant Membrane*) est dépendante de l'enrichissement de ces mêmes DRMs en GSL et cholestérol (15,16). Des études ultérieures ont constaté que la cavéoline était également retrouvée au niveau des membranes du Golgi (10,17).

Après avoir démontré que les cavéoles sont enrichies en GSL et en protéines-GPI (18,19), il a été émis l'hypothèse selon laquelle les microdomaines lipidiques pouvaient être définis par la présence de cavéoline (20). Cependant, il est rapidement apparu que tous les microdomaines membranaires n'étaient pas obligatoirement des cavéoles. C'est ce qui a été démontré chez les lymphocytes qui en dépit d'être déficient en cavéoles, possèdent d'autres types de microdomaines enrichis en GSL et protéines-GPI (21). L'idée selon laquelle les microdomaines membranaires enrichis en GSL et en cholestérol existent dans les membranes biologiques a également été soutenue par des études portant sur des membranes modèles. Dans des membranes artificielles comprenant des phospholipides, des GSL et du cholestérol, on observe que ce dernier forme préférentiellement des grappes avec les chaînes saturées d'acides gras des GSL formant une phase de liquide ordonné (Lo), distinct de la phase de liquide désordonné (Ld) constituée de phospholipides avec des chaînes d'acides gras insaturés (22).

En se basant principalement sur ces conclusions, Simons et ses collaborateurs ont proposé le concept de «radeaux lipidiques» en 1997. Selon le modèle d'origine, les radeaux lipidiques sont des assemblages dynamiques de cholestérol et de GSL dans les membranes cellulaires, où les lipides sont empaquetés plus étroitement que dans le reste de la membrane. En plus de PA-GPI, d'autres molécules de signalisation telles que les membres de la famille src kinase doublement acylées ou des protéines transmembranaires sont associées avec les lipides rafts (23) (**Fig. 6**).



**Figure 6. Modèle traditionnel de lipide raft.** **a.** Selon l'hypothèse originale, les radeaux lipidiques sont des assemblages nanométriques enrichis en cholestérol (jaune) et GSL, et comportant certains types de protéines, parmi lesquelles les protéines ancrées GPI (vert), les protéines doublement acylées (rouge), les protéines contenant un domaine SPFH (bleu) et certains récepteurs transmembranaires (pourpre). Les protéines peuvent se déplacer au sein même et en dehors des radeaux lipidiques. **b.** Les protéines et les lipides associés aux radeaux lipidiques peuvent être isolés biochimiquement en fonction de leur résistance aux détergents non ioniques utilisés à froid comme le Triton-X100 et de leur flottabilité en gradient de saccharose. SPFH, Stomatin-Prohibitin-Flotillin-Hflk/C.

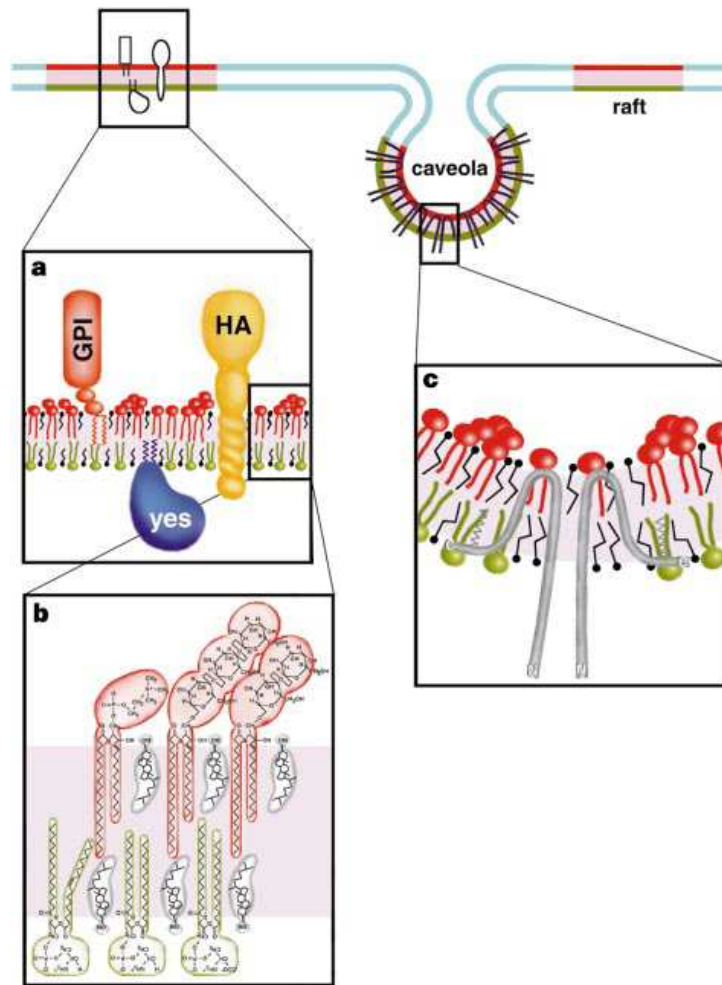
## **2.2 Les protéines associées aux radeaux lipidiques**

### **2.2.1 Propriétés communes**

Basé sur le modèle structurel des radeaux lipidiques, il a été postulé que les protéines possédant une haute affinité pour un environnement lipidique ordonné étaient sélectivement recrutées par les radeaux lipidiques (24). La majorité des protéines caractérisées au niveau des DRMs comprennent celles possédant une ancre GPI (25) et celles comportant des acides gras saturés (26), des modifications myristoyl et palmitoyl liées respectivement par une liaison amide sur une glycine en position N-terminale et par une liaison thioester sur des cystéines internes (27,28) (29). Enfin, les protéines possédant le domaine SPFH (*Stomatins Prohibitins Flotilins and HflK/C*) forment un autre groupe de protéines associées aux radeaux lipidiques (30) (**Fig. 6**).

Notons qu'il ne suffit pas à une protéine d'être modifiée par un lipide pour s'associer aux radeaux lipidiques: par exemple, les protéines prénylées ne sont pas particulièrement enrichies au niveau des DRMs (31).

Certains domaines transmembranaires peuvent être nécessaires à l'association de protéines avec les radeaux lipidiques. C'est le cas de la protéine hémagglutinine (HA) du virus de la grippe (**Fig. 7**). Le remplacement de son domaine transmembranaire ou la modification d'acides aminés le constituant par mutation entraîne la perte de cette propriété intrinsèque (32).



**Figure 7. Modèle d'organisation des radeaux lipidiques et cavéoles dans la membrane plasmique.** Les radeaux (en rouge) ségrègent à partir des autres régions (en bleu) de la bicouche. **a.** Des protéines sont localisées dans les radeaux. Elles y sont associées grâce à des ancres GPI, des chaînes acylées (exemple ici de la protéine Yes de la famille des kinases Src), ou grâce à un domaine transmembranaire spécifique (protéine hémagglutinine HA du virus de la grippe). **b.** La bicouche lipidique au niveau des radeaux est asymétrique avec un enrichissement en sphingomyéline et glycosphingolipides (en rouge) dans le feuillet exoplasmique et un enrichissement en glycérophospholipides (en vert) dans le feuillet cytoplasmique. Le cholestérol (en gris) est présent dans les deux feuillets. **c.** Les cavéoles sont formées par l'autoassemblage de molécules de cavéoline. La localisation des cavéoles au niveau des radeaux lipidiques est le résultat d'interactions avec le cholestérol et de l'acylation des cavéolines en C-terminal. D'après (23).

### **2.2.2 Les Cavéolines**

Les cavéolines constituent une famille de protéines membranaires intégrales de 20-24 kDa. Leur expression et localisation dans les lipides rafts se traduit par des invaginations de la membrane plasmique appelées *caveolae* (définie plus haut). Il existe 3 isoformes de la cavéoline: les cavéolines-1 et 2 sont exprimées dans la plupart des cellules, la cavéoline-1 étant plus abondante dans les adipocytes, les pneumocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales. La cavéoline-3 est principalement retrouvée dans les cellules musculaires (33). Ces protéines possèdent un domaine qui se lie au cholestérol et un domaine se liant à la membrane sous la forme d'une fourche, avec les extrémités carboxy- et amino-terminales face cytoplasmique (34). La cavéoline-1 est essentielle pour la formation des cavéoles et a été caractérisée comme le premier marqueur moléculaire de ces domaines (11).

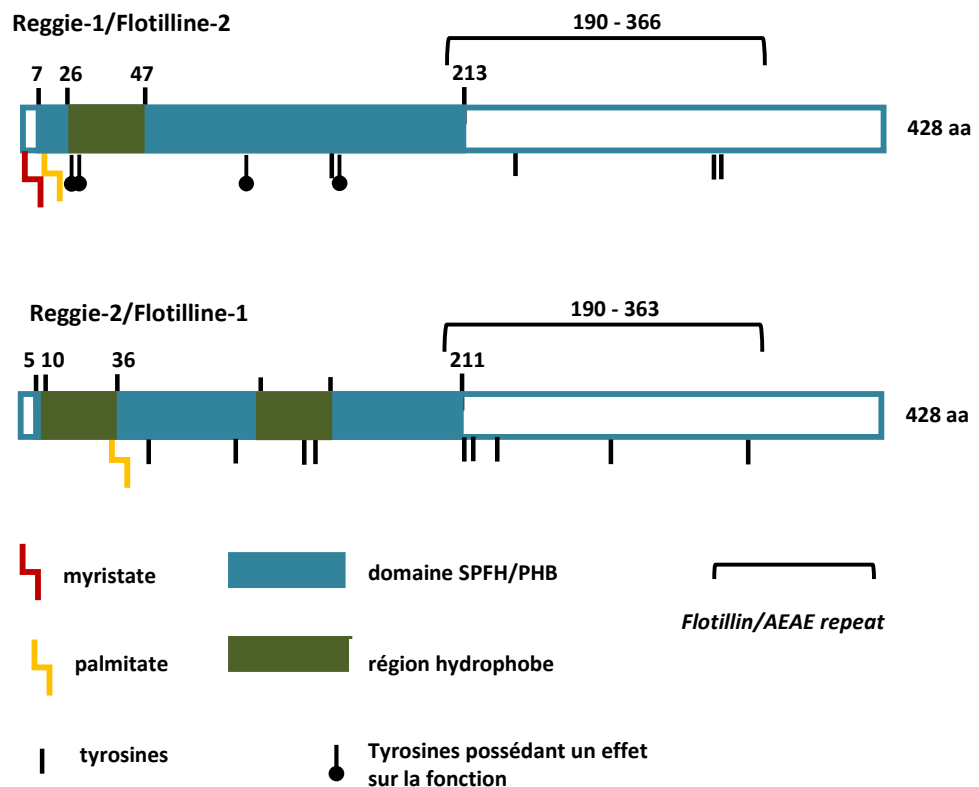
### **2.2.3 Reggie-1/ Flotilline-2 et Reggie-2/ Flotilline-1**

Les reggies ont été découvertes en tant que protéines régulées au cours de la régénération des axones dans les cellules ganglionnaires de la rétine, après lésion du nerf optique de Goldfish (35). Au cours de la même année, un autre groupe indépendant les a décrites en tant que nouvelles protéines et les a appelées flotillines pour leur capacité « à flotter » sur un gradient de saccharose après solubilisation dans le Triton X-100 à 4°C et ultracentrifugation (36). Les flotillines ont été considérées à l'époque comme résidentes des cavéoles, cependant cette notion est incompatible puisque les neurones et les lymphocytes exprimant les reggies sont dépourvus de cavéoles (21,37). Des expériences de double marquage en immuno-microscopie électronique ont démontré que les reggies définissent leurs propres microdomaines (38). Les reggies résident sur la face cytoplasmique de la membrane plasmique et à la surface des compartiments membranaires intracellulaires (37,38). Les reggies sont associées à la membrane plasmique par des groupements myristoyl et palmitoyl et une série d'acides aminés hydrophobes dans le domaine de tête (39,40).

Il a été suggéré que les protéines reggies appartenaient à la famille de protéines SPFH (*Stomatin, Prohibitin, Flotillin, HflK/C*), décrites sur la base de comparaisons de séquences et de recherches d'homologies (41). Les membres de



cette famille partagent un domaine d'homologie dans leur région N-terminale (**Fig. 8**). Une autre étude a identifié le domaine PHB (domaine d'homologie à la *ProHiBitin*) (42). Ce motif est réparti dans tous les règnes du vivant et semble avoir une origine ancienne bien qu'une évolution convergente ait été suggérée (43). Par conséquent, il a été postulé que le domaine PHB effectue une fonction fondamentale et commune, bien que très peu d'informations soient disponibles sur le rôle réel de ce motif.



**Figure 8. Structure des protéines Reggies/Flotillines.** Les protéines reggies sont exprimées sous la forme de polypeptides de 428 acides aminés. La région N-terminale des reggies contient un domaine homologue à la stomatine et à la prohibitine (domaine SPFH/PHB), tandis que la région C-terminale contient plusieurs motifs courts répétés appelés *flotillin-repeats*. Les régions hydrophobes sont indiquées en vert. Les chiffres renvoient aux acides aminés limitant les domaines. Reggie-1 est associée aux membranes par myristoylation de la Gly2 et par palmitoylation multiple des Cys4, 19 et 20, tandis que Reggie-2 est palmitoylée en Cys34. Les résidus de tyrosine des deux Reggies sont indiqués. Au niveau de Reggie-1, certains résidus de Tyr dont la signification biologique a été démontrée sont représentés par un point (Tyr24, 27, 124 et 163). Adapté de (44).

## **2.3 Méthodes et techniques d'étude des microdomaines lipidiques**

L'hypothèse initiale suggérant l'existence des radeaux lipidiques était essentiellement fondée sur des études réalisées par microscopie électronique sur des cellules fixées ou sur des modèles de membranes (23). La plupart des microdomaines lipidiques, à l'exception des cavéoles, sont morphologiquement monotones, ils ne peuvent pas être visualisés par microscopie électronique. De plus la taille proposée des radeaux lipidiques (~10-200 nm) est inférieure à la résolution qu'apporte la microscopie optique, l'observation de la dynamique des radeaux lipidiques dans les cellules vivantes est par conséquent un véritable défi. Le débat remettant en cause l'existence des radeaux lipidiques, dû en grande partie à la difficulté de pouvoir les observer, est toujours d'actualité.

Néanmoins, au cours de ces dernières années l'application de techniques d'imagerie sophistiquées a donné un bref aperçu de la dynamique des composants des radeaux lipidiques au niveau de cellules vivantes. Des études utilisant des techniques tels que le suivi de particules uniques (*Single Particle Tracking* ou SPT) ou de molécules uniques (*Single Molecule Tracking* ou SMT), la fluorescence spectroscopique de corrélation (FCS), le transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET) et l'épuisement de l'émission stimulée (STED) ont montré le *clustering* dynamique de la PA-GPI associée aux GSL dans des assemblages de 10 à 50 nm (45). Des expériences de microscopie bi-couleur totale par réflexion interne (FRBR) ont démontré que la PA-GPI est associée de manière dynamique avec des clusters de GSL et de cholestérol (46). Les résultats de ces expériences supportent le rôle des lipides des microdomaines dans la formation de «plateformes» nécessaires à la signalisation cellulaire.

### **2.3.1 Les radeaux lipidiques et la résistance membranaire aux détergents**

Les radeaux lipidiques sont résistants à la solubilisation par l'utilisation de détergents doux du fait d'une compaction renforcée des lipides membranaires qui bloque la pénétration et l'action des détergents.

La purification des DRMs doit être effectuée dans des conditions de température bien inférieures aux températures physiologiques. De plus la séparation de phases est fortement dépendante de la température et certains chercheurs ont soutenu que ce refroidissement induisait artificiellement la formation de domaines membranaires résistants aux détergents (47). Au contraire, d'autres ont proposé que le refroidissement stabilise simplement les domaines membranaires préexistants.

Ajoutant à la controverse, il a été proposé que les détergents tel que le Triton-X100, induisait une séparation de phases dans les membranes artificielles (48,49). Cependant l'extrapolation des observations réalisées sur ces systèmes de membrane artificielle aux membranes biologiques doit se faire avec beaucoup de prudence, la composition lipidique et protéique des membranes cellulaires étant beaucoup plus hétérogène et leur dynamique étant contrôlé par des interactions avec le cytosquelette (45). Ainsi, la question de savoir si les détergents induisent artificiellement la séparation de phase dans les membranes cellulaires reste un problème non résolu.

La composition lipidique et protéique des DRMs varie fortement en fonction du type et de la concentration en détergent utilisé ce qui peut conduire à une confusion quant à la composition moléculaire des radeaux lipidiques. Le détergent non-ionique Triton-X100 est le plus couramment utilisé pour la préparation des DRMs et il a été démontré qu'en comparaison à d'autres détergents tels que le Lubrol, le Tween ou le Brij il était le plus efficace quant à la solubilisation de la majorité des protéines membranaires et des lipides, tout en préservant et en enrichissant les composants des radeaux lipidiques (50).

**Malgré tout, l'utilisation de détergents doux** tels que le Brij, le Lubrol, le CHAPS ou le CHAPSO, permet d'obtenir des rendements de purification et des compositions en DRMs différents tant sur le plan des lipides que des protéines (**Fig. 9**). Cette observation peut être interprétée d'une manière telle qu'il existerait des sous-types de radeaux lipidiques différents (50-52). Le risque d'obtenir des artéfacts de préparation lié à l'utilisation des détergents a motivé le développement de méthodes annexes de purification des DRMs sans détergent (51,53).

De nombreux processus cellulaires contrôlés par des protéines associées aux DRMs sont sensibles à l'épuisement en cholestérol ou à la modulation de la concentration des autres constituants des radeaux lipidiques (23,54,55). La déplétion en cholestérol peut être réalisée de deux manières: en utilisant des composés liant ou chélatant le cholestérol comme la filipine, la saponine ou les cyclodextrines, ou en inhibant sa biosynthèse avec les statines. La spécificité du traitement peut être confirmée en réintroduisant artificiellement du cholestérol.

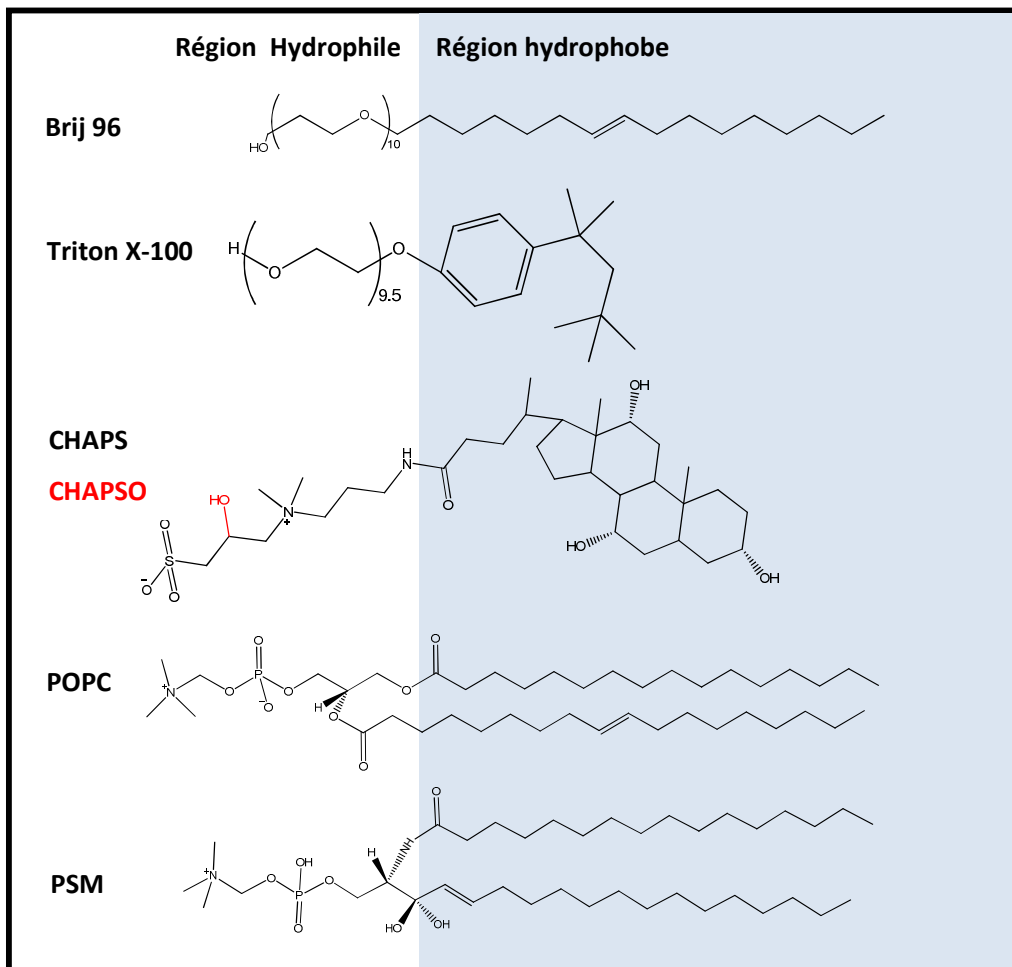


Figure 9. Diagramme comparant l'échelle relative des régions hydrophile (fond blanc) et hydrophobes (fond gris) des détergents Brij 96, Triton X-100, CHAPS et CHAPSO avec des lipides membranaires typiques: 1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphatidylcholine (POPC) et palmitoyl-sphingomyéline (PSM). Adapté de (56)

## **2.4 Rôle des radeaux lipidiques dans les processus cellulaires**

Les rafts sont impliqués dans une grande variété de processus biologiques. Ils permettent de concentrer certaines protéines puisqu'ils ont la capacité de favoriser les interactions protéiques. De plus, leurs propriétés physiques pourraient jouer un rôle important pour garantir aux protéines membranaires la conformation la plus compatible avec leur fonction. Actuellement, les rafts sont considérés comme jouant un rôle majeur dans la transduction des signaux, la réponse immunitaire et l'entrée de pathogènes :

### **- rafts et signalisation**

- a. Signalisation des IgE via le FcεRI, (57)
- b. Signalisation via le TCR (T-cell Receptor), (58) ; (59).
- c. Signalisation par BCR (B-cell Receptor); (60)
- d. Signalisation par EGFR (EGF Receptor); (61)
- e. Signalisation par l'insuline, (62); (63)

### **- rafts et immunité**

La synthèse des rafts est une étape essentielle à la formation de la synapse immunologique (58) ; (59) ; (64).

### **- rafts et infection**

- a. Les glycosphingolipides qui composent les rafts sont utilisés par les pathogènes (bactéries, champignons et parasites) pour adhérer aux cellules cibles, (65-67).
- b. Les récepteurs associés aux rafts, CD4 et CCR5, participent à l'entrée de pathogènes comme le VIH, (68-70).
- c. Les virus Ebola et Marburg possèdent dans leur enveloppe du GM, ganglioside résident des rafts, (71).

# *Chapitre III*

## *La voie de l'insuline*

### **3. LE RECEPTEUR DE L'INSULINE ET SA VOIE DE SIGNALISATION**

L'insuline est une hormone peptidique anabolique puissante, et le régulateur maître de l'homéostasie énergétique de tout l'organisme. Elle ne gouverne pas uniquement le devenir du glucose, mais également celui des protéines et des lipides. L'insuline est sécrétée par les cellules bêta des îlots de Langerhans dans le pancréas, et la destruction de ces cellules entraîne le diabète de type 1. La résistance aux effets de l'insuline, quant à elle, conduit au diabète de type 2, ce qui constitue un problème de santé grandissant partout dans le monde. La cascade de signalisation de l'insuline est initiée à la surface des cellules cibles où l'insuline se lie à son récepteur correspondant, le récepteur de l'insuline (RI).

#### **3.1 Tissus cibles de l'insuline**

L'insuline est un facteur de croissance clé pour de nombreux types cellulaires, on le retrouve plus particulièrement au cours du développement embryonnaire (72). Le RI est exprimé dans de nombreux tissus du corps humain, et les effets métaboliques de l'hormone sont plus particulièrement retrouvés au niveau du tissu adipeux, du muscle strié et du foie. Dans ces tissus, le RI est exprimé à des niveaux élevés, plus de  $10^5$  récepteurs par hépatocyte par exemple (73).

Sous l'influence de l'insuline, les adipocytes prélèvent le glucose et les lipides dans le sang pour les stocker sous forme de triacylglycérols (triglycérides). Le tissu adipeux est le site majeur de stockage des acides gras alimentaires circulant sous la forme de particules, les chylomicrons (74). L'insuline empêche également l'hydrolyse des triacylglycérols stockés, et donc la libération d'acides gras libres (AGL), dans les adipocytes. A jeun, en absence d'insuline, le tissu adipeux approvisionne les autres tissus en énergie en libérant les AGL dans la circulation (74).

Les cellules musculaires striées prélèvent le glucose circulant en réponse à l'insuline, et sont responsables pour une majeure partie du rééquilibrage de l'hyperglycémie postprandiale (75). L'insuline favorise également le stockage du

glucose dans les cellules musculaires sous forme de glycogène. L'augmentation de la captation du glucose par les cellules musculaires et les adipocytes est réalisée par un transporteur de glucose de type 4 (GLUT4) stocké à la surface de vésicules intracellulaires en l'absence d'insuline (76). La signalisation de l'insuline augmente l'exocytose de ces vésicules et par conséquent, la translocation de GLUT4 vers la membrane plasmique. L'insuline peut également augmenter l'activité du transporteur, et dans une certaine mesure, en réduire l'endocytose (77).

Le foie est quant à lui un organe «glucostat » puisqu'il adapte son métabolisme en fonction des niveaux de glucose sanguin via le transporteur GLUT2, constitutivement localisé à la membrane plasmique (78) . Cette adaptation hépatique est due notamment à l'expression de la glucose-6-phosphatase qui permet aux hépatocytes de libérer du glucose en réponse, par exemple, à la baisse des niveaux de glucose sanguin (75). L'insuline diminue l'activité de cette enzyme et la production de glucose hépatique par la voie de la néoglucogénèse. En outre, l'insuline diminue également la sécrétion de VLDL et stimule la synthèse de glycogène hépatique et la lipogénèse (75).

### **3.2 Le récepteur de l'insuline**

Le récepteur de l'insuline (RI) est constitué de 4 polypeptides glycosylés reliés par des ponts disulfures pour former une glycoprotéine de 400 kDa. On distingue deux paires de sous-unités: deux sous-unités transmembranaires  $\beta$  de 80 kDa possédant une activité protéine kinase, et deux sous-unités  $\alpha$  de 120 kDa à la surface de la membrane cellulaire (constituant ainsi un ectomère) et assurant la fixation de l'hormone grâce à la partie glucidique. L'ensemble des 4 sous-unités forme un cylindre appartenant à la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase, tous composés de domaines fonctionnellement distincts.

Lorsque l'insuline se fixe, le RI subit un changement conformationnel qui regroupe les sous-unités  $\beta$  en apposition étroite et permet la trans-autophosphorylation de plusieurs résidus de tyrosine au sein de ces sous-unités (79) (80). La plupart des autres récepteurs à activité tyrosine kinase intrinsèque, comme l'EGFR, sont constitués de monomères activés par un ligand, le facteur de



croissance, induisant la dimérisation. Même si une seule molécule de RI est fonctionnelle par elle-même, il a été démontré que la micro-agrégation de RI à la surface cellulaire est importante pour l'action de l'insuline (81). Il a été montré que le RI contient des résidus palmitoyl et myristoyl (82) (83) dont le rôle reste inconnu.

Dans la membrane plasmique des hépatocytes, les RI sont concentrés sur les microvillosités, tandis que dans les adipocytes, les récepteurs se retrouvent principalement sous la forme de clusters (84). Le récepteur associé à la membrane plasmique interagit éventuellement avec des éléments du cytosquelette, sa liaison à l'insuline le libérant de cette contrainte lui permettrait de diffuser plus librement (85) (86). Le RI contient un motif d'internalisation, retrouvé dans plusieurs autres récepteurs à activité tyrosine kinase, ce qui permet son endocytose de manière ligand-dépendante via un puits recouvert de clathrine (87) (88). Cette voie clathrine-dépendante est la voie d'internalisation majeure pour le RI (87) (89) (90) (85) bien que l'endocytose par la voie cavéolaire ait également été suggérée (91).

La dissociation de l'insuline de son récepteur se fait dans la lumière acide des endosomes précoces, le RI est recyclé vers la membrane plasmique, alors que l'insuline est dégradée dans les compartiments endosomaux (89). L'endocytose du complexe ligand-récepteur est un moyen de réguler à la baisse l'activité des récepteurs et, dans le cas des hépatocytes, il est également un moyen d'éliminer l'insuline de la circulation sanguine (87). Notons qu'une partie de la signalisation liée au RI se déroule au sein même des endosomes.

### **3.3 Voies de signalisation associées à l'insuline**

A partir de l'activation des IRS (insulin receptor substrate) par le récepteur de l'insuline, deux voies principales vont participer au transport de glucose. L'une directement via une action sur la quantité de transporteurs de glucose GLUT4 présents à la membrane plasmique, c'est la voie de la Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K) (**Fig. 10**); l'autre indirecte, il s'agit de la voie Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) (**Fig. 11**). La voie PI3K est essentiellement responsable des effets métaboliques de l'insuline, la voie MAPK, des effets sur la différenciation et la croissance cellulaire. Il existe également une autre voie régulant les effets

membranaires de l'insuline activée par le complexe APS/CAP/Cbl (voir point **3.4**) (**Fig. 12**).

Chaque voie joue un rôle distinct pour assurer la réponse :

**La voie PI3K.** La PI3K catalyse la réaction de phosphorylation du groupement 3-hydroxyl du phosphatidylinositol (PI) et des phosphoinositides. Les PI3K sont donc des kinases « lipidiques » qui sont associées à IRS-1 et dont l'activation entraîne entre autre le déclenchement de la voie permettant le transport de glucose (92). Les PI3K possèdent une sous-unité catalytique de 110 kDa et une sous-unité régulatrice de 85 kDa contenant deux domaines SH2. Il existe une multitude d'isoformes de sous-unités régulatrices et catalytiques et leurs associations entraînent un nombre important de PI3K différentes.

Les domaines SH2 de la sous-unité p85 reconnaissent les résidus tyrosine phosphorylés des IRS et rejoignent le complexe récepteur/IRS à proximité de la membrane, en transportant la sous-unité catalytique p110 (93). La liaison de p85 à p110 contrôle la stabilité et l'activité de p110 en exerçant sur elle une constante inhibition. La protéine p110 est alors activée et en contact avec la membrane (94), où elle phosphoryle le phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PI4,5P2) en phosphatidylinositol triphosphate (PIP3) qui constitue alors un second messager. En réponse à une stimulation par l'insuline, il se produit une accumulation de PIP3 à la membrane, créant ainsi des sites de reconnaissance pour d'autres kinases cellulaires telles que la protéine kinase B (PKB)/Akt ou la PDK1/2 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1/2). PKB activée par phosphorylation, à son tour phosphoryle et active d'autres relais intracellulaires impliqués en priorité dans les effets métaboliques de l'hormone. La phosphorylation de la glycogène synthase kinase 3 (GSK3)- $\beta$  favorise la synthèse de glycogène, celle de la kinase p70rsk et du facteur 4E-BP1 (4E binding protein 1), via la kinase mTOR (mammalian target of rapamycin) participe à l'action de l'insuline sur la synthèse protéique en augmentant le niveau général de traduction. La voie PI3K/PKB intervient également dans le contrôle négatif de l'expression génique: en phosphorylant les facteurs de transcription de la famille Forkhead, tel que FKHR, elle permet leur rétention cytosolique et prévient ainsi leur l'expression de leurs

gènes cibles parmi lesquels celui codant l'enzyme clé de la néoglucogenèse, la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK).

L'insuline exerce également, par la voie PKB, un effet anti-apoptotique en phosphorylant et inhibant le facteur pro-apoptotique Bad (95,96) (**Fig. 10**).

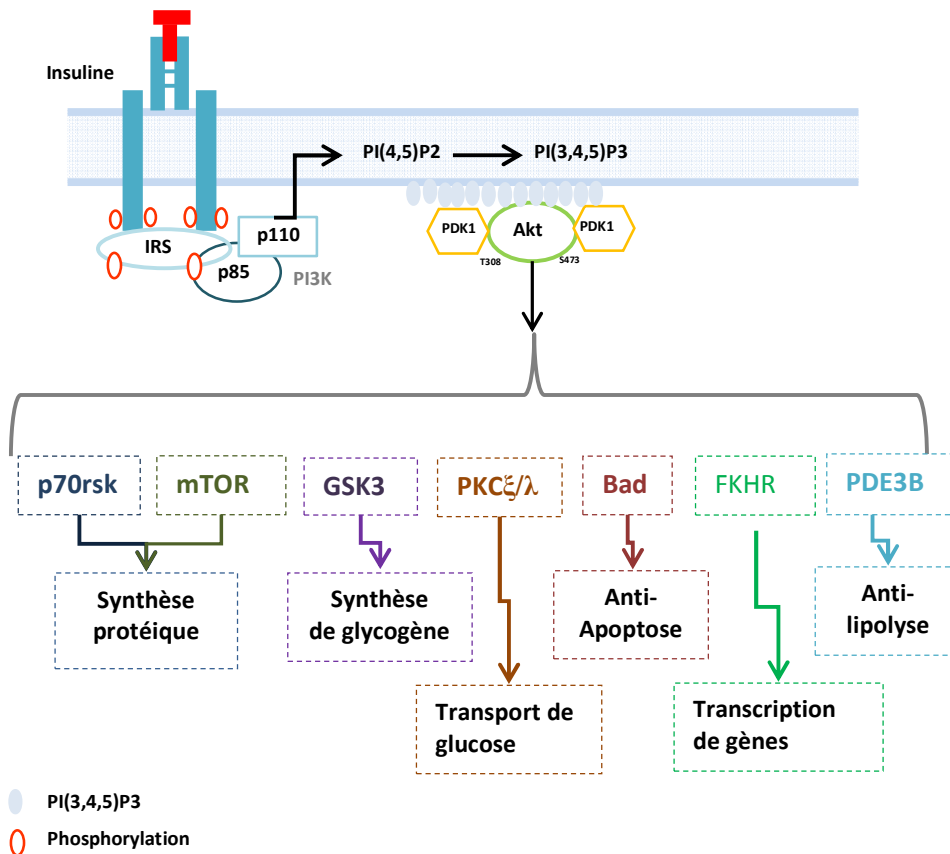


Figure 10. Voie de signalisation de l'insuline transitant par la voie PI3K. La fixation de l'insuline sur son récepteur induit la phosphorylation de ce dernier sur des résidus tyrosine. Ceci permet à la protéine substrat du récepteur de l'insuline (IRS) d'être activée par phosphorylation sur une tyrosine. La protéine IRS phosphorylée active à son tour la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) en se liant sur sa sous-unité p85. La conséquence de cette liaison est une levée de l'inhibition de la sous-unité catalytique p110 qui transforme le PIP2 membranaire en PIP3, second messager. La liaison du PIP3 à la phosphoinositide dépendant kinase 1 (PDK1) permet d'activer les protéines PKB/Akt et PKC responsables des effets métaboliques.

IRS, insulin receptor substrate; PDK1, phosphoinositide-dependent kinase-1; p70rsk, 70 kDa ribosomal S6 kinase; mTOR, mammalian target of rapamycin; GSK3, glycogène synthase kinase 3; PKC, protéine kinase C; FKHR, Forkhead in human rhabdomyosarcoma; PDE, Phosphodiesterase.

La voie de signalisation MAPK. Au départ du récepteur de l'insuline, deux voies aboutissent à l'activation de la voie MAP kinase (Fig. 11). Par le biais des protéines IRS, la liaison de

l'adaptateur Grb2 sur des phosphotyrosines spécifiques permet d'activer le facteur d'échange nucléotidique SOS (son of sevenless) qui active la petite protéine G Ras associée à la membrane plasmique en stimulant l'échange du GDP contre le GTP. Ras active alors la kinase Raf, qui phosphoryle et active la MAP kinase kinase (MEK) responsable de l'activation par phosphorylation des deux MAP kinases, ERK1 et 2 (extracellular signal-regulated kinase). Celles-ci activent la kinase p90rsk impliquée dans la synthèse protéique et sont transportées au noyau afin de phosphoryler et activer des facteurs de transcription tels que p62TCF impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaire. La seconde voie d'activation des MAP kinases démarre également au niveau du récepteur de l'insuline qui recrute les protéines adaptatrices de la famille Shc (src homologous and collagen protein), elles-mêmes reconnues par la protéine Grb2, activant ainsi la voie Ras. Shc activée, initie alors une cascade de phosphorylations (allant de Shc à Erk1/2), relayant les effets de l'insuline sur la transcription ou l'inhibition de certains gènes (Fig. 11).

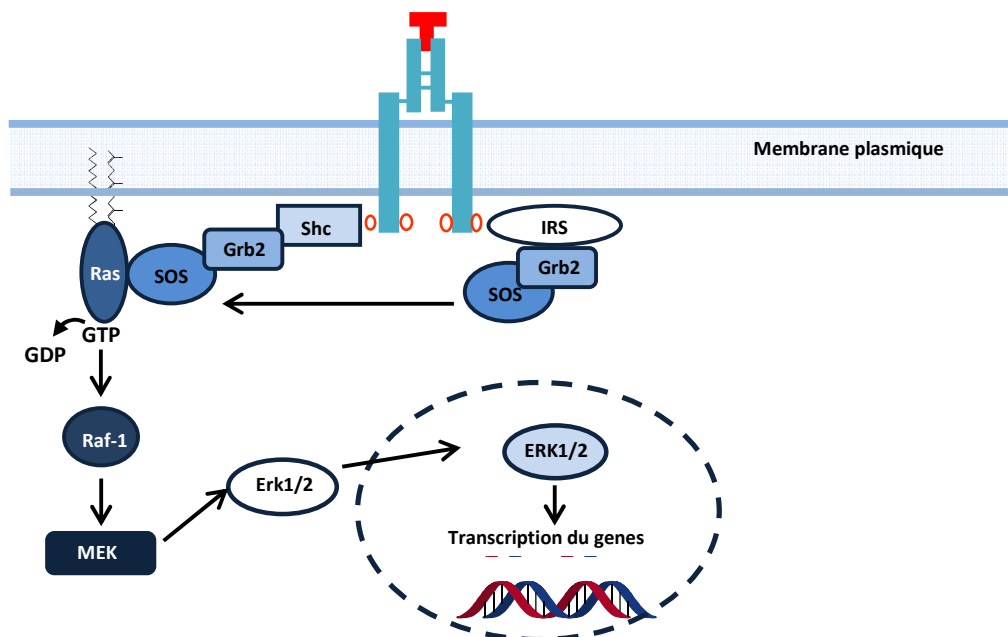


Figure 11. Voie de signalisation des MAPK.

Les protéines adaptatrices Grb2 ne possèdent aucune activité enzymatique. Elles sont constituées d'un domaine SH2 encadré par deux domaines SH3. Grâce à sa séquence SH2, Grb2 se fixe sur IRS ou sur SHC (une autre protéine adaptatrice) et grâce à ses séquences SH3, elle se fixe à SOS une molécule qui, en activant l'échange GDP/GTP de la petite protéine G : Ras, déclenche la cascade des MAP kinases (Raf→MEK→ERK). Erk active un grand nombre de facteurs de transcription responsables des effets de l'insuline sur la prolifération cellulaire.

Grb2, Growth factor receptor-bound protein 2; SH, src Homology domain; IRS, Insulin receptor substrate; SOS, Son of sevenless; MAP, Mitogen activated protein; Grb2, Growth factor receptor-bound protein 2; MEK, MAPK erk kinase; Erk, Extracellular signal regulated kinase; SHC, Src homology 2 domain-containing.

### **3.4 Cavéoles et radeaux lipidiques dans la signalisation de l'insuline**

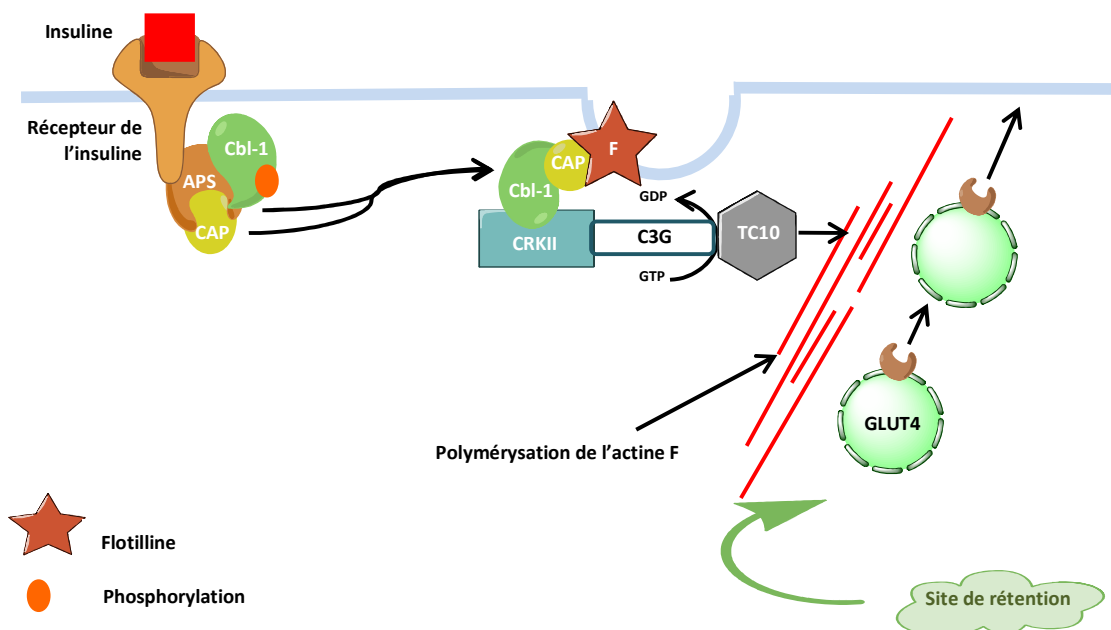
La cascade de phosphorylations provoquée par la fixation de l'insuline sur son récepteur peut être également le résultat de la fixation d'autres facteurs de croissance sur leur propre récepteur. Par exemple PI3K peut être activée par toutes sortes de stimuli divers. Toutefois, l'activité de ces facteurs ne conduit pas aux effets métaboliques de l'insuline, notamment la translocation de GLUT4 et l'augmentation de la captation du glucose. Ainsi, même si la signalisation PI3K est nécessaire pour cette activité associée à l'insuline, d'autres voies activées par l'insuline pourraient être nécessaires pour la translocation de GLUT4. En parallèle de cette translocation, la voie PI3K cible les cavéoles en phosphorylant la cavéoline-1, composant essentiel de ces structures (62,90,(97). Par la suite, la voie activée de l'insuline a été identifiée au sein des microdomaines membranaires. Tout d'abord, le produit du proto-oncogène c-Cbl est phosphorylé en réponse à l'insuline uniquement dans des types cellulaires capables d'effectuer la translocation de GLUT4 (98). Cbl est recruté au niveau du RI par le biais d'une protéine adaptatrice APS (99). Après phosphorylation de Cbl, les complexes se dissocient de ce dernier et s'accumulent au niveau des DRMs. (97,98,100).

Cette accumulation est possible grâce à une protéine s'associant à Cbl et appelée CAP, qui elle-même interagit avec la flotilline (**Fig. 12**) (36,101). Cbl phosphorylée recrute alors la protéine adaptatrice CrklI, avec le facteur d'échange nucléotidique C3G, au niveau des microdomaines. C3G, à son tour, actionne la petite GTPase TC10 associée constitutivement aux radeaux lipidiques (101,102).

L'inhibition de la voie Cbl-CAP-TC10 abolit la translocation de GLUT4, de la même manière que l'inhibition de PI3K (101,103). La localisation de cette voie au niveau des radeaux lipidiques est nécessaire à sa fonction (104). Il est suggéré que la signalisation dépendante de PI3K libérerait les vésicules intracellulaires contenant GLUT4 pour qu'elles puissent trafiquer vers la membrane plasmique,

alors que la voie Cbl-CAP-TC10 régulerait le trafic, l'ancrage ou la fusion de ces vésicules (105).

En effet, le complexe « exocyst » semble être une cible de TC10 (106). Il a été démontré que GLUT4 se localisait dans les cavéoles, ce qui expliquerait la nécessité de la voie TC10 à agir sur ces microdomaines (107). De toute évidence, une recherche plus approfondie est nécessaire pour déterminer le rôle des protéines Cbl en réponse à l'insuline.



**Figure 12. Voie du complexe APS/CAP/Cbl.** Cette voie démarre par la fixation de la protéine adaptatrice APS sur le récepteur de l'insuline. La protéine CAP (c-Cbl associated protein), en se liant à son tour sur le récepteur de l'insuline activé, recrute la protéine c-Cbl phosphorylée sur un résidu tyrosine par le récepteur de l'insuline. Le complexe CAP-c-Cbl phosphorylé est ciblé vers des régions spécialisées de la membrane, les rafts, au niveau desquels il s'associe à la flotilline. Cbl phosphorylée sur une tyrosine recrute alors l'adaptateur CrkII et le facteur d'échange nucléotidique C3G qui active la petite GTPase TC10, déclenchant la polymérisation des filaments d'actine servant de guide aux vésicules intracellulaires.

## *La voie de l'insuline*

**Au cours de ma thèse je me suis intéressée à l'implication de la O-GlcNAcylation dans la formation des radeaux lipidiques par le biais de la voie de signalisation de l'insuline .**

# *Chapitre IV*

*La O-N-*

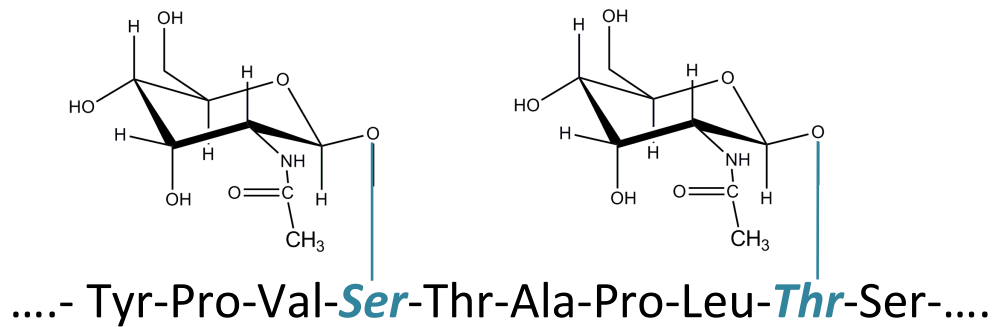
*acétylglucosaminylation*



#### **4. LA O-N-ACETYLGLUCOSAMINYLATION**

La modification des résidus de sérine et de thréonine des protéines nucléaires, cytoplasmiques et mitochondriales par la  $\beta$ -D-N-acétylglucosamine, modification post-traductionnelle appelée O-N-acétylglucosaminylation ou plus simplement O-GlcNAcylation (ou GlcNAcylation), a été découverte dans les années 1980 (108). Depuis, plus de 1000 protéines ont été identifiées comme étant modifiées par O-N-acétylglucosaminylation. Ces protéines sont de nature diverse et comprennent entre-autres des facteurs de transcription, des enzymes, des protéines du cytosquelette et des protéines ribosomales (109). Le nombre et la diversité des protéines ainsi modifiées suggèrent que la GlcNAcylation intervient dans différents processus physiologiques à tous les niveaux de régulation de la vie cellulaire. Bien que le rôle de la GlcNAcylation ne soit pas encore complètement compris, de nombreuses études démontrent qu'elle est impliquée dans la régulation de certains processus eux-mêmes régulés par phosphorylation, dans les interactions protéine-protéine et par extension dans l'activité enzymatique, dans le contrôle de la durée de demi-vie des protéines, dans le contrôle du trafic intracellulaire et notamment nucléocytoplasmique. Elle prend ainsi une part active dans la régulation de la transcription, la réponse au stress, le cycle cellulaire et le développement embryonnaire.

La modification par O-GlcNAc est majoritairement présente dans le cytosol et le noyau (110) des cellules eucaryotes mais également dans la mitochondrie (111). La GlcNAcylation ne requiert pas de séquence consensus au niveau de la protéine à modifier. Cependant, la présence de séquences de type proline-sérine/thréonine-sérine/thréonine, proline-valine-sérine/thréonine ou riches en acides aminés hydroxylés (sérine et/ou thréonine) est favorable à cette glycosylation (**Fig. 13**).



**Figure 13. Représentation schématique d'un peptide modifié par GlcNAcylation.** La GlcNAcylation consiste en l'ajout d'un unique résidu de *N*-acétylglucosamine sur des résidus de sérine ou de thréonine.

Certains sites de GlcNAcylation ont été identifiés comme, par exemple, la sérine 16 du récepteur murin aux œstrogènes (112). Il a également été rapporté que c-Myc est modifié par la O-GlcNAc sur la thréonine 58 (113), un résidu connu comme étant phosphorylé. La forme phosphorylée de c-Myc au niveau de ce résidu s'accumule principalement dans le cytoplasme, l'alternance O-GlcNAcylation/phosphorylation pourrait alors réguler différentes fonctions de c-Myc (114). Enfin, la sérine 149 de p53 est également modifiée par la O-GlcNAc et prévient sa dégradation en diminuant la phosphorylation de la thréonine 155 (115).

L'analyse de certaines cibles de la O-GlcNAc transférase ou OGT (116), l'enzyme permettant le transfert du résidu de GlcNAc sur la protéine cible, a permis d'établir que les sites de GlcNAcylation sont similaires à ceux reconnus par certaines kinases et plus particulièrement les kinases proline dépendantes (117), suggérant que GlcNAcylation et phosphorylation puissent être des modifications réciproques.

#### 4.1 Les enzymes de la GlcNAcylation

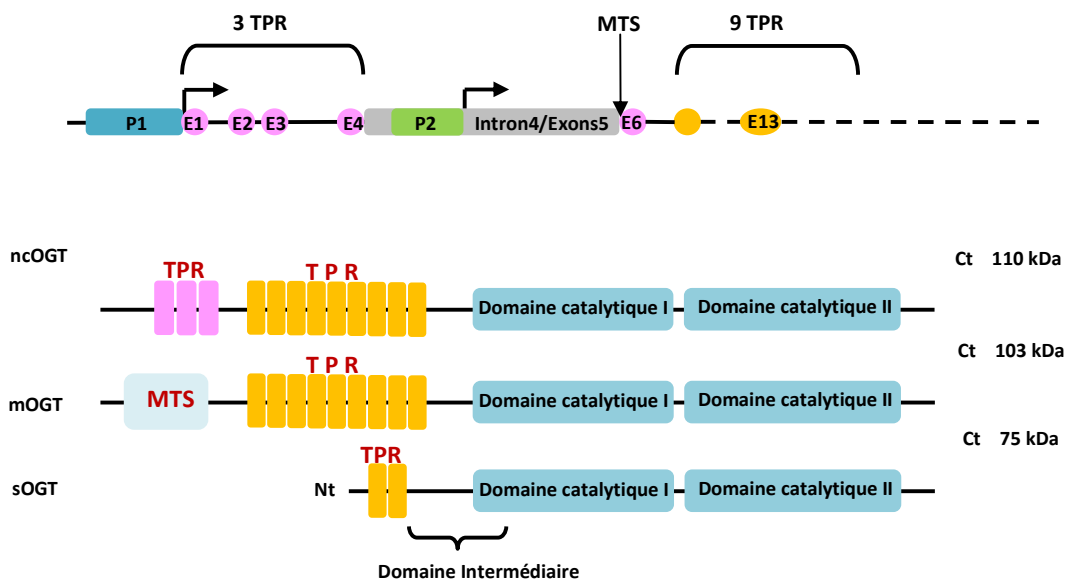
Bien que fonctionnant selon le même principe que le système kinases/phosphatases (plus de 1000 kinases et 150 phosphatases ont été répertoriées) (118,119), le dynamisme de la GlcNAcylation n'est contrôlé que par un seul couple d'enzymes antagonistes: la O-N-acétylglucosaminyltransférase (O-GlcNAc transférase ou OGT, E.C. 2.4.1.94), qui transfère le résidu GlcNAc sur la

protéine cible et la O-N-acétylglucosaminidase (O-GlcNAcase ou OGA, E.C. 3.2.1.52) qui hydrolyse ce résidu.

#### 4.1.1 La O-N-acétylglucosaminyltransférase (OGT)

**Domaines et fonctions de l'OGT.** Un seul gène codant l'OGT a été identifié (120), il est présent dans la région Xq13 chez l'homme. Chez les mammifères, l'OGT est exprimée dans tous les types de cellules avec un niveau maximal d'expression dans le pancréas, puis dans le cerveau (113-115).

L'OGT existe sous trois formes : deux formes nucléocytoplasmiques de 110 et 78 kDa et une forme mitochondriale de 103 kDa (121). *In vivo*, l'OGT forme un hétérotrimère composé de deux sous-unités de 110 kDa et d'une seule sous-unité de 78 kDa (122) (**Fig. 14**).



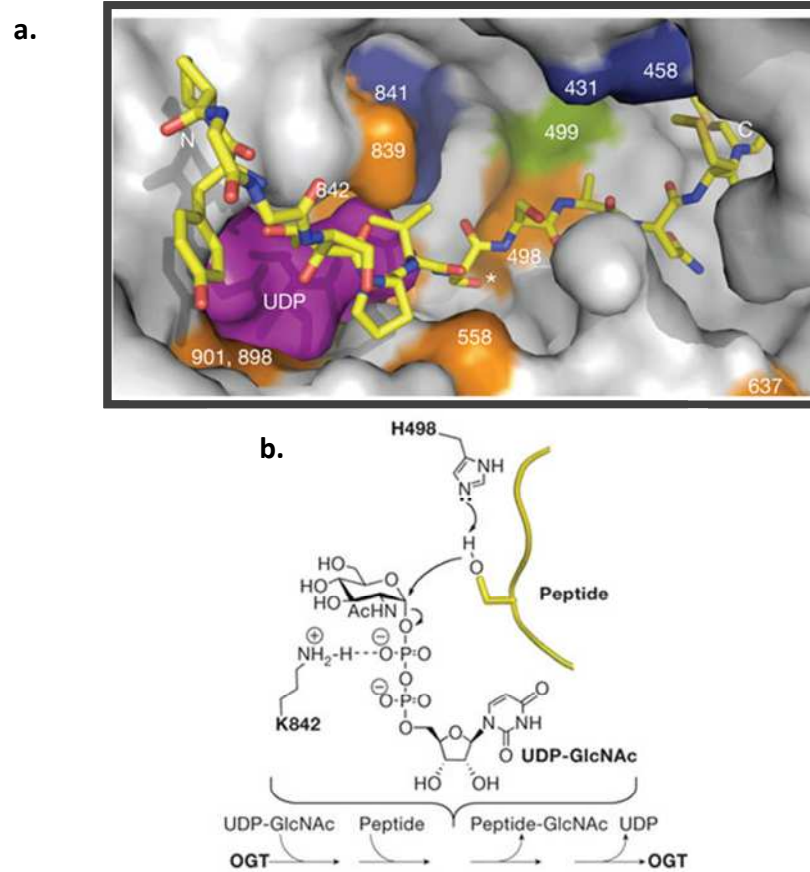
**Figure 14. Représentation schématique des trois isoformes de l'OGT.** La ncOGT est l'isoforme de pleine longueur issue du promoteur P1. Le transcrite de la mOGT est également issu du promoteur P1 mais il subit un épissage permettant l'introduction d'une séquence d'adressage à la mitochondrie (MTS). Le transcrite de la sOGT est issu du promoteur P2. Sa traduction nécessite l'utilisation d'une méthionine en phase interne conduisant à la synthèse d'une protéine tronquée. D'après (123).

L'OGT possède une haute affinité pour l'UDP-GlcNAc, estimée à 545 nM lors de sa purification (124). Cette très haute affinité, très inhabituelle, s'explique par le fait de la compétition pour l'UDP-GlcNAc avec les transporteurs du nucléotide-sucre de l'appareil de Golgi et du *reticulum endoplasmique*.

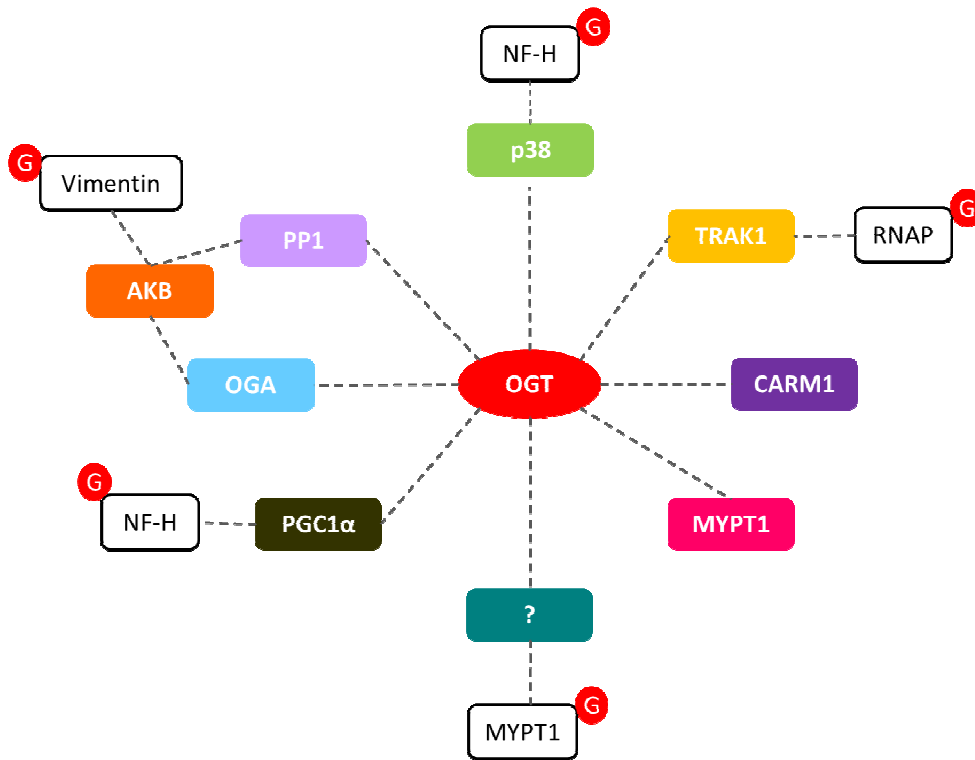
L'OGT est une protéine possédant un domaine catalytique C-terminal (125) et un domaine d'interaction protéique appelé TPR (*tetratricopeptide repeat*) (126,127) séparés par une région dite "espaceur". L'OGT des mammifères est à la fois tyrosine et sérine phosphorylée (128) et contient jusqu'à 11,5 TPRs.

Des structures de l'OGT récemment publiées nous permettent de mieux comprendre le mode de reconnaissance de la glycosyltransférase vis-à-vis de la séquence peptidique des protéines substrats et par conséquent son mécanisme enzymatique (129) (**Fig.15**).

**OGT et interactions protéiques.** L'OGT peut exercer son activité en interagissant avec un ou plusieurs de ses nombreux partenaires protéiques ce qui lui permet d'être adressée vers une localisation spécifique au sein de la cellule ou d'augmenter sa spécificité envers certains substrats. Ceci pourrait expliquer comment « une seule » OGT modifie spécifiquement une myriade de protéines et pourquoi aucune réelle séquence consensus de GlcNAcylation n'existe. Par exemple, TRAK1 (*trafficking protein, kinesin-binding-1*) également appelée OIP106 (*OGT-interacting protein of 106 kDa*) interagit avec l'OGT via son domaine TPR (109). Des expériences de co-immunoprécipitation ont montré la présence d'un complexe ARN polymérase II/TRAK1/OGT, suggérant que l'interaction avec TRAK1 est nécessaire pour l'adressage de l'OGT au niveau des sites de transcription, ce qui lui permettrait d'exercer son activité de régulation transcriptionnelle. L'OGT peut également être adressée au niveau des promoteurs par le biais d'une interaction avec mSin3A: l'OGT interagit alors avec une histone désacétylase (HDAC1) et réprime la transcription. De nombreux complexes protéiques impliquant l'OGT ou l'OGA ont été décrits à ce jour, tels que le complexe OGT/protéine phosphatase-1 (PP1), le GlcNAcylase, complexe comprenant l'OGT et l'OGA et un complexe plus sophistiqué comprenant quatre activités enzymatiques à savoir kinase/phosphatase/OGT/OGA, (**Fig. 16**).



**Figure 15. Structure du complexe OGT-UDP-peptide.** **a.** Site actif de l'OGT (gris) associé au peptide accepteur CKII (représentation en bâtonnets) et l'UDP (pourpre). **b.** mécanisme catalytique proposé pour l'OGT. D'après (129).



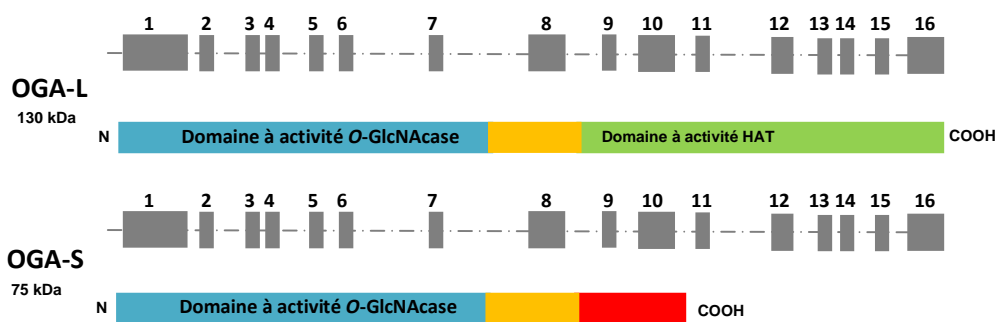
**Figure 16. Interactome de l'OGT:** schéma récapitulatif des interactants décrits de l'OGT. G= motif O-GlcNAc.

#### 4.1.2. La O-N-acétylglucosaminidase (OGA)

L'OGA est l'enzyme qui hydrolyse le résidu de O-GlcNAc conférant ainsi le caractère de réversibilité à la GlcNAcylation. L'OGA est connue depuis longtemps sous le nom d'hexosaminidase C (130) mais ce n'est qu'en 1994 qu'elle a été isolée et caractérisée à partir de la rate du rat en tant qu'OGA (131). L'enzyme clive spécifiquement les résidus GlcNAc dont le carbone C1 est engagé dans une liaison d'anomérie  $\beta$ .

L'ADNc de l'OGA a été cloné en 2001 (132). Chez l'homme, le gène codant l'OGA est localisé sur le chromosome 10 dans la région q24.1 à q24.3 (132). Le gène de l'OGA est ubiquitaire : il est présent et conservé depuis les procaryotes jusqu'à l'homme (133). La comparaison des séquences protéiques de mammifères révèle 80 % d'homologie entre elles et 55 % avec celle de *C. elegans* (132). L'OGA

ne possède pas d'homologie de séquence avec d'autres glycosidases. Cependant, de faibles homologies sont respectivement retrouvées entre les extrémités codant les régions N- et C-terminales avec des hyaluronidases et des acétyltransférases (134). Chez l'homme, l'OGA est exprimée dans tous les tissus (135) et la production de deux transcrits conduit aux deux isoformes identifiées: l'isoforme de pleine taille ou L-OGA de 130 kDa et l'isoforme de 75 kDa ou S-OGA (126,127,130,131) (**Fig. 17**).



**Figure 17. Organisation génomique et domaines protéiques des isoformes de l'OGA.**

L'isoforme longue de l'OGA (OGA-L) est codée par 16 exons et contient un domaine N-terminal à activité hyaluronidase et un domaine C-terminal à activité HAT. L'isoforme courte de l'OGA est codée par 10 exons et contient un domaine N-terminal à activité hyaluronidase. Le domaine HAT est remplacé par une queue unique de 14 acides aminés. D'après (136).

Les isoformes de l'OGA auraient des localisations subcellulaires préférentielles puisque dans une lignée cellulaire de glioblastome, l'OGA de 75 kDa est principalement localisée dans le noyau alors que son homologue de pleine longueur est plutôt cytoplasmique (132,135,137). Chez le rat, l'épissage alternatif des transcrits du gène de l'OGA permet la traduction de deux isoformes supplémentaires de 84 et 90 kDa (138).

Toutes les isoformes de l'OGA connues possèdent une activité *in vitro*. Cependant, l'OGA de pleine longueur est beaucoup plus active que l'isoforme de 75 kDa (139). Il apparaît cependant que l'activité catalytique est portée par

l'extrémité N-terminale (138). Pour l'OGA humaine, des expériences de mutagenèse ont montré l'importance des résidus aspartate 174 et 175 dans l'activité enzymatique (140).

L'OGA serait une enzyme bi-fonctionnelle puisqu'en plus de son activité O-GlcNAcase, elle possède une activité histone acétyltransférase (HAT) (138) (**Fig. 17**). Il a été récemment démontré que l'OGA-S s'accumule à la surface des gouttelettes lipidiques naissantes avec la périlipine-2, les deux protéines étant stabilisées par l'inhibition du protéasome (136).

#### **4.2. L'UDP-GlcNAc**

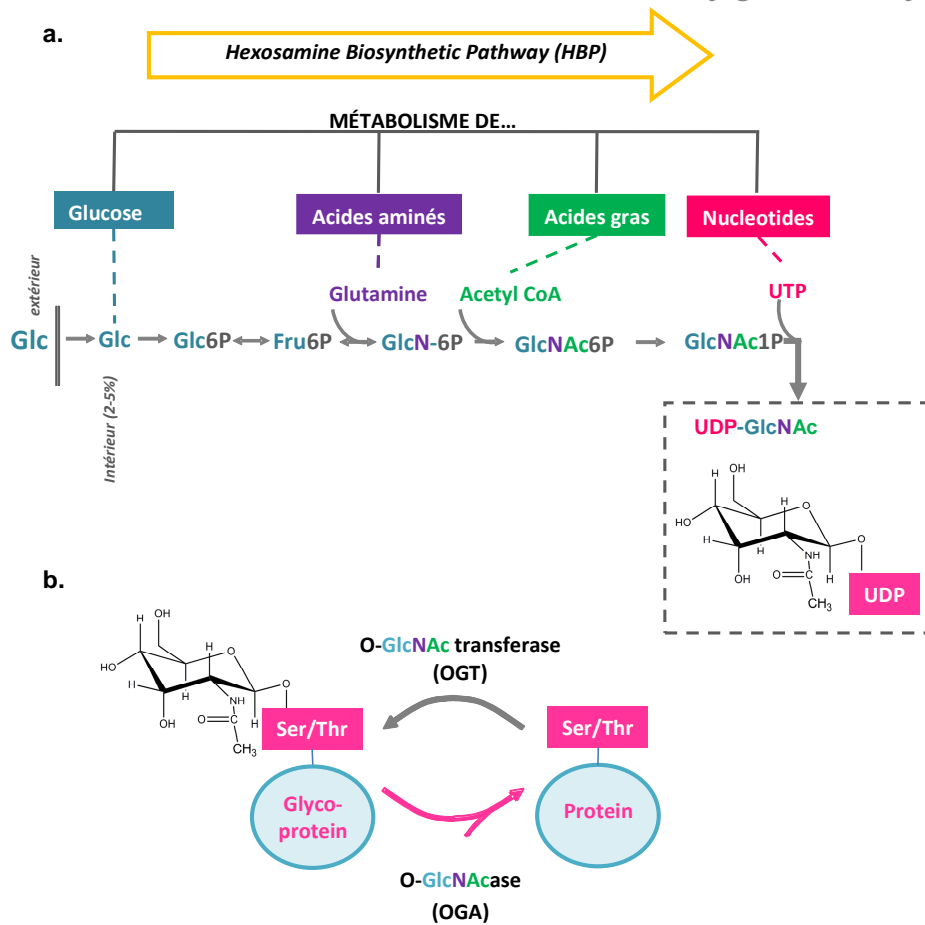
Le nucléotide-sucré donneur du résidu O-GlcNAc est l'uridine 5'-diphospho-N-acétylglucosamine ou UDP-GlcNAc qui est issu de la voie de biosynthèse des hexosamines (HBP ou *Hexosamine Biosynthetic pathway*), (**Fig. 18**).

Dans les cellules, 2 à 3% du glucose emprunte la voie des hexosamines et est converti en uridine-5'-diphospho N-acétylglucosamine (141).

Ce processus commence par la phosphorylation du glucose pour produire du glucose-6-phosphate converti ensuite en fructose-6-phosphate. La majeure partie du fructose-6-phosphate est utilisé pour produire de l'ATP via la voie de la glycolyse. Une petite fraction de celui-ci est métabolisé par la L-glutamine:D-fructose-6-phosphate amidotransférase (GFAT) en glucosamine-6-phosphate: cette réaction constitue l'étape limitante de la voie HBP (142,143).

Une augmentation du flux de glucose vers la voie HBP causée par la surexpression de la GFAT, l'utilisation de glucosamine ou l'hyperglycémie provoquent une augmentation de la production de l'UDP-GlcNAc et résulte en une augmentation concomitante du niveau de GlcNAcylation (138-140).





**Figure 18.** La voie de biosynthèse des hexosamines fournit le substrat aux processus de O-GlcNAcylation mais également de tous les autres types de glycosylation. **b.** Le dynamisme de la GlcNAcylation est contrôlé par deux enzymes l'OGT, qui transfère le résidu de GlcNAc sur les protéines cibles à partir de l'UDP-GlcNAc et l'OGA qui hydrolyse ce résidu.

#### 4.3.1 "Cross talk" entre O-GlcNAcylation et phosphorylation

La O-GlcNAcylation peut être considérée pour différentes raisons comme l'équivalent sucré de la phosphorylation (**Fig. 19**). Les niveaux de phosphorylation et de O-GlcNAcylation sont très sensibles à l'état nutritionnel de la cellule tout comme leur donneur respectif, l'ATP et l'UDP-GlcNAc, substrats à haut potentiel énergétique produits par le métabolisme cellulaire. Toutes les protéines O-GlcNAcylées identifiées à ce jour, peuvent également être modifiées par phosphorylation, ce qui renforce l'interaction possible entre les deux modifications.

La GlcNAcylation, comme la phosphorylation, est une modification post-traductionnelle dynamique et réversible. La demi-vie du motif O-GlcNAc étant beaucoup plus courte que la demi-vie de la protéine qu'il modifie (144), (143); les protéines GlcNAcylées subissent de nombreux cycles de GlcNAcylation/déGlcNAcylation au cours "de leur vie".

La mise en évidence de son dynamisme, et plus encore, l'existence, d'une relation de réciprocité avec la phosphorylation appelée « Ying Yang » (symbole de la conception taoïste qui joint les contraires), augmente plus encore son caractère essentiel. Comme il a été indiqué plus haut toutes les protéines GlcNAcylées sont également des phosphoprotéines. Ainsi, une protéine pourra être soit GlcNAcylée, soit phosphorylée, ou les deux. Pour certaines d'entre elles, il a été démontré qu'un même résidu d'acide aminé hydroxylé ou qu'un résidu hydroxylé adjacent pouvait être soit GlcNAcylé soit phosphorylé, les modifications post-traductionnelles s'excluant mutuellement. En effet, la modification pharmacologique des niveaux de phosphorylation affecte de manière opposée ceux de GlcNAcylation (145)). En outre, il a été démontré que la déphosphorylation due à l'activité phosphatasique du complexe PP1/OGT était suivie d'une GlcNAcylation du substrat (146). Il est également possible que les deux modifications agissent en synergie, la modification d'une protéine par phosphorylation entraînant sa GlcNAcylation ou vice-versa.

#### **4.4 Interaction de la O-GlcNAc avec d'autres modifications post-traductionnelles**

Il est probable que la O-GlcNAc entre en interaction avec d'autres modifications post-traductionnelles autres que la phosphorylation, mais peu d'études ont été réalisées dans ce domaine. On sait que la GlcNAcylation du suppresseur de tumeur p53 sur la sérine 149 empêche son ubiquitination (115), mais semble-t-il indirectement car la GlcNAcylation empêche la phosphorylation sur la thréonine 155. La surexpression modeste d'OGT modifie les patrons d'acétylation et de méthylation des histones, peut-être par défaut de phosphorylation de l'arginine méthyltransférase CARM1(147). Il a également été récemment démontré que la O-GlcNAc fait partie du code des histones (148).

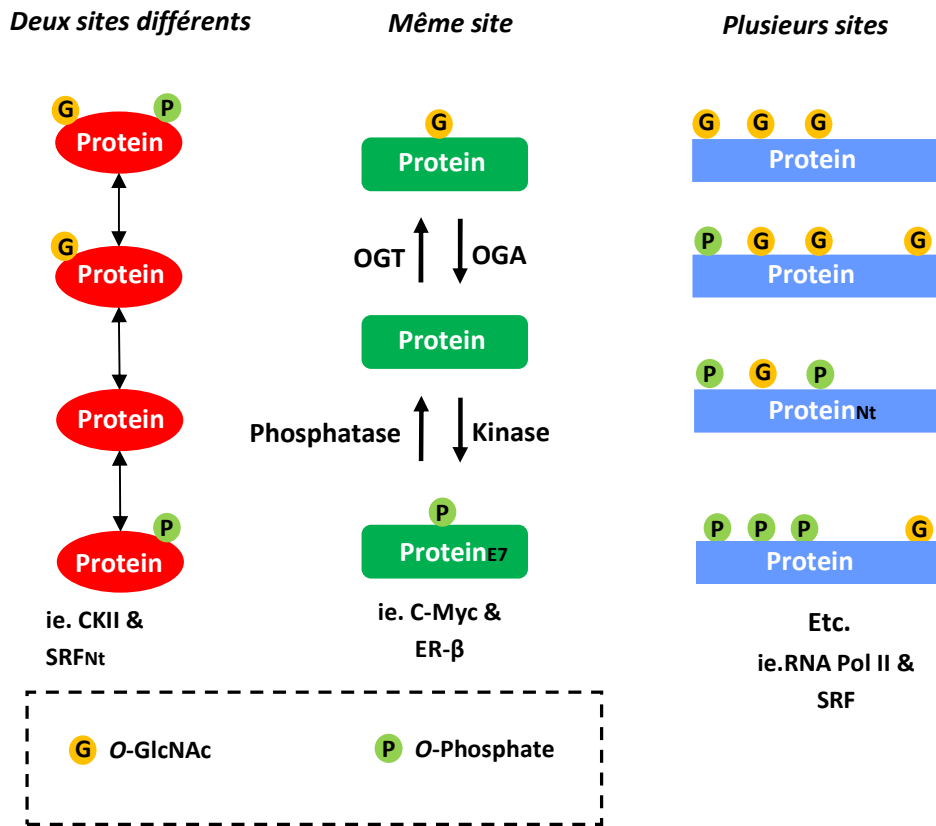


Figure 19. Quelques isoformes possibles d'une protéine phosphorylable et GlcNAcylable.

La GlcNAcylation intervient sur les résidus sérine et thréonine soit seule, soit sur un site adjacent à un site de phosphorylation, soit sur le même site, ou sur plusieurs sites en un nombre illimité de combinaisons. La GlcNAcylation et la phosphorylation peuvent avoir l'une pour l'autre une relation réciproque, elles sont dans ce cas antagonistes pour le même site (compétition de sites) ou pour des sites adjacents. Exemples concrets de modification sur des sites adjacents: caséine kinase II (CKII) et SRF; même site: c-Myc et récepteurs des œstrogènes (ER-β); plusieurs sites: ARN Pol II et SRF. D'après (149).

Beaucoup de protéines sont à la fois acétylées et modifiées par GlcNAcylation, mais la relation entre ces modifications reste largement inconnue (150). La compréhension et l'élucidation de la communication entre les modifications post-traductionnelles dans la régulation des fonctions ou des dysfonctionnements cellulaires semble être un domaine d'avenir en recherche biomédicale (112).

#### **4.5 Rôles de la O-GlcNAc**

La dynamique de la GlcNAcylation permet de réguler les interactions protéine-protéine, l'activité et l'expression de protéines ainsi que leur localisation nucléocytoplasmique (151), certaines de ces fonctions étant associées à l'antagonisme GlcNAcylation /phosphorylation.

**Modulation des interactions protéine-protéine par la O-GlcNAc:** La GlcNAcylation modulerait les interactions protéiques en induisant des changements de conformation comme cela a été observé pour p53 (152). Ces modifications conformationnelles pourraient être dues à la relation antagoniste entre GlcNAcylation et phosphorylation. En effet, la présence d'un groupement phosphate apporte localement une charge anionique à la protéine alors qu'un groupement GlcNAc, non chargé, ne fait qu'occuper le site. La littérature relate quelques exemples d'inhibition ou d'activation des interactions entre protéines modifiées par GlcNAcylation et leurs partenaires. C'est notamment le cas pour Sp1 où la glycosylation de son domaine de transactivation inhibe les interactions avec ses partenaires TAF110 et holo-Sp1 (153) et pour CREB et TAFII130, pour lesquels l'interaction est bloquée par la GlcNAcylation de CREB (154). De même, la présence d'un résidu de GlcNAc sur YY1 empêche le recrutement de la protéine Rb (155). Par contre, il a été démontré que le co-activateur transcriptionnel CBP interagit avec le facteur de transcription STAT5 lorsque ce dernier est sous sa forme GlcNAcyliée (156).

De manière plus générale, la présence d'un résidu O-GlcNAc permet la formation de complexes multimériques notamment avec les protéines de choc thermique comme cela a pu être démontré au laboratoire. En effet, les protéines de choc thermique Hsc70 et Hsp70 sont douées d'une activité lectinique (157) qui leur permet de s'associer à différentes protéines porteuses d'un résidu O-GlcNAc. Cette activité lectinique de Hsp 70 augmente, d'ailleurs, en cas de stress nutritionnel (158).

Il est proposé que la formation de complexes entre les protéines GlcNAcylées et les protéines de choc thermique permette de les protéger d'une éventuelle dénaturation et/ou dégradation.

**Rôle dans le transport nucléaire :** L'hypothèse d'un rôle de la GlcNAcylation dans le transport de protéines cytosoliques vers le noyau a été émise dès lors que les protéines du pore nucléaire ont été identifiées comme GlcNAcylées (159,160). Un anticorps dirigé spécifiquement contre le motif O-GlcNAc est d'ailleurs issu fortuitement de recherches sur les nucléoporines (161). Le rôle de la GlcNAcylation dans le transport nucléocytoplasmique reste, aujourd'hui, sujet à caution. En effet, l'utilisation de WGA (Wheat Germ Agglutinin, lectine liant le motif O-GlcNAc) inhibe le transport nucléaire (162). Cependant, cette inhibition est à attribuer à un encombrement stérique du pore nucléaire plutôt qu'au masquage du résidu modifié par O-GlcNAc (163). Différentes études sur des facteurs de transcription tels que Pax-6 (164), Stat5A (156,165) et Sp1 (166) ont permis de montrer des localisations différentes entre les isoformes porteuses d'un résidu O-GlcNAc et celles non glycosylées, l'isoforme GlcNAcylée étant préférentiellement nucléaire. Cependant, l'observation de ce phénomène pourrait être due à une activité accrue de l'OGA dans le compartiment cytoplasmique (137). L'exemple de c-Myc est le plus démonstratif en termes de transport nucléaire. En effet, des expériences de microscopie ont permis de montrer un adressage nucléaire d'un peptide de c-Myc modifié par GlcNAcylation (114). De même, l'acide okadaïque (inhibiteur de phosphatases) induit une diminution de la localisation nucléaire de la protéine Tau de manière concomitante à une diminution de sa GlcNAcylation (167). Il a été reporté que la localisation subcellulaire du facteur de transcription bêta-pancréatique Neuro D1 est régulé par GlcNAcylation dans la lignée cellulaire de souris insulinome MIN6 (168).

**Régulation de la stabilité des protéines par la GlcNAcylation :** Le protéasome, responsable de la dégradation enzymatique des protéines, est GlcNAcylé sur plusieurs de ses sous-unités. En effet, des études menées tout d'abord chez la drosophile ont montré que 5 des 19 protéines formant le 19S et que 9 des 14 protéines constituant le 20S sont GlcNAcylées (169). Ces résultats ont ensuite été confirmés chez les mammifères (170).

De manière plus spécifique, il a été démontré que le facteur de transcription Sp1 sous sa forme hypoGlcNAcylée a une demi-vie réduite par rapport à la forme GlcNAcylée (171). Cet effet protecteur de la GlcNAcylation des protéines a également été suggéré pour le récepteur bêta aux œstrogènes chez la souris (mER- $\beta$ ). La sérine 16 de ce facteur de transcription est le siège à la fois d'une GlcNAcylation et d'une phosphorylation. Située au coeur d'une séquence PEST, la phosphorylation de ce résidu induit la dégradation du récepteur alors que sa GlcNAcylation augmente sa demi-vie (112). Par ailleurs, il a également été démontré, comme nous l'avons mentionné plus haut, que la GlcNAcylation de la sérine 149 de p53 induit une diminution de son ubiquitinylation par inhibition de la phosphorylation de la thréonine 155 (115).

### **Régulation du cycle cellulaire**

Des études récentes ont montré que O-GlcNAc et OGT sont important dans la régulation du cycle cellulaire. L'ablation complète du gène de l'OGT chez la souris (120) et chez la drosophile (172) montre que l'OGT est indispensable à la vie. Globalement, les niveaux de O-GlcNAc diminuent au cours de la mitose, et augmentent une fois que les cellules entrent à G1 (173). Cette diminution au cours de la phase M est concomitantes à une diminution des niveaux d'ARNm OGT (174). En Plus, la O-GlcNAcylation d'oncogènes, tels que c-Myc (114), ou de suppresseurs de tumeur, comme p53 (115), régule leur stabilité. Enfin, l'analyse par spectrométrie de masse du phosphoprotéome et O-GlcNAc démontre que des altérations dans les niveaux d'OGT affectent considérablement les principaux points de régulation lors de la mitose (175).

Il a été démontré récemment que la O-GlcNAc et l'OGT affectent la structure de la chromatine. Par exemple, la GlcNAcylation de l'histone MLL5 méthyltransférase induit son activité enzymatique, en stimulant la granulopoïèse (176) et la surexpression de l'OGT affecte la dynamique de certaines modifications post-traductionnelles des histones dans la phase M (147). Enfin, la O-GlcNAc peut être considérée comme faisant partie du code des histones (148).

#### **4.6 La GlcNAcylation et le diabète de type II**

Le diabète de type II est caractérisé par une hyperglycémie chronique. Cette maladie résulte en partie d'un phénomène de résistance à l'insuline des cellules pancréatiques, du foie, des adipocytes et des muscles squelettiques. Cette résistance est marquée par un défaut de transport du glucose dans ces cellules.

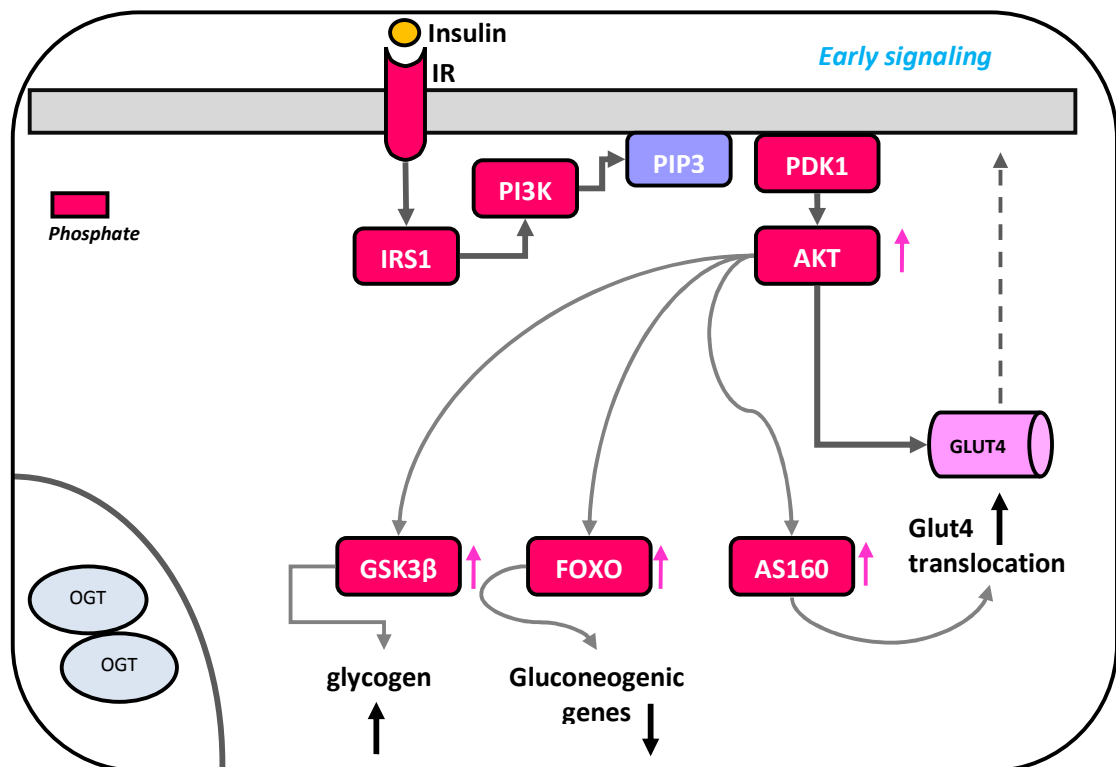
De longue date, il a été postulé que la voie de biosynthèse des hexosamines jouait un rôle dans l'étiologie du diabète et la toxicité du glucose. Un lien étroit entre la conversion du glucose en glucosamine et la résistance à l'insuline a été établie par des études réalisées sur les adipocytes 3T3L1 (141) et par une étude sur la glutamine:fructose 6-phosphate amidotransférase (177,178) enzyme régulant la biosynthèse de l'UDP-GlcNAc. Des études ultérieures ont montré que l'augmentation globale de O-GlcNAcylation par inhibition de la O-GlcNAcase par le PUGNAc, inhibait le transport de glucose insulino-dépendant (179). Toutefois, une étude a démontré qu'un inhibiteur plus spécifique de O-GlcNAcase, le NButGT, augmente la O-GlcNAcylation globale mais n'induit pas de résistance à l'insuline dans les adipocytes (180). D'autres études ont montré que l'augmentation de O-GlcNAcylation n'est pas indispensable pour l'insulino-résistance induite par le glucose (181).

Néanmoins, il existe de nombreuses études génétiques mais également des travaux portant sur des tissus sensibles à l'insuline, tels que le muscle, le foie et le tissu adipeux, soutenant une participation directe de la O-GlcNAcylation et de la voie de biosynthèse de hexosamines dans la résistance à l'insuline (182) (**Fig.20**).

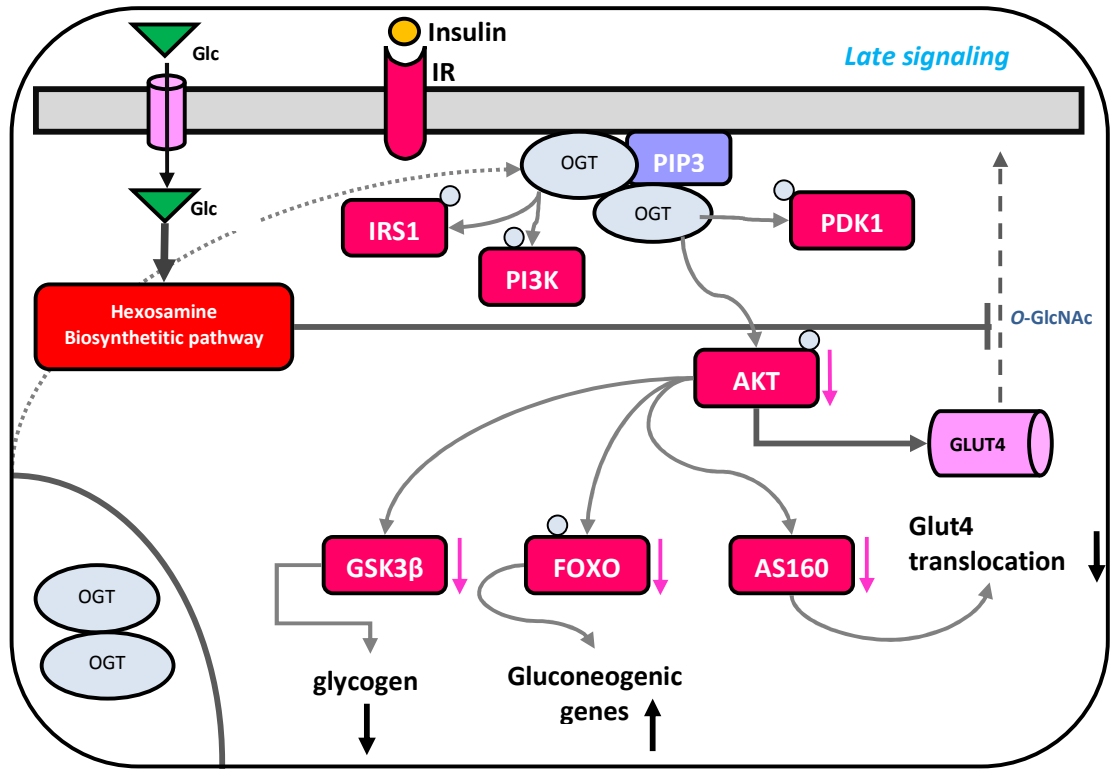
La surexpression de l'OGT dans le muscle, le tissu adipeux ou dans le foie provoque cette même résistance à l'insuline (183,184); ceci serait dû à la GlcNAcylation de protéines clés de la voie de transduction de l'insuline (185). Dans des cultures primaires d'adipocytes de rat, une diminution du niveau de transporteur du glucose GLUT4 à la surface cellulaire est concomitante à la GlcNAcylation de IRS-1 et d'Akt2 (186). La glycosylation de ces deux protéines est induite par l'insuline suite au recrutement de l'OGT à la membrane plasmique par le biais du PIP3 et est responsable d'une inhibition de la transduction du signal

(184). La glycosylation d'Akt inhibe son activité par diminution de sa phosphorylation (187),(188). Le facteur de transcription FoxO1 est l'une des cibles d'Akt. FoxO1 joue un rôle crucial dans l'expression des protéines impliquées dans la néoglucogénèse telles que la glucose 6-phosphatase et la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK). La phosphorylation de FoxO1 par Akt inhibe sa fixation à l'ADN et donc son activité transcriptionnelle (189). Par ailleurs, l'activité transcriptionnelle de FoxO1 est augmentée lorsque celui-ci est GlcNAcylé (190). L'insuline active également la glycogène synthase; l'activité de cette dernière étant inhibée par GlcNAcylation (191).

La GlcNAcylation est également impliquée dans la voie de synthèse de l'insuline. En effet, NeuroD1 et PDX-1, deux facteurs de transcription pancréatiques impliqués dans cette voie, sont GlcNAcylés (168),(192). La glycosylation de NeuroD1 induit sa relocalisation nucléaire (168) alors que celle de PDX-1 est associée à une augmentation de son interaction à l'ADN et à une surexpression de l'insuline (192).







**Figure 20. Régulation de la voie de signalisation de l'insuline par O-GlcNAcylation.** Au cours de la phase tardive de signalisation insulinaire, une modification par GlcNAcylation de certaines molécules clés de la cascade permet d'atténuer le signal de l'insuline. Ce mécanisme serait réalisé par le biais de la translocation d'OGT à la membrane plasmique, en réponse à l'insuline. D'après (182).

# *Chapitre V*

*V. TRAVAUX PERSONNELS(partie 1):  
La O-GlcNAc: un élément régulateur de  
la communication entre les lipides rafts  
et la voie de l'insuline ?*

## **5. LA O-GlcNAc: UN ELEMENT REGULATEUR DE LA COMMUNICATION ENTRE LES LIPIDES RAFTS ET LA VOIE DE L'INSULINE ?**

Bien que les fonctions régulées par la O-GlcNAcylation soient très largement étudiées, aucune étude n'a porté jusqu'ici sur le rôle putatif de cette modification dans la dynamique des radeaux lipidiques ni sur la localisation potentielle de l'OGT au niveau de ces microdomaines. Or, il a été récemment démontré que l'élévation des niveaux de O-GlcNAcylation participait activement au phénomène de résistance à l'insuline et un nombre important de preuves a également été apporté sur le rôle critique des microdomaines lipidiques dans ce phénomène de résistance (34,101,193,194). On sait également depuis peu qu'après stimulation par l'insuline, l'OGT est recrutée à la membrane plasmique par l'intermédiaire de son domaine PPO (PIP-binding activity of OGT), et que cette re-localisation inactive la voie de signalisation PI3-kinase/Akt par antagonisme de la phosphorylation (184).

Ces trois observations suggèrent que l'OGT constitue un relai essentiel permettant de transmettre et d'intégrer l'information portée par des stimuli externes au travers de la membrane plasmique, et plus particulièrement des rafts.

**L'objectif** de ce travail a été d'étudier le rôle potentiel de la O-GlcNAcylation et particulièrement de l'OGT dans la formation des microdomaines dans un contexte de signalisation par l'insuline.

Les résultats de cette étude ont été compilés et présentés sous la forme d'une publication en cours de finalisation :

**Insulin signaling controls the expression of O-GlcNAc transferase and its interaction with lipid microdomains**

**Yobana PEREZ-CERVERA**, Katia GUEDRI, Vanessa DEHENNAUT, Stéphanie OLIVIER, Carlos Josué SOLORZANO MATA, Jean- Claude MICHALSKI, François FOULQUIER and Tony LEFEBVRE.

**INSULIN SIGNALING CONTROLS THE EXPRESSION OF  
O-GLCNAC TRANSFERASE AND ITS INTERACTION  
WITH LIPID MICRODOMAINS.**

**Yobana PEREZ-CERVERA, Katia GUEDRI, Vanessa DEHENNAUT, Stéphanie OLIVIER,  
Carlos Josué SOLÓRZANO MATA, Jean-Claude MICHALSKI, François FOULQUIER and  
Tony LEFEBVRE**

CNRS-UMR 8576, Unit of Structural and Functional Glycobiology, IFR 147, University of Lille 1,  
59655 Villeneuve d'Ascq, FRANCE

Address correspondence to: Tony Lefebvre, Tel. + 33 3 20 43 47 58; Fax. +33 3 20 43 65 55; E-mail.

tony.lefebvre@univ-lille1.fr

Running title: OGT localizes to lipid rafts

**Nonstandard abbreviations**

DRM, Detergent Resistant Membrane

OGA, *O*-GlcNAcase

OGT, *O*-GlcNAc transferase

WCL, Whole cell lysate

**Abstract (136 words)**

Lipid microdomains (rafts) are dynamic ordered lipid domains belonging to cell membranes involved in diverse cellular functions including signal transduction, membrane trafficking and infection. Many studies have reported relationships between insulin signaling and lipid rafts. Likewise, links between insulin signaling and *O*-GlcNAcylation have also been described. However, the potential connection between *O*-GlcNAc and raft dynamics remains unexplored. Here we show that *O*-GlcNAc and the enzyme that creates this modification, *O*-GlcNAc transferase (OGT), are localized in rafts. Upon insulin stimulation, we observe time-dependent increases in OGT expression and localization within rafts. We also show these processes depend on activation of the PI3-Kinase (PI3K) pathway and that inhibition of this pathway prevents assembly of rafts upon insulin stimulation. Taken together these findings indicate that *O*-GlcNAcylation, lipid rafts, and signaling pathways are spatiotemporally coordinated to enable fundamental cellular functions.

**Key words:** Lipid rafts, Cell signaling, *O*-GlcNAcylation, PI3-Kinase

## **Introduction**

Lipids were long considered the fifth wheel among the families of biological molecules. This concept was overturned in the early seventies when Singer and Nicolson proposed the fluid mosaic model, in which membranous components are spatiotemporally organized and wherein integral proteins diffuse laterally through the membrane (1). They showed that the lipid bilayer membrane is in a liquid state and that individual lipid molecules move laterally in the plane of the membrane. During the late eighties, the discovery of lipid microdomains was another major breakthrough for the understanding of the biological roles of lipids in the field of cellular signaling. It was proposed that apical proteins are clustered together with lipids in the trans Golgi network into microdomains enriched in glycosphingolipids (2). This proposal partly explained how apically transported proteins are segregated to the basolaterally resident compounds. The use of non-ionic detergents enabled extraction of these lipid rafts and the analysis of their composition. Rafts are enriched in glycosphingolipids and cholesterol, which self-associate to form liquid-ordered domains, and enable glycolipid-protein complexes to become detergent insoluble (3). Rafts have since been implicated as crucial effectors of fundamental cell functions such as cell signaling (4). Numerous studies have reported the pivotal function of rafts in insulin signaling (5). It was observed three decades ago that insulin receptors in adipocytes are mostly clustered (6) whereas in hepatocytes they are evenly dispersed on the cell surface. In adipocytes these receptors are sequestered in caveolar invaginations of the plasma membrane (7) whereas in hepatocytes, which lack caveolin, the main cholesterol-binding structural component of caveolae, the receptors localized in lipid rafts only upon stimulation by insulin (8). In any case, cholesterol is crucial for the activation of the insulin receptor and for downstream signaling. More precisely in  $\beta$ -cells it has been shown that non-caveolar lipid rafts participate in insulin signaling and that, depending on the insulin receptor isoform (A- or B-type driving the expression of insulin or glucokinase respectively), the activation occurred within distinct plasma membrane domains (9). Recently it was suggested that insulin resistance might be the result of lipid microdomain disturbances. An increase in ganglioside GM3 content in 3T3-L1 adipocytes correlates with a decrease in the insulin receptor content in lipid microdomains and leads to defective insulin signaling (10).

Intriguingly, recent studies have proposed *O*-GlcNAc transferase (OGT) is recruited to the plasma membrane through an interaction with PIP3 (phosphatidylinositol-3, 4, 5 triphosphate) via a PPO (phosphoinositide-interaction domain of OGT) region involved in the termination of the insulin transduction cascade (11). These data indicating a physical interaction between OGT and the plasma membrane led us to ask the question whether the glycosyltransferase may be recruited to lipid microdomains in response to insulin stimulation. Here we investigate the relationships between insulin signaling, rafts formation and the highly dynamic post-translational modification (PTM) *O*-GlcNAcylation.

## **Materials and methods**

### ***Cell culture and treatments***

HepG2 cells were maintained in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco, Cergy Pontoise, France) supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 5 IU/mL penicillin, and 50 µg/mL streptomycin at 37°C in a humidified atmosphere enriched with 5% CO<sub>2</sub>. Cultures were carried out on dishes (diameter 100 mm) preliminarily treated with 0.1% (w/v) porcine gelatin (Sigma-Aldrich, Lyon, France) as described previously (12). For starvation, cells were washed with 10 mL of phosphate buffered-saline (PBS) and incubated in serum-free medium for 24 hours and then incubated with 100 nM of human recombinant insulin (Gibco) for the indicated time periods.

### ***Subcellular fractionation***

HepG2 cells were fractionated using the ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kit (Calbiochem, Darmstadt, Germany) according to the manufacturer's instructions.

### ***Preparation of the Detergent-Resistant Membrane (DRM) fractions***

The procedure was adapted from a previously described protocol (13). Briefly, cells were washed in cold PBS and lysed in a MES buffered saline (MBS: 25 mM MES, 150 mM NaCl, pH 6.5) containing either 1% (w/v) of CHAPSO (3-([3-Cholamidopropyl]dimethylammonio)-2-hydroxy-1-propanesulfonate), 1% Triton X 100 (***t-Octylphenoxypolyethoxyethanol***) 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaF, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM EGTA, 5 mM DTT and a cocktail of proteases inhibitors. The lysate was passed ten times through a 21-gauge needle fitted to a 2 mL syringe and incubated on ice for 30 min. An equal volume of the cell lysate was added to 90% (w/v) sucrose in MBS and 2 mL of the mixture was placed in a 12 mL ultracentrifuge tube. A discontinuous sucrose gradient was formed on the top of the mixture by casting 6 mL of 35% (w/v) sucrose in MBS and then 4 mL of 5% (w/v) sucrose in MBS. The tubes were placed in a Beckman SW41 rotor and centrifuged for 23 h at 30,000 rpm



(100,000 X g) at 4°C. Twelve fractions of 1 mL each were collected from the top to the bottom and subsequently analyzed. The DRM fractions corresponding to lipid microdomains were identified by Western blot using an anti flotillin-1 antibody.

### ***Cholesterol and protein assays***

Samples were assayed for their protein content using the BCA protein assay kit (Pierce) and for their cholesterol content using the Amplex Red Cholesterol Assay Kit (Invitrogen) and according to the manufacturer's recommendations.

### ***SDS-PAGE, Western blotting and antibody staining***

Equal amounts of protein were subjected to Western blotting. Samples were analyzed by SDS-PAGE under reducing conditions and proteins were electroblotted on a nitrocellulose sheet (GE Healthcare, Templemars, France). Equal loading was verified using Ponceau red staining. Membranes were first saturated for 45 min with 5% (w/v) non-fatty acid milk in Tris-Buffered Saline (TBS)-Tween buffer (15 mM Tris/HCl, 140 mM NaCl and 0.05 % (v/v) Tween-20, pH 8.0).

Antibodies used were the mouse monoclonal anti-*O*-GlcNAc RL2 (1:1,000; Ozyme, Saint-Quentin en Yvelines, France), mouse monoclonal anti-CD147 (1:2,000; Biolegend, Saint-Quentin en Yvelines, France), Rabbit polyclonal anti-OGT AL28 (1:2,000; generously provided by Pr. G.W. Hart) and TI14 (1:2,000; Sigma), rabbit polyclonal anti-insulin receptor chain  $\beta$  (1:1,000; Santa Cruz Biotechnology), rabbit polyclonal anti HSP70 (1:1,000; Stressgen, Brussels, Belgium), mouse monoclonal anti-Hsp70 (1:1,000; Stressgen), rabbit polyclonal anti-GAPDH (1:5,000; Abcam, Paris, France), rabbit polyclonal anti-Flotillin-1 (1:4,000; Sigma), mouse monoclonal anti-Flotillin-2 (1:2,000; Santa Cruz Biotechnology), rabbit polyclonal anti-phospho-AKT and mouse monoclonal anti-AKT (1:2,000; Cell signalling), rabbit polyclonal anti-tubulin (1:1,000 Santa Cruz Biotechnology); rabbit polyclonal anti-histone 2B (1:5,000; Millipore), rabbit polyclonal anti phospho-Erk1/2 (1:1,000; Cell signalling, Boston, MA, USA), rabbit polyclonal anti-Erk2 (1:5,000;

Cell Signalling), chicken anti-OGA 345 (1:4,000; generously provided by Pr. G. W. Hart) and rabbit polyclonal anti-actin (1:10,000; Santa Cruz Biotechnology)

Membranes were incubated with the different antibodies overnight at 4°C, then washed three times with TBS-Tween for 10 min and incubated with either an anti-rabbit, an anti-mouse (GE Healthcare) or an anti-chicken (Abcam) horseradish peroxidase-labelled secondary antibody at a dilution of 1:10,000 for 1h. Finally, three washes of 10 min each were performed with TBS-Tween and the detection was carried out with enhanced chemiluminescence (GE Healthcare).

### ***Immunofluorescence microscopy***

Cells were grown on glass coverslips for 12-24 h, washed once with PBS, and fixed by incubating for 25 min with 4% (w/v) paraformaldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.2) at room temperature. The coverslips were rinsed twice with 0.1 M glycine in PBS for 15 min. The fixed cells were incubated for 1 hour with primary antibodies diluted in the blocking solution (0.1 % (v/v) Triton X-100, 1 % (w/v) bovine serum albumin (BSA), 2 % (v/v) normal goat serum in PBS). After washing with PBS, Alexa 488- or Alexa 568-conjugated secondary antibodies (Molecular Probes, Villebon sur Yvette, *France*) diluted in the blocking solution were applied for 1 h. Immunostaining was detected through an inverted Leica TCS-SP5 confocal microscope. Data were collected by using a Leica TCS SP5 and processed in Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems, San Jose, CA, USA).

## **Results**

### **Insulin increases membrane associated OGT levels.**

To investigate the effects of insulin stimulation on OGT and *O*-GlcNAcylation levels, HepG2 cells were starved for 24 hours prior to stimulation with insulin for 8 hours. After this time cellular fractionation was performed. Cytosolic, membrane, and nuclear proteins were then isolated and analyzed by Western blot (Fig. 1). The efficiency of fractionation was first checked using established fraction-specific protein markers;  $\beta$ -tubulin for the cytoplasmic fraction, CD147 for the membrane fraction and H2B for the nuclear fraction. The distribution of OGT was estimated within each fraction and, interestingly while no change was detected in the nuclear fraction, a significant increase in OGT levels was observed in the membrane fraction following insulin stimulation. This demonstrates that OGT is recruited to membranes following insulin stimulation, an observation in accord with previous data (11). We next wondered whether the interaction between OGT and membranes was specifically localized to lipid microdomains.

### ***O*-GlcNAc and OGT are resident of Rafts.**

The occurrence of *O*-GlcNAcylated proteins within lipid microdomains has never been investigated. To address this lack of knowledge we isolated detergent-resistant membranes (DRM) from HepG2 cells using a buffer containing either CHAPSO (see the materials and methods section for details) and fractionated them using discontinuous sucrose density gradient ultracentrifugation (13). Fractions were collected and probed using anti-flotillin-1 (an established protein specific marker of rafts), anti-actin, anti-OGT and anti-*O*-GlcNAc antibodies (Fig. 2A). Fractions were also analyzed according to their cholesterol and proteins contents (Fig. 2B). We find DRMs contain both OGT and *O*-GlcNAcylated proteins. To test whether the presence of OGT and *O*-GlcNAcylated proteins within DRMs is not detergent dependent, DRMs were prepared with CHAPSO and Triton X100, and fractions 5, the most cholesterol-enriched, were analysed (Fig. 3). No significant difference was observed regarding the use of either detergent.

**Insulin stimulates the expression of OGT and promotes its targeting to rafts.**

Preliminary experiments demonstrated that in parallel to activation of insulin signaling-associated pathways, including the PI3K and MAPK pathways, the expression of OGT and its activity were enhanced (data not shown). To determine whether such a phenomenon occurs within DRMs, time-course experiments were performed using HepG2 cells (Fig. 4). First, cells were stimulated with insulin for 4 hours and the level of *O*-GlcNAcylation associated to the DRMs (Fig. 4A) was determined. We observed that *O*-GlcNAc increases both in the DRMs (fraction No. 5) and in the non-DRMs fractions (fractions No. 11 and 12) in response to insulin. We then performed time course experiments to evaluate the effect of insulin stimulation. The expression of OGT increases and is accompanied by a burst in *O*-GlcNAcylation (Fig. 4B left panel and S1A); note that a slight increase in OGA is also observed. More importantly and as expected based on the above data (Fig. 4B right panel and S1B), the *O*-GlcNAcylation level gradually increases in DRMs and OGT transiently localizes to the lipid microdomains in response to insulin. We also found that the established DRMs-specific marker flotillin (Fig. 4B right panel and S1B), the insulin receptor  $\beta$ -chain, and the less common DRMs resident protein Hsp70 (Fig. S1B) also accumulated within lipid microdomains in response to insulin. It seems likely OGT follows a bulk flow that displaces it to DRMs during insulin stimulation.

**The expression of OGT and its localization to DRMs is PI3-Kinase dependent.**

Since the expression of OGT and its recruitment to DRMs is mediated by the insulin-signaling cascade, we tested the effect of inhibition of the PI3K and of the MAPK pathways on OGT expression and targeting to lipid microdomains (Fig. 5). We find the PI3K inhibitor wortmannin abolishes the effect of insulin on OGT expression (Figure 5A) whereas treatment of the cells with the MAPK pathway inhibitor U0126 does not, showing that the PI3K pathway contributes to the expression of OGT. Moreover, wortmannin also blocks insulin-mediated OGT targeting to the plasma membrane and, more generally, the DRM-resident marker flotillin (Fig. 5B and S2) and the insulin receptor  $\beta$ -chain (fig. S2). Note that both the localization of OGT and flotillin to fraction No. 5 corresponding to

the DRMs is strictly dependent upon the stimulation by insulin. The same experiment was carried out using U0126 and we find this MAPK inhibitor did not affect the DRMs, OGT/insulin receptor  $\beta$ -chain, nor the flotillin (Fig. S2). These results strongly suggest that assembly of lipid microdomains and targeting of OGT to rafts are under the control of the PI3K pathway.

### **Effects of inhibiting MAPK and PI3K on the localization of flotillin-2 and the insulin receptor.**

After insulin stimulation, large clusters of insulin receptors co-localizing to the DRM- specific marker flotillin-2 are observed (Fig. 6). A previous study reporting a similar phenomenon showed that the human hepatoma HuH7 cell insulin receptor is recruited to DRMs upon insulin stimulation (8). To address whether this co-localization is dependent upon the MAPK and/or the PI3K pathways, cells were first treated with wortmannin or U0126 prior to insulin stimulation and then co-localization of the two proteins was evaluated by confocal microscopy. We used lovastatin, a cholesterol biosynthesis inhibitor, as a control to verify our colocalization assay was functioning appropriately. As expected, we find lovastatin treatment completely abolishes the formation of flotillin-2/insulin receptor clusters, indicating the assay reports on colocalization appropriately. Wortmannin treatment significantly diminishes colocalization of flotillin-2 and insulin receptor into clusters. In contrast, however, on treating cells with U0126 we find only a slight decrease in colocalization of flotillin-2 and the insulin receptor. This observation suggests that the formation of flotillin-2/insulin receptor clusters is likely dependent on the PI3K pathway.

## DISCUSSION

In this work, we describe connections between the dynamics of lipid microdomains and *O*-GlcNAcylation in response to insulin stimulation. *O*-GlcNAc has received much attention in the last ten years (15) due in large part to commonalities between *O*-GlcNAcylation and phosphorylation. *O*-GlcNAc is much more simple than classical *N*- and *O*-Glycosylation and is highly dynamic, making it able to control many fundamental cellular processes (16). Nevertheless relatively few studies describe the regulation of signaling pathways by *O*-GlcNAcylation. Among these few examples, the modification of the p65 sub-unit of NF- $\kappa$ B by *O*-GlcNAcylation on threonine 322 and 352 (17) is notable, though the functional role of *O*-GlcNAc on this transcription factor remains unclear. On one hand, it was shown to decrease the interaction between NF- $\kappa$ B and the inhibitor I $\kappa$ B $\alpha$  thus enhancing its activity; on the other hand, it was suggested that in cardiomyocytes *O*-GlcNAcylation leads to a decrease in the activation of the NF- $\kappa$ B pathway (18). With regard to the MAPK pathway, we previously demonstrated that inhibition of OGT in *Xenopus laevis* oocytes leads to its inactivation (19) and that an increase in the *O*-GlcNAcylation content results in its activation (20). We have also observed *O*-GlcNAcylation of Erk2, the downstream component of the MAPK pathway, but have not identified any functional role in this case (21). A more detailed view of the regulation of the PI3K/AKT pathway has been obtained. As an example, numerous components of the insulin signaling pathway or proteins involved in the metabolism of glucose have been shown to be *O*-GlcNAcylated; AKT1 (22), AKT2 (23), GLUT1 (24), casein-kinase II, glycogen synthase kinase-3 (25), IRS1/2 (26), PDK1, the p110 $\alpha$  unit of PI3-Kinase and the  $\beta$ -chain of the insulin receptor (11). The group of Ronald Evans in La Jolla demonstrated that in response to insulin, OGT was recruited within ninety seconds to the inner face of the plasma membrane by PIP3 through a region adjacent to the catalytic domain II located at the carboxyl end of the transferase (11). Lysines 981 and 982 were identified as crucial for interacting with the acidic phosphate groups of the phosphoinositides through a newly described interaction domain of OGT named PPO for "PIP-binding activity of OGT", while another report indicates that mutations of eight of the ten lysines in the C-Cat domain did not affect OGT catalytic activity (27). In the same paper, it has been also reported that the exposure of 3T3-L1 adipocytes to

high glucose concentrations or PUGNAc decreased the phosphorylation of AKT at threonine 308, a known phosphorylated critical site. In contrast, phosphorylation of Erk1/2 in the MAPK pathway was unaffected. The phosphorylation of IRS1 was also modified under these conditions, since the treatment of adipocytes with PUGNAc or the adenoviral infection of adipocytes and Fao hepatoma cells with Ad-OGT increased the phosphorylation of IRS1 at Ser307 and Ser632/635, three sites that down-regulate the insulin signaling pathway. Taken as a whole, this paper demonstrates that OGT can perturb the insulin-signaling cascade by interacting with PIP3 at the plasma membrane. OGT modifies numerous components of the insulin signaling pathway lowering the response to insulin, and thus in all likelihood, participating in the physiopathology of insulin resistance. But, intriguingly, it was found that individuals with Alzheimer's disease and type-2 diabetes have a decrease in the activation of the PI3K pathway that correlates with a general decrease with *O*-GlcNAcylation (28). Quite obviously, apprehending the regulation of signaling pathways by *O*-GlcNAcylation, especially in multifactorial pathologies like type-2 diabetes and neurodegeneration, needs to be deepened and clarified.

Our observation that after cell starvation flotillin locates to fraction No. 5, which is composed of DRMs, in response to insulin is therefore interesting. Lovastatin is often used for synchronizing cells in G1 phase (29). As shown in figures 3, during S1 and S2 phases we observed a significant increase of flotillin in DRMs after stimulation of starved cells (synchronized in G0/G1) with insulin suggesting that lipid microdomains are necessary for cell cycle resumption. Even though the effect exerted by lovastatin on the cell cycle arrest is partly the result of a proteasome inhibition (30), it cannot be ruled out that blocking the formation of rafts is a crucial event for the resumption of the cell cycle. In this sense, a recent observation made on embryonic stem cells (31) is of interest. Indeed, depletion of cholesterol using methyl- $\beta$ -cyclodextrin or the down-expression of caveolin-1 by siRNA reduced the expression of cyclin D1 and cyclin E and the proliferation index.

Based on our findings, we propose that cells control their signaling pathways by increasing OGT levels and targeting the enzyme to rafts through activation of the PI3K pathway (Fig. 7). This ubiquitous mechanism may constitute a common regulatory system found in animal cells in response to external stimuli. One can expect that deregulation of this process could have dramatic effects on the etiology of diseases such as cancers, diabetes and senile dementia.

## REFERENCES

1. Singer, S.J., and Nicolson, G.L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**, 720-731
2. Van Meer, G., and Simons, K. (1988) Lipid polarity and sorting in epithelial cells. *J. Cell. Biochem.* **36**, 51-58
3. Skibbans, J.E., Roth, M.G., and Matlin, K.S. (1989) Differential extractability of influenza virus hemagglutinin during intracellular transport in polarized epithelial cells and nonpolar fibroblasts. *J. Cell. Biol.* **108**, 821-832
4. Simons, K., and Gerl, M.J. (2010) Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **11**, 688-699
5. Bickel, P.E. (2002) Lipid rafts and insulin signaling. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **282**, E1-E10
6. Jarett, L., Schweitzer, J.B. and Smith, R.M. (1980) Insulin receptors: differences in structural organization on adipocyte and liver plasma membranes. *Science* **210**, 1127-1128
7. Gustavsson, J., Parpal, S., Karlsson, M., Ramsing, C., Thorn, H., Borg, M., Lindroth, M., Peterson, K.H., Magnusson, K.E., and Strålfors, P. (1999) Localization of the insulin receptor in caveolae of adipocyte plasma membrane. *FASEB J.* **13**, 1961-1971
8. Vainio, S., Heino, S., Månsson, J.E., Fredman, P., Kuismanen, E., Vaarala, O., and Ikonen, E. (2002) Dynamic association of human insulin receptor with lipid rafts in cells lacking caveolae. *EMBO reports* 95-100
9. Uhles, S., Moede, T., Leibiger, B., Berggren, P.O., and Leibiger, I.B. (2003) Isoform-specific insulin receptor signaling involves different plasma membrane domains. *J. Cell. Biol.* **163**, 1327-1337
10. Inokuchi, J. (2007) Isoform-specific insulin receptor signaling involves different plasma membrane domains. *Yakugaku Zasshi*, **127**, 579-586
11. Yang, X., Ongusaha, P.P., Miles, P.D., Havstad, J.C., Zhang, F., So, W.V., Kudlow, J.E., Michell, R.H., Olefsky, J.M., Field, S.J., and Evans, R.M. (2008) Phosphoinositide signalling links O-GlcNAc transferase to insulin resistance. *Nature* **451**, 964-969



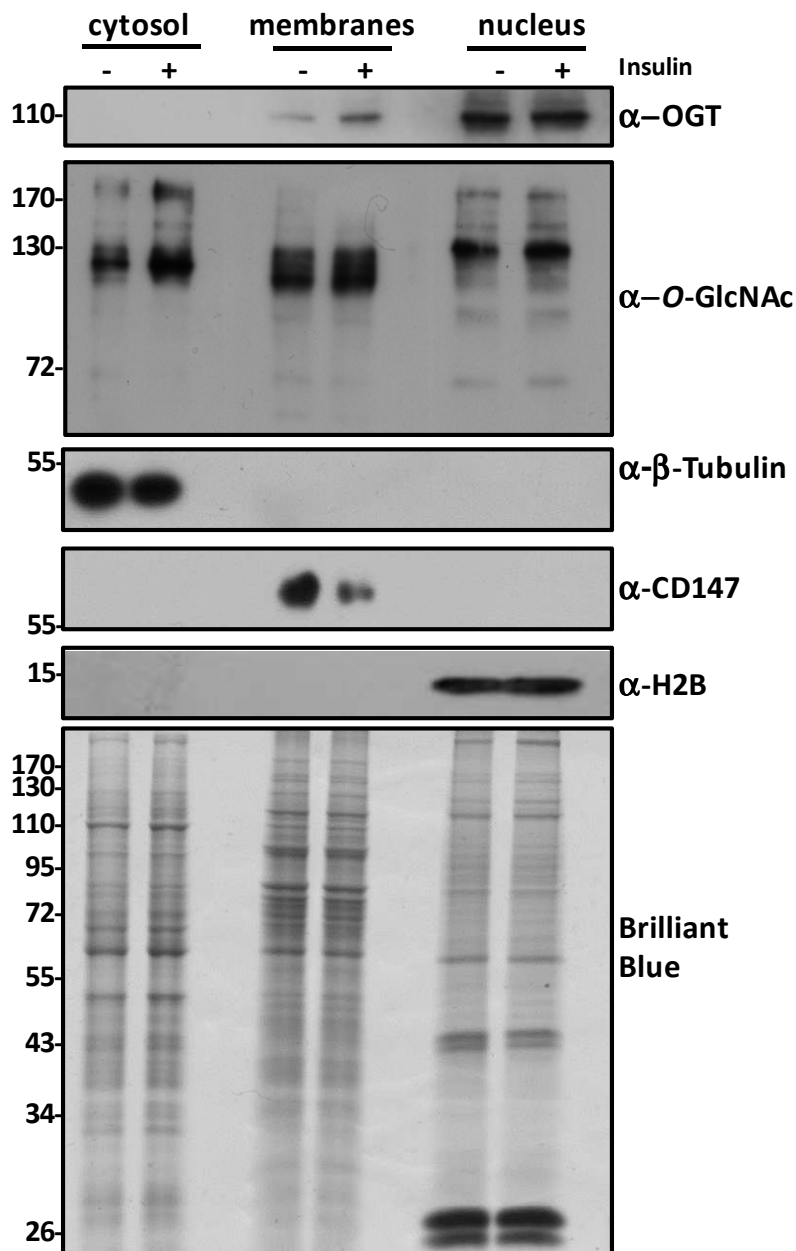
12. Guinez, C., Losfeld, M.E., Cacan, R., Michalski, J.C., and Lefebvre, T. (2006) Modulation of HSP70 GlcNAc-directed lectin activity by glucose availability and utilization. *Glycobiology* **16**, 22-28
13. Thompson, A.J., Williamson, R., Schofield, E., Stephenson, J., Hanger, D., and Anderton, B. (2009) Quantitation of glycogen synthase kinase-3 sensitive proteins in neuronal membrane rafts. *Proteomics* **9**, 3022-3035
14. Broquet, A.H., Thomas, G., Masliah, J., Trugnan, G., and Bachelet, M. (2003) Expression of the molecular chaperone Hsp70 in detergent-resistant microdomains correlates with its membrane delivery and release. *J. Biol. Chem.* **278**, 21601-21606
15. Zeidan, Q., and Hart, G.W. (2010) The intersections between O-GlcNAcylation and phosphorylation: implications for multiple signaling pathways. *J. Cell. Sci.* **123**, 13-22
16. Hart, G.W., Slawson, C., Ramirez-Correa, G., and Lagerlof, O. (2010) Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease. *Annu. Rev. Biochem.* **80**, 825-858
17. Yang, W.H., Park, S.Y., Nam, H.W., Kim do, H., Kang, J.G., Kang, E.S., Kim, Y.S., Lee, H.C., Kim, K.S., and Cho, J.W. (2008) NFkappaB activation is associated with its O-GlcNAcylation state under hyperglycemic conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**, 17345-17350
18. Zou, L., Yang, S., Champattanachai, V., Hu, S., Chaudry, I.H., Marchase, R.B., and Chatham, J.C. (2009) Glucosamine improves cardiac function following trauma-hemorrhage by increased protein O-GlcNAcylation and attenuation of NF- $\kappa$ B signaling. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **296**, H515-523
19. Dehennaut, V., Lefebvre, T., Sellier, C., Leroy, Y., Gross, B., Walker, S., Cacan, R., Michalski, J.C., Vilain, J.P., and Bodart, J.F. (2007) O-linked N-acetylglucosaminyltransferase inhibition prevents G2/M transition in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Biol. Chem.* **282**, 12527-12536
20. Dehennaut, V., Hanouille, X., Bodart, J.F., Vilain, J.P., Michalski, J.C., Landrieu, I., Lippens, G., and Lefebvre, T. (2008) Microinjection of recombinant O-GlcNAc transferase potentiates *Xenopus* oocytes M-phase entry. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **369**, 539-546

21. Dehennaut, V., Slomianny, M.C., Page, A., Vercoutter-Edouart, A.S., Jesus, C., Michalski, J.C., Vilain, J.P., Bodart, J.F., and Lefebvre, T. (2008) Identification of structural and functional O-linked N-acetylglucosamine-bearing proteins in *Xenopus laevis* oocyte. *Mol. Cell. Proteomics* **7**, 2229-2245
22. Gandy, J.C., Rountree, A.E., and Bijur, G.N. (2006) Akt1 is dynamically modified with O-GlcNAc following treatments with PUGNAc and insulin-like growth factor-1. *FEBS Lett.* **580**, 3051-3058
23. Park, S.Y., Ryu, J., and Lee, W. (2005) *Exp. Mol. Med.* **37**, 220-229
24. Buse, M.G., Robinson, K.A., Marshall, B.A., Hresko, R.C., and Mueckler, M.M. (2002) O-GlcNAc modification on IRS-1 and Akt2 by PUGNAc inhibits their phosphorylation and induces insulin resistance in rat primary adipocytes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **283**, E241-E250
25. Lubas, W.A., and Hanover, J.A. (2000) Functional expression of O-linked GlcNAc transferase. Domain structure and substrate specificity. *J. Biol. Chem.* **275**, 10983-10988
26. Patti, M.E., Virkamaki, A., Landaker, E.J., Kahn, C.R., and Yki-Jarvinen, H. (1999) Activation of the hexosamine pathway by glucosamine in vivo induces insulin resistance of early postreceptor insulin signaling events in skeletal muscle. *Diabetes* **48**, 1562-1571
27. Lazarus MB, Nam Y, Jiang J, Sliz P, Walker S. (2011) Structure of human O-GlcNAc transferase and its complex with a peptide substrate. *Nature* 469(7331):564-7.
28. Liu, Y., Liu, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., and Gong, C.X. (2011) Deficient brain insulin signalling pathway in Alzheimer's disease and diabetes. *J. Pathol.* **225**, 54-62

29. Javanmoghadam-Kamrani, S., and Keyomarsi, K. (2008) Synchronization of the cell cycle using lovastatin. *Cell Cycle* **7**, 2434-2440
30. Rao, S., Porter, D.C., Chen, X., Herliczek, T., Lowe, M., and Keyomarsi, K. (1999) Lovastatin-mediated G1 arrest is through inhibition of the proteasome, independent of hydroxymethyl glutaryl-CoA reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **96**, 7797-7802
31. Lee, M.Y., Ryu, J.M., Lee, S.H., Park, S.H., Park, J.H., and Han, H.J. (2010) Lipid rafts play an important role for maintenance of embryonic stem cell self-renewal. *J. Lipid. Res.* **51**, 2082-2089

## **Acknowledgements**

The authors thank the University of Lille 1 and the “Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)” for financial support. We are particularly grateful to Dr. Andrew J. Thompson for his expert advice in the preparation of DRMs and to Ms. Jennifer Stallars for her technical assistance. YPC is a recipient of a Rosalind Franklin fellowship (IcyTDF) and ECOS NORD No.M09S02. The authors also wish to thank the Bioimaging Core Facility of Lille, IRI CNRS and are also grateful to Dr. Vanessa Dehennaut-Lefebvre for critical reading of the manuscript and to Dr. David Vocadlo for English editing the manuscript. The authors declare they have no conflict of interest.

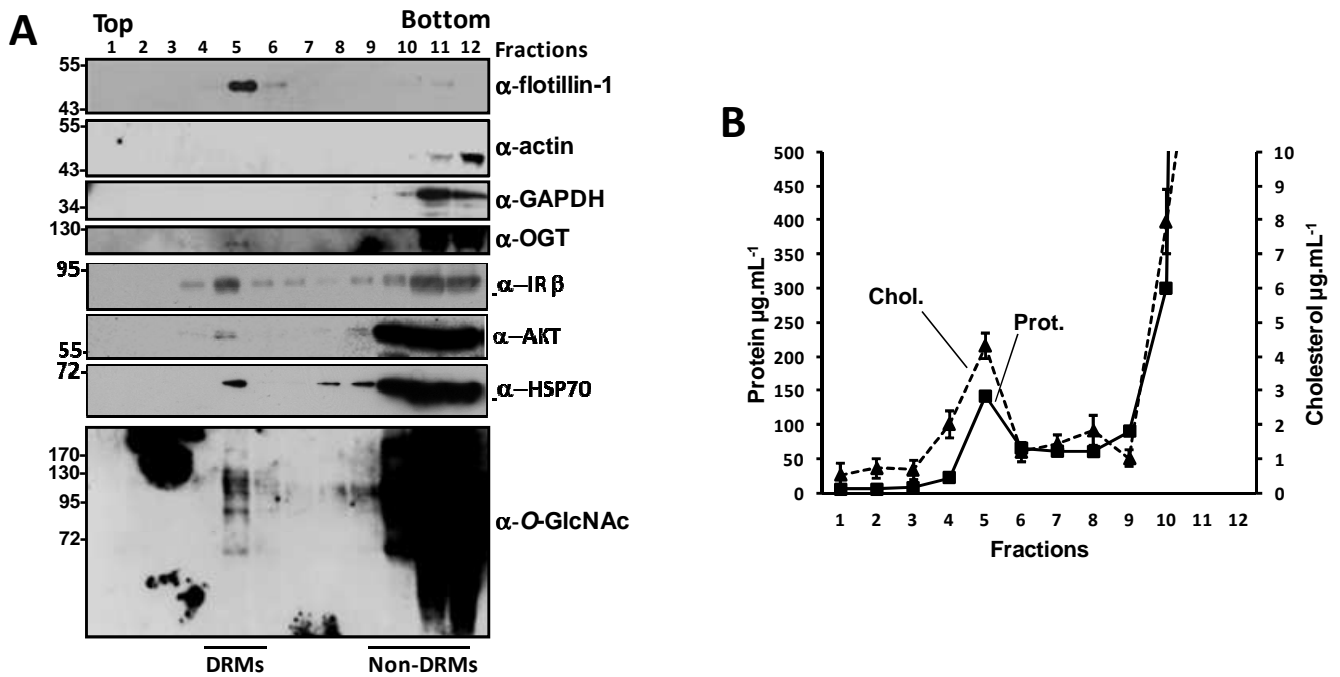


**Figure 1- Insulin stimulates the localization of OGT to membranes.**

HepG2 cells were stimulated with insulin for 8 hours and were then fractionated into cytosolic, membranous and nuclear compartments. The efficiency of fractionation was evaluated by monitoring specific protein markers.

The molecular mass markers are indicated at left (kDa).

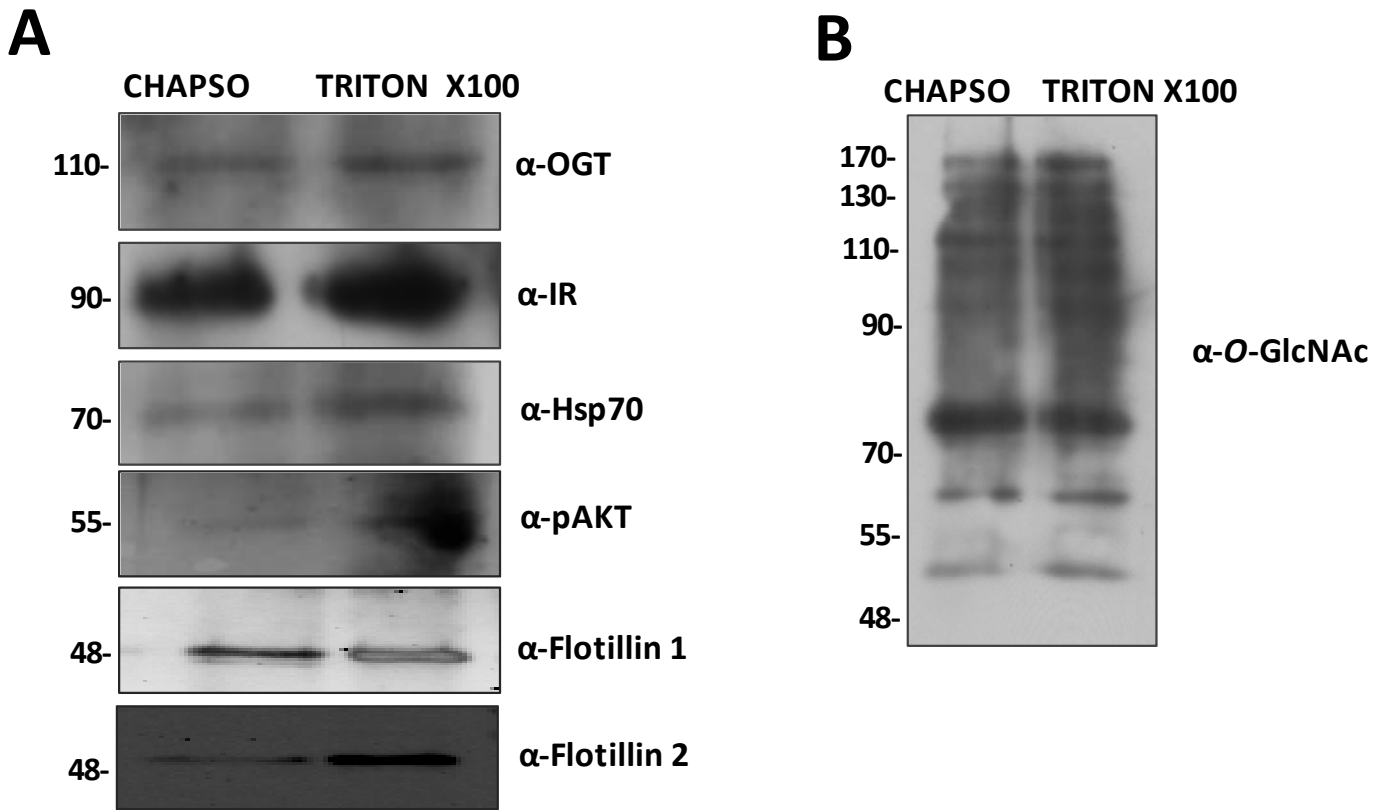
**Perez-Cervera et al. Fig. 1**



**Figure 2- A few OGT and O-GlcNAcylated proteins fraction are located within DRMs.**

DRMs were prepared from HepG2 cells. The OGT, AKT, HSP70 and O-GlcNAc content for each of the twelve fractions was analyzed by Western blot. Actin, GAPDH and flotillin-1 were used to evaluate DRM preparations (panel A). Distribution of cholesterol (dotted lines) and proteins (black lines) was analyzed for the twelve fractions (n =3) (panel B).

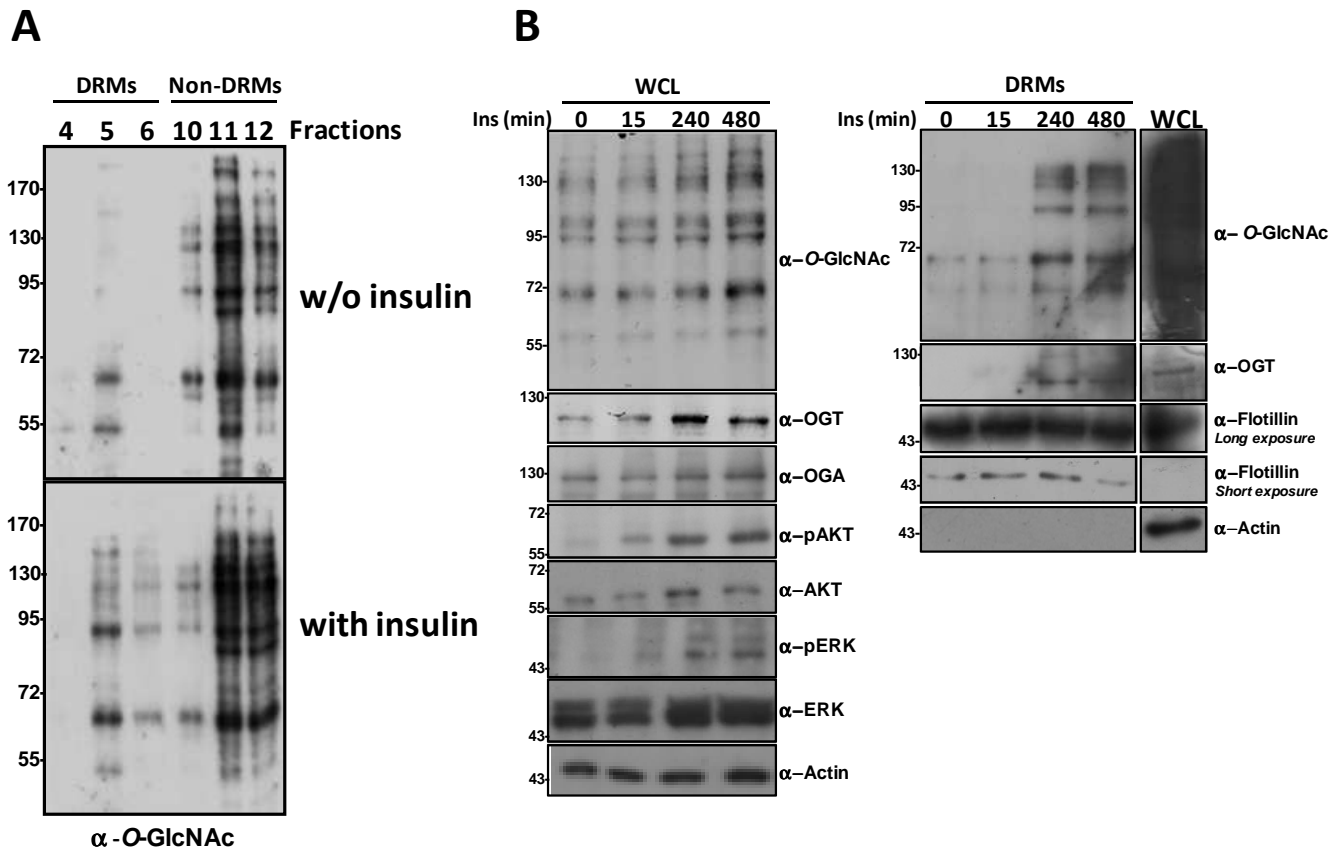
Perez-Cervera et al. Fig. 2



**Figure 3- OGT and O-GlcNAcylated proteins are visualized within rafts when DRMs are prepared with a zwitterionic detergent, CHAPSO or with a non-ionic detergent, Triton X-100.**

DRMs (corresponding to fractions 5) prepared from HepG2 cells were purified and analyzed according to their reactivity with anti-OGT, IR  $\beta$ -chain, anti-pAKT, anti-Flotillin-1 and 2, and anti-Hsp70 antibodies (panel A) and anti O-GlcNAc (panel B). The molecular mass markers are indicated at the left (kDa).

**Perez-Cervera et al. Fig. 3**

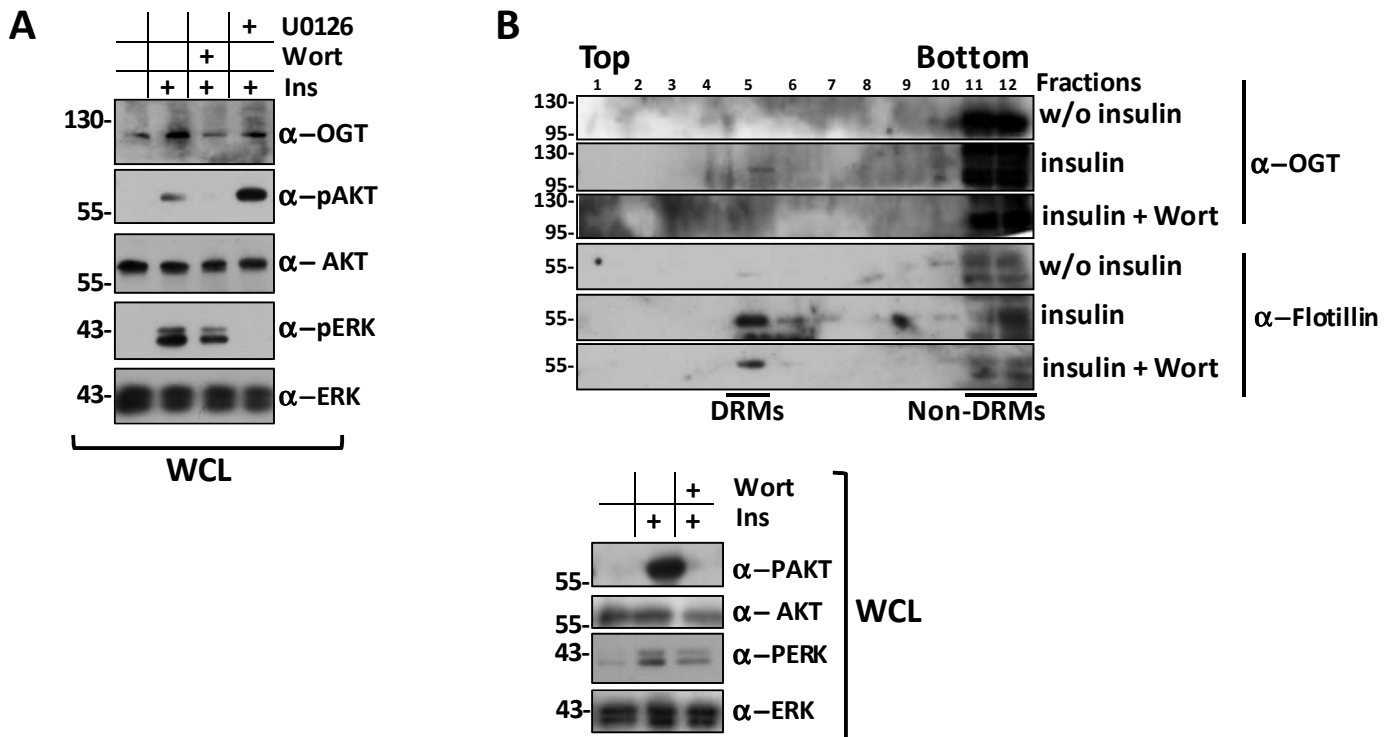


**Figure 4- Insulin increases the O-GlcNAc and the OGT levels of DRMs.**

After stimulation of the cells with insulin for 4 hours, DRMs were purified and the quality of the preparation was evaluated (data not shown). Fractions No. 5, corresponding to DRMs, the adjacent fractions (No. 4 and 6) and the non-DRMs fractions (No. 11 and 12) were analyzed by Western blot using an anti-O-GlcNAc antibody (panel A). An insulin stimulation time course experiment was performed and each DRM containing fraction (No. 5) was analyzed according to their O-GlcNAc and OGT content (panel B). The molecular mass markers are indicated at the left (kDa).

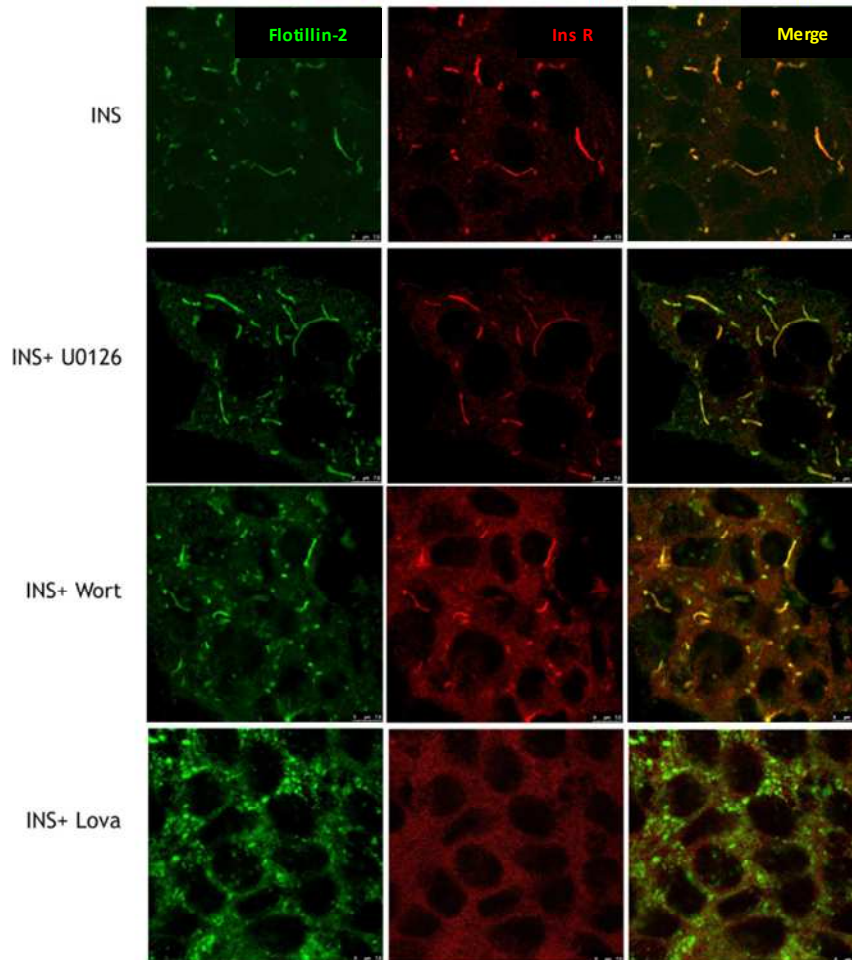
Perez-Cervera et al. Fig. 4





**Figure 5- The insulin-stimulated expression and DRM-localization of OGT is controlled by the PI3K pathway.**  
 HepG2 cells were treated with insulin in conjunction with either the PI3K pathway inhibitor wortmannin or the MAPK pathway inhibitor U0126. Crude cell extracts were analyzed by Western blot for their OGT content. The activation of the PI3K and MAPK pathways was evaluated by measuring the phosphorylation of their respective downstream effectors, AKT and ERK 1/2 (panel A). The purification of DRMs was performed using both starved cells and cells treated with insulin and with wortmannin or vehicle (panel B). The fractions were evaluated using anti-flotillin-1 and anti-OGT antibodies. Activation of the PI3K pathway was evaluated by measuring the phosphorylation of its downstream effector AKT on crude extract. The molecular mass markers are indicated at the left (kDa).

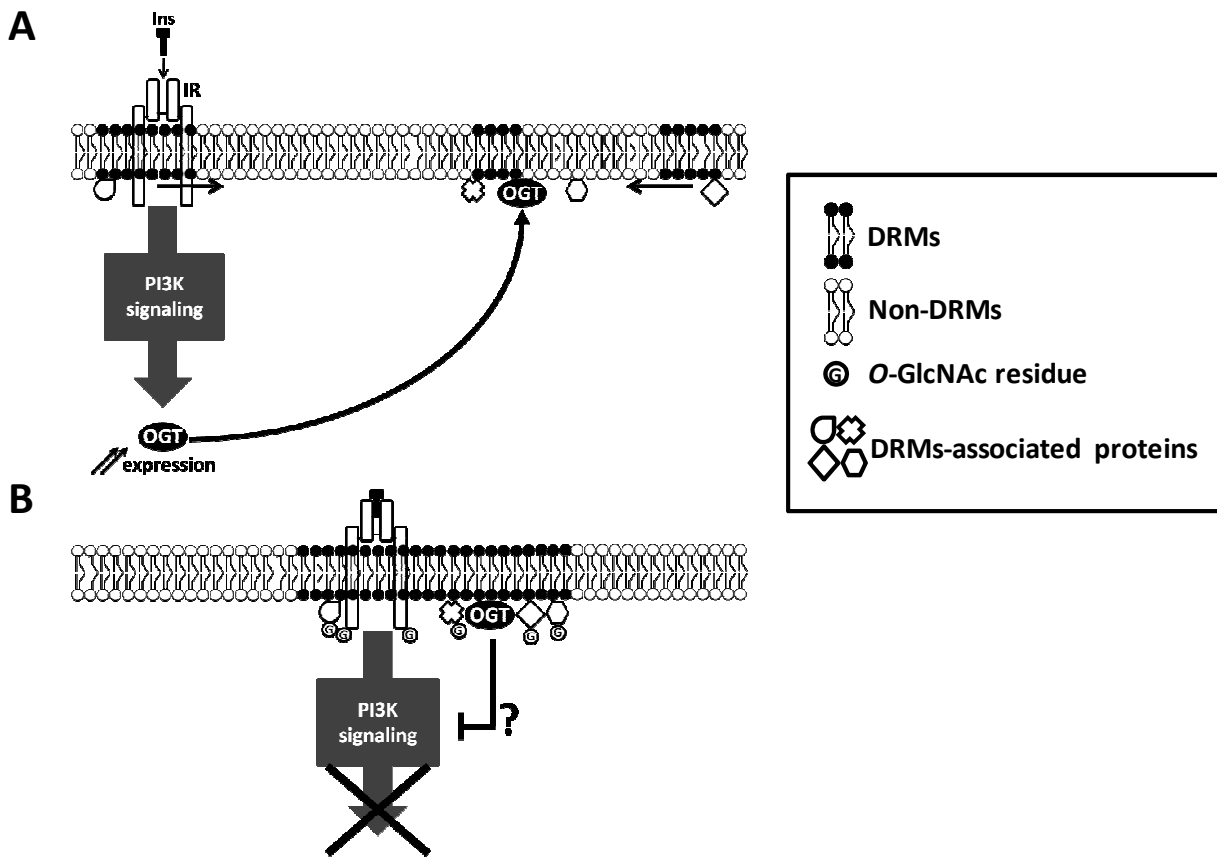
Perez-Cervera et al. Fig. 5



**Figure 6- Localization of insulin receptor to flotillin-2 clusters depends on PI3K pathway.**

HepG2 cells were treated with insulin (INS) alone or in conjunction with the MAPK inhibitor U0126, the PI3K inhibitor wortmannin (Wort), or the cholesterol synthesis inhibitor lovastatin (Lova). Cells were then incubated with specific antibodies against flotillin-2 and the insulin receptor, followed by incubation with fluorescent secondary antibodies. Green: flotillin-2; red: insulin receptor (Ins R); yellow indicates co-localization of flotillin-2 and the insulin receptor.

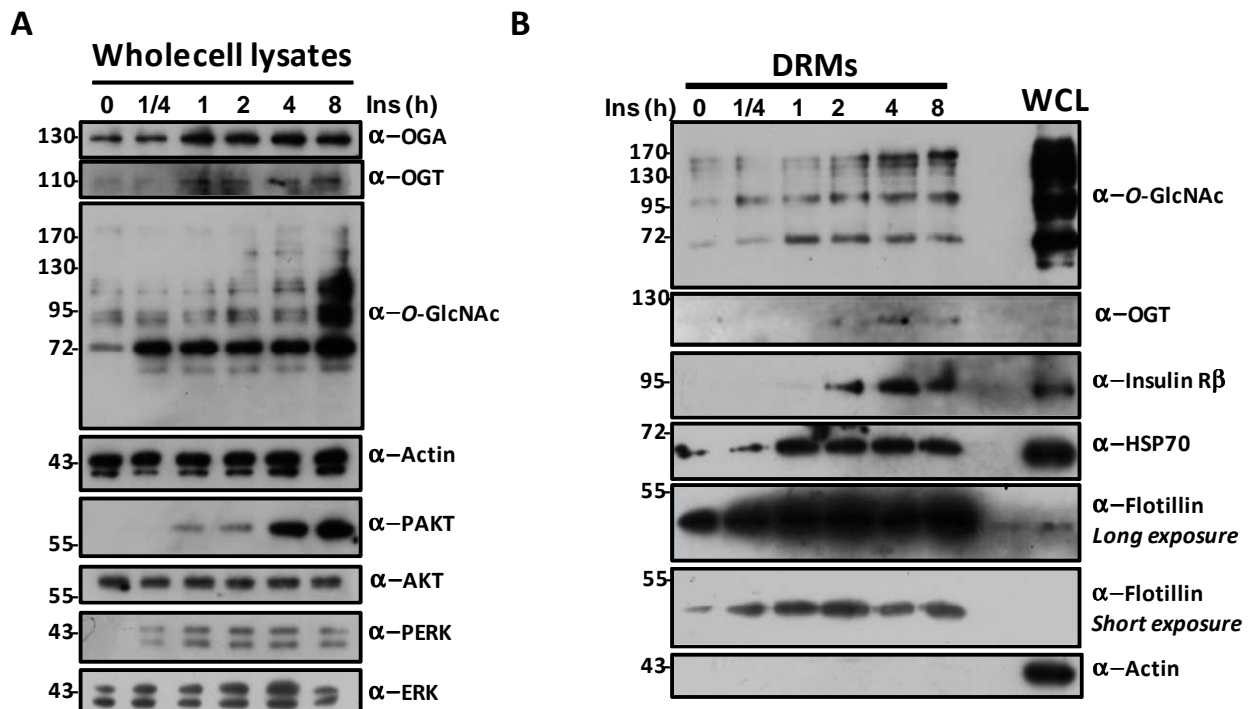
**Perez-Cervera et al. Fig. 6**



**Figure 7. Insulin signaling potentiates OGT expression and localization to DRMs.**

Upon insulin stimulation the expression of OGT is enhanced and its localization to lipid microdomains is increased (panel A). OGT and resident DRMs proteins segregate (panel B) allowing the latter to be O-GlcNAcylated. In accordance with Yang and coauthors (2008) we propose that the recruitment of OGT to rafts leads to inactivation of signaling pathways.

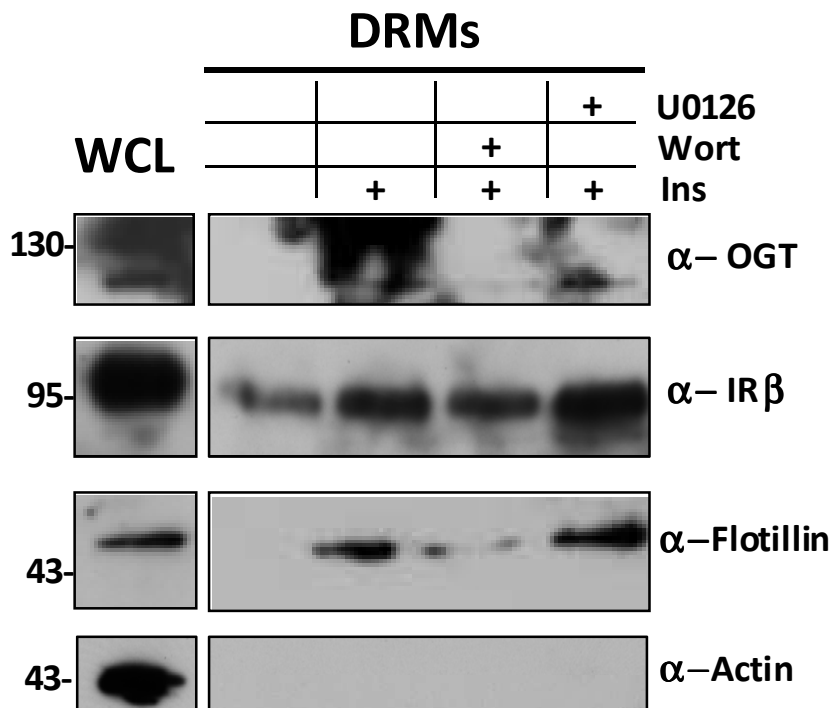
Perez-Cervera et al. Fig. 7



**Figure S1- Insulin stimulates the expression of OGT and its interaction with rafts.**

HepG2 cells were stimulated with insulin for the indicated time periods (from 15 min to 8 hours). Crude cell extracts were analyzed by Western blot according to their OGA, OGT, Hsp70, flotillin-1 and actin contents. The activation of the PI3K and MAPK pathways was evaluated by measuring the phosphorylation of their respective downstream effectors, AKT and ERK 1/2 (panel A). The purification of the DRMs was performed for each condition, the fractions were tested according to their reactivity with an anti-flotillin-1 and an anti-actin antibodies and each fraction corresponding to the detergent-insoluble material was analyzed by Western blot (panel B) with a string of antibodies. DRMs, Detergent-resistant membranes; WCL, Whole Cell Lysate. The molecular mass markers are indicated at the left (kDa).

**Perez-Cervera et al. Fig. S1**



**Figure S2- Contrary to the inhibition of the MAPK pathway, inhibiting the PI3K pathway disturbs the DRMs-OGT targeting.**

After serum starvation HepG2 cells were stimulated with insulin alone or in conjunction with wortmannin or U0126. The purification of the DRMs was performed as previously described. Each fraction corresponding to the detergent-insoluble material (No. 5) was analyzed by Western blot according to their reactivity with anti-flotillin-1, anti-actin, anti-OGT and anti-IR  $\beta$ -chain antibodies. DRMs, Detergent-resistant membranes; WCL, Whole Cell Lysate. The molecular mass markers are indicated at the left (kDa).

**Perez-Cervera et al. Fig. S2**

## **5.1 Discussion**

Comme énoncé plus haut, il a été démontré que la stimulation d'adipocytes par l'insuline induisait un recrutement de l'OGT à la membrane plasmique (184). Ce phénomène est impliqué dans l'inactivation de la voie de l'insuline par O-GlcNAcylation. Nous avons recherché et observé ce recrutement membranaire de l'OGT au niveau des cellules HepG2 (article 1, Fig. 1). La suite du travail s'est focalisé sur la mise en évidence de l'OGT et des protéines O-GlcNAcylées au niveau des microdomaines lipidiques.

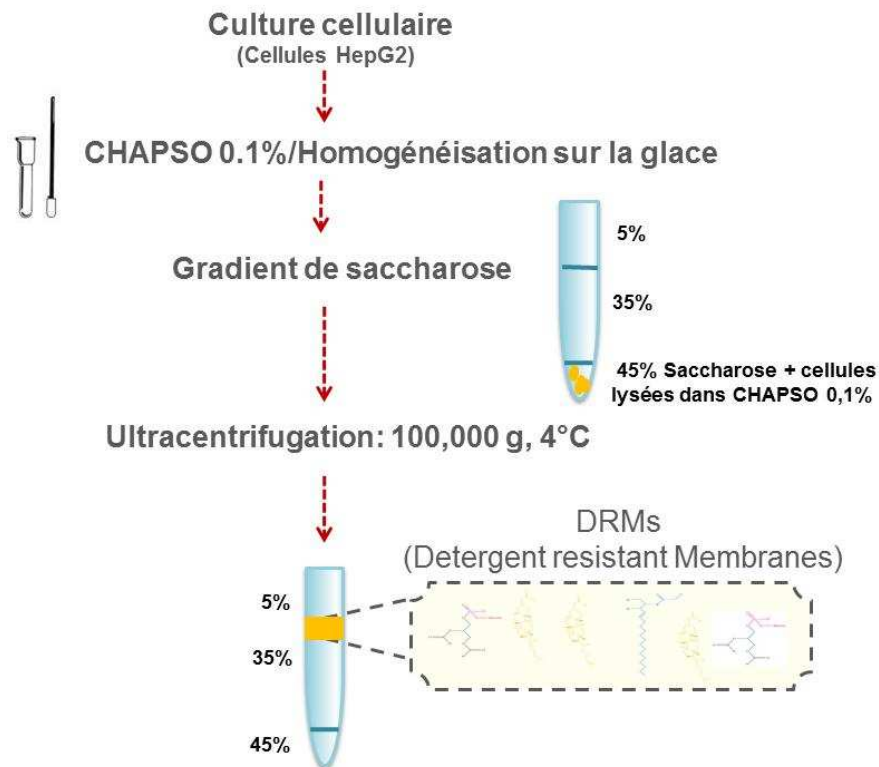
### **5.1.1 Préparation des « Detergent-resistant Membranes » à partir des cellules HepG2**

Il y a longtemps de cela, la membrane plasmique était considérée comme une simple barrière biologique séparant le milieu intracellulaire du milieu externe. Cette conception est devenue caduque au cours du XX<sup>ème</sup> siècle, puisqu'il a été progressivement admis que cette membrane jouait un rôle prépondérant dans un grand nombre de processus physiologiques, cette dernière possédant tous les éléments essentiels aux échanges entre la cellule et son environnement (**voir chapitre 1**).

C'est ainsi que l'hypothèse des rafts, ou microdomaines lipidiques, proposée par Simons en 1997, a fait reconsidérer le rôle des lipides dans les membranes biologiques (**voir chapitre 2**). La répartition asymétrique de la membrane sous forme d'une phase liquide ordonnée (lo) dans un environnement membranaire plus fluide (phase liquide désordonnée, ld), permet de concentrer sélectivement certaines protéines et de conférer à la membrane des propriétés sélectives à un temps donné et à un endroit précis. La composition lipidique particulière des microdomaines les rend résistants à l'action de détergents à 4°C, cette propriété est utilisée pour les isoler en gradient de saccharose sous forme de DRMs (detergent-resistant membranes) (195) (**Fig. 21**).

Dès mon arrivée au laboratoire (26 mars 2009), nous avons entrepris de tester plusieurs méthodes de préparation des DRMs et de rechercher un modèle cellulaire adéquat qui nous permette d'étudier le rôle de la O-GlcNAcylation au niveau des microdomaines lipidiques. C'est ainsi que nous avons importé et adapté

la purification des « rafts » (**Fig. 21**), en utilisant comme détergent le CHAPSO à une concentration de 0.1% (w/v) (**article 1, Fig. 2 et 3**). Nous avons également testé le Triton X-100 (0.1%, v/v), détergent plus doux que le CHAPSO (52).



**Figure 21. Mode opératoire utilisé pour la purification des microdomaines lipidiques.**

Ce dernier consiste à lyser des cellules dans des conditions très douces et à fractionner le lysat (à 45% de saccharose au final) sur un gradient discontinu de saccharose. La faible densité des DRMs leur confère la propriété de sédimenter à l'interface 5% (w/v) saccharose/35% (w/v) saccharose. Les fractions de 1 mL chacune sont alors collectées et analysées.

Il a été démontré que l'utilisation de détergents doux à faible concentration permet de détecter des molécules faiblement associées aux DRMs (55,196,197). De manière intéressante, nous avons retrouvé les mêmes molécules associées aux DRMs en utilisant deux détergents différents, à savoir le CHAPSO et le TX100 (**article 1, Fig. 3**). Cette observation suggère que nos protéines d'intérêt sont associées aux « lipides rafts » de manière détergent-indépendante.

En raison de leur faible densité, les DRMs migrent à l'interface 5% (w/v) saccharose/35% (w/v) saccharose au cours de l'ultracentrifugation. Cette méthode de fractionnement permet d'isoler les DRMs et d'identifier les protéines et les lipides qui les constituent. L'isolement de fractions membranaires résistantes aux détergents à partir d'une membrane dépend d'un certain nombre de paramètres incluant la nature du détergent, le rapport détergent/lipide, la température et le type cellulaire étudié (50,198).

La majorité de nos connaissances portant sur les lipides rafts provient d'expériences basées sur l'insolubilisation par des détergents, base de la purification de ces rafts. Récemment, un large éventail de détergents a été utilisé pour la purification des « rafts » ce qui a permis de les sous-classer (195).

La résistance à l'extraction par le Triton X-100 à 4°C est la technique la plus utilisée pour savoir si une protéine se situe dans un environnement de type raft. La capacité d'un détergent à solubiliser les membranes est d'autant plus grande que sa capacité à s'insérer dans celles-ci est importante. En 1998, Patra a montré clairement que la solubilisation de bicouches lipidiques monophasiques par le Triton X-100 est dépendante de la longueur et du nombre d'insaturation en cis des chaînes d'acides gras des lipides (199), ainsi que de la capacité des têtes polaires à créer des liaisons de type électrostatique et ionique. Plus les chaînes acylées sont longues et saturées, plus elles sont ordonnées et peuvent créer des interactions de van der Waals entre elles. L'insolubilité des lipides dans le Triton X-100 est révélatrice de l'association étroite des lipides au sein des membranes et de l'état d'ordre de ceux-ci.

Bien que le détergent le plus couramment utilisé pour obtenir des DRMs est le Triton X-100, d'autres détergents ont été utilisés comme le Lubrol WX, les Brij (35, 58 et 98), le Tween 20, CHAPS et le CHAPSO. L'utilisation de ces détergents a permis de montrer que certaines protéines sont solubles dans le Triton X-100 mais insolubles dans un autre détergent (général plus doux). Par exemple la prominine, une protéine localisée exclusivement à l'apex des microvillosités dans les cellules MDCK (Madin-Darby Canine Kidney), est insoluble dans le Lubrol bien que soluble dans le Triton (200). Il en est de même pour MDR1, une autre protéine



polytopique (201). Ces résultats ont conduit leurs auteurs à proposer l'existence de plusieurs types de rafts.

Pour Lichtenberg, l'existence possible de plusieurs types de rafts dans les membranes implique la coexistence de deux types de phases liquides membranaires (202). Il envisage pourtant que ces types de domaines puissent posséder des complexes protéiques différents plutôt qu'une séparation de phase spontanée des lipides.

Une autre étude portant sur des cellules neuronales primaires a démontré que les fractions membranaires obtenues en présence de Triton X-100 ou de CHAPSO étaient de compositions différentes en ce qui concerne la concentration en cholestérol et le contenu en protéines. En appui de ces observations, des analyses protéomiques ont démontré une certaine hétérogénéité quant au contenu en protéines (52)

Dans notre étude, les DRMs obtenus après solubilisation des membranes par le Triton X-100 ou le CHAPSO ont été retrouvées à l'interface 5-35% du gradient de saccharose ; il s'agit généralement de la fraction 5 caractérisée par la présence de Flotilline, marqueur des DRMs (39). La fraction 5 se caractérise également par sa haute concentration en cholestérol (**article 1, Fig. 2B**).

Le fait qu'une protéine soit retrouvée en faible quantité dans des membranes résistantes au Triton X-100 suggère qu'elle a soit peu d'affinité pour des microdomaines de type raft, soit que son association à ces microdomaines est faible ou transitoire et qu'elle ne résiste pas à l'action de ce détergent. C'est pour cette raison, comme nous l'avons mentionné un peu plus loin, que d'autres détergents réputés plus doux ont été proposés. Ainsi, plusieurs protéines polytopiques apicales comme la prominine, MDR1 et ATP7B sont complètement solubilisées par le Triton X-100 mais résistantes à d'autres détergents (200,201). Au regard de ces observations (52), nous avons testé la résistance des protéines O-GlcNAcylées, de l'OGT, de la chaîne  $\beta$  du récepteur de l'insuline, d'HSP70 et des Flotillines 1 et 2 à l'extraction par le Triton X-100 et le CHAPSO (**article 1, Fig. 3**). Bien que ces protéines soient toutes retrouvées associées aux DRMs, que ce soit en présence de Triton-X100 ou de CHAPSO, notre choix s'est porté sur l'extraction par le second détergent qui reste selon nous plus doux, plus fidèle en

termes de reproductibilité d'expérience et par conséquent plus sécurisant pour nos analyses.

Enfin, concernant le modèle cellulaire, notre choix s'est porté sur les cellules HepG2, cellules issues d'un hépatocarcinome humain. Ces cellules, très utilisées au laboratoire et appréciées pour le fait qu'elles expriment très correctement l'OGT et l'OGA, et parce qu'elles répondent très bien aux différents agents pharmacologiques ciblant ces enzymes, se sont révélées négatives pour l'expression des cavolines. Ceci en fait un modèle de choix pour étudier le rôle des microdomaines lipidiques "non-cavéolaires". Enfin ces cellules expriment le récepteur de l'insuline à leur surface.

### **5.1.2 Protéines associées aux microdomaines lipidiques des cellules HepG2**

Les lipides rafts sont capables d'inclure ou d'exclure certaines protéines (55). On y retrouve principalement des protéines liées par une ancre de type glycosylphosphatidylinositol, des protéines liées au cholestérol, des protéines doublement acylées et d'autres protéines transmembranaires (**voir chapitre 2**). Les protéines associées aux microdomaines lipidiques sont très souvent impliquées dans les processus de signalisation, d'adhésion et de migration cellulaire (45,55).

Nos expériences ont montré pour la première fois la localisation de l'OGT et de protéines O-GlcNAcylées au niveau des microdomaines lipidiques (**article 1, Fig. 2A**). Nous avons également retrouvé différentes protéines associées aux lipides rafts et préalablement décrites dans la littérature; c'est le cas d'HPS70, du récepteur de l'insuline, d'Akt et des protéines résidentes des microdomaines lipidiques, les Flotillines 1 et 2 (**article 1, Fig. 3**). Ces protéines associées aux microdomaines jouent différentes fonctions liées aux lipides rafts:

**HSP70:** Le recrutement d'HSP70 dans les radeaux lipidiques est requise pour l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt dans le stade précoce de l'infection par le JEV (Japanese encephalitis virus) (203).

**Flotilline 1:** Il a récemment été démontré que le "knockdown" de la flotilline 1 modifie le comportement de "clustering" du récepteur de l'EGF (EGFR) à la membrane plasmique lors de sa stimulation. Plus particulièrement, la flotilline 1 forme un complexe avec CRAF, MEK1, ERK et KSR1 (Kinase suppressor of RAS), l'inactivation de la Flotilline 1 inactivant directement ERK 1/2. Ainsi, la flotilline 1 joue un rôle direct au cours de la phase initiale (activation du récepteur) et de la phase tardive (activation des MAP kinases) dans la voie de signalisation par l'EGF (204).

*N.B.* Concernant l'EGFR, il a été récemment démontré que son association à un radeau lipidique spécifique change sa conformation allostérique (205). Ainsi, l'association de protéines aux radeaux lipidiques induirait des changements conformationnel qui moduleraient leurs fonctions.

**Flotilline 2:** Curieusement, il a été démontré que la flotilline 2 joue un rôle dans le regroupement de la protéine précurseur du peptide amyloïde (APP) responsable de la maladie d'Alzheimer à la surface cellulaire, affectant par conséquent son clivage protéolytique et la génération du peptide amyloïde pathogène (206).

Ainsi, une des fonctions majeures des flotillines au niveau des microdomaines lipidiques serait de réguler la formation de complexes macromoléculaires/clusters nécessaires à l'initiation de processus cellulaires tels que la transduction du signal (signalisation de l'insuline) ou, dans le cas d'APP, son endocytose et son traitement protéolytique.

**AKT:** Il a été démontré qu'en réponse aux facteurs de croissance l'activité d'AKT était plus forte au niveau des lipides rafts. De plus l'activité d'AKT en réponse au facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) ou à l'IGF-1 est régulée de manière différentielle entre les rafts et non-rafts de la membrane plasmique (207,208). L'activité des voies de signalisation liées à AKT telle que la voie PI3-kinase doit donc être directement liée à la formation de radeaux lipidiques.

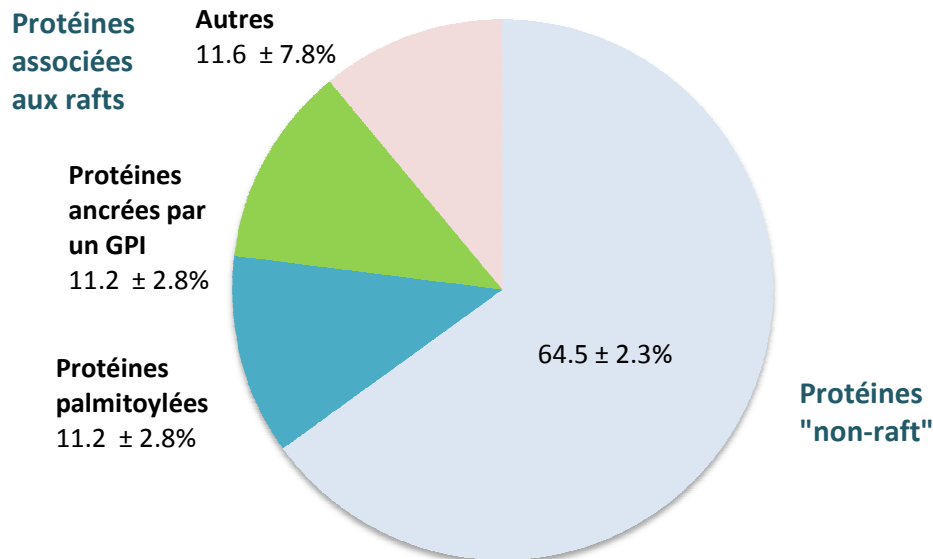
Les protéines membranaires possèdent des affinités différentes pour les rafts. Comment cette affinité est-elle contrôlée ? Quel élément et quel événement

rendent une protéine "raftophilique"? La majorité des études qui ont tenté de répondre à cette question ont été fondées sur la solubilisation des protéines par différents détergents; le caractère indirect et controversé de ces expériences limite la compréhension de ce phénomène d'affinité.

Récemment, le marquage fluorescent de protéines transmembranaires et leur observation par microscopie confocale a permis de mieux comprendre leur répartition au niveau des microdomaines lipidiques (209). Ces expériences suggèrent que la palmitoylation joue un rôle fondamental dans la régulation de l'affinité pour les radeaux lipidiques, comme cela pourrait être le cas pour les Flotillines 1 et 2, elles-mêmes modifiées par ce type de lipidation. Cependant, il est important de souligner que la palmitoylation n'est pas suffisante pour associer la protéine aux radeaux lipidiques car de nombreuses protéines palmitoylées ne sont pas associées aux rafts, comme par exemple la transferrine, généralement utilisé comme marqueur non-raft. Dans ce cas, il semble qu'il faille tenir compte d'autres éléments parmi lesquels la longueur du domaine transmembranaire et la séquence en acides aminés pour déterminer la "raftophilicité" d'une protéine (32,210,211).

L'ancre GPI est un autre type de modification lipidique connu pour favoriser l'association des protéines aux radeaux lipidiques. Même si la structure de toutes les ancras n'ont pas encore été toutes étudiées, il en existe qui ne possèdent pas nécessairement le caractère "raftophilique" (212).

Des études cherchant à déterminer le pourcentage de protéines de la membrane plasmique appartenant aux radeaux lipidiques ont été entreprises sur des vésicules géantes (giant plasma membrane vesicles). La dépalmitoylation des protéines a été réalisée par l'utilisation de dithiothréitol et l'élimination des ancras GPI par traitement à la phospholipase "GPI-spécifique" (209). Il a été ainsi démontré qu'environ 65% des protéines de la membrane plasmique sont retrouvées dans des zones "non-raft". Parmi les protéines associées aux rafts, 12% le sont par palmitoylation, 11% par ancre GPI et 11% par un mode indéterminé puisqu'insensibles à l'agent réducteur ou à la phospholipase (**Fig. 22**). On peut supposer que pour ce dernier groupe l'association aux rafts se fasse par cholestéroylation ou par interaction avec les sphingolipides (213).



**Figure 22. Répartition des protéines associées aux microdomaines lipidiques selon le mode de modification (reproduit à partir de (209)).**

Au cours de cette étude, nous avons également recherché la présence d'OGA dans les microdomaines lipidiques mais en vain. Il a été récemment démontré que la forme courte de l'OGA (OGA-S) s'accumule à la surface des « lipid droplet », gouttelettes lipidiques naissantes contenant la périlipine-2 (136). Ces données suggèrent qu'il existe un lien entre le dynamisme de la O-GlcNAcylation et l'assemblage et la mobilisation des « lipid droplet » et que l'OGA aurait une certaine affinité pour les microdomaines lipidiques bien que nous ne l'ayons pas démontré.

### **5.1.3 Le recrutement de l'OGT et du récepteur de l'insuline aux radeaux lipidiques est contrôlé par la voie PI3K**

Pendant longtemps il était considéré que la présence des récepteurs de l'insuline au niveau adipocytaire était limitée aux cavéoles (214), tandis qu'au niveau hépatocytaire, l'affinité du récepteur pour les radeaux lipidiques ne semblait augmenter qu'après activation par l'insuline. Ceci laissait suggérer que les

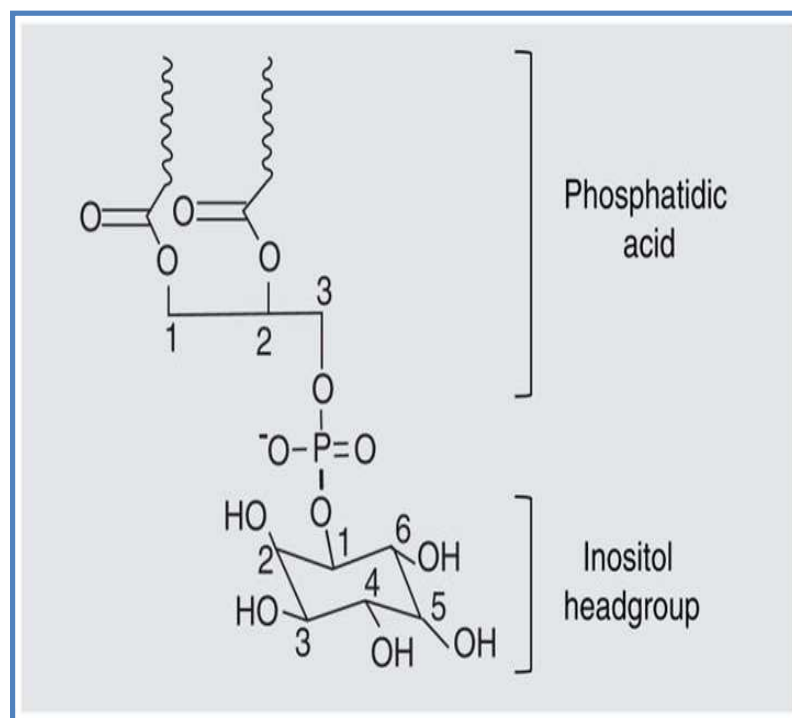
récepteurs de l'insuline étaient préférentiellement regroupés sous la forme de "clusters" chez les adipocytes alors que ces récepteurs seraient individualisés chez les hépatocytes (215).

Dans un premier temps, nous avons mis en évidence qu'après stimulation par l'insuline, il y avait une augmentation de l'association de l'OGT au niveau de la membrane plasmique (**article 1, Fig. 1**) et dans un deuxième temps, nous avons confirmé notre hypothèse selon laquelle la glycosyltransférase, mais également le récepteur de l'insuline, s'associait progressivement aux microdomaines lipidiques en réponse à l'hormone (**article 1, Fig. 4 et Fig. S1**). Cette observation suggère que l'OGT jouerait un rôle dans la transduction du signal porté par des stimuli externes (ici l'insuline) au travers des microdomaines lipidiques, permettant ainsi la propagation de l'information par l'activation de la voie PI3Ki: l'OGT serait, au niveau des rafts, une protéine relai.

Il a été décrit que de nombreuses molécules associées à la signalisation de l'insuline, et localisées de la membrane cellulaire au noyau, sont O-GlcNAcylées. De ce fait, la sous-unité bêta transmembranaire du récepteur de l'insuline, les protéines IRS-1 et 2, les sous-unités p85 et p110 de la PI-3 kinase, PDK-1 et le facteur de transcription FoxO1 (Forkhead box O1) sont des cibles de l'OGT et, pour certains d'entre eux, il semblerait que la O-GlcNAcylation ait un effet opposé à celui induit par l'insuline (**voir chapitre 4**). De manière intéressante, il a été mis en évidence que l'OGT est activée par phosphorylation sur un ou plusieurs résidus de tyrosine (128). Cette activation de l'OGT est induite par l'insuline dans les cellules adipocytaires 3T3L1. De plus, en appui d'une précédente étude montrant que l'insuline induit une relocalisation de l'OGT à la membrane plasmique par le biais d'une interaction entre l'OGT et les PIP3, nous démontrons qu'après stimulation par l'insuline, l'OGT est relocalisée spécifiquement aux microdomaines lipidiques. Cette translocation de l'OGT, en réponse à l'insuline, pourrait constituer un mécanisme de régulation de son activité vis-à-vis de substrats impliqués dans la signalisation cellulaire au niveau des microdomaines lipidiques.

Dans ce sens, plusieurs composants de la voie PI3K/Akt sont retrouvés dans les DRMs. Par exemple, l'activation d'AKT en réponse aux facteurs de croissance débute au niveau des microdomaines lipidiques par une interaction avec le PIP3, (207,208).

Le phosphatidylinositol (**Fig. 23**) joue un rôle important dans la transduction du signal. La signalisation à partir de ce phospholipide déclenche une grande variété de réponses cellulaires, y compris la croissance, la différenciation ou la mort cellulaire, le trafic des vésicules et la motilité (216,217). L'association de protéines aux phosphoinositides induit la relocalisation des protéines ou des changements conformationnels qui modifient leur fonction. On est en droit de s'attendre au même phénomène pour l'OGT.



**Figure 23.** Phosphatidylinositol. Un groupe de tête, inositol, est lié à l'acide phosphatidique par le groupement hydroxyle du C1. L'acide phosphatidique est constitué d'un squelette de glycérol lié au niveau des carbones SN1 et SN2 à deux acides gras. Le carbone SN3 du glycérol est phosphorylé pour compléter la structure de l'acide phosphatidique. Les groupes hydroxyles portés par les C4 et C5 sont phosphorylés pour donner le PIP2. Le PIP3 est généré par PI3K qui phosphoryle l'hydroxyle du C3 de l'inositol. D'après (218).

L'activation de la voie PI3K induit le recrutement de la kinase éponyme, PI3K, à la membrane plasmique et la synthèse de PIP3 à partir de PIP2, abondant dans la membrane plasmique. PIP3 est un phospholipide "critique" jouant le rôle de « messenger secondaire » (219). Ce message est relayé par les protéines

possédant des domaines de liaison au PIP3 tel que le domaine « pleckstrin homology » (PH) (220). Dans notre cas, il est connu que l'OGT partage une homologie avec la protéine phosphatase 5 qui présente une affinité pour les lipides (221) et plus spécifiquement pour les phosphoinositides. C'est cette caractéristique qui permet à l'OGT de s'associer à la membrane plasmique en réponse à l'insuline (184). Il a aussi été démontré que la Prohibitine (PHB), résidente des microdomaines lipidiques, interagit avec l'OGT en réponse à l'insuline (222), les deux partenaires interagissant également avec le récepteur de l'insuline. De façon plus spéculative, il est possible que l'OGT interagisse avec différentes protéines associées aux microdomaines lipidiques et que cette interaction, en fonction du partenaire, régule différents processus biologiques tels que le cycle cellulaire, la différenciation cellulaire, la transcription ou même exerce un rétrocontrôle négatif sur la signalisation de l'insuline.

Le type d'interaction par lequel l'OGT interagit avec les microdomaines lipidiques reste à décrire même si l'hypothèse PIP3 nous semble la plus probable.

#### **5.1.4 La voie PI3K régule le "clustering" des protéines membranaires à la surface cellulaire**

La distribution des rafts à la surface membranaire varie selon le type et l'état d'activation de la cellule. Morphologiquement, nous avons observé par microscopie confocale, après stimulation par l'insuline, la formation de clusters au niveau de la membrane plasmique où le récepteur de l'insuline colocalise avec la flotilline-2 (**article 1, Fig. 6**).

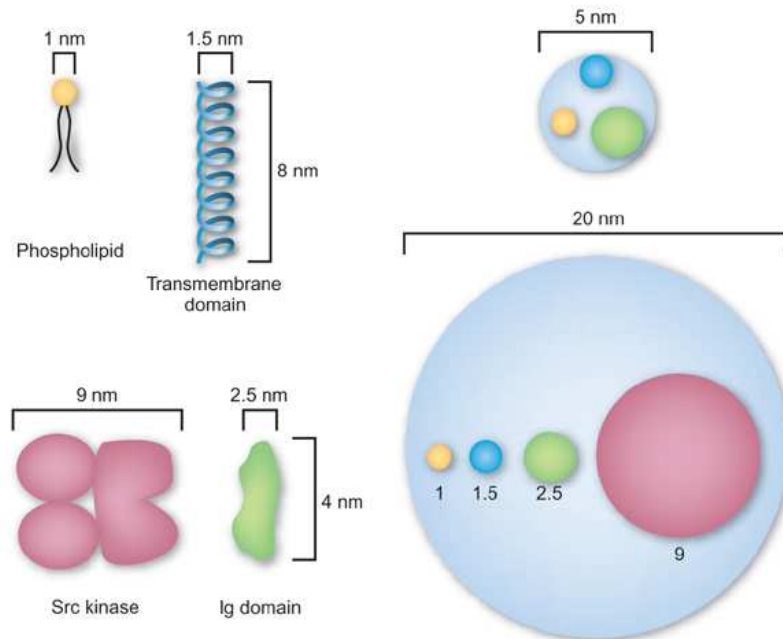
Ces données suggèrent que la formation de "clusters" est une condition pré-requise pour la signalisation de l'insuline. Cette observation corrèle avec ce que nous avons mentionné plus haut: l'activité du récepteur de l'insuline est sensible aux changements de son environnement membranaire. L'association du récepteur aux DRMs pourrait être déclenchée par un changement conformationnel induit par la liaison de l'insuline. Ainsi on peut penser que le récepteur de l'insuline contient des groupements palmitoyles et myristoyles qui pourraient être exposés dans la conformation active, favorisant les interactions entre le récepteur et les microdomaines lipidiques. Dans ce sens il a été démontré que la palmitoylation



réversible de protéines de signalisation régule leur association aux microdomaines (223). La ségrégation du récepteur de l'insuline avec la flotilline-2 dans ces domaines, à son tour, pourrait favoriser sa signalisation. Ainsi, la localisation du récepteur de l'insuline dans les microdomaines lipidiques pourrait le protéger de ses "down"-régulateurs, tels que les tyrosines phosphatases.

Nous avons mis en évidence qu'en bloquant la voie PI3K, avec un stéroïde appelé wortmannine (218), et utilisé dans l'étude des rôles physiologiques du PIP3, nous provoquons une diminution de l'association de l'OGT aux microdomaines lipidiques et aussi une diminution de son expression (**article 1, Fig. 5 et Fig. S2**). Parallèlement, nous avons observé par microscopie confocale que l'utilisation de la wortmannine induit la dissociation de ces "clusters" de la même manière que la dissociation observée pour la lovastatine, un inhibiteur de la biosynthèse du cholestérol (**article 1, Fig. 6**). Cette observation suggère une relation très forte entre l'activation de l'OGT et la formation de clusters. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Xiaoyong Yang (184), qui a démontré que l'association de l'OGT à la membrane plasmique est dépendante de la voie PI3K. Plus spécifiquement, cet auteur et ses collaborateurs ont démontré que les groupements phosphates du PIP3 sont nécessaires à son interaction avec les résidus basiques (K981, K982) du domaine PPO de l'enzyme (184). Au contraire, l'inhibition de la voie MAP Kinase avec l'inhibiteur U0126 n'a pas laissé apparaître de dissociation des "clusters", au contraire une forme plus allongée de ces derniers à même été observée (**article 1, Fig. 6**); ceci renforce l'idée selon laquelle la voie PI3K est indispensable pour la formation de ces "clusters".

Les clusters observés par microscopie confocale ne sont pas à proprement parler des microdomaines mais au mieux une association hiérarchique bien supérieure de ces derniers. En effet, bien que l'idée originale de radeaux lipidiques ait été envisagée pour des plates-formes de grande taille (micron-sized), des tentatives de visualisation des rafts par microscopie optique ont échoué, conduisant à une réévaluation de leur taille (nano-sized). L'idée actuelle est que les microdomaines lipidiques sont extrêmement petits mais hautement dynamiques (**Fig. 24**), (22).



**Figure 24. Quelle est la taille d'un radeau lipidique en comparaison des molécules qui le constitue ?** Ce schéma représente les dimensions caractéristiques des constituants des radeaux lipidiques, à savoir un phospholipide, une kinase Src, un domaine transmembranaire et un domaine du type immunoglobuline (Ig, retrouvé au niveau de l'ectodomaine des protéines associées aux rafts). Les deux cercles bleus (5 nm et 20 nm de diamètre) indiquent les limites inférieure et supérieure des tailles estimées des radeaux lipidiques. D'après (224).

**Comment la dynamique des radeaux s'opère-t-elle ?** Des données suggèrent que les radeaux lipidiques ont des demi-vies de l'ordre de 100 nanosecondes ou moins. Ainsi, des études de résonance paramagnétique électronique (RPE) ont été utilisées pour déterminer la demi-vie des lipides au sein des radeaux et, des méthodes de suivi d'une seule molécule utilisées pour mesurer les interactions des protéines aux radeaux (225-227). Les deux types de mesures ont donné des résultats similaires à savoir des demi-vies de l'ordre de 100 nanosecondes. La demi-vie d'un raft est par conséquent beaucoup plus courte que le temps nécessaire à bon nombre d'enzymes pour catalyser leurs réactions et également beaucoup plus courte que la demi-vie de la plupart des interactions protéine-protéine, notamment celles retrouvées dans les voies de signalisation.

Cependant, la dynamique des radeaux lipidiques est influencée par les protéines qui le constituent. Une des conséquences de ce modèle est par exemple que les contacts cellule-cellule pourraient moduler la taille et la stabilité des radeaux par le biais des protéines membranaires. Une telle régulation permettrait la formation de radeaux lipidiques plus grands avec une demi-vie plus longue. Une nouvelle approche biophysique a d'ailleurs suggéré que de grands domaines ordonnés lipidiques sont présents dans la synapse immunologique des cellules T (228).

Il est possible que la formation de grands « clusters » soit nécessaire pour l'association de l'OGT aux microdomaines lipidiques en vue d'exercer un rétrocontrôle négatif de la signalisation de l'insuline. Cependant, la nature exacte de l'association de l'OGT aux microdomaines lipidiques reste à caractériser. Nous envisageons d'identifier les protéines O-GlcNAcylées au niveau de microdomaines lipidiques par des méthodes alliant des approches de co- et d'immunoprécipitation et de protéomiques.

Afin de confirmer l'implication de l'OGT dans la formation des radeaux lipidiques, des études complémentaires d'inhibition de l'activité de l'OGT par le 5SGlcNAc sont en cours. Les premières données suggèrent que l'inhibition de l'OGT limite la formation des radeaux lipidiques.

# Chapitre 6

## TRAVAUX PERSONNELS

*(Partie 2):*

*Mise en évidence de la O-GlcNAc chez*

*Toxoplasma gondii et Plasmodium*

*falciparum*

## 6. MISE EN EVIDENCE DE LA O-GLCNAC CHEZ *Toxoplasma gondii* ET *Plasmodium falciparum*

### 6.1 *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*)

*T. gondii* est un protozoaire intracellulaire obligatoire, appartenant au phylum *Apicomplexa*. La partie sexuée du cycle de vie de *T. gondii* se déroule généralement chez les félins, sa consommation de viandes contenant les formes kystiques du parasite : ceci constitue l'étape d'infection. Dans le tractus intestinal du félin, il y a tout d'abord formation de gamétocytes puis d'ocystes éliminés dans les fèces. Dans le milieu extérieur, le cycle de reproduction de *T. gondii* continue, il y a transformation en sporocystes puis en sporozoïtes infectants ingérés par divers animaux parmi lesquels les porcs et les moutons. Chaque phase de ce cycle peut être à l'origine de l'infection de l'homme par *T. gondii* (229).

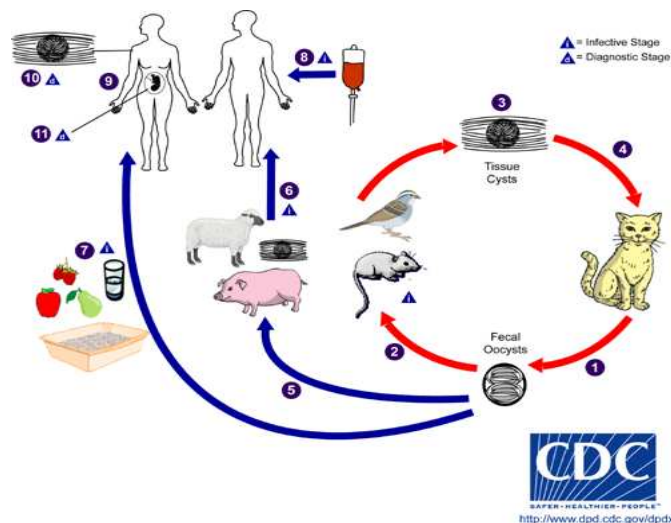


Figure 25. Cycle de *Toxoplasma gondii*. Le toxoplasme a un cycle complexe qui implique la transmission entre hôtes par des stades spécialisés pour l'invasion. Les seuls hôtes définitifs connus pour *T. gondii* sont les membres de la famille des Félidae (chats domestiques). Les oocystes non sporulés se trouvent dans les matières fécales de chats<sup>1</sup>. Les oocystes prennent 1 à 5 jours pour sporuler dans l'environnement et deviennent

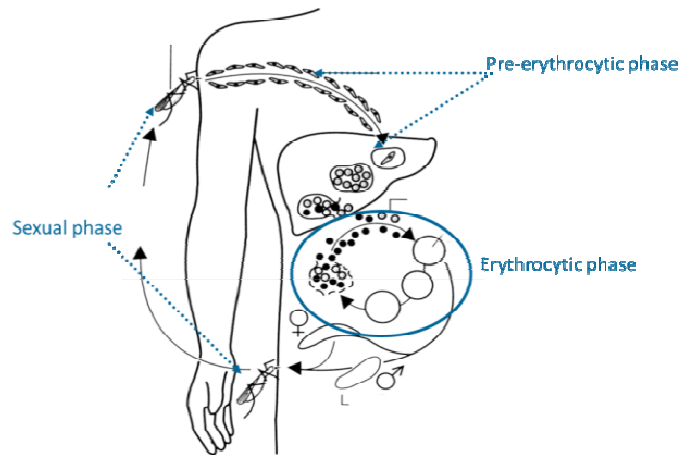
infectieux. Les hôtes intermédiaires dans la nature incluant les oiseaux et les rats deviennent infectés après ingestion de la terre, de l'eau ou des plantes contaminés avec les oocystes **2**. Les oocystes se transforment rapidement en tachyzoïtes après ingestion. Ces tachyzoïtes se localisent dans le tissu neuronal et musculaire et se développent dans les tissus de bradyzoïtes **3**. Les chats deviennent également infectés après avoir consommé des hôtes intermédiaires hébergeant des kystes **4**. Les animaux d'élevage pour la consommation humaine et de gibier sauvage peuvent aussi être infectés après l'ingestion d'oocystes sporulés dans l'environnement **5**. Les humains peuvent être infectés par plusieurs voies : en mangeant de la viande insuffisamment cuite d'animaux hébergeant des kystes **6** ; en consommant des aliments ou de l'eau contaminés par des excréments de chats contaminés ou par des échantillons environnementaux tels que les selles des sols contaminés ou par la litière d'un chat **7** ; par transfusion sanguine ou par transplantation d'organes **8** ; par voie transplacentaire de la mère au fœtus **9**. Chez l'hôte humain, les parasites forment des kystes tissulaires, le plus souvent dans le muscle squelettique, le myocarde, le cerveau et les yeux. Ces kystes peuvent rester tout au long de la vie de l'hôte. Le diagnostic est habituellement réalisé par la sérologie, bien que des kystes peuvent être observés dans des spécimens de biopsie colorées. Le diagnostic des infections congénitales peut être obtenu par la détection d'ADN de *T. gondii* dans un fluide amniotique en utilisant des méthodes moléculaires telles que la PCR. D'après (<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Toxoplasmosis.html>)

Les données sur la prévalence sérologique indiquent que la toxoplasmose est une des infections les plus communes chez l'homme à travers le monde. Une prévalence élevée de l'infection en France est liée à certaines préférences alimentaires parmi lesquelles la consommation de viande crue ou insuffisamment cuite, tandis qu'en Amérique centrale cette forte prévalence (jusqu'à 90% de la population) est liée au nombre élevé de chats errants vivants dans un climat favorable à la survie des oocystes (230). La séroprévalence globale aux Etats-Unis chez les adolescents et les adultes est de 22,5%, données recueillies par le National Health AND Nutrition Examination Survey (NHANES), avec une séroprévalence chez les femmes en âge de procréer (15 à 44 ans) de 15% (231).

## **6.2 *Plasmodium falciparum***

Le paludisme est la maladie parasitaire la plus importante dans le monde avec 225 millions de cas cliniques répertoriés et une estimation de 781.000 décès par an: le paludisme représente de ce fait un problème majeur de santé publique mondiale (OMS 2011). Bien qu'il soit admis que cinq espèces de *Plasmodium* soient responsables du paludisme chez l'homme (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* et *P. knowlesi*), *Plasmodium falciparum* est l'espèce la plus répandue,

en particulier en Afrique (86%). Le cycle de vie des parasites du genre *Plasmodium* alterne entre un hôte définitif (un moustique du genre *Anopheles*), au sein duquel s'effectue la reproduction sexuée, et un hôte intermédiaire (un vertébré), dans lequel la reproduction du parasite est asexuée.



**Figure 26. Cycle de *Plasmodium falciparum*.** Le *Plasmodium* est un parasite hétéroxène, ou polyxène, c'est-à-dire possédant plusieurs hôtes intermédiaires. Le moustique acquiert le parasite *P. falciparum* par piqûre et absorption du sang d'un hôte déjà infecté. On distingue 2 phases dans le cycle de vie de Plasmodium : une phase dans l'hôte définitif (l'homme, phase asexuée) et une phase intermédiaire dans le moustique Anophèle (phase sexuée). Le paludisme chez les humains se développe par l'intermédiaire de deux phases : une phase érythrocyte et une exoérythrocytique. La phase exoérythrocytique comporte une infection du système hépatique, alors que la phase érythrocytaire implique l'infection des érythrocytes. D'après (232)

### 6.3 Les modifications post-traductionnelles: cible thérapeutique potentielle ?

Il n'existe pas aujourd'hui ni de traitement, ni de vaccin efficace contre la toxoplasmose et le paludisme. Une meilleure connaissance de la biologie des organismes unicellulaires responsables de ces deux pathologies, et peut-être plus précisément une caractérisation plus approfondie de leur métabolisme, devrait permettre l'élaboration de thérapies plus fiables et plus efficaces. Dans ce sens, les modifications post-traductionnelles pourraient constituer des cibles de choix et originales puisqu'elles sont indispensables et vitales pour la survie de toutes les cellules, *Plasmodium* et *Toxoplasma* n'échappant pas la règle. Le caractère

dynamique de certaines d'entre-elles renforce ce côté essentiel puisqu'elles confèrent une certaine flexibilité et une haute adaptabilité aux organismes les exprimant en réponse à des changements constants du milieu extérieur. Pour cette raison, les modifications post-traductionnelles pourraient représenter de nouvelles cibles thérapeutiques efficaces et spécifiques contre le parasite responsable du paludisme ou de la toxoplasmose par exemple (232).

Jusqu'à ce jour, en dehors des travaux de Banerjee (233), aucune étude n'avait clairement démontré la présence de O-GlcNAcylation chez les organismes de l'embranchement des Apicomplexes. Mais grâce à nos observations, nous prouvons définitivement que *T. gondii* et *P. falciparum* expriment des protéines O-GlcNAcylées. Nous rapportons également la séquence potentielle de l'OGT chez *T. gondii* et enfin nous suggérons fortement que *Plasmodium falciparum* O-GlcNAcyle lui-même également ses protéines intracellulaires.

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

Direct evidence of O-GlcNAcylation in the apicomplexan  
*Toxoplasma gondii*: a biochemical and bioinformatic  
study

**Yobana Perez-Cervera**, Grégoire Harichaux , Jörg Schmidt, Françoise Debierre-Grockiego, Vanessa Dehennaut, Ulrike Bieker, Edwige Meurice,  
Tony Lefebvre and Ralph T. Schwarz

**Amino Acids (2011) 40:847–856**



# Direct evidence of *O*-GlcNAcylation in the apicomplexan *Toxoplasma gondii*: a biochemical and bioinformatic study

Yobana Perez-Cervera · Grégoire Harichaux · Jörg Schmidt ·  
Françoise Debierre-Grockiego · Vanessa Dehennaut ·  
Ulrike Bieker · Edwige Meurice · Tony Lefebvre · Ralph T. Schwarz

Received: 2 April 2010 / Accepted: 13 July 2010 / Published online: 27 July 2010  
© Springer-Verlag 2010

**Abstract** *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum* are apicomplexan parasites responsible for serious diseases in humans. Many studies have focused on the post-translational modifications (PTMs) found in the two protists including phosphorylation, acetylation or SUMOylation but only a few of these are concerned with the nuclear and cytosolic-specific glycosylation *O*-GlcNAcylation. *O*-GlcNAcylation is a highly dynamic PTM—regulated by the ON and OFF enzymes: *O*-GlcNAc transferase and *O*-GlcNAcase—that can compete with phosphorylation but its function remains unclear. In this work, we directly prove the *O*-GlcNAcylation in *T. gondii* using antibodies specifically directed against the

modification and we strongly suggest its occurrence in *P. falciparum*. We found that the inducible 70 kDa-Heat Shock Protein is *O*-GlcNAcyated, or associated with an *O*-GlcNAc-partner, in *T. gondii*. Using anti-OGT antibodies we were able to detect the expression of the glycosyl-transferase in *T. gondii* cultured both in human foreskin fibroblast and in Vero cells and report its putative sequence. For the first time the presence of *O*-GlcNAcylation is unequivocally shown in *T. gondii* and suspected in *P. falciparum*. Since the *O*-GlcNAcylation is implicated in many biological fundamental processes this study opens a new research track in the knowledge of apicomplexans' life cycle and pathogenic potential.

Y. Perez-Cervera and G. Harichaux equally contribute together;  
T. Lefebvre and R. T. Schwarz equally contribute together.

Y. Perez-Cervera · G. Harichaux · V. Dehennaut · E. Meurice ·  
T. Lefebvre (✉) · R. T. Schwarz  
Unit of Structural and Functional Glycobiology,  
CNRS-UMR 8576, IFR 147, Université de Lille 1,  
Cité Scientifique, 59655 Villeneuve d'Ascq, France  
e-mail: tony.lefebvre@univ-lille1.fr

J. Schmidt · F. Debierre-Grockiego · U. Bieker · R. T. Schwarz  
Institut für Virologie, AG Parasitologie, Philipps University  
Marburg, Hans-Meerwein-Str. 2, 35043 Marburg, Germany

F. Debierre-Grockiego  
UMR Université-INRA 0483, “Immunologie parasitaire,  
vaccinologie, biothérapies anti-infectieuses”,  
UFR Sciences Pharmaceutiques,  
31 avenue Monge, 37200 Tours, France

#### Present Address:

V. Dehennaut  
CNRS-UMR 8161, Genetic, Functional and Structural  
Approaches of Cancers, Institut de Biologie de LILLE, IFR 142,  
Universités de LILLE 1 et de LILLE 2, Institut PASTEUR de  
LILLE, 1, Rue Calmette, BP 447, 59021 Lille Cedex, France

**Keywords** *Toxoplasma gondii* ·  
*Plasmodium falciparum* · *O*-GlcNAc · *O*-GlcNAcylation ·  
*O*-GlcNAc transferase · OGT

## Introduction

The obligate intracellular parasites *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum* are responsible for two major infectious diseases, toxoplasmosis and malaria, respectively. These two ubiquitous protozoans have been intensively studied during the last hundred years. *T. gondii* was identified in 1908 in the North African rodent gundi (*Ctenodactylus gundi*) by Nicolle and Manceaux (Nicolle and Manceaux, 1908). This parasite infects warm-blooded animals including humans and in the majority of the cases the infection has no serious consequences for the immunocompetent patients. Nevertheless a reactivation of the latent parasite in immunocompromised individuals may cause encephalitis, an acute inflammation of the brain, and it is also noteworthy that cerebral toxoplasmosis is a major

cause of morbidity and mortality among AIDS patients. It has been calculated that the seroprevalence for toxoplasmosis for the pregnant women was near 45% in France (Berger et al. 2009) and it is estimated that a third of humans worldwide are infected. *Plasmodium* was observed for the first time by Alphonse Laveran (who was awarded the Nobel Prize for Medicine in 1907) in red blood cells of individuals infected with the parasite. Malaria, transmitted by the female anopheles mosquito, is a mild illness when it is caused by *P. vivax*, *P. malariae* or *P. ovale* but it can be severe when it is caused by *P. falciparum*. Each year *P. falciparum* is responsible for 300–500 million documented cases worldwide and causes the death of 2–3 millions, mainly children. Numerous post-translational modifications (PTMs) occurring in *T. gondii* and *P. falciparum* have been described (for reviews see Weiss et al. 2009 and Chung et al. 2009). Of these PTMs we find as regards *T. gondii* *N*-glycosylation (Fauquenoy et al. 2008; Luk et al. 2008), glypiation (modification with Glycosyl-Phosphatidyl Inositol (GPI) Striepen et al. 1997; Debierre-Grockiego et al. 2009), SUMOylation (modification with a Small Ubiquitin-like MOdifier Braun et al. 2009), perhaps ubiquitination and neddylation (Frickel et al. 2007), acetylation and glutamylation of  $\alpha$ -tubulin (Plessmann et al. 2004), and methylation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin (Xiao et al. 2010). Concerning *Plasmodium*, phosphorylation (Ward et al. 2004; Schneider and Mercereau-Puijalon 2005; Dorin-Semblat et al. 2007), prenylation (Chakrabarti et al. 2002), glypiation (Gerold et al. 1994; Wichmann et al. 2007), acetylation (Cui et al. 2007; Andrews et al. 2009), methylation (Cui et al. 2008), SUMOylation, ubiquitination (Horrocks and Newbold 2000), palmitoylation, and protein cleavage (for review see Chung et al. 2009) have been reported. Of all these PTMs, the existence of *O*-GlcNAcylation in *T. gondii* and *P. falciparum* remained controversial. The *O*-GlcNAcylation occurs within the cytosolic and the nuclear compartments of eukaryotes (for reviews see Hart et al. 2007; Butkinaree et al. 2010) and it has recently been shown that mitochondrial proteins could also be *O*-GlcNAcylated (Hu et al. 2009). Virtually it is assumed that *O*-GlcNAcylation is widely expressed in all the living organisms from viruses to humans through bacteria and nematodes with the exception of yeast. Until recently there was a doubt concerning the existence of this PTM in apicomplexans. The first study, reporting the putative existence of *O*-GlcNAcylation in apicomplexans, was done in the early '90s (Dieckmann-Schuppert et al. 1993). It was shown that erythrocytes infected with *P. falciparum* contained *O*-glycans with terminal GlcNAc and further analyses suggested that these structures could be simply *O*-GlcNAc. In the same report, it was attested that *P. falciparum* possessed its own *O*-GlcNAc transferase (OGT) using the synthetic peptide Pro-Tyr-Thr-Val-Val.

Later Hoessli et al. (2003) demonstrated that MSP1 (Merozoite Surface Protein-1) that is expressed and GPI-anchored at the cell surface of *P. falciparum* bore *O*-GlcNAc moieties. But owing to its extracellular localization we cannot assume that this glycosylation is related to the nuclear and cytoplasmic-specific *O*-GlcNAcylation.

Recently the OGTs expressed by *Cryptosporidium parvum*—that is phylogenetically close to *Plasmodium* and *Toxoplasma*—and by the minimalist protist *Giardia lamblia* have been characterized (Banerjee et al. 2009). This study strongly supports the hypothesis that *O*-GlcNAcylation occurs in lower eukaryotes and that the two protists make their *O*-GlcNAc moieties using their own OGTs. Nevertheless, none of these three studies showed direct evidence of *O*-GlcNAcylation in these parasites.

In the present report we used two distinct anti-*O*-GlcNAc directed antibodies, namely, RL2 and CTD110.6, to show that *T. gondii* unambiguously expresses the nuclear and cytoplasmic modification and to suggest its occurrence in *P. falciparum*. Among the plethora of *O*-GlcNAcylated proteins observed, Hsp70 was identified either as being itself modified or associated with an *O*-GlcNAcylated partner. We also found that *T. gondii* expresses its own OGT and using sequences' alignment we found that the parasite's enzyme shares a high identity with SPINDLY.

## Materials and methods

### Culture and purification of the parasites

*T. gondii* grown in African green monkey kidney cells (Vero cells, ATCC CCL-81), were cultured in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco BRL), and supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, Gibco), 2 mM glutamine, 100 units/mL penicillin, and 0.1 mg/mL streptomycin. Parasites ( $5 \times 10^7$ ) were added to confluent monolayer of cells ( $175 \text{ cm}^2$ ), harvested after being cultivated for 72 h, and liberated from their host cells using a Mixer Mill homogenizer (Retsch). The suspension was run through a 20 mL glass-wool column to remove cellular debris. The purity of the tachyzoite suspension was monitored microscopically. Cell lines and parasites were routinely tested for *Mycoplasma* contamination. To control the efficiency of parasite purification, *T. gondii* cells liberated from their host cells were mixed with homogenized Vero cells, and the mixture was purified using glass-wool columns as described previously (Grimwood et al. 1979).

The *P. falciparum* strain FCBR was obtained from B. Enders, Behring Co. (Marburg, Germany) and was maintained as previously described (Schmidt et al. 1998). Development and multiplication of plasmodial cultures were monitored by microscopic evaluation of

Giemsa-stained smears. Parasite cultures were routinely checked for *Mycoplasma* contamination. Parasite multiplication was assessed as described previously (Dieckmann-Schuppert et al. 1992). Trophozoites were isolated from rings and non-infected erythrocytes by magnetic separation using SuperMACS and D columns (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany).

#### SDS-PAGE and Western blotting

All the cells and the parasites used in this study were lysed in the following homogenization buffer (HB): 10 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% (v/v) Triton X-100, 0.5% (w/v) sodium deoxycholate, 0.1% (w/v) SDS, proteases inhibitors, pH 7.4. After centrifugation at 20,000g for 10 min, the supernatant was mixed with Laemmli buffer and boiled for 10 min. The proteins were run on 8 or 10% SDS-PAGE in reducing conditions. The gels were either stained with brilliant blue or electroblotted onto a nitrocellulose sheet. The transfer efficiency was checked using the Ponceau red staining. The blots were saturated with 5% (w/v) non-fat milk in TBS (Tris-buffered saline)-Tween (15 mM Tris, 140 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween) or with 3% (w/v) bovine serum albumin in TBS for 45 min. The primary antibodies were incubated overnight at 4°C. The mouse monoclonal anti-*O*-GlcNAc (RL2, Ozyme), mouse monoclonal anti- $\alpha$ -tubulin (Santa-Cruz Biotechnologies), and rabbit polyclonal anti-actin (Sigma) were respectively used at dilutions of 1:1,000; 1:1,000 and 1:10,000. The mouse monoclonal (IgM) anti-*O*-GlcNAc CTD110.6 (generously provided by Prof. G.W. Hart) was used at a dilution of 1:4,000. The rabbit polyclonal anti-OGT antibodies AL25 and AL35 (gifts from Prof. G.W. Hart) were both used at a dilution of 1:10,000 and the rabbit polyclonal anti-Hsp70 (Stressgen) was used at a dilution of 1:30,000. The specificity of the RL2 and of the CTD110.6 antibodies was checked by co-incubation with 1 M of free GlcNAc. Then the membranes were washed three times for 10 min in TBS-Tween and incubated with either an anti-mouse (IgG or IgM) horseradish peroxidase-labeled secondary antibody or an anti-rabbit IgG horseradish peroxidase-labeled secondary antibody (GE Healthcare) at a dilution of 1:10,000. Finally, three washes of 10 min each were performed with TBS-Tween and the detection was carried out with enhanced chemiluminescence using Hyperfilms (GE Healthcare).

#### Measurement of the OGT activity

The *T. gondii* OGT activity was assayed by using the procedure described by Banerjee et al. 2009 with the following slight differences. The activity was measured in triplicate on the nucleocytoplasmic *T. gondii* (or HepG2 as

a positive control) proteins using 0.4  $\mu$ Ci of UDP-[<sup>3</sup>H]GlcNAc. After labeling, the proteins were precipitated with trichloro-acetic acid (TCA) at a final concentration of 20% (m/v), and then recovered on glass microfiber filters (GF/A, Whatman), and intensively washed with 0.1% (m/v) TCA under vacuum. The precipitates were rinsed with absolute ethanol and then counted on the filters in a liquid scintillation counter (Beckman).

#### Immunoprecipitation

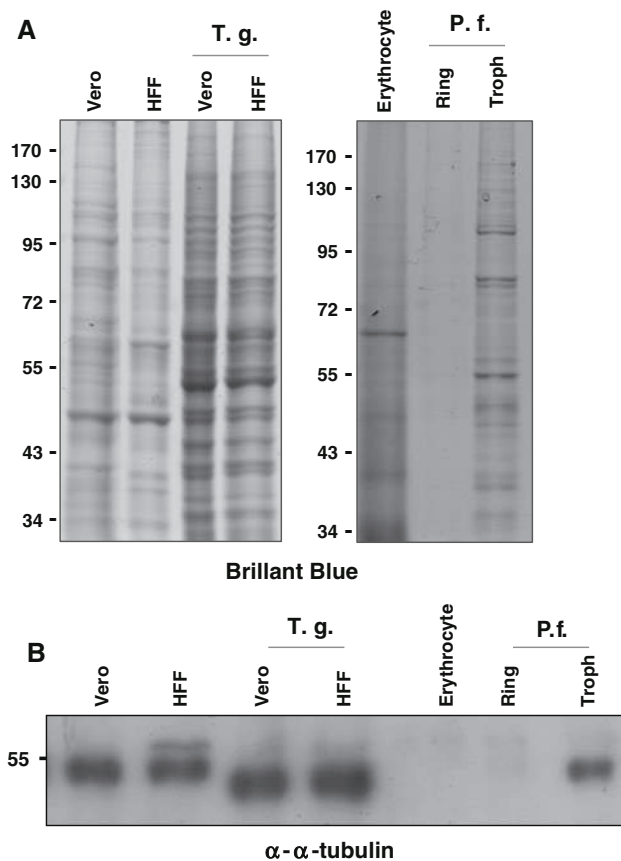
HeLa cells or *T. gondii* were lysed in 1 mL of HB. After centrifugation at 20,000 g, supernatants were incubated overnight at 4°C with 10  $\mu$ L of anti-*O*-GlcNAc (RL2). Then 50  $\mu$ L of proteins G was added to the samples that were newly placed for 1 h at 4°C. Four washes were realized in the following order: HB, HB supplemented with 0.5 M NaCl, HB/TNE (10 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4) (v/v) and finally TNE alone. Immunoprecipitates were resuspended in Laemmli buffer and boiled. Immunoprecipitation experiments were controlled by replacing the anti-*O*-GlcNAc specific-directed antibodies by non-immune antibodies.

#### BLAST and sequences' alignment

The sequence of the catalytic domain II of the human OGT (AAH38180.1; GI:23315618) was used for performing the BLAST analyses. The databases used were ApiDB (<http://apidb.org>) and ToxoDB (<http://toxodb.org/toxo/>). MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>) and ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) were used for the realization of the sequences' alignments.

## Results

The crude extracts of *T. gondii* and *P. falciparum* were resolved by SDS-PAGE and the proteins were stained brilliant blue. It was observed that the parasites display distinct protein profiles when compared to Vero/HFF and erythrocytes, respectively (Fig. 1a), suggesting that there was cross-contamination between the different organisms. This absence of contamination is unequivocally attested by the anti- $\alpha$ -tubulin staining (Fig. 1b);  $\alpha$ -tubulin is expressed in Vero cells, HFF, and *T. gondii* but the difference of molecular weight observed between the two cell types and the parasite asserts that there was no contamination during the preparation of *T. gondii*. With regard to the preparation of *P. falciparum* a high expression of  $\alpha$ -tubulin is observed for the trophozoites, whereas no  $\alpha$ -tubulin is observed for the erythrocytes.



**Fig. 1** *T. gondii*, *P. falciparum* and their host cells display distinct protein profiles. The Vero cells, HFF, erythrocytes, and protozoan cells were lysed in the homogenization buffer and run using SDS-PAGE. The extracts were either stained with brilliant blue (a) or electroblotted onto nitrocellulose and analyzed for their alpha-tubulin content (b). HFF, human foreskin fibroblast; T.g., *Toxoplasma gondii*; P.f., *Plasmodium falciparum*

*T. gondii* and *P. falciparum* express both a myriad of *O*-GlcNAcylated proteins

In order to prove that *O*-GlcNAcylation occurs in *T. gondii* and *P. falciparum* we analyzed the parasites' proteins using two anti-*O*-GlcNAc specific antibodies (RL2, Fig. 2a and CTD110.6, Fig. 2b) that recognize a wide range of *O*-GlcNAcylated proteins. The RL2 antibody was originally designed for recognizing a group of eight proteins located to the nuclear pore complex (Snow et al. 1987) and further analyses indicated that the antibody was directed against the *O*-GlcNAc moieties of these proteins (Holt et al. 1987). The CTD110.6 antibody (mouse IgM) was designed against the consensus heptapeptide YSPTSPS (Comer et al. 2001; Teo et al. 2010) that is repeated in a high number of copies in the Carboxyl-Terminal Domain of the RNA polymerase II. Using the RL2 we can see that the proteins expressed by *T. gondii* and *P. falciparum* are heavily *O*-GlcNAcylated (Fig. 2a). The *T. gondii* and the

Vero cells' *O*-GlcNAc profiles are rather different since *O*-GlcNAcylated proteins having an apparent molecular weight more than 130 kDa are found for *T. gondii* but are undetectable for the Vero cells. The band having a 34 kDa apparent molecular weight in the erythrocyte lane (asterisk) and which displays a high reactivity with the anti-*O*-GlcNAc antibody is not found in the *P. falciparum* corresponding lane. In the same idea the bands having an apparent molecular weight close to 38–41 kDa in the Vero cells' lane (asterisks) are not found in the *T. gondii* lane ruling out the concern of a contamination during the preparation of the parasites. The specificity of the RL2 was asserted by incubating the antibody with free *N*-acetylglucosamine. As for RL2, the staining with the CTD110.6 reveals that the *O*-GlcNAcylation profiles are rather different when the *T. gondii* and the *P. falciparum* extracts are compared to their host cells and that many proteins bear the *O*-GlcNAc residue (Fig. 2b). The specificity of the CTD110.6 was also checked by incubating the antibody with free *N*-acetylglucosamine (data not shown). It is noteworthy that *O*-GlcNAcylated proteins were also detected when *T. gondii* was cultured in HFF (data not shown).

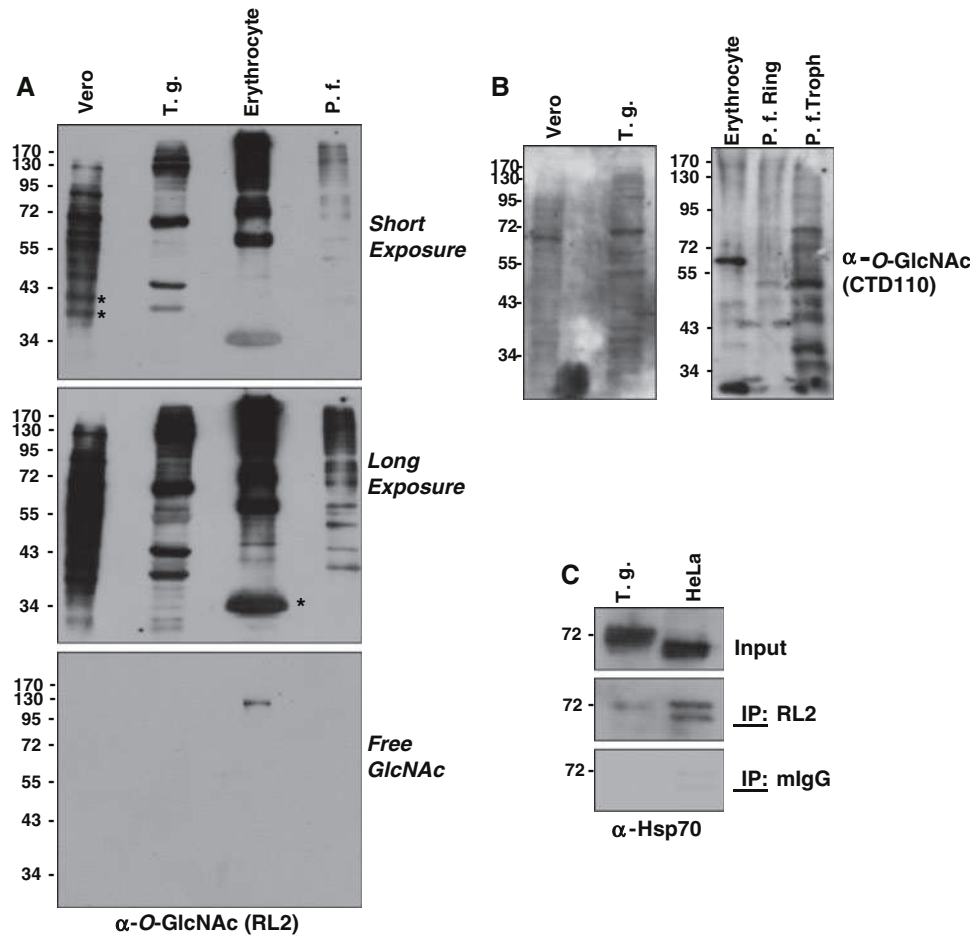
Since one of the *O*-GlcNAcylated proteins detected in *T. gondii* with the RL2 and the CTD110.6 displays a molecular mass close to the 72 kDa mass marker we sought that it may be the 70 kDa-Heat Shock Protein (Hsp70), a well-recognized *O*-GlcNAcylated protein (Guinez et al. 2006). For that purpose the *O*-GlcNAcylated proteins expressed in *T. gondii* and in HeLa (positive control) cells were immunoprecipitated either with the RL2 antibody or with non-immune IgG (negative control). The resultant immunoprecipitates were blotted with an anti-Hsp70 antibody (Fig. 2c). We can observe that in *T. gondii*, Hsp70 is *O*-GlcNAc-modified or at least tightly associated with an *O*-GlcNAcylated partner.

The nuclear and cytoplasmic *O*-GlcNAc transferase is found in *T. gondii*

The next step of our study was to prove OGT in the parasites. To tentatively detect the enzyme responsible for the attachment of the sugar moiety we have tested a panel of anti-OGT antibodies. Using the AL35 and the AL25 antibodies against the proteins expressed by *T. gondii* we were able to detect a band migrating close to the OGT expressed by the Vero cells and the HFF (Fig. 3a). In contrast, we did not find any band that might correspond to OGT with the *P. falciparum* extracts. According to this result, we cannot rule out that the proteins detected with the anti-*O*-GlcNAc antibodies with the *P. falciparum* extracts are the previously described GPI-anchored *O*-GlcNAcylated proteins (Hoessli et al. 2003).

We have assayed the endogenous OGT activity found in *T. gondii* and compared it to the HepG2 cells since this





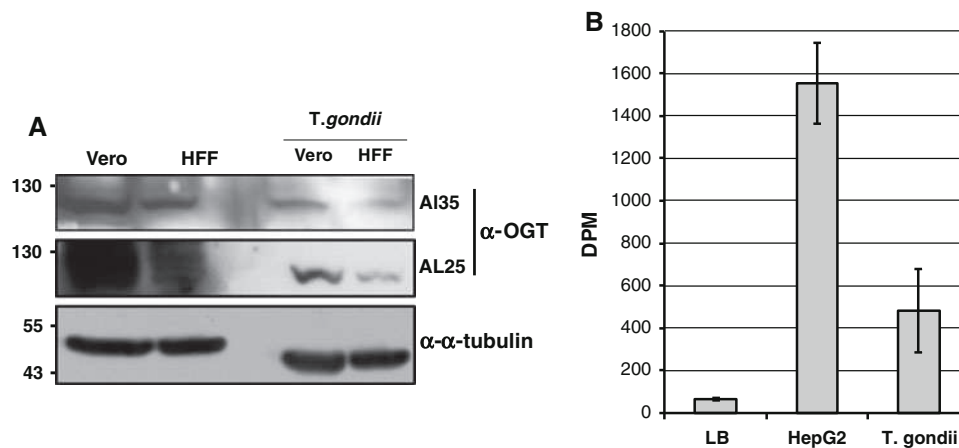
**Fig. 2** *T. gondii* and *P. falciparum* express a myriad of *O*-GlcNAcylated proteins. After host cells and parasites lysis, the proteins were run on SDS-PAGE, electroblotted onto nitrocellulose sheets and analyzed for their *O*-GlcNAc content either with the RL2 antibody (a) or the CTD110.6 antibody (b). The asterisks indicate *O*-GlcNAcylated proteins expressed in Vero cells or in the erythrocytes and that are not found in the parasites taking away any problem of contamination. The specificity of the RL2 was checked by incubating the antibody with

free *N*-acetylglucosamine (GlcNAc). HeLa cells and *T. gondii* extracts were incubated with the RL2 antibody in order to immunoprecipify *O*-GlcNAcylated proteins (c). After running on SDS-PAGE the immunoprecipitated proteins were analyzed by Western blot according to their Hsp70 content. A negative control was realized by replacing the anti-*O*-GlcNAc antibody by non-immune mouse IgG. *T.g.*, *Toxoplasma gondii*; *P.f.*, *Plasmodium falciparum*; *OGT*, *O*-GlcNAc transferase

human hepatocarcinoma cell line is known to possess appreciable levels of *O*-GlcNAcylation (Fig. 3b). For that purpose we followed the procedure described by Banerjee et al. (2009) who measured the OGT activities for *Giardia* and *Cryptosporidium* nucleocytosolic extracts. We detected a significant *T. gondii* OGT activity that is sevenfold higher than the background. Nevertheless this activity is threefold lower than that of the HepG2 cells.

Using the amino acids' sequence of the catalytic domain II (CDII; Lazarus et al. 2005) of the human OGT we have studied the Apicomplexan Genome Resource (ApiDB) by using the "Basic Local Alignment Search Tool" (BLAST). We found the sequence *TGGT1\_112580* as the putative *T. gondii* OGT (Fig. 4). This sequence was aligned with SPY (SPindLY, from *Arabidopsis thaliana*), with the predicted sequence corresponding to the *Cryptosporidium*

*parvum* (cgd1\_1300 SPindLY-like TPR repeats; 1032 amino acids) and published by Banerjee et al. (2009), with the *Cryptosporidium muris* predicted sequence (CMU\_036020 TPR\_repeat containing protein; 1070 amino acids) found in our Blast researches and with some OGT sequences found in other organisms (Fig. 4). The maximal identity/homology found for these eight sequences set around the two last thirds of the proteins that is in the catalytic domains. These alignments revealed that most of the amino acids essential for the binding properties and for the catalytic activity (Lazarus et al. 2005; Martinez-Fleites et al. 2008; Clarke et al. 2008; Martinez-Fleites et al. 2010) of the glycosyltransferase are present in the two herein described sequences, i.e., *T. gondii* and *C. muris* OGTs (Fig. 4). The mobile loop found in the catalytic pocket between the  $\beta$ N4 and the  $\alpha$ N4 structures is found for



**Fig. 3** The OGT is expressed in *T. gondii*. The protein extracts from Vero cells, HFF and from *T. gondii* cultured in both host cells were run on SDS-PAGE, electroblotted and analyzed according to their OGT content either with the AL35 or the AL25 antibodies (a). The relative activities of *T. gondii* and HepG2 OGTs were measured using

a labeling with UDP-[<sup>3</sup>H] GlcNAc as described under the 'Materials and methods' section (b). HFF, human foreskin fibroblast; *T.g.*, *Toxoplasma gondii*; LB, labeling buffer (negative control); DPM, disintegrations per minute

*T. gondii* and *C. muris* except that the basic residue (HsOGT Arg647; *Tg*OGT Arg701) is changed to a cysteine in *C. muris* OGT (Cys781). The glycine and the threonine residues located within this motif are conserved along with the eight species tested (HsOGT Gly641/Thr643). The residues implicated in the binding of the beta-phosphate of UDP-GlcNAc are strictly conserved among the species (HsOGT Lys852/Thr931; *Tg*OGT Lys793/Thr876; *Cm*OGT Lys871/Thr955). The alpha-phosphate between the two residues defined as necessary for bridging the threonine is also strictly conserved (HsOGT Thr932; *Tg*OGT Thr877; *Cm*OGT Thr956), whereas the second residue is divergent (HsOGT Gln848; *Tg*OGT Asn790; *Cm*OGT Arg869). The residue stabilizing the ribose part of the nucleotide-sugar is homologous for the species since we find either an aspartic acid or a glutamic acid residue (HsOGT Asp935; *Tg*OGT Glu880; *Cm*OGT Glu959). In our alignments we also found the histidine 558, which is conserved among all the species (*Tg*OGT His623; *Cm*OGT His668) and which mutation inactivates the enzyme. Finally in the *T. gondii* C-terminal OGT sequence we find the Lys937/Arg938 dipeptide sequence (HsOGT Lys981/Lys982) necessary for the binding of OGT to the phosphoinositides (Yang et al. 2008) and named PPO for PIP-binding activity of OGT.

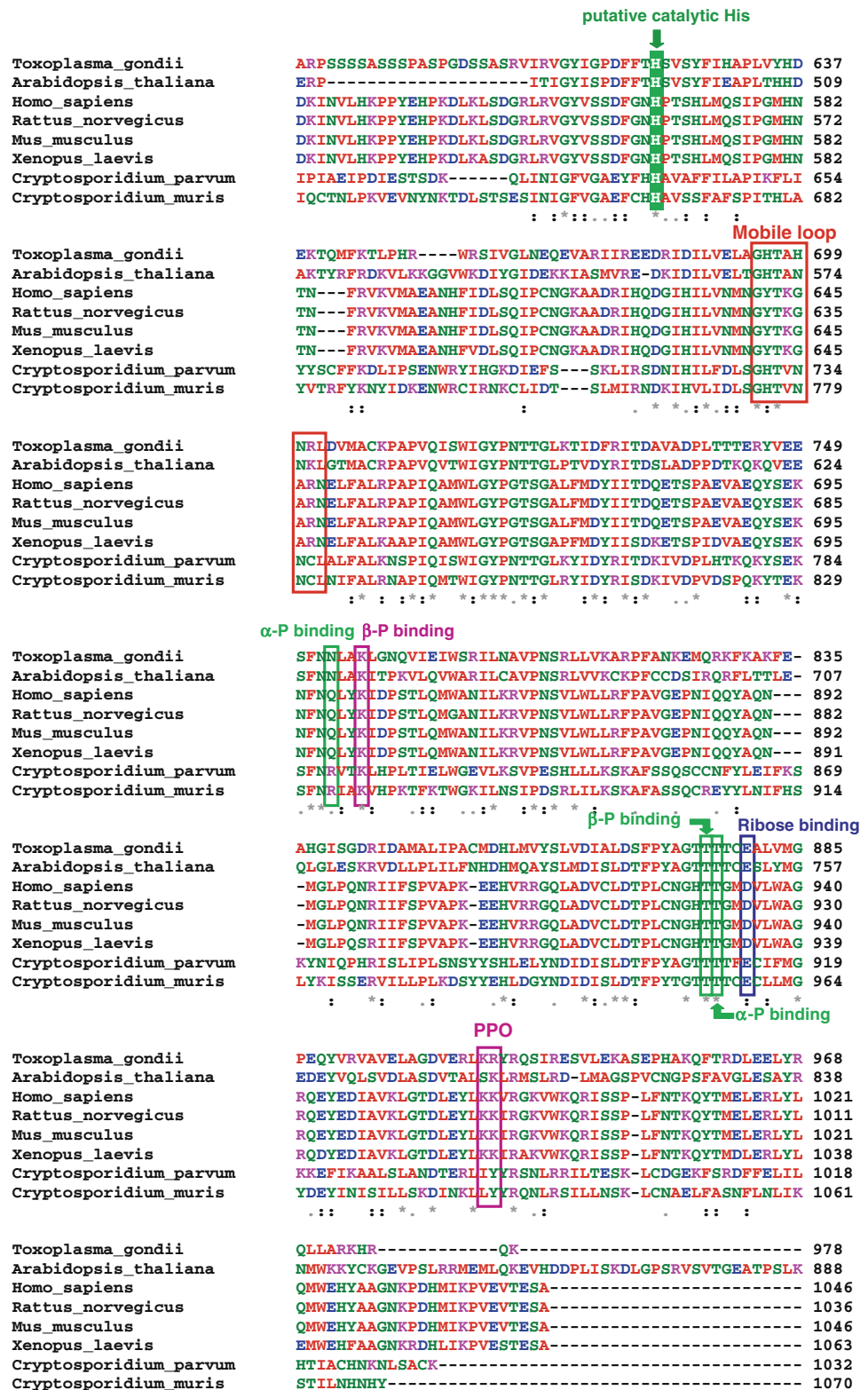
## Discussion

*O*-GlcNAcylation is widely expressed in many organisms including viruses, bacteria, and *C. elegans*. In eukaryotes, this modification preferentially occurs within the cytosolic, the nuclear (Hart et al. 2007) and the mitochondrial (Hu et al.

2009) compartments. *O*-GlcNAcylation differs from typical *N*- and *O*-glycosylations by many features, one of the most surprising being its high dynamism. The functions played by *O*-GlcNAcylation are multiple and include the regulation of the cell cycle, the intracellular trafficking of proteins, their turnover, and many others (for recent review see Butkinaree et al. 2010). To date no study has clearly reported the presence of *O*-GlcNAcylation in yeast and in apicomplexans. In the present work we definitively prove that *T. gondii* possess a large variety of *O*-GlcNAcylated proteins and in a second part we report the potential sequence of *T. gondii* OGT. We have also arguments for suggesting that *P. falciparum* *O*-GlcNAcylates its intracellular proteins, but since we failed to find a putative OGT sequence, we cannot certainly assert that what we detected with this parasite is indeed the classical nucleocytoplasmic *O*-GlcNAcylation. We also attempted to prove the OGA in *T. gondii* and *P. falciparum* by Western blot and by *in silico* analyses but the two approaches proved unfruitful. This lack of finding is in accordance with the previously published data by Banerjee et al. (2009) who did not find homologues of the OGA for their parasites.

OGT is a glycosyltransferase (EC. 2.4.1.94) assigned to the GT41 family in the CAZY (Carbohydrate-Active enZYme) database (Cantarel et al. 2009). It belongs to the Glycogen Phosphorylase/GlycosylTransferase Family (GPGTF), which includes the glycogen phosphorylase, the UDP-GlcNAc 2-epimerase and the glycosyl transferase MurG (Wrabl and Grishin 2001; Lazarus et al. 2005). The human *OGT* gene resides on the Xq13.1 locus (Nolte and Müller 2002), a region associated with neurological disorders, and its deletion results in cell lethality (Shafi et al. 2000). OGT has been identified in many kinds of organism

**Fig. 4** The *T. gondii* putative OGT sequence shares similar features with other species. The putative OGT sequence (TGGT1\_112580) found for *T. gondii* was aligned with other known OGT sequences and with the putative *Cryptosporidium muris* OGT sequence (CMU\_036020). The putative catalytic histidine, the mobile loop located within the catalytic pocket and described by Martinez-Fleites et al. (2008), the binding sites for the UDP-GlcNAc ribose, alpha-phosphates and beta-phosphates, and PPO (PIP-binding activity of OGT) are highlighted



(Wrabl and Grishin 2001). For example, the plant *Arabidopsis* expressed two OGTs, namely, SPY for SPindIY and SEC for SECret agent (Hartweck et al. 2002) and the bacteria *Listeria monocytogenes* expresses the OGT GmaR

that controls the flagellar motility (Shen et al. 2006). In humans, there are three known OGT isoforms differing in their N-terminal region (for review see Lazarus et al. 2009): the nuclear and cytoplasmic OGT (ncOGT) that

contains 11.5 TPRs (TetraTricopeptide Repeats; amino acids 1–473 in the human OGT sequence); the mitochondrial OGT (mOGT) which contains 9.5 TPR, and a mitochondrial targeting sequence and the short OGT isoform (sOGT) found within the nucleus and the cytoplasm and which only contains 2.5 TPRs. All these isoforms share a common sequence in the C-terminal region. In this part of the enzyme two catalytic domains (CD) are found (amino acids 504–1046 in the human OGT), the CDI and the CDII (Lazarus et al. 2005). In our study we used the sequence of the second catalytic domain for finding putative apicomplexans OGTs. We found several sequences between which are *TGGT1\_112580* for *T. gondii* OGT and *CMU\_036020* for *Cryptosporidium muris* OGT. The alignment and the analysis of these sequences with other previously described OGTs show that the most conserved part of the enzyme is located in the second half, the region where are located the two catalytic domains (Fig. 4). In our alignments the *T. gondii* OGT shares a maximal identity with the plant (*Arabidopsis thaliana*) OGT homologue SPindLY: 40% for the full-lengths OGTs and 50% for the catalytic domain of the enzymes. As detailed in the ‘Results’ section we found most of the amino acids essential for the binding properties that are for the ribose and the  $\alpha/\beta$ - phosphates binding. We also found the histidine 558 necessary for the catalytic activity of OGT. It seems that this crucial residue is at the catalytic basis of the enzyme since it may serve for the deprotonation of the Ser/Thr hydroxyl group of the acceptor (Lazarus et al. 2009; Martinez-Fleites et al. 2010). At last we found the KR dipeptide instead of the KK dipeptide described by Yang et al. (2008) and crucial for the PIP-binding (PPO domain). In conclusion the putative *T. gondii* OGT sequence possesses the main crucial amino acids residues necessary for its biological properties. This finding that *T. gondii*, along with perhaps other protozoan parasites, expresses its own OGT opens up new therapeutic perspectives. Indeed it has been established that OGT is necessary for stem cells’ viability (Shafi et al. 2000), and numerous works have shown that its knock-down using si/shRNA interferes with many fundamental biological functions. The few differences found for the UDP-GlcNAc binding properties of *T. gondii* and human OGTs suggest that specific pharmacological inhibitors could be designed and synthesized so as to specifically block the parasite OGT. The generation of new molecules targeting the *Toxoplasma* metabolism may be an alternative to the resistance developed by the parasite toward the current drug therapies. In this view it has been recently observed that the use of the small-molecule inhibitor tachypleginA blocked the motility of *T. gondii* by inducing an unidentified PTM of TgMLC1, a protein partner of the myosin motor protein TgMyoA (Heaslip et al. 2010). This finding is very interesting since it may be envisaged that this

inhibitor, or a derivative one, can be used for stopping the *T. gondii* infectivity through targeting an enzyme involved in protein modification. In addition to be dependent upon the motor proteins, the invasion process is also tightly orchestrated by the microtubule network. Xiao et al. (2010) recently showed that *T. gondii*  $\alpha$ -tubulins and  $\beta$ -tubulins were highly modified. The different PTMs occurring on microtubules are undoubtedly fundamental actors of the invasion process and blocking their metabolism by the use of inhibitors should interfere with the infection pathway.

The next step in these studies will be to identify which proteins are *O*-GlcNAcylated in *T. gondii*. This identification will be helpful for the understanding of the function played by the modification in the parasites life cycles and in the infection processes.

Finally this study is another proof that *O*-GlcNAcylation is ubiquitous and it shows that this PTM is fundamental even for the simplest organisms.

**Acknowledgments** We thank the “Université de Lille 1” (Villeneuve d’Ascq, France) and the “Centre National de la Recherche Scientifique” and the “Deutsche Forschungsgemeinschaft” (Bonn, Germany). We are particularly grateful to Professor Gerald W. Hart for the kind gift of AL25, AL35 and CTD110.6. YPC is a recipient of a Rosalind Franklin fellowship.

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Andrews KT, Tran TN, Wheatley NC, Fairlie DP (2009) Targeting histone deacetylase inhibitors for anti-malarial therapy. *Curr Top Med Chem* 9:292–308
- Banerjee S, Robbins PW, Samuelson J (2009) Molecular characterization of nucleocytosolic *O*-GlcNAc transferases of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum*. *Glycobiology* 19:331–336
- Berger F, Goulet V, Le Strat Y, Desenclos JC (2009) Toxoplasmosis among pregnant women in France: risk factors and change of prevalence between 1995 and 2003. *Rev Epidemiol Sante Publique* 57:241–248
- Braun L, Cannella D, Pinheiro AM, Kieffer S, Belrhali H, Garin J, Hakimi MA (2009) The small ubiquitin-like modifier (SUMO)-conjugating system of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 39:81–90
- Butkinaree C, Park K, Hart GW (2010) *O*-linked beta-*N*-acetylglucosamine (*O*-GlcNAc): extensive crosstalk with phosphorylation to regulate signaling and transcription in response to nutrients and stress. *Biochim Biophys Acta* 1800:96–106
- Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B (2009) The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZY): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res* 37:D233–D238
- Chakrabarti D, Da Silva T, Barger J, Paquette S, Patel H, Patterson S, Allen CM (2002) Protein farnesyltransferase and protein prenylation in *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* 277:42066–42073
- Chung DW, Pons N, Cervantes S, Le Roch KG (2009) Post-translational modifications in *Plasmodium*: more than you think!. *Mol Biochem Parasitol* 168:123–134



- Clarke AJ, Hurtado-Guerrero R, Pathak S, Schüttelkopf AW, Borodkin V, Shepherd SM, Ibrahim AF, van Aalten DM (2008) Structural insights into mechanism and specificity of *O*-GlcNAc transferase. *EMBO J* 27:2780–2788
- Comer FI, Vosseller K, Wells L, Accavitti MA, Hart GW (2001) Characterization of a mouse monoclonal antibody specific for *O*-linked *N*-acetylglucosamine. *Anal Biochem* 293:169–177
- Cui L, Miao J, Furuya T, Li X, Su XZ, Cui L (2007) PfGCN5-mediated histone H3 acetylation plays a key role in gene expression in *Plasmodium falciparum*. *Eukaryot Cell* 6:1219–1227
- Cui L, Fan Q, Cui L, Miao J (2008) Histone lysine methyltransferases and demethylases in *Plasmodium falciparum*. *Int J Parasitol* 38:1083–1097
- Debierre-Grockiego F, Molitor N, Schwarz RT, Lüder CG (2009) *Toxoplasma gondii* glycosylphosphatidylinositols up-regulate major histocompatibility complex (MHC) molecule expression on primary murine macrophages. *Innate Immun* 15:25–32
- Dieckmann-Schuppert A, Bender S, Odenthal-Schnittler M, Bause E, Schwarz RT (1992) Apparent lack of *N*-glycosylation in the asexual intraerythrocytic stage of *Plasmodium falciparum*. *Eur J Biochem* 205:815–825
- Dieckmann-Schuppert A, Bause E, Schwarz RT (1993) Studies on *O*-glycans of *Plasmodium-falciparum*-infected human erythrocytes. Evidence for *O*-GlcNAc and *O*-GlcNAc-transferase in malaria parasites. *Eur J Biochem* 216:779–788
- Dorin-Semlat D, Quashie N, Halbert J, Sicard A, Doerig C, Peat E, Ranford-Cartwright L, Doerig C (2007) Functional characterization of both MAP kinases of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* by reverse genetics. *Mol Microbiol* 65:1170–1180
- Fauquenoy S, Morelle W, Hovasse A, Bednarczyk A, Slomianny C, Schaeffer C, Van Dorsseleer A, Tomavo S (2008) Proteomics and glycomics analyses of *N*-glycosylated structures involved in *Toxoplasma gondii*-host cell interactions. *Mol Cell Proteomics* 7:891–910
- Frickel EM, Quesada V, Muething L, Gubbels MJ, Spooner E, Ploegh H, Artavanis-Tsakonas K (2007) Apicomplexan UCHL3 retains dual specificity for ubiquitin and Nedd8 throughout evolution. *Cell Microbiol* 9:1601–1610
- Gerold P, Dieckmann-Schuppert A, Schwarz RT (1994) Glycosylphosphatidylinositols synthesized by asexual erythrocytic stages of the malarial parasite, *Plasmodium falciparum*. Candidates for plasmodial glycosylphosphatidylinositol membrane anchor precursors and pathogenicity factors. *J Biol Chem* 269:2597–2606
- Grimwood BG, Hechemy K, Stevens RW (1979) *Toxoplasma gondii*: purification of trophozoites propagated in cell culture. *Exp Parasitol* 48:282–286
- Guinez C, Losfeld ME, Cacan R, Michalski JC, Lefebvre T (2006) Modulation of HSP70 GlcNAc-directed lectin activity by glucose availability and utilization. *Glycobiology* 16:22–28
- Hart GW, Housley MP, Slawson C (2007) Cycling of *O*-linked beta-*N*-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature* 446:1017–1022
- Hartweck LM, Scott CL, Olszewski NE (2002) Two *O*-linked *N*-acetylglucosamine transferase genes of *Arabidopsis thaliana* L. Heynh have overlapping functions necessary for gamete and seed development. *Genetics* 161:1279–1291
- Heaslip AT, Leung JM, Carey KL, Catti F, Warshaw DM, Westwood NJ, Ballif BA, Ward GE (2010) A small-molecule inhibitor of *T. gondii* motility induces the posttranslational modification of myosin light chain-1 and inhibits myosin motor activity. *PLoS Pathog* 6:e1000720
- Hoessli DC, Poincelet M, Gupta R, Ilangumaran S, Nasir-ud-Din (2003) *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1. *Eur J Biochem* 270:366–375
- Holt GD, Snow CM, Senior A, Haltiwanger RS, Gerace L, Hart GW (1987) Nuclear pore complex glycoproteins contain cytoplasmically disposed *O*-linked *N*-acetylglucosamine. *J Cell Biol* 104:1157–1164
- Horrocks P, Newbold CI (2000) Intraerythrocytic polyubiquitin expression in *Plasmodium falciparum* is subjected to developmental and heat-shock control. *Mol Biochem Parasitol* 105:115–125
- Hu Y, Suarez J, Fricovsky E, Wang H, Scott BT, Trauger SA, Han W, Hu Y, Oyeleye MO, Dillmann WH (2009) Increased enzymatic *O*-GlcNAcylation of mitochondrial proteins impairs mitochondrial function in cardiac myocytes exposed to high glucose. *J Biol Chem* 284:547–555
- Lazarus BD, Roos MD, Hanover JA (2005) Mutational analysis of the catalytic domain of *O*-linked *N*-acetylglucosaminyl transferase. *J Biol Chem* 280:35537–35544
- Lazarus BD, Love DC, Hanover JA (2009) *O*-GlcNAc cycling: implications for neurodegenerative disorders. *Int J Biochem Cell Biol* 41:2134–2146
- Luk FC, Johnson TM, Beckers CJ (2008) *N*-linked glycosylation of proteins in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* 157:169–178
- Martinez-Fleites C, Macauley MS, He Y, Shen DL, Vocadlo DJ, Davies GJ (2008) Structure of an *O*-GlcNAc transferase homolog provides insight into intracellular glycosylation. *Nat Struct Mol Biol* 15:764–765
- Martinez-Fleites C, He Y, Davies GJ (2010) Structural analyses of enzymes involved in the *O*-GlcNAc modification. *Biochim Biophys Acta* 1800:122–133
- Nicolle C, Manceaux L (1908) Sur une infection à corps de Leshman (ou organismes voisins) du gondi. *CR Acad Sci* 147:763
- Nolte D, Müller U (2002) Human *O*-GlcNAc transferase (OGT): genomic structure, analysis of splice variants, fine mapping in Xq13.1. *Mamm Genome* 13:62–64
- Plessmann U, Reiter-Owona I, Lechtreck KF (2004) Posttranslational modifications of alpha-tubulin of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res* 94:386–389
- Schmidt A, Schwarz RT, Gerold P (1998) *Plasmodium falciparum*: asexual erythrocytic stages synthesize two structurally distinct free and protein-bound glycosylphosphatidylinositols in a maturation-dependent manner. *Exp Parasitol* 88:95–102
- Schneider AG, Mercereau-Pujalon O (2005) A new Apicomplexa-specific protein kinase family: multiple members in *Plasmodium falciparum*, all with an export signature. *BMC Genomics* 6:30
- Shafi R, Iyer SP, Ellies LG, O'Donnell N, Marek KW, Chui D, Hart GW, Marth JD (2000) The *O*-GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:5735–5739
- Shen A, Kamp HD, Gründling A, Higgins DE (2006) A bifunctional *O*-GlcNAc transferase governs flagellar motility through anti-repression. *Genes Dev* 20:283–295
- Snow CM, Senior A, Gerace L (1987) Monoclonal antibodies identify a group of nuclear pore complex glycoproteins. *J Cell Biol* 104:1143–1156
- Striepen B, Zinecker CF, Damm JB, Melgers PA, Gerwig GJ, Koolen M, Vliegthart JF, Dubremetz JF, Schwarz RT (1997) Molecular structure of the “low molecular weight antigen” of *Toxoplasma gondii*: a glucose alpha 1–4 *N*-acetylgalactosamine makes free glycosyl-phosphatidylinositols highly immunogenic. *J Mol Biol* 266:797–813
- Teo CF, Ingale S, Wolfert MA, Elsayed GA, Nöt LG, Chatham JC, Wells L, Boons GJ (2010) Glycopeptide-specific monoclonal antibodies suggest new roles for *O*-GlcNAc. *Nat Chem Biol* 6:338–343
- Ward P, Equinet L, Packer J, Doerig C (2004) Protein kinases of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*: the kinome of a divergent eukaryote. *BMC Genomics* 5:79

- Weiss LM, Fiser A, Angeletti RH, Kim K (2009) *Toxoplasma gondii* proteomics. *Expert Rev Proteomics* 6:303–313
- Wichmann D, Schwarz RT, Ruppert V, Ehrhardt S, Cramer JP, Burchard GD, Maisch B, Debierre-Grockiego F (2007) *Plasmodium falciparum* glycosylphosphatidylinositol induces limited apoptosis in liver and spleen mouse tissue. *Apoptosis* 12:1037–1041
- Wrabl JO, Grishin NV (2001) Homology between *O*-linked GlcNAc transferases and proteins of the glycogen phosphorylase superfamily. *J Mol Biol* 314:365–374
- Xiao H, El Bissati K, Verdier-Pinard P, Burd B, Zhang H, Kim K, Fiser A, Angeletti RH, Weiss LM (2010) Post-translational modifications to *Toxoplasma gondii* alpha- and beta-tubulins include novel C-terminal methylation. *Proteome Res* 9:359–372
- Yang X, Ongusaha PP, Miles PD, Havstad JC, Zhang F, So WV, Kudlow JE, Michell RH, Olefsky JM, Field SJ, Evans RM (2008) Phosphoinositide signalling links *O*-GlcNAc transferase to insulin resistance. *Nature* 451:964–969

## 6.4 Discussion

Bien que d'énormes efforts aient été fournis pour comprendre et contrôler la biologie de *Plasmodium falciparum* et de *Toxoplasma gondii*, bon nombre d'études restent controversées. C'est notamment le cas pour celles portant sur la N- et la O-glycosylations de ces deux parasites. Dans cette étude nous nous sommes plus particulièrement focalisés sur un type de O-Glycosylation, la O-GlcNAcylation.

Après s'être assurés que nos préparations parasitaires étaient dépourvues de toute contamination provenant des cellules hôtes (**article 2, Fig. 1**), notre étude a permis de montrer pour la première fois, et ce de manière directe, l'existence de la O-GlcNAcylation chez *T. gondii* et *P. falciparum* (**article 2, Fig. 2**). Nous rapportons dans cette même étude l'existence d'une OGT propre à *T. gondii* (**article 2, Fig. 3**) ainsi que sa séquence potentielle (**article 2, Fig. 4**). Il avait été préalablement prédit la présence de l'OGT chez *Toxoplasma* et *Dictyostelium* mais elle n'avait pas été retrouvée chez d'autres protistes: Eimeria, Entamoeba, Leishmania, Plasmodium, Spironucleus, Theileria, Trichomonas, et Trypanosoma (233).

La séquence codant l'OGT et exprimée par chez *T. gondii* possède les principaux résidus d'acides aminés essentiels à son activité catalytique dont l'histidine 558 responsable de la déprotonation des résidus hydroxylés en vue de leur O-GlcNAcylation subséquente, les résidus impliqués dans la liaison au donneur de N-acétylglucosamine, l'UDP-GlcNAc ou les résidus basiques du domaine PPO (PIP-binding activity of OGT) (**article 2, Fig. 4**). Cette observation suggère donc que *T. gondii*, exprime sa propre OGT ce qui ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques.

Les mêmes études effectuées pour *Plasmodium falciparum* ne nous ont pas permises de retrouver avec un niveau suffisamment satisfaisant de séquence codant sa propre OGT bien que la présence de O-GlcNAcylation chez cet organisme ne laisse de place à aucun doute. De plus, des analyses *in silico* réalisés par une autre équipe ont récemment suggéré que la protéine AMA1 possède des sites potentiels de O-GlcNAcylation au niveau des résidus Thr517 et Ser498, et que AMA1 O-GlcNAcyliée puisse de ce fait constituer un antigène conformationnel approprié pour l'élaboration d'un vaccin anti-paludique (234).

Nous avons également démontré dans cette étude que la protéine de choc thermique HSP70 exprimée par *T. gondii* est O-GlcNAcylée ou associée à un partenaire O-GlcNAcylé (**article 2, Fig. 2C**). Les protéines de choc thermique sont impliquées en tant que chaperon moléculaire dans le repliement des protéines et dans leur transport transmembranaire (235,236). Il existe plusieurs sous-familles de protéines de choc thermique : celles de basse masse moléculaire (16-35 kDa) appelées également petites protéines de choc thermique (smHsps, *small heat shock proteins*), la sous-famille hsp60, la sous-famille hsp70 (68-78 kDa) et celles de masse moléculaire élevée (89-110 kDa, soit hsp90 et hsp100) (235,236). Au cours de ces dernières années, il est apparu évident que le rôle des protéines de choc thermique ne se limitait pas à des réactions de stress. Par exemple, il a été établi chez certains protozoaires, un lien entre l'expression des protéines de choc thermique et le développement et la survie intracellulaire (235). Le rôle de la O-GlcNAcylation de Hsp70 exprimée chez *T. gondii* reste bien évidemment totalement inconnu.

Au cours de cette étude, nous avons également tenté de prouver l'existence de l'OGA chez *T. gondii* et *P. falciparum* par Western blot et par des analyses *in silico*. Malheureusement, ces deux approches se sont avérées infructueuses, mais ce manque de données est en accord avec les résultats publiés par Banerjee (233) qui n'ont pas, non plus, trouvé d'homologues de l'OGA chez ces parasites.

Bien que l'expression de glycoprotéines ait été prouvée à la fois chez *P. falciparum* (237) et chez *Toxoplasma gondii* (238), et que nous venons de démontrer la présence de la O-GlcNAcylation chez ces mêmes organismes, l'exploration de ces modifications post-traductionnelles n'en est qu'à ces premiers balbutiements. Le chemin semble donc encore très long avant que nous puissions espérer élucider l'implication potentielle de ces glycosylations dans les mécanismes d'infection de la cellule hôte et de développement du parasite. Ces travaux futurs pourraient permettre d'améliorer la pharmacothérapie dans le traitement des pathologies liées à *T. gondii* et *P. falciparum*, et l'identification des protéines O-GlcNAcylées pourraient constituer de nouvelles cibles thérapeutiques.

# Annexe:

The hexosamine biosynthetic pathway and O-GlcNAcylation drive the expression of  $\beta$ -catenin and cell proliferation

Stéphanie Olivier, Céline Guinez, Anne-Marie Mir, **Yobana Perez-Cervera**,  
Chunming Liu, Jean-Claude Michalski, Tony Lefebvre.

**Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** 2012. 302(4):E417-24

## The hexosamine biosynthetic pathway and *O*-GlcNAcylation drive the expression of $\beta$ -catenin and cell proliferation

Stéphanie Olivier-Van Stichelen,<sup>1</sup> Céline Guinez,<sup>1</sup> Anne-Marie Mir,<sup>1</sup> Yobana Perez-Cervera,<sup>1</sup> Chunming Liu,<sup>2</sup> Jean-Claude Michalski,<sup>1</sup> and Tony Lefebvre<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CNRS-UMR 8576, Unit of Structural and Functional Glycobiology, University of Lille 1, Villeneuve d'Ascq, France; and

<sup>2</sup>Department of Molecular and Cellular Biochemistry, Markey Cancer Center, University of Kentucky, Lexington, Kentucky

Submitted 29 July 2011; accepted in final form 21 November 2011

**Olivier-Van Stichelen S, Guinez C, Mir AM, Perez-Cervera Y, Liu C, Michalski JC, Lefebvre T.** The hexosamine biosynthetic pathway and *O*-GlcNAcylation drive the expression of  $\beta$ -catenin and cell proliferation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302: E417–E424, 2012. First published November 22, 2011; doi:10.1152/ajpendo.00390.2011.—The short half-life protooncogene  $\beta$ -catenin acquires a remarkable stability in a large subset of cancers, mainly from mutations affecting its proteasomal degradation. In this sense, colorectal cancers (CRC) form a group of pathologies in which early steps of development are characterized by an aberrant expression of  $\beta$ -catenin and an uncontrolled proliferation of epithelial cells. Diet has long been described as an influence in the emergence of CRC, but the molecular events that link metabolic disorders and CRC remain elusive. Part of the explanation may reside in hexosamine biosynthetic pathway (HBP) flux. We found that fasted mice being force-fed with glucose or glucosamine leads to an increase of  $\beta$ -catenin and *O*-GlcNAcylation levels in the colon. MCF7 cells possessing intact Wnt/ $\beta$ -catenin signaling heavily expressed  $\beta$ -catenin when cultured in high glucose; this was reversed by the HBP inhibitor azaserine. HBP inhibition also decreased the expression of  $\beta$ -catenin in HT29 and, to a lesser extent, HCT116 cells. The same observation was made with regard to the transcriptional activity of  $\beta$ -catenin in HEK293 cells. Inhibition of HBP also blocked the glucose-mediated proliferation capacity of MCF7 cells, demonstrating that glucose affects both  $\beta$ -catenin expression and cell proliferation through the HBP. The ultimate element conducting these events is the dynamic posttranslational modification *O*-GlcNAcylation, which is intimately linked to HBP; the modulation of its level affected the expression of  $\beta$ -catenin and cell proliferation. In accordance with our findings, we propose that metabolic disorders correlate to CRC via an upregulation of HBP that reverberates on high *O*-GlcNAcylation levels including modification of  $\beta$ -catenin.

glucose; hexosamine biosynthetic pathway; glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase; protooncogene; diet; colorectal cancers

THE WNT/ $\beta$ -CATENIN PATHWAY is fundamental during embryogenesis and for the renewal of the intestinal crypt epithelium (25). During these processes, the main component of this pathway, the protooncogene  $\beta$ -catenin controls cell proliferation by initiating the transcription of its target genes, including cyclin D1 and c-Myc (15, 29). This process is shut down by targeting  $\beta$ -catenin to the 26S proteasome. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling is also crucial for cardiac and neuronal development and plays an important part in many disorders affecting these tissues such as cardiac hypertrophy and neurodegenerative diseases. Misregulations in this system are also often observed in hepatoblastoma, hepatocellular carcinoma, and ovarian or pancreatic

cancers, but these dysfunctions were more accurately described in colorectal cancers (CRC). Eighty percent of CRC result from genetic alterations of the crucial member of the  $\beta$ -catenin destruction complex adenomatous polyposis coli (APC), preventing the proteasomal degradation of  $\beta$ -catenin (33) that acquires an aberrant stability. This leads to uncontrolled cell proliferation (27). Remarkably, over time, diet appears to be a key factor involved in CRC emergence. Some nutrients like carbohydrates are known to play a critical role in this process, since high-carbohydrate consumption greatly increases the probability of setting up CRC (10, 16). Moreover, some observations have drawn a correlation between CRC and diet; thus, CRC are also considered obesity-associated diseases. Since the 1990s, it has been clearly demonstrated that patients suffering from CRC show intolerance to glucose and resistance to insulin, reflecting a metabolic disorder (24, 31). Type 2 diabetes individuals also have a higher risk of developing CRC than normal individuals (17).

Despite these observations, the molecular mechanism linking a metabolic disorder or overfeeding to CRC remains unknown. To tentatively answer this question, we started with the observation that metabolic syndrome and diet lead to a common event, a punctual or permanent hyperglycemia. On the basis of their dependence on nutritional status, we questioned whether the hexosamine biosynthetic pathway (HBP) and the posttranslational modification (PTM) *O*-GlcNAcylation could contribute to the emergence of CRC (13). Two decades ago, it was determined that the development of insulin resistance requires three key components: glucose, insulin, and glutamine, and that a small percentage (2–3%) of glucose is used to provide UDP-GlcNAc (*N*-acetylglucosamine), the final product of the HBP (21). Other nutrients are also implicated in the makeup of this nucleotide sugar: ketogenic amino acids, glutamine, fatty acids, and sugars (hexoses). UDP-GlcNAc is the donor of the GlcNAc group for glycosylation processes, including *O*-GlcNAcylation. Accordingly, both UDP-GlcNAc and *O*-GlcNAcylation are considered nutritional sensors. Thanks to its privileged position among thousands of PTMs, *O*-GlcNAcylation reflects the cell's nutritional status to the regulation of fundamental biological processes: transcription, translation, cell signaling, intracellular trafficking, cell cycle, and development (35). Thereby, an imbalance in the use of nutrients will have a repercussion in the homeostasis of the tissues, and consequently, pathologies such as cancers may arise. Numerous factors involved in the cancerization processes or cell cycle regulation are *O*-GlcNAcylation: the protooncogenes c-Myc, (7) and  $\beta$ -catenin (19, 26, 37), the tumor suppressor p53 (32), and components of the MAPK or PI3K pathways (8, 34). Last, the modification of *O*-GlcNAcylation

Address for reprint requests and other correspondence: T. Lefebvre, CNRS-UMR 8576, Unit of Structural and Functional Glycobiology, IFR147, Univ. of Lille 1, 59655 Villeneuve d'Ascq, France (e-mail: tony.lefebvre@univ-lille1.fr).



levels in malignancy and tumoral progression has been identified as crucial to the development of breast, lung, liver, and colon cancers (11, 22, 36). In this study, using refed or glucose/glucosamine force-fed mice, we made the correlation between an increase in  $\beta$ -catenin content and *O*-GlcNAcylation in the colon. We also report a similar observation in vitro by culturing MCF7 cells in a high-glucose medium.

In contrast to glucosamine, azaserine, the inhibitor of the rate-limiting enzyme of the HBP, affects glucose-induced  $\beta$ -catenin expression, its transcriptional activity, and cell proliferation in a dose-dependent manner. Elevation of the *O*-GlcNAcylation content, using the OGA inhibitor NButGT, increases the level of  $\beta$ -catenin and slows down the cell proliferation. The expression of  $\beta$ -catenin was diminished in the colorectal cancer cell line HT29 and slightly in HCT116 by azaserine and another HBP inhibitor, DON (5-oxo-6-diazo-norleucine). Moreover, we observed higher levels of  $\beta$ -catenin, OGT, OGA, and *O*-GlcNAcylation in these cells compared with a fetal colon line. Taken together, our observations and results led us to propose that diet and metabolic disorders are predisposition factors for cancers, particularly CRC, by promoting an elevation of  $\beta$ -catenin level and a stimulation of cell proliferation through the HBP.

## MATERIALS AND METHODS

**Cell culture and transfection.** MCF7, HEK293, HT29, and HCT116 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing various concentrations of glucose (0, 1, or 4.5 g/l) for MCF7 and HEK293. CCD841CoN cells were maintained in Eagle's minimum essential medium (EMEM). All cell lines were maintained in a medium supplemented with 10% (vol/vol) fetal calf serum (heat inactivated for the HT29 and the HCT116 cells), 2 mM L-glutamine, 5 IU/ml penicillin, and 50  $\mu$ g/l streptomycin at 37°C in a 5% (vol/vol) CO<sub>2</sub>-enriched humidified atmosphere.

For a TOP/FOP Flash reporter assay, HEK293 cells were transfected with  $\beta$ -galactosidase, TOP-Flash, FOP Flash, and  $\beta$ -catenin-2 $\times$  Flag vector by the Lipofectamine 2000 (Invitrogen) reagent (2  $\mu$ l) in six-well plates with 0.2  $\mu$ g of DNA for 24 h.

shRNA plasmids (29-mer) were purchased from CliniSciences and were used according to the manufacturer's indications.

**Drugs.** Glucosamine (GlcNH<sub>2</sub>) was used at a final concentration of 20 mM; NButGT (1,2-dideoxy-2'-propyl- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-[2,1-D]- $\Delta$ -2'-thiazoline) at 100  $\mu$ M; azaserine [*O*-(2-diazoacetyl)-L-serine] at 50  $\mu$ M or at the indicated concentration (see text for details); and DON at 10 or 50  $\mu$ M. Cells were treated for 16 h with the different drugs except as specified in the text.

**Lysis and immunoprecipitation.** Cells were first washed with 10 ml of cold phosphate-buffered saline (PBS) and lysed on ice with lysis buffer [10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100 (vol/vol), 0.5% sodium deoxycholate (wt/vol), 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS; wt/vol), and proteases inhibitors, pH 7.4]. Cell extracts were then centrifuged at 20,000 g for 10 min at 4°C. Supernatants were first precleared with Sepharose-labeled protein A for 1 h. After the beads were discarded, the supernatants were incubated together with the rabbit polyclonal anti- $\beta$ -catenin (H102, Santa Cruz Biotechnology) at a final dilution of 1:500 and placed overnight at 4°C. Antibody-bound proteins were recovered after adding 30  $\mu$ l of Sepharose-labeled protein A for 1 h at 4°C. Beads were gently centrifuged for 1 min and subsequently washed with the following buffers: lysis buffer, lysis buffer supplemented with 500 mM NaCl, lysis buffer-TNE [10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, and 1 mM EDTA, pH 7.4 (vol/vol)] and finally with TNE alone.

**SDS-PAGE, western blotting, and antibody staining.** Equal amounts of extracted protein were subjected to Western blotting.

Samples were analyzed by 8, 10, or 15% reticulated SDS-PAGE under reducing conditions, and proteins were electroblotted on a nitrocellulose sheet (GE Healthcare). Efficiency of the transfer and equal loading were verified using Ponceau red staining. Membranes were first saturated for 45 min with 5% (*m/v*) nonfatty acid milk in Tris-buffered saline (TBS)-Tween buffer [15 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, and 0.05% Tween 20 (vol/vol), pH 8.0]. Mouse monoclonal anti-*O*-GlcNAc (RL2, Ozyme) was used at a dilution of 1:1,000. Rabbit polyclonal anti- $\beta$ -catenin H102 (Santa Cruz Biotechnology), and chicken anti-OGA (345, generously provided by Prof. G. W. Hart) were used at a dilution of 1:2,000. Mouse monoclonal anti-tubulin (Santa Cruz Biotechnology), rabbit polyclonal anti-histone 2B (Millipore), and rabbit polyclonal anti-GAPDH (Abcam) were used at a dilution of 1:5,000.

Membranes were incubated with the different antibodies overnight at 4°C and then washed three times with TBS-Tween for 10 min and incubated with either an anti-rabbit or an anti-mouse horseradish peroxidase-labeled secondary antibody at a dilution of 1:10,000 for 1 h. Finally, three 10-min washes were performed with TBS-Tween, and detection was carried out with enhanced chemiluminescence (GE Healthcare). Densitometry analyses of the Western blots were done with GeneTools software (version 3.07.03, Syngene).

**Fractionation.** Fractionation was realized with a Proteoextract subcellular proteome extraction kit (MERCK) as recommended by the manufacturer.

**Luminescence assay.** After transient transfection of Super8 $\times$ TOPFlash(M50) or Super8 $\times$ FOPFlash(M51) with  $\beta$ -galactosidase (determination of transfection efficiencies) and  $\beta$ -catenin2 $\times$ Flag vectors in six-well plates, HEK293 cells were lysed using 200  $\mu$ l of passive lysis buffer (Promega). Luciferase reporter activity was measured in triplicate in a 96-well plate following back-addition of 100  $\mu$ l of Luciferase assay buffer (Promega). In parallel, 70  $\mu$ l of Galacton Substrate Mix (1:200 Tropix Galacton; 99:200 Tropix Galacto reaction buffer diluent, 100:200 18 M $\Omega$  water; Applied Biosystems) was incubated for 20 min out of light, and 100  $\mu$ l of Tropix Accelerator-II (Applied Biosystems) was back-added before  $\beta$ -galactosidase activity was measured.

**Proliferation assay.** MCF7 cells ( $2 \times 10^3$ ) were cultured in 96-well plates using DMEM over 5 days. Each day, cell growth was determined using the MTS reagent method (Promega) according to the manufacturer's directions.

**In vivo assay.** Eight- to twelve-wk-old male C57BL6/CR mice were purchased from the provider Charles River Elevage (Saint-Germain sur l'Arbresle, France). Procedures were carried out according to French guidelines and as described (12) for the care of experimental animals. Mice were adapted to the environment for 1 wk prior to study and maintained in a 12:12-h light-dark cycle with water and regular diet (65% carbohydrate, 11% fat, and 24% protein). For the experiment, mice were fasted for 24 h or refed a regular diet for 18 h (glucose was added to the drinking water at a concentration of 200 g/l after the fasted period). For gavage experiments, 24-h-fasted mice received glucosamine (2.5 g/kg) or glucose (5 g/kg) orally and were killed 3 or 6 h later after intraperitoneal anesthesia (pentobarbital sodium). Colons were then collected, washed in PBS, and lysed in 2 ml of NP-40 lysis buffer {10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% (vol/vol) NP-40, 0.084% (wt/vol) sodium fluoride, 0.44% (wt/vol) sodium pyrophosphate, 0.018% (wt/vol) sodium orthovanadate, 1  $\mu$ M PUGNAc [*O*-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene) amino-N-phenylcarbamate] and proteases inhibitors, pH 7.4}. Tissues were broken using Ultraturax, incubated with gentle agitation for 2 h, and centrifuged at 20,000 g for 30 min at 4°C to take over the soluble fraction. Glycemia was measured using an Accu-Chek Performa apparatus (Roche).

## RESULTS

*Glucose or glucosamine force-feeding modulates  $\beta$ -catenin expression and O-GlcNAcylation level in vivo.* To gain insight into the underlying mechanism of how feeding reverberates on the expression of  $\beta$ -catenin, C57BL6 mice were fasted for 24 h and then refed a regular diet for 18 h or force-fed with glucose or glucosamine for 3 or 6 h. The mice's blood glucose concentrations were measured (Fig. 1A), and then colons were collected, homogenized, and analyzed by Western blotting (Fig. 1B). In refed and especially in force-fed mice, we observed increased  $\beta$ -catenin expression and elevation of the O-GlcNAcylation contents. Interestingly, it must be noted that the use of glucosamine impacted the  $\beta$ -catenin and the O-GlcNAcylation levels (Fig. 1B) without affecting mice glycemia (Fig. 1A).

We next questioned whether the expression and activity of  $\beta$ -catenin depended on the nutritional status and, more particularly, glucose concentration. To check this hypothesis, in vitro experiments were performed in MCF7 cells, which express a high amount of  $\beta$ -catenin without exhibiting any mutation in the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. The expression of  $\beta$ -catenin was determined according to the cell glucose status in vitro. MCF7 cells were grown in media containing increasing amounts of glucose for 24 h, and the expression of  $\beta$ -catenin was deter-

mined (Fig. 1C).  $\beta$ -Catenin and O-GlcNAcylation levels were maximal when glucose was used at 25 mM vs. 0 and 5 mM (Fig. 1C), correlating with the observation made in vivo (Fig. 1B). Interestingly, but not surprisingly, we noted that the proliferation rate of cells (MTS assays for 96 h) was accelerated according to the glucose status (Fig. 1D). These data indicate that the expression of  $\beta$ -catenin correlates with the status of glucose both in vivo and in vitro.

*Expression of  $\beta$ -catenin and its transcriptional activity are dependent on HBP flux.* After entering the cell, glucose follows different metabolic pathways: glycogen synthesis, pentoses shunt, glycolysis, or the HBP, which provides UDP-GlcNAc, the substrate for the O-GlcNAcylation processes (Fig. 2A). Owing to the quicker expression of  $\beta$ -catenin after administration of glucose and glucosamine to fasted mice, we thought that glucose/glucosamine influenced the expression of the protooncogene by being harnessed through the HBP. This pathway was explored using azaserine, an inhibitor of its rate-limiting enzyme GFAT (glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase) (Fig. 2A). MCF7 cells were maintained in a culture medium containing three different concentrations of glucose with or without azaserine. We observed an increase of  $\beta$ -catenin expression (Fig. 2B) and transcriptional activity (TOP/FOP-Flash assays; Fig. 2C) following high-glucose

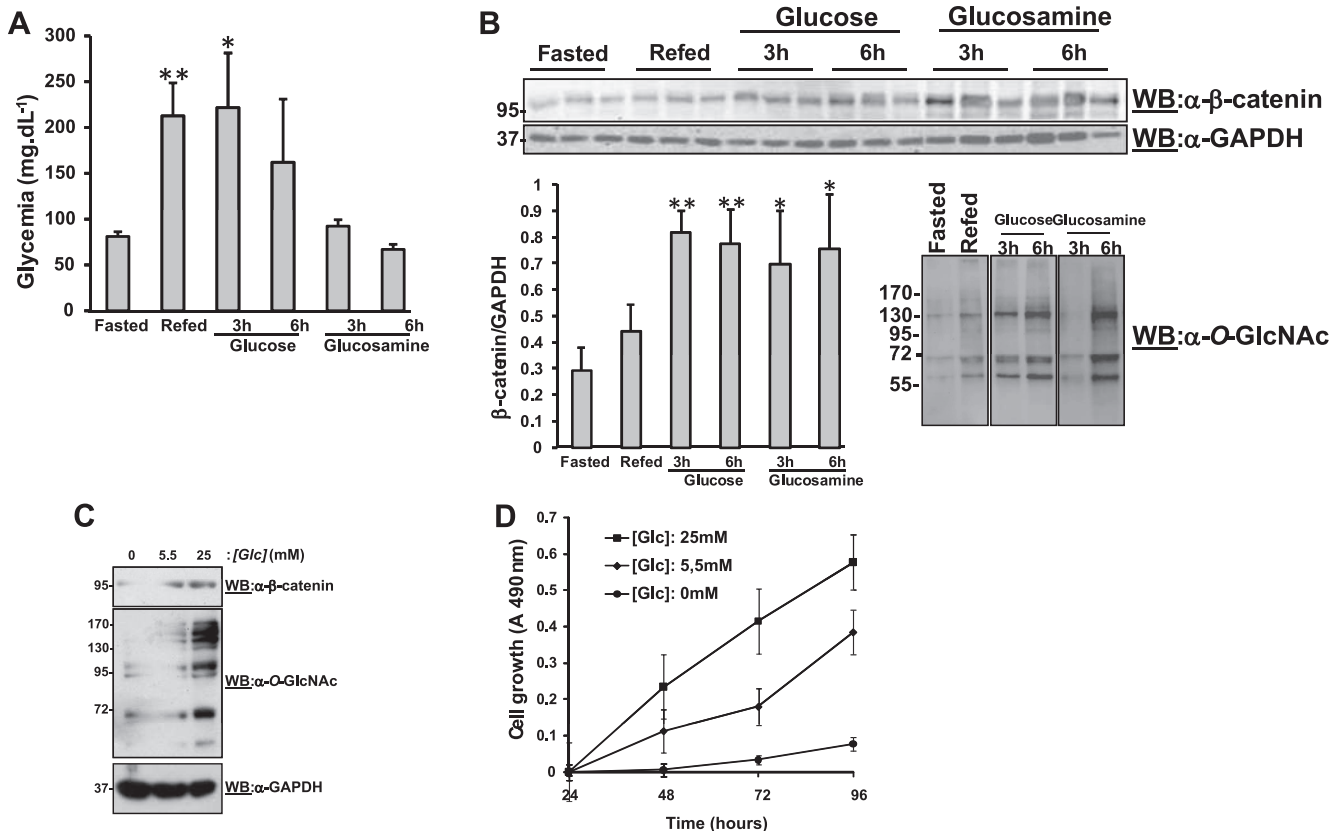


Fig. 1.  $\beta$ -Catenin and O-GlcNAcylation levels are elevated in refed and force-fed mice compared with fasted mice. C57BL6 mice were fasted for 24 h and refed a regular diet for 18 h or force-fed with glucose or glucosamine for 3 or 6 h. A: glycemia of each mice used in this study was measured, and values were represented as a histogram. B: colon homogenates were analyzed by immunoblot according to their  $\beta$ -catenin, GAPDH, and O-GlcNAcylation contents. The ratios of  $\beta$ -catenin/GAPDH expressions for the different conditions are represented as a histogram. C: MCF7 cells were cultured with 0, 5.5, or 25 mM glucose for 24 h, and expression of  $\beta$ -catenin and level of O-GlcNAcylation were determined by Western blot. D: proliferation rate of cells was determined for each glucose concentration condition by using the MTS method at 490 nm ( $n = 6$ ). WB, Western Blot. Molecular mass markers are indicated at the left (in kDa). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .



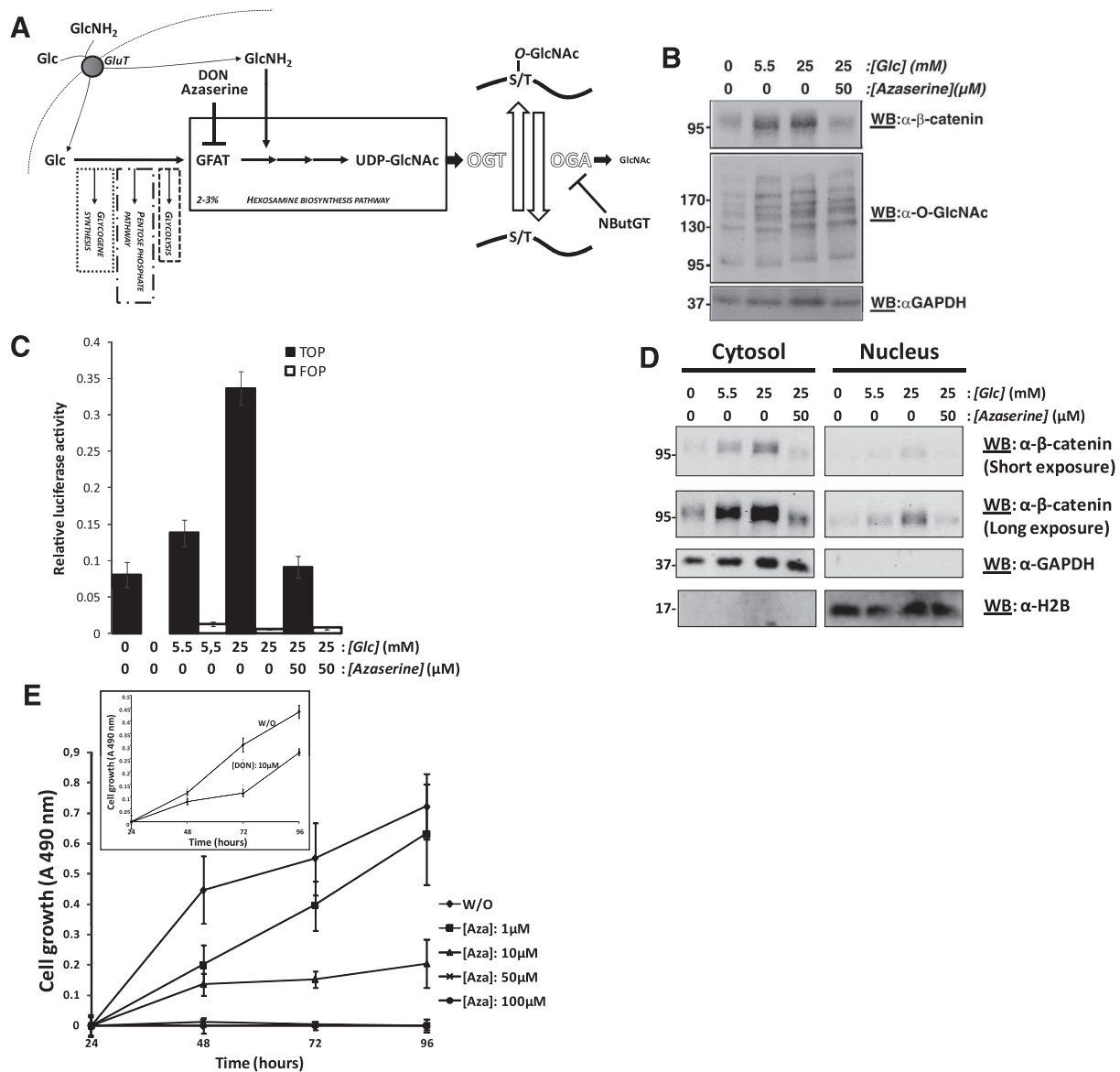


Fig. 2.  $\beta$ -Catenin expression, transcriptional activity, and cell proliferation are controlled by the hexosamine biosynthesis pathway (HBP). *A*: The cell circumvents 2–3% of the glucose toward the HBP for providing for UDP-GlcNAc, the substrate of many *N*-acetylglucosaminyltransferases including the *O*-GlcNAc transferase (OGT) responsible for *O*-GlcNAcylation processes. Hydrolysis of the GlcNAc moiety is catalyzed by *O*-GlcNAcase (OGA). The HBP is blocked by azaserine or DON (5-oxo-6-diazo-norleucine), two inhibitors of the rate-limiting enzyme GFAT (glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase), and activated by glucosamine, which shortcuts this enzyme. NButGT specifically inhibits the OGA. *B*: MCF7 cells were cultured in the absence of glucose, with 5.5 mM or 25 mM glucose with or without azaserine (for 18 h). Cell homogenates were immunoblotted with anti- $\beta$ -catenin or anti-*O*-GlcNAc antibodies. Equal loading was assessed using GAPDH staining. *C*: HEK293 cells were transfected with TOP or FOP flash reporter plasmid and then incubated for 24 h in DMEM using variant conditions of glucose concentrations (0, 5.5, or 25 mM). Azaserine (Aza) was added 18 h before measurement of luciferase activity. This experiment is representative of 3 independent observations. *D*: subcellular fractionation was performed with MCF7 cells maintained in 0, 5.5, or 25 mM glucose with or without azaserine. Antibodies specifically directed against GAPDH (cytosol) and H2B (nucleus) were used to ensure the purity of each fraction. *E*: MCF7 cells were grown in DMEM supplemented with 25 mM glucose and with increasing concentrations of azaserine for 4 days. The proliferation rate of the cells was determined for each day using the MTS method at 490 nm ( $n = 6$ ). The same experiment was done with 10  $\mu$ M DON ( $n = 6$ ) (inset). Molecular mass markers are indicated at the left (in kDa).

treatment, and, as expected, azaserine reversed the glucose effect at both the expression and the activity levels of  $\beta$ -catenin. This result demonstrates that the glucose-mediated  $\beta$ -catenin expression is conducted by the HBP. Since the functions of  $\beta$ -catenin depend on its subcellular localization, subcellular fractionation was performed on MCF7 cells following azaserine treatment (Fig. 2*D*). The

glucose concentration upregulated the expression of the protooncogene in the cytosol and the nucleus (the same results were obtained by culturing cells with glucosamine or the OGA inhibitor PUGNAc; data not shown) without affecting the distribution, and azaserine reversed this enhancement in the two fractions. From this set of experiments, it can be deduced that the HBP flux increases the expression

and activity of  $\beta$ -catenin without modifying its subcellular distribution. It has been extensively reported that stabilization of  $\beta$ -catenin affects cell proliferation via transcription of its target genes (15, 29). Finally, after we observed that cell proliferation was dependent on the concentration of glucose (Fig. 1D), we tested increasing concentrations of azaserine on the proliferation capacities of MCF7 cells (Fig. 2E). These experiments show that the proliferation rate of the cells is blocked by the use of azaserine in a dose-dependent manner. DON was also used in proliferation rate assays and showed that, similar to azaserine, it reduced cell proliferation (Fig. 2E, inset). Through these findings, we demonstrated that glucose enhances the expression of  $\beta$ -catenin and its transcriptional capability through the HBP without modifying its subcellular distribution. We also demonstrated that MCF7 cell proliferation is controlled by the HBP flux.

*HBP enhances  $\beta$ -catenin expression and accelerates cell proliferation by elevating O-GlcNAcylation levels.* As depicted in Fig. 2A, UDP-GlcNAc is the main end product of the HBP. This nucleotide sugar is the donor of the GlcNAc group for all glycosylation processes, including the O-GlcNAcylation. It was demonstrated that plakoglobin, which follows a process of degradation similar to that of  $\beta$ -catenin, is protected by O-GlcNAcylation (14). Therefore, we suggested that the fate of  $\beta$ -catenin was linked to the same PTM. To check this hypothesis, MCF7 cells were incubated with increasing amounts of glucose and then incubated with NButGT, a specific inhibitor of OGA, azaserine, or glucosamine that short-cuts the HBP by bypassing GFAT (Fig. 2A). Interestingly, both NButGT and glucosamine elevated the expression of  $\beta$ -catenin (Fig. 3A). As we observed with glucose (Fig. 1D) and azaserine and DON (Fig. 2E), we tested the effect of NButGT on the proliferation rate of MCF7 cells (Fig. 3B). As expected, and contrary to

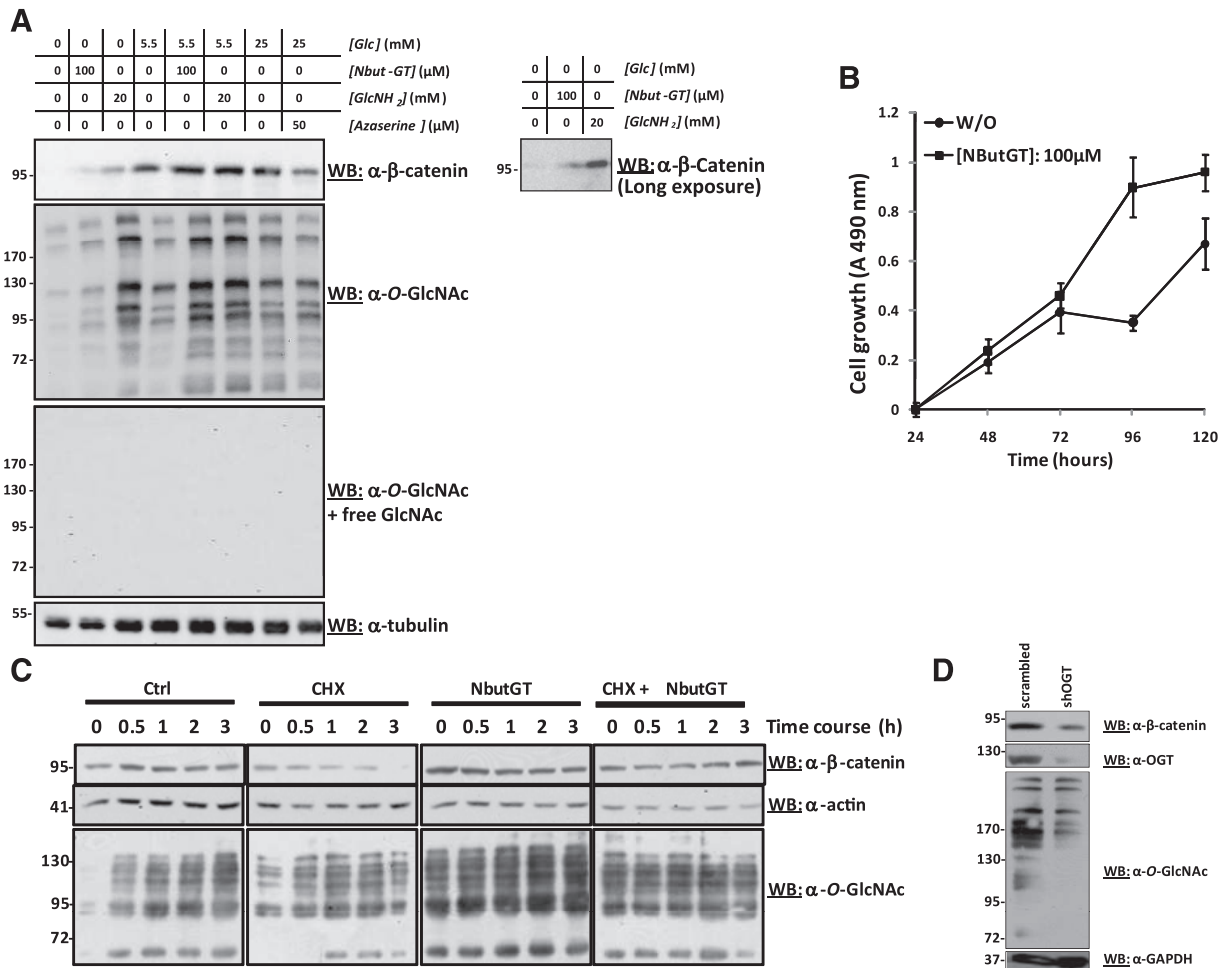


Fig. 3. Expression of  $\beta$ -catenin and proliferation rate of MCF7 cells are dependent on O-GlcNAcylation status. *A*: MCF7 cells were cultured in DMEM using various concentrations of glucose. The OGA inhibitor NButGT, the HBP activator glucosamine, and the GFAT inhibitor were tested at the indicated concentration for 18 h. Cell homogenates were immunoblotted with anti- $\beta$ -catenin, anti-O-GlcNAc (with and without free *N*-acetylglucosamine), and anti-tubulin antibodies. *B*: MCF7 cells were grown in DMEM supplemented with 25 mM glucose with or without NButGT for 5 days. The proliferation rate of the cells was determined for each day by using the MTS method at 490 nm ( $n = 6$ ). *C*: MCF7 cells were incubated with the protein synthesis inhibitor cycloheximide (CHX), NButGT, or both for indicated time periods. Expression of  $\beta$ -catenin and actin were analyzed by Western blot. Efficiency of NButGT was confirmed using an anti-O-GlcNAc antibody. *D*: MCF7 cells were transfected with a shRNA plasmid for 24 h to specifically decrease expression of OGT. A scrambled construction was used as a negative control. Expressions of OGT, O-GlcNAcylation,  $\beta$ -catenin, and GAPDH were thus determined by Western blot. W/O, without NButGT (vehicle). Molecular mass markers are indicated at the left (in kDa).

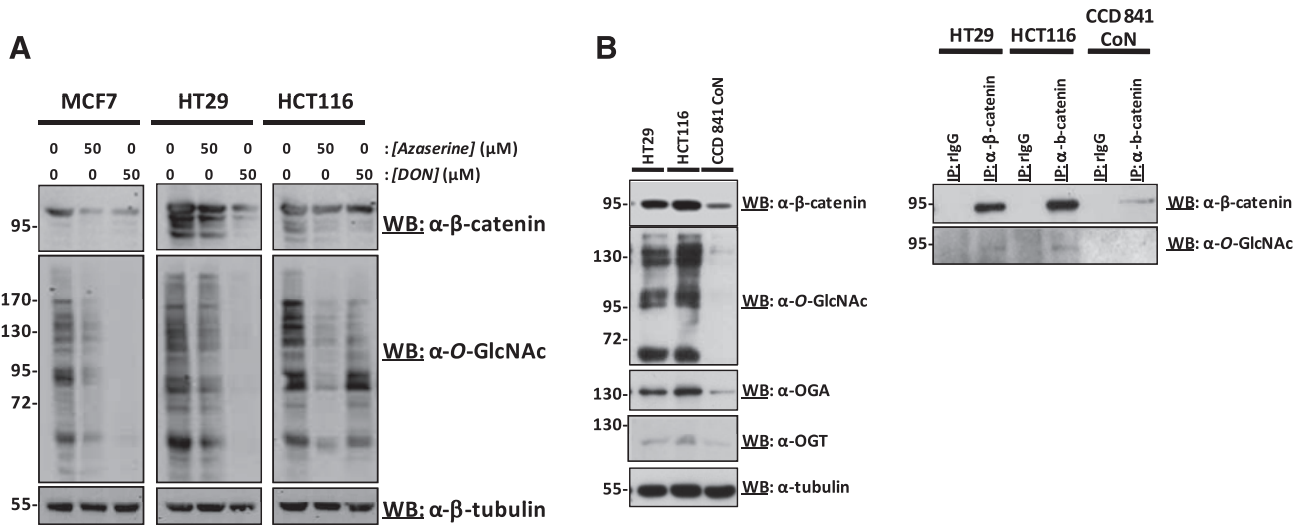


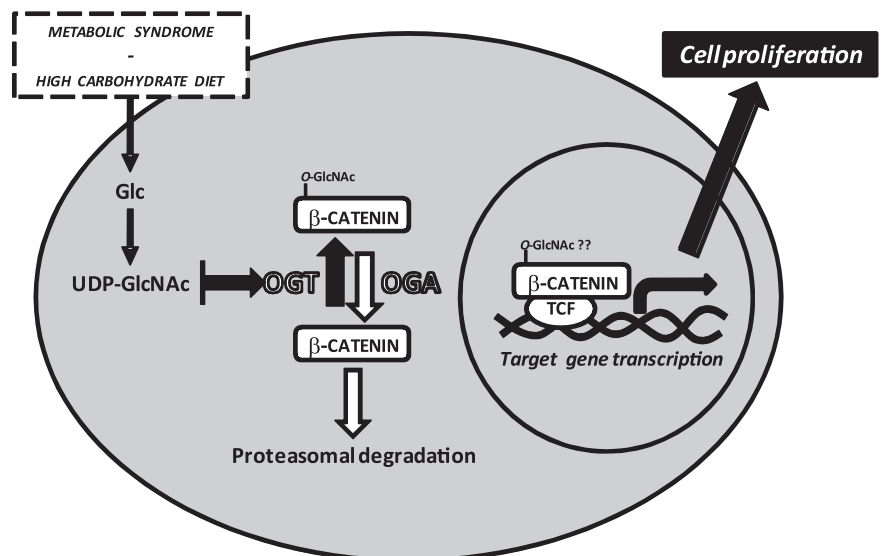
Fig. 4.  $\beta$ -Catenin, *O*-GlcNAc cycling enzymes, and *O*-GlcNAcylation levels are elevated in colorectal cancer cell lines. *A*: efficiency of HBP inhibitors azaserine and DON was determined in HT29 and HCT116 compared with MCF7 cells. *B*: HT29, HCT116, and CCD841CoN cells were analyzed according to their  $\beta$ -catenin, *O*-GlcNAcylation, OGA, and OGT contents by immunoblot (left). The *O*-GlcNAcylation status of each cell line's  $\beta$ -catenin was checked by analysis of protooncogene immunoprecipitates with anti-*O*-GlcNAc antibody (right). Controls of immunoprecipitation (IP) were performed using nonrelevant rabbit IgG antibodies. Molecular mass markers are indicated at the left (in kDa).

azaserine and DON, the OGA inhibitor accelerated the proliferation of the cells. In another set of experiments, MCF7 cells were incubated with cycloheximide (CHX) with or without NButGT. The  $\beta$ -catenin content was then assessed for increasing time periods (Fig. 3C). We observed that the inhibition of OGA compensates for the effect of CHX on the expression of  $\beta$ -catenin. These results demonstrated that *O*-GlcNAcylation prevents the degradation of  $\beta$ -catenin. Last, we used a shRNA strategy to knock down the OGT (Fig. 3D). We observed that the downexpression of the glycosyltransferase also downregulated the level of  $\beta$ -catenin.

*$\beta$ -catenin and O-GlcNAcylation levels are elevated in colorectal cancer cell lines compared with normal cells.* Azaserine and DON were both used in MCF7 as well as HT29 (adenocarcinoma) and HCT116 (carcinoma), two colon cancer cell lines expressing high amounts of  $\beta$ -catenin (Fig. 4A)

(33). The two inhibitors were efficient in MCF7 and HT29 and to a lesser extent in HCT116 cells. These differences may be explained by the fact that HCT116 cells express a  $\beta$ -catenin mutated in the D-box ( $\Delta$ S45) that dramatically decreases its phosphorylation and impedes its correct targeting to the proteasome. The last point of the study compared the expression of  $\beta$ -catenin, the *O*-GlcNAc cycling enzymes, and the level of *O*-GlcNAcylation in HT29 and HCT116 cells with a normal colon cell line, CCD841CoN (21 wk gestation fetus) (Fig. 4B).  $\beta$ -Catenin, OGT, OGA, and the PTM are heavily expressed in the cancer cell lines. To measure the level of *O*-GlcNAcylation of the  $\beta$ -catenin in the three cell lines, the protooncogene was immunoprecipitated and analyzed according to its *O*-GlcNAcylation content (Fig. 4B). Interestingly, we showed a direct correlation between the modification and the expression of

Fig. 5. Hypothetical mechanism by which diet and uncontrolled cell proliferation are linked. An excess of nutrients including carbohydrates elevates the production of UDP-GlcNAc, the end product of the HBP and substrate of OGT. Among the plethora of targets of OGT,  $\beta$ -catenin acquires an aberrant stability (it escapes proteasomal degradation) and therefore increased transcriptional activity, the cell gains an uncontrolled proliferation that may lead to cancer.



$\beta$ -catenin. This last observation strengthens our hypothesis, according to which *O*-GlcNAcylation level  $\beta$ -catenin expression and emergence of cancer could be linked.

## DISCUSSION

$\beta$ -Catenin mutations are found in a plethora of human tumors: desmoid, endometrial, gastric, hepatic, ovarian, pancreatic, and colorectal. A defect in Wnt signaling is found in various human diseases, including osteoarthritis, Dupuytren's disease, polycystic kidney disease, and cardiovascular and neurodegenerative diseases. During their lifetimes, nearly 5% of individuals will develop a CRC, which, among the 200 forms of cancer, ranks first in terms of morbidity and mortality. The progression of CRC is a long process that is strictly organized spatially and temporally according to Vogelstein's sequence (9). During the succession of events, crucial components, such as oncogenes and tumor suppressors belonging to diverse signaling pathways, accumulate mutations (18). In 90% of CRC cases, mutations occur in the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway, constituting early steps in the cancerization process of the colic and rectal mucosa (18, 27). In this way, inactivating mutations of the tumor suppressor APC are found in 85% of the sporadic forms of CRC, whereas 10% of these cancers possess activating mutations in  $\beta$ -catenin itself (23). Beyond the hereditary character of CRC and of the first importance played by environmental factors, it appears that the sedentary, overfed Western lifestyle enhances the risk of CRC emergence (2, 3, 5). Indeed, over time, the metabolic syndrome has been described as promoting CRC (6, 10, 17, 24). It has been established that an imbalance in food uptake and energy expenditure is associated with the development of CRC; this problem is more remarkable for obese and type 2 diabetes individuals (4–6). It is also noticeable that nutrients like carbohydrates are more influential for the progression of cancer (10, 16), but what links carbohydrate excess to CRC remains to be deciphered, even though the setting up of insulin resistance may be part of the explanation (24). Accordingly, nutritional metabolic troubles could have repercussions on the deregulation of the HBP and thus *O*-GlcNAcylation processes (Fig. 5), resulting in cell signaling failures, with Wnt signaling being directly affected in CRC.

Understanding and apprehending the underlying mechanisms causing CRC in response to a metabolic disorder should help reduce the progression of this serious health issue.  $\beta$ -Catenin and its associated signaling pathway are early actors in the development of CRC. The functions of  $\beta$ -catenin are intimately linked to its short half-life, its synthesis, and its degradation being rigorously controlled (33). Unfortunately, exposed mutations in the machinery regulating its expression can cause dramatic effects (18, 25, 27).  $\beta$ -Catenin is modified by numerous PTMs (30), including phosphorylation and ubiquitination (20), that control targeting of the oncoprotein to the 26S proteasome, and *O*-GlcNAcylation, whose function has been poorly studied (19, 26, 37). Owing to the homology between  $\beta$ -catenin and plakoglobin (14), and according to our observations, we propose that  $\beta$ -catenin acquires an aberrant stability, i.e., an enhanced half-life, after it is modified by the OGT (Fig. 5). This lifestyle-dependent stabilization may precede or aggravate the subsequent mutations affecting the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. Since a part of glucose participates in the

production of UDP-GlcNAc, the substrate of OGT, we suggest that diet and CRC are linked through the HBP. Stabilization of  $\beta$ -catenin by activation or mutation of the Wnt pathway promotes the acceleration or loss of control of cell proliferation. The second case may lead to CRC. Previous studies already pointed out the crucial role of glucose in the expression of  $\beta$ -catenin (1, 28) and are in perfect agreement with our findings. Those authors showed that, in macrophages, glucose increases the expression of  $\beta$ -catenin in an HBP-dependent manner. Here, we found that, in addition to upregulating Wnt signaling by autocrine activation as demonstrated by Anagnostou and Sheperd (1), the HBP also stabilizes  $\beta$ -catenin by favoring its *O*-GlcNAcylation; these two consequences may be exerting a synergistic effect. We therefore propose that an elevated flux through the HBP, and accordingly an elevated *O*-GlcNAcylation status, constitutes a new process in the cancerization of the colic and rectal mucosa and explain why metabolic disorders and overfeeding enhance the risk of CRC.

## ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to Dr. David Vocadlo (Simon Fraser University, BC, Canada), who provided us NButGT, and to Dr. Randall T. Moon (University of Washington, Seattle, WA), who provided us the TOP/FOP flash system. We are also grateful to Heather N. Russell-Simmons (Markey Cancer Center, University of Kentucky, Lexington, KY) for proofreading the manuscript.

## GRANTS

This work was financially supported by the Ligue Contre le Cancer/Comité du Nord, the University of Lille 1, and the Centre National de la Recherche Scientifique. S. Olivier is a recipient of a fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

## DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the author(s).

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Author contributions: S.O., C.G., and T.L. conception and design of research; S.O., C.G., A.-M.M., Y.P.-C., and C.L. performed experiments; S.O., C.G., C.L., J.-C.M., and T.L. analyzed data; S.O., C.G., C.L., J.-C.M., and T.L. interpreted results of experiments; S.O. and T.L. prepared figures; S.O. and T.L. drafted manuscript; S.O., C.G., A.-M.M., Y.P.-C., C.L., J.-C.M., and T.L. approved final version of manuscript; T.L. edited and revised manuscript.

## REFERENCES

1. Anagnostou SH, Sheperd PR. Glucose induces an autocrine activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in macrophage cell lines. *Biochem J* 416: 211–218, 2008.
2. Ahmed FE. Effect of diet, life style, and other environmental/chemopreventive factors on colorectal cancer development, and assessment of the risks. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 22: 91–147, 2004.
3. Baade PD, Meng X, Youl PH, Aitken JF, Dunn J, Chambers SK. The impact of body mass index and physical activity on mortality among patients with colorectal cancer in Queensland, Australia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 20: 1410–1420, 2011.
4. Berster JM, Göke B. Type 2 diabetes mellitus as risk factor for colorectal cancer. *Arch Physiol Biochem* 114: 84–98, 2008.
5. Bianchini F, Kaaks R, Vainio H. Overweight, obesity, and cancer risk. *Lancet Oncol* 3: 565–574, 2002.
6. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 348: 1625–1638, 2003.
7. Chou TY, Hart GW, Dang CV. c-Myc is glycosylated at threonine 58, a known phosphorylation site and a mutational hot spot in lymphomas. *J Biol Chem* 270: 18961–18965, 1995.
8. Dehennaut V, Slomianny MC, Page A, Vercoutter-Edouart AS, Jessus C, Michalski JC, Vilain JP, Bodart JF, Lefebvre T. Identification of



- structural and functional O-linked N-acetylglucosamine-bearing proteins in *Xenopus laevis* oocyte. *Mol Cell Proteomics* 7: 2229–2245, 2008.
9. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759–767, 1990.
  10. Gnagnarella P, Gandini S, La Vecchia C, Maisonneuve P. Glycemic index, glycemic load, and cancer risk: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 87: 1793–1801, 2008.
  11. Gu Y, Mi W, Ge Y, Liu H, Fan Q, Han C, Yang J, Han F, Lu X, Yu W. GlcNAcylation plays an essential role in breast cancer metastasis. *Cancer Res* 70: 6344–6351, 2010.
  12. Guinez C, Filhoulaud G, Rayah-Benhamed F, Marmie S, Dubuquoy C, Dentin R, Moldes M, Burnol AF, Xang X, Lefebvre T, Girard J, Postic C. O-GlcNAcylation increases ChREBP protein content and transcriptional activity in the liver. *Diabetes* 60: 1399–1413, 2011.
  13. Hanover JA, Krause MW, Love DC. The hexosamine signaling pathway: O-GlcNAc cycling in feast or famine. *Biochim Biophys Acta* 1800: 80–95, 2010.
  14. Hatsell S, Medina L, Merola J, Haltiwanger R, Cowin P. Plakoglobin is O-glycosylated close to the N-terminal destruction box. *J Biol Chem* 278: 37745–37752, 2003.
  15. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281: 1509–1512, 1998.
  16. Key TJ, Spencer EA. Carbohydrates and cancer: an overview of the epidemiological evidence. *Eur J Clin Nutr* 61, Suppl 1: S112–S121, 2007.
  17. Khaw KT, Wareham N, Bingham S, Luben R, Welch A, Day N. Preliminary communication: glycated hemoglobin, diabetes, and incident colorectal cancer in men and women: a prospective analysis from the European prospective investigation into cancer-Norfolk study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13: 915–919, 2004.
  18. Klaus A, Birchmeier W. Wnt signaling and its impact on development and cancer. *Nat Rev Cancer* 8: 387–398, 2008.
  19. Lefebvre T, Baert F, Bodart JF, Flament S, Michalski JC, Vilain JP. Modulation of O-GlcNAc glycosylation during *Xenopus* oocyte maturation. *J Cell Biochem* 93: 999–1010, 2004.
  20. Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y, Zhang Z, Lin X, He X. Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 108: 837–847, 2002.
  21. Marshall S, Bacote V, Traxinger RR. Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. *J Biol Chem* 266: 4706–4712, 1991.
  22. Mi W, Gu Y, Han C, Liu H, Fan Q, Zhang X, Cong Q, Yu W. O-GlcNAcylation is a novel regulator of lung and colon cancer malignancy. *Biochim Biophys Acta* 1812: 514–519, 2011.
  23. Olivier S, Mir AM, Michalski JC, Lefebvre T. Signaling and metabolic predispositions linked to the colorectal cancer. *Med Sci (Paris)* 27: 514–520, 2011.
  24. Pais R, Silaghi H, Silaghi AC, Rusu ML, Dumitrascu DL. Metabolic syndrome and risk of subsequent colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 15: 5141–5148, 2009.
  25. Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 434: 843–850, 2005.
  26. Sayat R, Leber B, Grubac V, Wiltshire L, Persad S. O-GlcNAcylation of beta-catenin regulates its nuclear localization and transcriptional activity. *Exp Cell Res* 314: 2774–2787, 2008.
  27. Segditsas S, Tomlinson I. Colorectal cancer and genetic alterations in the Wnt pathway. *Oncogene* 25: 7531–7537, 2006.
  28. Sethi JK, Vidal-Puig AJ. Wnt signalling at the crossroads of nutritional regulation. *Biochem J* 416: e11–e13, 2008.
  29. Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, Ben-Ze'ev A. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 5522–5527, 1999.
  30. Xu W, Kimelman D. Mechanistic insights from structural studies of beta-catenin and its binding partners. *J Cell Sci* 120: 3337–3344, 2007.
  31. Yam D, Fink A, Mashiah A, Ben-Hur E. Hyperinsulinemia in colon, stomach and breast cancer patients. *Cancer Lett* 104: 129–132, 1996.
  32. 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* 8: 1074–1083, 2006.
  33. Yang J, Zhang W, Evans PM, Chen X, He X, Liu C. Adenomatous polyposis coli (APC) differentially regulates beta-catenin phosphorylation and ubiquitination in colon cancer cells. *J Biol Chem* 281: 17751–17757, 2006.
  34. 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* 451: 964–969, 2008.
  35. Zeidan Q, Hart GW. The intersections between O-GlcNAcylation and phosphorylation: implications for multiple signaling pathways. *J Cell Sci* 123: 13–22, 2010.
  36. Zhu Q, Zhou L, Yang Z, Lai M, Xie H, Wu L, Xing C, Zhang F, Zheng S. O-GlcNAcylation plays a role in tumor recurrence of hepatocellular carcinoma following liver transplantation. *Med Oncol* [Epub ahead of print], 2011.
  37. Zhu W, Leber B, Andrews DW. Cytoplasmic O-glycosylation prevents cell surface transport of E-cadherin during apoptosis. *EMBO J* 20: 5999–6007, 2001.

# *Bibliographie*

## BIBLIOGRAPHIE

1. Gorter, E., and Grendel, F. (1925) *J Exp Med* **41**, 439-443
2. Singer, S. J. (2004) *Annu Rev Physiol* **66**, 1-27
3. Dufourc, E. J. (2008) *J Chem Biol* **1**, 63-77
4. Bittman, R., Kasireddy, C. R., Mattjus, P., and Slotte, J. P. (1994) *Biochemistry* **33**, 11776-11781
5. Boggs, J. M. (1987) *Biochim Biophys Acta* **906**, 353-404
6. Xu, F., Rychnovsky, S. D., Belani, J. D., Hobbs, H. H., Cohen, J. C., and Rawson, R. B. (2005) *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 14551-14556
7. Berthiaume, L. G. (2002) *Sci STKE* **2002**, pe41
8. Yamada, E. (1955) *J Biophys Biochem Cytol* **1**, 445-458
9. Drab, M., Verkade, P., Elger, M., Kasper, M., Lohn, M., Lauterbach, B., Menne, J., Lindschau, C., Mende, F., Luft, F. C., Schedl, A., Haller, H., and Kurzchalia, T. V. (2001) *Science* **293**, 2449-2452
10. Dupree, P., Parton, R. G., Raposo, G., Kurzchalia, T. V., and Simons, K. (1993) *EMBO J* **12**, 1597-1605
11. Rothberg, K. G., Heuser, J. E., Donzell, W. C., Ying, Y. S., Glenney, J. R., and Anderson, R. G. (1992) *Cell* **68**, 673-682
12. Rodriguez-Boulan, E., and Nelson, W. J. (1989) *Science* **245**, 718-725
13. van Meer, G. (1998) *Trends Cell Biol* **8**, 29-33
14. Brown, D. A., and Rose, J. K. (1992) *Cell* **68**, 533-544
15. Cerneus, D. P., Ueffing, E., Posthuma, G., Strous, G. J., and van der Ende, A. (1993) *J Biol Chem* **268**, 3150-3155
16. Hanada, K., Nishijima, M., Akamatsu, Y., and Pagano, R. E. (1995) *J Biol Chem* **270**, 6254-6260
17. Kurzchalia, T. V., Dupree, P., Parton, R. G., Kellner, R., Virta, H., Lehnert, M., and Simons, K. (1992) *J Cell Biol* **118**, 1003-1014
18. Anderson, R. G. (1993) *Curr Opin Cell Biol* **5**, 647-652
19. Parton, R. G., Joggerst, B., and Simons, K. (1994) *J Cell Biol* **127**, 1199-1215
20. Sargiacomo, M., Sudol, M., Tang, Z., and Lisanti, M. P. (1993) *J Cell Biol* **122**, 789-807
21. Fra, A. M., Williamson, E., Simons, K., and Parton, R. G. (1994) *J Biol Chem* **269**, 30745-30748
22. Hancock, J. F. (2006) *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 456-462
23. Simons, K., and Ikonen, E. (1997) *Nature* **387**, 569-572
24. Schroeder, R., London, E., and Brown, D. (1994) *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 12130-12134
25. Arreaza, G., and Brown, D. A. (1995) *J Biol Chem* **270**, 23641-23647
26. McConville, M. J., and Ferguson, M. A. (1993) *Biochem J* **294 ( Pt 2)**, 305-324
27. Milligan, G., Parenti, M., and Magee, A. I. (1995) *Trends Biochem Sci* **20**, 181-187
28. Shenoy-Scaria, A. M., Dietzen, D. J., Kwong, J., Link, D. C., and Lublin, D. M. (1994) *J Cell Biol* **126**, 353-363
29. Arni, S., Keilbaugh, S. A., Ostermeyer, A. G., and Brown, D. A. (1998) *J Biol Chem* **273**, 28478-28485
30. Langhorst, M. F., Reuter, A., and Stuermer, C. A. (2005) *Cell Mol Life Sci* **62**, 2228-2240
31. Melkonian, K. A., Ostermeyer, A. G., Chen, J. Z., Roth, M. G., and Brown, D. A. (1999) *J Biol Chem* **274**, 3910-3917
32. Scheiffele, P., Roth, M. G., and Simons, K. (1997) *EMBO J* **16**, 5501-5508
33. Schwencke, C., Braun-Dullaeus, R. C., Wunderlich, C., and Strasser, R. H. (2006) *Cardiovasc Res* **70**, 42-49
34. Bickel, P. E. (2002) *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**, E1-E10
35. Schulte, T., Paschke, K. A., Laessing, U., Lottspeich, F., and Stuermer, C. A. (1997) *Development* **124**, 577-587

36. Bickel, P. E., Scherer, P. E., Schnitzer, J. E., Oh, P., Lisanti, M. P., and Lodish, H. F. (1997) *J Biol Chem* **272**, 13793-13802
37. Lang, D. M., Lommel, S., Jung, M., Ankerhold, R., Petrausch, B., Laessing, U., Wiechers, M. F., Plattner, H., and Stuermer, C. A. (1998) *J Neurobiol* **37**, 502-523
38. Stuermer, C. A. (2010). *Biochim Biophys Acta* **1812**, 415-422
39. Morrow, I. C., Rea, S., Martin, S., Prior, I. A., Prohaska, R., Hancock, J. F., James, D. E., and Parton, R. G. (2002) *J Biol Chem* **277**, 48834-48841
40. Neumann-Giesen, C., Falkenbach, B., Beicht, P., Claasen, S., Luers, G., Stuermer, C. A., Herzog, V., and Tikkanen, R. (2004) *Biochem J* **378**, 509-518
41. Tavernarakis, N., Driscoll, M., and Kypides, N. C. (1999) *Trends Biochem Sci* **24**, 425-427
42. Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P., and Ponting, C. P. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5857-5864
43. Rivera-Milla, E., Stuermer, C. A., and Malaga-Trillo, E. (2006) *Cell Mol Life Sci* **63**, 343-357
44. Babuke, T., and Tikkanen, R. (2007) *Eur J Cell Biol* **86**, 525-532
45. Lingwood, D., and Simons, K. 2010. *Science* **327**, 46-50
46. Pinaud, F., Michalet, X., Iyer, G., Margeat, E., Moore, H. P., and Weiss, S. (2009) *Traffic* **10**, 691-712
47. Brown, D. A. (2006) *Physiology (Bethesda)* **21**, 430-439
48. Heerklotz, H. (2002) *Biophys J* **83**, 2693-2701
49. Heerklotz, H., Szadkowska, H., Anderson, T., and Seelig, J. (2003) *J Mol Biol* **329**, 793-799
50. Schuck, S., Honsho, M., Ekroos, K., Shevchenko, A., and Simons, K. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 5795-5800
51. Gaus, K., Rodriguez, M., Ruberu, K. R., Gelissen, I., Sloane, T. M., Kritharides, L., and Jessup, W. (2005) *J Lipid Res* **46**, 1526-1538
52. Williamson, R., Thompson, A. J., Abu, M., Hye, A., Usardi, A., Lynham, S., Anderton, B. H., and Hanger, D. P. (2010). *BMC Neurosci* **11**, 120
53. Luria, A., Vegelyte-Avery, V., Stith, B., Tsvetkova, N. M., Wolkers, W. F., Crowe, J. H., Tablin, F., and Nuccitelli, R. (2002) *Biochemistry* **41**, 13189-13197
54. Edidin, M. (2003) *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **32**, 257-283
55. Simons, K., and Toomre, D. (2000) *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 31-39
56. Morris, R. J., Jen, A., and Warley, A. (2011). *J Neurochem* **116**, 671-677
57. Sheets, E. D., Holowka, D., and Baird, B. (1999) *J Cell Biol* **145**, 877-887
58. Janes, P. W., Ley, S. C., Magee, A. I., and Kabouridis, P. S. (2000) *Semin Immunol* **12**, 23-34
59. Langlet, C., Bernard, A. M., Drevot, P., and He, H. T. (2000) *Curr Opin Immunol* **12**, 250-255
60. Cheng, P. C., Dykstra, M. L., Mitchell, R. N., and Pierce, S. K. (1999) *J Exp Med* **190**, 1549-1560
61. Waugh, M. G., Lawson, D., and Hsuan, J. J. (1999) *Biochem J* **337 ( Pt 3)**, 591-597
62. Mastick, C. C., Brady, M. J., and Saltiel, A. R. (1995) *J Cell Biol* **129**, 1523-1531
63. Vainio, S., Heino, S., Mansson, J. E., Fredman, P., Kuismanen, E., Vaarala, O., and Ikonen, E. (2002) *EMBO Rep* **3**, 95-100
64. Harder, T., and Engelhardt, K. R. (2004) *Traffic* **5**, 265-275
65. Norkin, L. C., Wolfrom, S. A., and Stuart, E. S. (2001) *Exp Cell Res* **266**, 229-238
66. Taieb, N., Yahi, N., and Fantini, J. (2004) *Adv Drug Deliv Rev* **56**, 779-794
67. van der Goot, F. G., and Harder, T. (2001) *Semin Immunol* **13**, 89-97
68. Dimitrov, D. S., Golding, H., and Blumenthal, R. (1991) *AIDS Res Hum Retroviruses* **7**, 799-805
69. Manes, S., Mira, E., Gomez-Mouton, C., Lacalle, R. A., Keller, P., Labrador, J. P., and Martinez, A. C. (1999) *EMBO J* **18**, 6211-6220
70. Xavier, R., Brennan, T., Li, Q., McCormack, C., and Seed, B. (1998) *Immunity* **8**, 723-732
71. Bavari, S., Bosio, C. M., Wiegand, E., Ruthel, G., Will, A. B., Geisbert, T. W., Hevey, M., Schmaljohn, C., Schmaljohn, A., and Aman, M. J. (2002) *J Exp Med* **195**, 593-602
72. Hill, D. E. (1978) *Semin Perinatol* **2**, 319-328
73. Kahn, C. R., Freychet, P., Roth, J., and Neville, D. M., Jr. (1974) *J Biol Chem* **249**, 2249-2257
74. Fielding, B. A., and Frayn, K. N. (1998) *Br J Nutr* **80**, 495-502



75. Gerich, J. E. (1992) *Horm Metab Res Suppl* **26**, 18-21
76. Mueckler, M. (1994) *Eur J Biochem* **219**, 713-725
77. Pessin, J. E., Thurmond, D. C., Elmendorf, J. S., Coker, K. J., and Okada, S. (1999) *J Biol Chem* **274**, 2593-2596
78. Baly, D. L., and Horuk, R. (1988) *Biochim Biophys Acta* **947**, 571-590
79. Hubbard, S. R. (1997) *EMBO J* **16**, 5572-5581
80. Luo, R. Z., Beniac, D. R., Fernandes, A., Yip, C. C., and Ottensmeyer, F. P. (1999) *Science* **285**, 1077-1080
81. Kahn, C. R., Baird, K. L., Jarrett, D. B., and Flier, J. S. (1978) *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 4209-4213
82. Magee, A. I., and Siddle, K. (1988) *J Cell Biochem* **37**, 347-357
83. Hedo, J. A., Collier, E., and Watkinson, A. (1987) *J Biol Chem* **262**, 954-957
84. Jarett, L., Schweitzer, J. B., and Smith, R. M. (1980) *Science* **210**, 1127-1128
85. Carpentier, J. L., Paccaud, J. P., Gorden, P., Rutter, W. J., and Orci, L. (1992) *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 162-166
86. Carpentier, J. L., and McClain, D. (1995) *J Biol Chem* **270**, 5001-5006
87. Backer, J. M., Kahn, C. R., Cahill, D. A., Ullrich, A., and White, M. F. (1990) *J Biol Chem* **265**, 16450-16454
88. Paccaud, J. P., Reith, W., Johansson, B., Magnusson, K. E., Mach, B., and Carpentier, J. L. (1993) *J Biol Chem* **268**, 23191-23196
89. Bergeron, J. J., Cruz, J., Khan, M. N., and Posner, B. I. (1985) *Annu Rev Physiol* **47**, 383-403
90. Schlessinger, J., Shechter, Y., Willingham, M. C., and Pastan, I. (1978) *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 2659-2663
91. Smith, R. M., Harada, S., Smith, J. A., Zhang, S., and Jarett, L. (1998) *Cell Signal* **10**, 355-362
92. Cheatham, B., Vlahos, C. J., Cheatham, L., Wang, L., Blenis, J., and Kahn, C. R. (1994) *Mol Cell Biol* **14**, 4902-4911
93. Reif, K., Nobes, C. D., Thomas, G., Hall, A., and Cantrell, D. A. (1996) *Curr Biol* **6**, 1445-1455
94. Egawa, K., Sharma, P. M., Nakashima, N., Huang, Y., Huver, E., Boss, G. R., and Olefsky, J. M. (1999) *J Biol Chem* **274**, 14306-14314
95. Le Roith, D., and Zick, Y. (2001) *Diabetes Care* **24**, 588-597
96. White, M. F. (2002) *Am J Physiol Endocrinol Metab* **283**, E413-422
97. Yamamoto, M., Toya, Y., Schwencke, C., Lisanti, M. P., Myers, M. G., Jr., and Ishikawa, Y. (1998) *J Biol Chem* **273**, 26962-26968
98. Ribon, V., and Saltiel, A. R. (1997) *Biochem J* **324 ( Pt 3)**, 839-845
99. Liu, J., Kimura, A., Baumann, C. A., and Saltiel, A. R. (2002) *Mol Cell Biol* **22**, 3599-3609
100. Mastick, C. C., and Saltiel, A. R. (1997) *J Biol Chem* **272**, 20706-20714
101. Baumann, C. A., Ribon, V., Kanzaki, M., Thurmond, D. C., Mora, S., Shigematsu, S., Bickel, P. E., Pessin, J. E., and Saltiel, A. R. (2000) *Nature* **407**, 202-207
102. Chiang, S. H., Baumann, C. A., Kanzaki, M., Thurmond, D. C., Watson, R. T., Neudauer, C. L., Macara, I. G., Pessin, J. E., and Saltiel, A. R. (2001) *Nature* **410**, 944-948
103. Kimura, A., Baumann, C. A., Chiang, S. H., and Saltiel, A. R. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9098-9103
104. Watson, R. T., Shigematsu, S., Chiang, S. H., Mora, S., Kanzaki, M., Macara, I. G., Saltiel, A. R., and Pessin, J. E. (2001) *J Cell Biol* **154**, 829-840
105. Saltiel, A. R., and Pessin, J. E. (2003) *Traffic* **4**, 711-716
106. Inoue, M., Chang, L., Hwang, J., Chiang, S. H., and Saltiel, A. R. (2003) *Nature* **422**, 629-633
107. Shigematsu, S., Watson, R. T., Khan, A. H., and Pessin, J. E. (2003) *J Biol Chem* **278**, 10683-10690
108. Torres, C. R., and Hart, G. W. (1984) *J Biol Chem* **259**, 3308-3317
109. Cheung, W. D., and Hart, G. W. (2008) *J Biol Chem* **283**, 13009-13020
110. Holt, G. D., and Hart, G. W. (1986) *J Biol Chem* **261**, 8049-8057

111. Hu, Y., Suarez, J., Fricovsky, E., Wang, H., Scott, B. T., Trauger, S. A., Han, W., Oyeleye, M. O., and Dillmann, W. H. (2009) *J Biol Chem* **284**, 547-555
112. Cheng, X., and Hart, G. W. (2001) *J Biol Chem* **276**, 10570-10575
113. Chou, T. Y., Hart, G. W., and Dang, C. V. (1995) *J Biol Chem* **270**, 18961-18965
114. Kamemura, K., Hayes, B. K., Comer, F. I., and Hart, G. W. (2002) *J Biol Chem* **277**, 19229-19235
115. Yang, W. H., Kim, J. E., Nam, H. W., Ju, J. W., Kim, H. S., Kim, Y. S., and Cho, J. W. (2006) *Nat Cell Biol* **8**, 1074-1083
116. Haltiwanger, R. S., Holt, G. D., and Hart, G. W. (1990) *J Biol Chem* **265**, 2563-2568
117. Vulliet, P. R., Hall, F. L., Mitchell, J. P., and Hardie, D. G. (1989) *J Biol Chem* **264**, 16292-16298
118. Forrest, A. R., Ravasi, T., Taylor, D., Huber, T., Hume, D. A., and Grimmond, S. (2003) *Genome Res* **13**, 1443-1454
119. Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., and Sudarsanam, S. (2002) *Science* **298**, 1912-1934
120. Shafi, R., Iyer, S. P., Ellies, L. G., O'Donnell, N., Marek, K. W., Chui, D., Hart, G. W., and Marth, J. D. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 5735-5739
121. Love, D. C., Kochan, J., Cathey, R. L., Shin, S. H., and Hanover, J. A. (2003) *J Cell Sci* **116**, 647-654
122. Lubas, W. A., Frank, D. W., Krause, M., and Hanover, J. A. (1997) *J Biol Chem* **272**, 9316-9324
123. Hanover, J. A., Yu, S., Lubas, W. B., Shin, S. H., Ragano-Caracciola, M., Kochran, J., and Love, D. C. (2003) *Arch Biochem Biophys* **409**, 287-297
124. Haltiwanger, R. S., Blomberg, M. A., and Hart, G. W. (1992) *J Biol Chem* **267**, 9005-9013
125. Wrabl, J. O., and Grishin, N. V. (2001) *J Mol Biol* **314**, 365-374
126. Blatch, G. L., and Lassle, M. (1999) *Bioessays* **21**, 932-939
127. Iyer, S. P., and Hart, G. W. (2003) *J Biol Chem* **278**, 24608-24616
128. Whelan, S. A., Lane, M. D., and Hart, G. W. (2008) *J Biol Chem* **283**, 21411-21417
129. Lazarus, M. B., Nam, Y., Jiang, J., Sliz, P., and Walker, S. 2011. *Nature* **469**, 564-567
130. Braidman, I., Carroll, M., Dance, N., Robinson, D., Poenaru, L., Weber, A., Dreyfus, J. C., Overdijk, B., and Hooghwinkel, G. J. (1974) *FEBS Lett* **41**, 181-184
131. Dong, D. L., and Hart, G. W. (1994) *J Biol Chem* **269**, 19321-19330
132. Gao, Y., Wells, L., Comer, F. I., Parker, G. J., and Hart, G. W. (2001) *J Biol Chem* **276**, 9838-9845
133. Dennis, R. J., Taylor, E. J., Macauley, M. S., Stubbs, K. A., Turkenburg, J. P., Hart, S. J., Black, G. N., Voadlo, D. J., and Davies, G. J. (2006) *Nat Struct Mol Biol* **13**, 365-371
134. Schultz, J., and Pils, B. (2002) *FEBS Lett* **529**, 179-182
135. Comtesse, N., Maldener, E., and Meese, E. (2001) *Biochem Biophys Res Commun* **283**, 634-640
136. Keembiyehetty, C. N., Krzeslak, A., Love, D. C., and Hanover, J. A. (2011). *J Cell Sci* **124**, 2851-2860
137. Wells, L., Gao, Y., Mahoney, J. A., Vosseller, K., Chen, C., Rosen, A., and Hart, G. W. (2002) *J Biol Chem* **277**, 1755-1761
138. Toleman, C., Paterson, A. J., Whisenhunt, T. R., and Kudlow, J. E. (2004) *J Biol Chem* **279**, 53665-53673
139. Kim, E. J., Kang, D. O., Love, D. C., and Hanover, J. A. (2006) *Carbohydr Res* **341**, 971-982
140. Cetinbas, N., Macauley, M. S., Stubbs, K. A., Drapala, R., and Voadlo, D. J. (2006) *Biochemistry* **45**, 3835-3844
141. Marshall, S., Bacote, V., and Traxinger, R. R. (1991) *J Biol Chem* **266**, 4706-4712
142. Love, D. C., and Hanover, J. A. (2005) *Sci STKE* **2005**, re13
143. Wells, L., Vosseller, K., and Hart, G. W. (2003) *Cell Mol Life Sci* **60**, 222-228
144. Chou, C. F., Smith, A. J., and Omary, M. B. (1992) *J Biol Chem* **267**, 3901-3906
145. Griffith, L. S., and Schmitz, B. (1999) *Eur J Biochem* **262**, 824-831

146. Wells, L., Kreppel, L. K., Comer, F. I., Wadzinski, B. E., and Hart, G. W. (2004) *J Biol Chem* **279**, 38466-38470
147. Sakabe, K., and Hart, G. W. 2010. *J Biol Chem* **285**, 34460-34468
148. Sakabe, K., Wang, Z., and Hart, G. W. (2010). *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 19915-19920
149. Whelan, S. A., and Hart, G. W. (2003) *Circ Res* **93**, 1047-1058
150. Choudhary, C., Kumar, C., Gnad, F., Nielsen, M. L., Rehman, M., Walther, T. C., Olsen, J. V., and Mann, M. (2009) *Science* **325**, 834-840
151. Comer, F. I., and Hart, G. W. (1999) *Biochim Biophys Acta* **1473**, 161-171
152. Shaw, P., Freeman, J., Bovey, R., and Iggo, R. (1996) *Oncogene* **12**, 921-930
153. Roos, M. D., Su, K., Baker, J. R., and Kudlow, J. E. (1997) *Mol Cell Biol* **17**, 6472-6480
154. Lamarre-Vincent, N., and Hsieh-Wilson, L. C. (2003) *J Am Chem Soc* **125**, 6612-6613
155. Hiromura, M., Choi, C. H., Sabourin, N. A., Jones, H., Bachvarov, D., and Usheva, A. (2003) *J Biol Chem* **278**, 14046-14052
156. Gewinner, C., Hart, G., Zachara, N., Cole, R., Beisenherz-Huss, C., and Groner, B. (2004) *J Biol Chem* **279**, 3563-3572
157. Guinez, C., Lemoine, J., Michalski, J. C., and Lefebvre, T. (2004) *Biochem Biophys Res Commun* **319**, 21-26
158. Guinez, C., Losfeld, M. E., Cacan, R., Michalski, J. C., and Lefebvre, T. (2006) *Glycobiology* **16**, 22-28
159. Hanover, J. A., Cohen, C. K., Willingham, M. C., and Park, M. K. (1987) *J Biol Chem* **262**, 9887-9894
160. Holt, G. D., Haltiwanger, R. S., Torres, C. R., and Hart, G. W. (1987) *J Biol Chem* **262**, 14847-14850
161. Park, M. K., D'Onofrio, M., Willingham, M. C., and Hanover, J. A. (1987) *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 6462-6466
162. Finlay, D. R., Newmeyer, D. D., Price, T. M., and Forbes, D. J. (1987) *J Cell Biol* **104**, 189-200
163. Miller, M. W., and Hanover, J. A. (1994) *J Biol Chem* **269**, 9289-9297
164. Lefebvre, T., Planque, N., Leleu, D., Bailly, M., Caillet-Boudin, M. L., Saule, S., and Michalski, J. C. (2002) *J Cell Biochem* **85**, 208-218
165. Nanashima, N., Asano, J., Hayakari, M., Nakamura, T., Nakano, H., Yamada, T., Shimizu, T., Akita, M., Fan, Y., and Tsuchida, S. (2005) *J Biol Chem* **280**, 43010-43016
166. Dauphinee, S. M., Ma, M., and Too, C. K. (2005) *J Cell Biochem* **96**, 579-588
167. Lefebvre, T., Ferreira, S., Dupont-Wallois, L., Bussiere, T., Dupire, M. J., Delacourte, A., Michalski, J. C., and Caillet-Boudin, M. L. (2003) *Biochim Biophys Acta* **1619**, 167-176
168. Andrali, S. S., Qian, Q., and Ozcan, S. (2007) *J Biol Chem* **282**, 15589-15596
169. Sumegi, M., Hunyadi-Gulyas, E., Medzihradszky, K. F., and Udvardy, A. (2003) *Biochem Biophys Res Commun* **312**, 1284-1289
170. Zhang, F., Su, K., Yang, X., Bowe, D. B., Paterson, A. J., and Kudlow, J. E. (2003) *Cell* **115**, 715-725
171. Han, I., and Kudlow, J. E. (1997) *Mol Cell Biol* **17**, 2550-2558
172. Gambetta, M. C., Oktaba, K., and Muller, J. (2009) *Science* **325**, 93-96
173. Slawson, C., Zachara, N. E., Vosseller, K., Cheung, W. D., Lane, M. D., and Hart, G. W. (2005) *J Biol Chem* **280**, 32944-32956
174. Whitfield, M. L., Sherlock, G., Saldanha, A. J., Murray, J. I., Ball, C. A., Alexander, K. E., Matese, J. C., Perou, C. M., Hurt, M. M., Brown, P. O., and Botstein, D. (2002) *Mol Biol Cell* **13**, 1977-2000
175. Wang, Z., Udeshi, N. D., Slawson, C., Compton, P. D., Sakabe, K., Cheung, W. D., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., and Hart, G. W. (2010) . *Sci Signal* **3**, ra2
176. Fujiki, R., Chikanishi, T., Hashiba, W., Ito, H., Takada, I., Roeder, R. G., Kitagawa, H., and Kato, S. (2009) *Nature* **459**, 455-459
177. Daniels, M. C., Ciaraldi, T. P., Nikoulina, S., Henry, R. R., and McClain, D. A. (1996) *J Clin Invest* **97**, 1235-1241

178. Cooksey, R. C., Hebert, L. F., Jr., Zhu, J. H., Wofford, P., Garvey, W. T., and McClain, D. A. (1999) *Endocrinology* **140**, 1151-1157
179. Vosseller, K., Wells, L., Lane, M. D., and Hart, G. W. (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 5313-5318
180. Macauley, M. S., Bubb, A. K., Martinez-Fleites, C., Davies, G. J., and Vocadlo, D. J. (2008) *J Biol Chem* **283**, 34687-34695
181. Robinson, K. A., Ball, L. E., and Buse, M. G. (2007) *Am J Physiol Endocrinol Metab* **292**, E884-890
182. Slawson, C., Copeland, R. J., and Hart, G. W. (2010). *Trends Biochem Sci* **35**, 547-555
183. McClain, D. A., Lubas, W. A., Cooksey, R. C., Hazel, M., Parker, G. J., Love, D. C., and Hanover, J. A. (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 10695-10699
184. Yang, X., Ongusaha, P. P., Miles, P. D., Havstad, J. C., Zhang, F., So, W. V., Kudlow, J. E., Mitchell, R. H., Olefsky, J. M., Field, S. J., and Evans, R. M. (2008) *Nature* **451**, 964-969
185. Whelan, S. A., Dias, W. B., Thiruneelakantapillai, L., Lane, M. D., and Hart, G. W. 2009. *J Biol Chem* **285**, 5204-5211
186. Park, S. Y., Ryu, J., and Lee, W. (2005) *Exp Mol Med* **37**, 220-229
187. Kang, E. S., Han, D., Park, J., Kwak, T. K., Oh, M. A., Lee, S. A., Choi, S., Park, Z. Y., Kim, Y., and Lee, J. W. (2008) *Exp Cell Res* **314**, 2238-2248
188. Soesanto, Y. A., Luo, B., Jones, D., Taylor, R., Gabrielsen, J. S., Parker, G., and McClain, D. A. (2008) *Am J Physiol Endocrinol Metab* **295**, E974-980
189. Issad, T., and Kuo, M. (2008) *Trends Endocrinol Metab* **19**, 380-389
190. Kuo, M., Zilberfarb, V., Gangneux, N., Christeff, N., and Issad, T. (2008) *Biochimie* **90**, 679-685
191. Parker, G., Taylor, R., Jones, D., and McClain, D. (2004) *J Biol Chem* **279**, 20636-20642
192. Gao, Y., Miyazaki, J., and Hart, G. W. (2003) *Arch Biochem Biophys* **415**, 155-163
193. Ikonen, E., and Vainio, S. (2005) *Sci STKE* **2005**, pe3
194. Vainio, S., Bykov, I., Hermansson, M., Jokitalo, E., Somerharju, P., and Ikonen, E. (2005) *Biochem J* **391**, 465-472
195. Chamberlain, L. H. (2004) *FEBS Lett* **559**, 1-5
196. Simons, K., and Vaz, W. L. (2004) *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **33**, 269-295
197. Thompson, A. J., Williamson, R., Schofield, E., Stephenson, J., Hanger, D., and Anderton, B. (2009) *Proteomics* **9**, 3022-3035
198. Staneva, G., Seigneuret, M., Koumanov, K., Trugnan, G., and Angelova, M. I. (2005) *Chem Phys Lipids* **136**, 55-66
199. Patra, S. K., Alonso, A., and Goni, F. M. (1998) *Biochim Biophys Acta* **1373**, 112-118
200. Roper, K., Corbeil, D., and Huttner, W. B. (2000) *Nat Cell Biol* **2**, 582-592
201. Slimane, T. A., Trugnan, G., Van, I. S. C., and Hoekstra, D. (2003) *Mol Biol Cell* **14**, 611-624
202. Lichtenberg, D., Goni, F. M., and Heerklotz, H. (2005) *Trends Biochem Sci* **30**, 430-436
203. Zhu, Y. Z., Cao, M. M., Wang, W. B., Wang, W., Ren, H., Zhao, P., and Qi, Z. T. (2011). *J Gen Virol* **93**, 61-71
204. Amaddii, M., Meister, M., Banning, A., Tomasovic, A., Mooz, J., Rajalingam, K., and Tikkanen, R. (2012). *J Biol Chem*
205. Coskun, U., Grzybek, M., Drechsel, D., and Simons, K. (2011). *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 9044-9048
206. Schneider, A., Rajendran, L., Honsho, M., Gralle, M., Donnert, G., Wouters, F., Hell, S. W., and Simons, M. (2008) *J Neurosci* **28**, 2874-2882
207. Gao, X., and Zhang, J. (2008) *Mol Biol Cell* **19**, 4366-4373
208. Gao, X., and Zhang, J. (2009) *Commun Integr Biol* **2**, 32-34
209. Levental, I., Lingwood, D., Grzybek, M., Coskun, U., and Simons, K. (2010). *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 22050-22054
210. Barman, S., and Nayak, D. P. (2000) *J Virol* **74**, 6538-6545
211. Engel, S., Scolari, S., Thaa, B., Krebs, N., Korte, T., Herrmann, A., and Veit, M. (2009). *Biochem J* **425**, 567-573

212. Ferguson, M. A. J., Kinoshita, T., and Hart, G. W. (2009)
213. Contreras, F. X., Ernst, A. M., Wieland, F., and Brugger, B. (2011). *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**
214. Gustavsson, J., Parpal, S., Karlsson, M., Ramsing, C., Thorn, H., Borg, M., Lindroth, M., Peterson, K. H., Magnusson, K. E., and Stralfors, P. (1999) *FASEB J* **13**, 1961-1971
215. Jarett, L., Kiechle, F. L., Popp, D. A., Kotagal, N., and Gavin, J. R., 3rd. (1980) *Biochem Biophys Res Commun* **96**, 735-741
216. Engelman, J. A., Luo, J., and Cantley, L. C. (2006) *Nat Rev Genet* **7**, 606-619
217. Martin, T. F. (1998) *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**, 231-264
218. McNamara, C. R., and Degtarev, A. (2011) *Future Med Chem* **3**, 549-565
219. Rameh, L. E., and Cantley, L. C. (1999) *J Biol Chem* **274**, 8347-8350
220. Kutateladze, T. G. (2010). *Nat Chem Biol* **6**, 507-513
221. Chen, M. X., and Cohen, P. T. (1997) *FEBS Lett* **400**, 136-140
222. Ande, S. R., Moulik, S., and Mishra, S. (2009) *PLoS One* **4**, e4586
223. Cherukuri, A., Carter, R. H., Brooks, S., Bornmann, W., Finn, R., Dowd, C. S., and Pierce, S. K. (2004) *J Biol Chem* **279**, 31973-31982
224. Shaw, A. S. (2006) *Nat Immunol* **7**, 1139-1142
225. Kawasaki, K., Yin, J. J., Subczynski, W. K., Hyde, J. S., and Kusumi, A. (2001) *Biophys J* **80**, 738-748
226. Kenworthy, A. K., Petranova, N., and Edidin, M. (2000) *Mol Biol Cell* **11**, 1645-1655
227. Kusumi, A., Koyama-Honda, I., and Suzuki, K. (2004) *Traffic* **5**, 213-230
228. Gaus, K., Chklovskaya, E., Fazekas de St Groth, B., Jessup, W., and Harder, T. (2005) *J Cell Biol* **171**, 121-131
229. Dubey, J. P. (1998) *Int J Parasitol* **28**, 1019-1024
230. Sousa, O. E., Saenz, R. E., and Frenkel, J. K. (1988) *Am J Trop Med Hyg* **38**, 315-322
231. Jones, J. L., Dargelas, V., Roberts, J., Press, C., Remington, J. S., and Montoya, J. G. (2009) *Clin Infect Dis* **49**, 878-884
232. Chung, D. W., Ponts, N., Cervantes, S., and Le Roch, K. G. (2009) *Mol Biochem Parasitol* **168**, 123-134
233. Banerjee, S., Robbins, P. W., and Samuelson, J. (2009) *Glycobiology* **19**, 331-336
234. Uddin, N., Hoessli, D. C., Butt, A., Kaleem, A., Iqbal, Z., Afzal, I., Muhammad, H., Zamani, Z., and Shakoory, A. R. (2011). *Mol Biol Rep* **39**, 4663-4672
235. Shonhai, A. (2010). *FEMS Immunol Med Microbiol* **58**, 61-74
236. Tutar, L., and Tutar, Y. (2010). *Curr Pharm Biotechnol* **11**, 216-222
237. Macedo, C. S., Schwarz, R. T., Todeschini, A. R., Previato, J. O., and Mendonca-Previato, L. (2011). *Mem Inst Oswaldo Cruz* **105**, 949-956
238. Luo, Q., Upadhyaya, R., Zhang, H., Madrid-Aliste, C., Nieves, E., Kim, K., Angeletti, R. H., and Weiss, L. M. (2011). *Microbes Infect* **13**, 1199-1210