

N° d'ordre : 42386

Université des Sciences et Technologies de Lille

Thèse de doctorat

Présentée par

Eudoxie DULARY

En vue de l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Lille 1

Discipline : Biologie moléculaire et structurale, biochimie

Spécialité : Biochimie et biologie moléculaire

**N-glycosylation et pathologies associées :
Etude de deux acteurs majeurs Man2C1 et Gdt1**

Soutenue le 29 Juin 2017 devant la commission d'examen

Président : Dr. Anne Harduin-Lepers (Université de Lille 1)

Rapporteurs : Dr. Cécile Voisset (Université de Brest)

Dr. Mohamed Ouzzine (Université de Lorraine)

Examineurs : Pr. Alain Hovnanian (Université de Paris Descartes)

Dr. François Foulquier (Université de Lille 1)

Dr. Sandrine DUVET (Université de Lille 1)

Ce travail a été réalisé sous la direction du Dr. Sandrine Duvet au sein de l'Unité de
Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle
(UGSF-UMR8576 / CNRS Directeur : Pr. Christophe D'Hulst)

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

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury :

Madame le docteur Anne Harduin-Lepers, c'est un réel plaisir pour moi que vous ayez accepté la présidence de ce jury. Je tiens également à vous remercier pour nos nombreuses discussions le soir à la porte de votre bureau, elles m'ont été d'une grande aide et d'un grand soutien.

Madame le docteur Cécile Voisset, je tiens à vous remercier d'avoir accepté d'être membre de mon jury en qualité de rapportrice.

Monsieur le docteur Mohamed Ouzzine, je vous remercie de participer à ce jury de thèse et d'assurer le rôle de rapporteur.

Monsieur le professeur Alain Hovnanian, merci à vous d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse en qualité d'examineur.

Monsieur le docteur François Foulquier, c'est un réel plaisir pour moi que tu sois l'un des membres de mon jury. D'un point de vue plus personnel, je tiens sincèrement à te remercier pour la chance que tu m'as donné de faire partie de ton équipe pendant ces 5 années. Tu as su être un chef impressionnant par ton savoir et tes analyses mais tu as également su être une personne à l'écoute et un soutien dans les moments difficiles.

Madame le docteur Sandrine Duvet, merci. Merci de m'avoir fait confiance il y a 5 ans, merci de m'avoir aidé dans les manip et dans l'élaboration de ce manuscrit de thèse. Merci aussi d'avoir accepté ce changement de sujet et surtout d'avoir tout donné pour que cette thèse soit possible. Merci aussi d'un point de vue plus personnel pour votre soutien.

Je tiens également à remercier :

Messieurs le docteur Pascal Mariot et le professeur André Klein pour votre présence lors de mes comités de suivi de thèse.

L'équipe du 020 : Dominique, pour ton aide lors de la rédaction de la revue et surtout pour tes nombreuses blagues qui nous apportent le sourire tous les matins. **Willy et Jean-Claude**, un grand merci pour vos analyses sur mon travail lors des réunions de groupe. **Marie-Ange**, je crois que c'est un grand merci que je dois te dire, merci d'avoir su être à l'écoute quand j'en avais besoin. **Geoffroy**, je te remercie de la confiance que tu m'as accordée il y a presque 2 ans maintenant pour prendre le relai de Fanny sur le sujet levure. Merci également pour tes nombreux conseils sur la levure. Tu es un puit de science et une personne pédagogue même s'il est parfois difficile de te suivre. Je te remercie très sincèrement.

Le bureau : Anne-Marie, 1 an déjà que vous avez laissé un grand vide au sein du labo et surtout du bureau. Vous m'avez apporté un grand soutien et surtout de grandes parties de rigolade. J'apprécie toujours vos visites au labo qui sont un réel bonheur pour moi. Je vous souhaite de vous épanouir dans votre vie de jeune retraitée ! **Dorothée**, nous sommes arrivées presque en même temps au sein du labo, 5 années passées à rire, à pleurer, à travailler et surtout à te piquer ta paillasse. Ça y est, tu vas enfin pouvoir avoir une paillasse non encombrée et surtout tu vas être soulagée par la diminution du nombre de flasques à autoclaver.... **Céline**, tu es arrivée récemment dans l'équipe mais je suis contente d'avoir pu passer ce peu de temps avec toi. Je te souhaite de t'épanouir aussi bien dans l'équipe que dans ta vie personnelle. **Marine**, le rayon de soleil de cette équipe. Tu as su nous apporter un coup de fraîcheur dans l'équipe avec ta bonne humeur. Merci pour ton soutien et nos nombreuses discussions. Je te souhaite de vivre tes rêves, tu as toutes les qualités pour réussir, il ne manque plus que celle de croire en toi !!! **Sven (ou Svenichou pour les intimes)**, ça y est te voilà enfin tranquille, je m'en vais !!!! Je tiens sincèrement à te remercier pour tout ce que tu as fait pour moi. C'est un réel honneur de partager une revue et une publication à tes côtés. Je te souhaite de réussir dans la recherche, tu es fait pour ça et ne

perd surtout pas ton objectif de vue ! Courage pour la dernière ligne droite qui sera j'en suis sûre une grande réussite. **Elodie**, l'ovni débarqué en novembre dernier. Tu es une fille géniale avec qui j'ai adoré passé ces derniers mois. Tu es remarquable par ton énergie et par ta folie mais également et surtout par ton courage. Je te souhaite de t'éclater dans ce que tu fais (même si c'est déjà ce que tu fais). **Anne-Sophie**, merci de ton soutien, je te souhaite de réussir ce que tu entreprends mais dis-toi que même si ça ne fonctionne pas, ce n'est pas une fin mais juste le début d'autre chose.

Les étudiants présents et passés : je tiens à remercier les anciens de m'avoir si bien accueilli au sein du C9 : Marie, Florent, Agata, Stéphanie, Pierre et Anne-Sophie, et Cindy. Je souhaite également plein de courage à Maxence, Charles, Justine et Sumeyye pour les années à venir.

Le personnel de l'UGSF : Je tiens également à remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou loin à ce travail et dont j'ai pu croiser la route durant ces 5 années passées à l'UGSF.

D'un point de vue plus personnel, je tiens à remercier :

Maxime, tu as été mon pilier pendant ces années. Tu as su être le témoin de mon bonheur mais également le soutien de mon malheur. Tu es un ami et une personne chère dans ma vie. Sans toi cette thèse n'aurait peut-être pas vu le jour et je te remercie d'avoir su me pousser à relever la tête. Je n'oublie pas **Lucie**, d'abord une amie avec qui j'ai partagé de nombreux repas le midi puis devenue la moitié de mon pilier. Avec vous deux, j'ai un soutien complet et sans faille. Merci à vous deux d'être ce que vous êtes et ce que vous apportez dans ma vie.

Elodie, une amie, un témoin, une sœur, une personne tellement importante dans ma vie. Nous avons partagé tellement de choses depuis que l'on se connaît. Toujours là l'une pour l'autre dans les très bons moments mais aussi dans les moins bons. Tu as toujours su quand ça n'allait pas et être là pour moi. Tu me fais le plus grand honneur, avec ton petit mari, **Nicolas**, de me demander d'être la marraine de bébé d'amour, j'espère que je serais à la hauteur de vos attentes.

Les membres de ma famille, mes grands-parents, cousins, cousines, beaux-parents mais également mes anges gardiens, Mémé et Marraine, vous n'avez pas pu voir la fin de ce travail mais j'espère que vous êtes fières de moi.

Mes parents, merci d'avoir fait de moi la personne que je suis devenue. Vous avez tout fait pour que je réussisse ma vie et pour ça je vous dis merci. Vous avez su nous apporter un grand soutien pour la maison, pour l'organisation du mariage et pour que notre vie soit une réussite. Je profite donc de ces lignes pour vous dire merci !

Ludo, tu es une personne exceptionnelle, pleine de patience et d'écoute. Tu es mon mari, mon meilleur ami et mon soutien. Merci d'avoir été aussi patient pendant toutes ces années, d'avoir su m'aider à ta façon ces derniers mois et d'être là chaque jour à mes côtés.

Résumé

Le processus de N-glycosylation est un processus complexe faisant intervenir 2 compartiments subcellulaires, le *reticulum* endoplasmique et l'appareil de Golgi, et de nombreuses enzymes, les glycosyltransférases et les glycosidases. Les N-glycannes sont impliqués dans des fonctions physiologiques telles que les interactions cellule-cellule, mais également dans le processus de mise en conformation des N-glycoprotéines nouvellement synthétisées. Des perturbations du processus de N-glycosylation vont conduire à l'apparition de pathologies comme le cancer ou les « Congenital Disorders of Glycosylation » (CDG).

La Man2C1 est une glycosidase impliquée dans le processus de dégradation ERAD « Endoplasmic reticulum associated degradation » des N-glycoprotéines mal conformées. Elle entre en jeu dans la dégradation des oligosaccharides solubles libérés lors de ce processus. En 2011, une étude a suggéré l'implication de la Man2C1 dans l'activation de la voie PI3K/Akt dans le cancer de la prostate. La première partie de mon travail de thèse a consisté à préciser cette implication et notamment à déterminer si le rôle catalytique de l'enzyme influe sur l'activation de la voie PI3K/Akt. Nous avons montré l'existence d'une corrélation entre l'expression de la Man2C1 et l'activation de la voie PI3K/Akt dans différentes lignées cancéreuses prostatiques. L'étude du profil structural des N-glycannes dans différentes lignées cancéreuses prostatiques a permis de mettre en évidence le transfert de précurseurs oligosaccharidiques incomplets de type Man₉Gn₂ et Man₅Gn₂, ainsi qu'une diminution de l'antennarisation des N-glycannes. Nous avons également montré une augmentation de l'expression de la Man2C1 en corrélation avec le degré de cancérisation et le niveau d'activation de la voie PI3K/Akt. Cependant, aucun lien direct n'a été mis en évidence ni entre le niveau d'expression de la Man2C1, ni entre l'activité catalytique de la Man2C1 et l'activation de la voie PI3K/Akt dans les lignées cancéreuses prostatiques. La deuxième partie de mon travail de thèse a porté sur l'étude fonctionnelle de Gdt1p dans la N-glycosylation chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Bien que les processus de glycosylation golgien soient différents chez l'Homme et la levure, les acteurs intervenant dans ce processus sont placés sous l'influence d'une homéostasie intracellulaire extrêmement régulée. TMEM165, est une protéine golgienne dont la déficience conduit à une perturbation de l'homéostasie golgienne et à l'apparition d'un CDG de type II. Mon étude a porté sur l'orthologue fonctionnel de TMEM165 chez *Saccharomyces cerevisiae*, Gdt1p. Les premières études portant sur TMEM165/Gdt1p ont suggéré son rôle d'antiport Ca²⁺/H⁺ dans la membrane de l'appareil de Golgi. Récemment, il a été montré que la délétion de Gdt1p, en présence de fortes concentrations calciques, provoque un défaut de glycosylation qui peut être supprimé par l'ajout de Mn²⁺. Nous avons donc étudié le rôle de Gdt1p dans le processus de glycosylation en utilisant différents mutants de *pmr1p*, unique transporteur de Ca²⁺/Mn²⁺ dans la membrane de l'appareil de Golgi. Notre étude a montré que le défaut de glycosylation observé est lié à une perturbation de l'homéostasie en Mn²⁺ de l'appareil de Golgi et que la restauration de la glycosylation par le Mn²⁺ nécessite l'utilisation du gradient calcique présent dans les saccules golgiens. Notre étude a donc permis de mettre en évidence la fonction de transport du Mn²⁺ et a donc suggéré un rôle d'antiport Ca²⁺/Mn²⁺ pour Gdt1p.

Summary

N-glycosylation is a complex process localized in two cellular subcompartments, the Endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus, many enzymes like glycosyltransferases and glycosidases are involved in this process. N-glycans are involved in physiological functions such as cell-cell interactions and also in the folding of N-glycoproteins newly synthesized. Disturbances of N-glycosylation process can lead to pathologies such as cancer or Congenital Disorders of Glycosylation.

Man2C1 is a glycosidase involved in the Endoplasmic reticulum associated degradation (ERAD) pathway of unfolded glycoproteins and precisely in the catabolism of cytosolic free oligosaccharides. In 2011, a study has suggested an involvement of Man2C1 in Akt pathway activation in prostate cancer. The first part of my work consisted to precise the involvement of Man2C1 and determine if the catalytic activity of Man2C1 influence the activation of PI3K/Akt pathway. We showed a correlation between Man2C1 expression and Akt activation in prostate cancer cell lines. N-Glycan structures are modified in various prostate cancer cell lines since incomplete Man₅Gn₂ and Man₉Gn₂ oligosaccharides precursors are transferred and branched N-glycans are decreased. We also have correlated an increase of Man2C1 expression with the stage of cancer and PI3K/Akt pathway activation. However, neither direct link between Man2C1 expression level, nor catalytic activity of Man2C1 and the level of activation of Akt pathway in prostate cancer cell lines have been demonstrated.

In the second part of my work we analyzed the involvement of Gdt1p in N-glycosylation process in *Saccharomyces cerevisiae*. Although Glycan maturation process is different between Human and Yeasts, the actors are subjected to an extreme control of Golgi homeostasis. TMEM165 is a Golgi localized protein whose impairment leads to Golgi homeostasis disruption and CDG type II. My study was based on TMEM165 ortholog in *Saccharomyces cerevisiae*, Gdt1p. Previous studies on TMEM165/Gdt1p have suggested a function as an antiport Ca²⁺/H⁺ in the Golgi membrane. Recently, N-glycosylation defects have been reported when deleted Gdt1p yeast strains were exposed to high calcium concentrations. This disturbance can be suppressed by manganese in the medium. We analyzed the involvement of Gdt1p in Glycosylation process using Pmr1p mutants, the only one Ca²⁺/Mn²⁺ transporter known in the Golgi apparatus. Our study has demonstrated that the glycosylation defect observed is due to a disturbance in manganese Golgi homeostasis and needs calcium gradient of golgi saccules. Our study confirmed Mn²⁺ transport function of Gdt1p and suggested an Ca²⁺/Mn²⁺ function for Gdt1p.

Abréviations

ALG : Asparagin-linked glycosylation
Asn : Asparagine
BiP : Binding immunoglobulin protein
CaZy : Carbohydrate Active enzyme
CDG : Congenital disorders of glycosylation
CHOP : C/EBP homologous protein
CNX : Calnéxine
CRT : Calréticuline
Cst : Castanospermine
EDEM : ER degradation enhancing α -mannosidase like protein
ENGase : Endo- β -N-acétylglucosaminidase
ERAD : ER associated degradation
ERGIC : ER/Golgi Intermediate compartiment
ERQC : ER quality control
GH : Glycosylhydrolase
Glc : Glucose
GlcNAc : N-acétylglucosamine
GlcNAcT : GlcNAc transférase
GlcNH₂ : Glucosamine
HSP : Heat Shock Protein
Man : Mannose
OST : Oligosaccharyltransférase
PDI : Protein disulfide isomerase
PMM2 : Phosphomannomutase 2
PNGase : Peptide-N-glycanase
PPI : Peptidyl prolyl isomerase
PSA : Prostate serique antigen
PTEN : Phosphatase and TENsin homolog
RE : Réticulum endoplasmique
SW : Swainsonine
UGGT : UDP-Glc:glycoprotéine glucosyltransférase

Publications

Revue scientifique :

Eudoxie Dulary*, Sven Potelle*, Dominique Legrand, and François Foulquier. 2016. "TMEM165 Deficiencies in Congenital Disorders of Glycosylation Type II (CDG-II): Clues and Evidences for Roles of the Protein in Golgi Functions and Ion Homeostasis." *Tissue and Cell*, June. doi:10.1016/j.tice.2016.06.006.

Publications :

Sven Potelle*, Eudoxie Dulary*, Leslie Climer, Sandrine Duvet, Willy Morelle, Dorothée Vicogne, Elodie Lebredonchelle, et al. 2017. "Manganese-Induced Turnover of TMEM165." *The Biochemical Journal*, March. doi:10.1042/BCJ20160910.

Potelle, Sven, Willy Morelle, **Eudoxie Dulary**, Sandrine Duvet, Dorothée Vicogne, Corentin Spriet, Marie-Ange Krzewinski-Recchi, et al. 2016. "Glycosylation Abnormalities in Gdt1p/TMEM165 Deficient Cells Result from a Defect in Golgi Manganese Homeostasis." *Human Molecular Genetics* 25 (8): 1489–1500. doi:10.1093/hmg/ddw026.

Krzewinski-Recchi, Marie-Ange, Sven Potelle, Anne-Marie Mir, Dorothée Vicogne, **Eudoxie Dulary**, Sandrine Duvet, Willy Morelle, Geoffroy de Bettignies, and François Foulquier. 2017. "Evidence for Splice Transcript Variants of TMEM165, a Gene Involved in CDG." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1861 (4): 737–48. doi:10.1016/j.bbagen.2017.01.011.

Communications par affiche :

Eudoxie DULARY, Anne-Marie MIR, François FOULQUIER and Sandrine DUVET "Modification of the N-glycosylation pathway in prostate cancer: a link between Man2C1 and carcinogenesis?". 25th Joint Glycobiology meeting, 14-16 septembre 2014. Gand, Belgique.

S. Potelle, **E. Dulary**, L. Climer, W. Morelle, Y. Guérardel, D. Vicogne, MA. Krzewinski-Recchi, S. Duvet, E. Lebredonchel, A. Klein, M. Houdou, D. Legrand, G. de Bettignies, J. Jaeken, E. Morava, V. Lupashin, G. Matthijs F. Foulquier. "Relationship between Golgi glycosylation and Golgi Mn²⁺ homeostasis: TMEM165 does the job". Gordon Research conference, 9 au 24 Mars 2017. Los Angeles, Etats-Unis.

Table des matières

A/ BIOSYNTHESE DES N-GLYCOPROTEINES	1
1) LE PROCESSUS DE N-GLYCOSYLATION	1
2) LA SYNTHÈSE DU PRECURSEUR OLIGOSACCHARIDIQUE.....	1
a) Les nucléotides-sucres et les intermédiaires lipidiques.....	1
b) Le cycle des dolichols.....	3
c) Transfert sur une protéine naissante : l'OST.....	5
3) LA MATURATION RETICULAIRE	7
a) Les Glucosidases I et II	7
b) Les acteurs du « contrôle qualité ».....	7
a. Les chaperonnes.....	8
b. Les enzymes de mise en conformation protéique.....	8
c. Les lectines	8
c) L'UDP-Glc:Glycoprotéine-Glucosyltransférase : UGGT	9
d) Le cycle CNX/CRT	10
4) LA MATURATION GOLGIENNE	11
a) ERGIC-53/VIPL/VIP-36.....	12
b) Les glycosyltransférases golgiennes.....	12
5) N-GLYCOSYLATION ET PATHOLOGIES ASSOCIEES.....	14
a) Les CDG	14
b) N-Glycosylation et cancer	16
6) LE PROCESSUS DE DEGRADATION ERAD.....	17
a) La formation du signal de dégradation	17
a. La ER Mannosidase I	17
b. EDEM	18
b) Rétrotranslocation dans le cytosol	19
c) Catabolisme	20
B/ LA MANNOSIDASE CYTOSOLIQUE ET LE CANCER DE LA PROSTATE	21
1) GENERALITES	21
a) Caractéristiques de la Man2C1	21
b) Rôles de la Man2C1 dans les processus physiologiques.....	22
a. Importance de l'expression de la Man2C1 dans la biosynthèse des N-glycoprotéines.....	22
b. Rôle de la Man2C1 dans l'apoptose	22
c. Implication de la Man2C1 dans le processus de cancérisation	23
c) Rôle dans le cancer de la prostate	24
a. Le cancer de la prostate	24
b. La Man2C1 dans le cancer de la prostate.....	25
d) Problématique et objectifs du projet de thèse	26
2) MATERIELS ET METHODES.....	27
a) Culture Cellulaire	27
b) Western Blot	28
c) Analyse structurale du précurseur oligosaccharidique par marquage métabolique au [2- ³ H] mannose.....	29
d) Analyse structurale des N-glycannes par spectrométrie de masse	30
3) RESULTATS	32
a) Etude de l'expression de la Man2C1 dans les lignées cancéreuses prostatiques.....	32
b) Etude du processus de N-glycosylation dans les lignées cancéreuses prostatiques.....	33
a. Analyse structurale des oligosaccharides solubles cytosoliques.....	33
b. Analyse du précurseur oligosaccharidique synthétisé et transféré sur les N-glycoprotéines.....	35
c. Etude du processus de maturation golgienne	37

c)	Etude de l'influence de l'expression de la Man2C1 sur l'activation de la voie PI3K/Akt	39
a.	Etude de l'activation de Akt en fonction de l'expression de la Man2C1 dans les lignées cancéreuses prostatiques	39
b.	Influence de l'expression de la Man2C1 sur l'activation de Akt dans les lignées HeLa	40
c.	Etude de l'influence de l'augmentation d'expression de la Man2C1 sur l'activation de la voie Akt dans les lignées cancéreuses prostatiques.....	41
d)	Etude de l'influence de l'activité catalytique de la Man2C1 sur l'activation de la voie PI3K/Akt.....	43
a.	Dans les lignées cancéreuses prostatiques.....	43
b.	Dans les lignées HeLa surexprimant la Man2C1	45
e)	Etude des variations d'expression de la Man2C1 et du processus de N-glycosylation dans des biopsies de patients atteints du cancer de la prostate	47
a.	Etude de l'expression traductionnelle de la Man2C1 dans des parties saines et tumorales de patients.....	47
b.	Etude de la N-glycosylation dans les biopsies de patients	48
4)	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	49

C/ ANALYSE FONCTIONNELLE DE GDT1P CHEZ SACCHAROMYCES CEREVISIAE..... 54

1)	GENERALITES	54
a)	La N-glycosylation	54
a.	Le processus de N-glycosylation chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	54
b.	Un modèle d'étude de la N-glycosylation : l'invertase	56
b)	Homéostasie cellulaire chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	58
a.	L'homéostasie calcique et les transporteurs	58
•	L'homéostasie calcique	58
•	Les transporteurs de Ca^{2+}	59
b.	L'homéostasie du Mn^{2+} et ses transporteurs associés	60
•	L'homéostasie du Mn^{2+}	60
•	Les transporteurs de manganèse	60
•	La régulation de l'expression des transporteurs de Mn^{2+}	61
c.	Pmr1p	62
•	Généralités	62
•	Mutants pmr1p	62
c)	TMEM165-CDG	63
a.	Topologie et domaines	63
b.	TMEM165-CDG	64
c.	L'orthologue fonctionnel de TMEM165 chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : Gdt1p	66
d)	Problématique et Objectifs.....	68
2)	TRAVAUX PERSONNELS	69
a)	Introduction	69
b)	Travaux de recherche	69
a.	La suppression du défaut de glycosylation observé dans une souche $\Delta pmr1$ par le Ca^{2+} dépend de Gdt1p.....	69
b.	La fonction de Gdt1p dans la glycosylation est dépendante de la fonction de pmr1p.	70
c.	La fonction de Pmr1p conditionne l'expression de Gdt1p	71
d.	Quantification du manganèse dans les différentes souches de levure	73
e.	Analyse structurale des polymannanes issus des différentes souches WT/gdt1 Δ /pmr1 Δ /gdt1 Δ pmr1 Δ en présence de Ca^{2+} et/ou Mn^{2+}	74
f.	Etude de l'implication des motifs EXGDK/R dans la fonction de gdt1p.....	77
c)	Publications.....	79
d)	Discussion	80

Index des figures et des tableaux

Figure 1: Voies simplifiées de biosynthèse des nucléotides-sucres et intermédiaires lipidiques associés.	2
Figure 2: Structure du précurseur oligosaccharidique	3
Figure 3: Le cycle des Dolichols	4
Figure 4 : Transfert co-traductionnel du précurseur oligosaccharidique sur la séquence consensus Asn-X-Ser/Thr par l'Oligosaccharyltransférase	6
Figure 5: Cycle Calnexine/Calréticuline	10
Figure 6: Les différents types de structures obtenues par le processus de maturation golgienne	11
Figure 7: La maturation golgienne	14
Figure 8 : Translocation de la glycoprotéine à travers la membrane du RE et les différents partenaires de ce transport (adapté d'après Wang et Ng, 2008).....	19
Figure 9: Le processus de dégradation ERAD	20
Figure 10: Activité catalytique et produit de la Man2C1.....	21
Figure 11 : Domaines fonctionnels de la Man2C1.....	22
Figure 12: Mécanisme d'activation de la voie PI3K/Akt par la Man2C1 via l'inhibition de l'activité PIP3 phosphatase de PTEN (proposé par He et al., 2011)	25
Figure 13: Etude de l'expression traductionnelle de la Man2C1 dans les lignées cancéreuses prostatiques	32
Figure 14: Analyse des oligosaccharides solubles par spectrométrie de masse de type MALDI-Tof dans les lignées cancéreuses prostatiques.....	33
Figure 15 : Analyse des oligosaccharides solubles par spectrométrie de masse de type MALDI-Tof dans les lignées cancéreuses prostatiques après 48h de traitement en présence de SW.....	34
Figure 16: Analyse par marquage métabolique au mannose tritié du précurseur oligosaccharidique synthétisé et transféré sur les N-glycoprotéines en cours de synthèse	36
Figure 17: Analyse des N-glycannes par spectrométrie de masse de type MALDI-Tof.....	38
Figure 18: Etude de l'expression traductionnelle de la Man2C1 et de l'activation de la voie PI3K/Akt dans les lignées cancéreuses prostatiques.....	39
Figure 19: Analyse de l'expression traductionnelle de la Man2C1 et de l'activation de la voie PI3K/Akt dans des lignés HeLa surexprimant la Man2C1	40
Figure 20: Analyse par Western Blot de l'influence de la surexpression de la Man2C1 sur l'activation de la voie PI3K/Akt.....	42
Figure 21: Etude de l'activation de Akt avec ou sans traitement à la swainsonine dans les lignées DU145, PC-3 et LNCaP	44
Figure 22: Etude de l'activation de Akt avec ou sans traitement à la swainsonine dans les lignées HeLa Rev 2, Rev 3 et NAM.....	46
Figure 23: Analyse par Western Blot de l'expression de la Man2C1 dans des biopsies de parties saines et tumorales de patients atteints d'un cancer de la prostate	47
Figure 24 : Profil glycanique des N-glycoprotéines issues de parties saines et tumorales de biopsies de patients	48
Figure 25 : Comparaison de la maturation glycanique golgienne chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> et chez l'Homme.....	56
Figure 26 : Représentation schématique d'un profil de migration de l'invertase.....	58

Figure 27: L'homéostasie calcique et les transporteurs de Ca ²⁺ chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	59
Figure 28 : les transporteurs de Mn ²⁺ chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	61
Figure 29 : les différents mutants de pmr1p.....	63
Figure 30: Prédiction de la topologie de TMEM165 et motifs conservés	64
Figure 31: Mutations protéiques de TMEM165 identifiées chez 6 patients atteints d'un TMEM165-CDG.....	65
Figure 32: Alignement des séquences protéiques entre TMEM165 et Gdt1p	67
Figure 33: rôles hypothétiques de GDT1/TMEM165 dans l'homéostasie golgienne	68
Figure 34 : Profil de glycosylation de l'invertase en présence de concentrations croissantes en CaCl ₂ (10 mM à 300 mM)	70
Figure 35: Analyse du profil de glycosylation de l'invertase dans les souches Δpmr1 et Δgdt1Δpmr1 après complémentation avec les mutants de pmr1p	71
Figure 36: Etude de l'expression de gdt1p en présence des différents mutants de pmr1p. ..	72
Figure 37: Influence de l'exposition au MnCl ₂ (1 mM) sur l'expression de gdt1p.	72
Figure 38 : Quantification du Mn ²⁺ total présent dans les différentes souches par ICP-MS..	73
Figure 39: Analyse des spectres ¹ H-RMN des différentes souches cultivées dans un milieu YPD	74
Figure 40: Spectres 1H-RMN des souches Δgdt1 / Δpmr1 et Δgdt1Δpmr1 cultivées en présence de 500 mM CaCl ₂ et/ou 50 μM MnCl ₂	76
Figure 41: Quantification par GC/MS du nombre de résidus de Mannose par chaîne dans les souches WT / Δgdt1 / Δpmr1 et Δgdt1Δpmr1 dans les différentes conditions de culture	76
Figure 42: Profil de migration de l'invertase dans une souche Δgdt1 transformée avec les différents mutants de gdt1p.	77
Figure 43: Profil de migration de l'invertase dans une souche Δgdt1Δpmr1 complétementée par pmr1p-D53A ou pmr1p-Q783A et par les différents mutants de gdt1p.	78
Figure 44 : Hypothèses de transport de gdt1p et pmr1p.....	81
Figure 45: Hypothèse de transport de gdt1p et de pmr1p dans la lumière de l'appareil de Golgi	81

A/ Biosynthèse des N-glycoprotéines

1) Le processus de N-Glycosylation

Les N-Glycoprotéines sont synthétisées dans 2 compartiments subcellulaires, le *Reticulum* endoplasmique (RE) et l'appareil de Golgi. La première étape a lieu dans le RE et consiste en la synthèse et le transfert d'un oligosaccharide précurseur sur une protéine en cours de synthèse. Cette étape permet la mise en place d'un contrôle qualité assurant le processus de mise en conformation des N-glycoprotéines nouvellement synthétisées. La deuxième étape, étape de maturation de la partie glycanique, est réalisée principalement dans l'appareil de Golgi. Ces 2 étapes nécessitent l'intervention de nombreuses enzymes, les glycosidases et les glycosyltransférases dont la fonction dépend du substrat, de la liaison mais également de l'environnement réticulaire ou golgien.

2) La synthèse du précurseur oligosaccharidique

a) Les nucléotides-sucres et les intermédiaires lipidiques

L'assemblage du précurseur oligosaccharidique nécessite trois nucléotides-sucres : l'UDP-GlcNAc, le GDP-Man et l'UDP-Glc, mais également des intermédiaires lipidiques : le Dolichol-P, Dolichol-P-Glc et le Dolichol-P-Man. Ces composés sont synthétisés à partir de différentes voies métaboliques résumées dans la Figure 1.

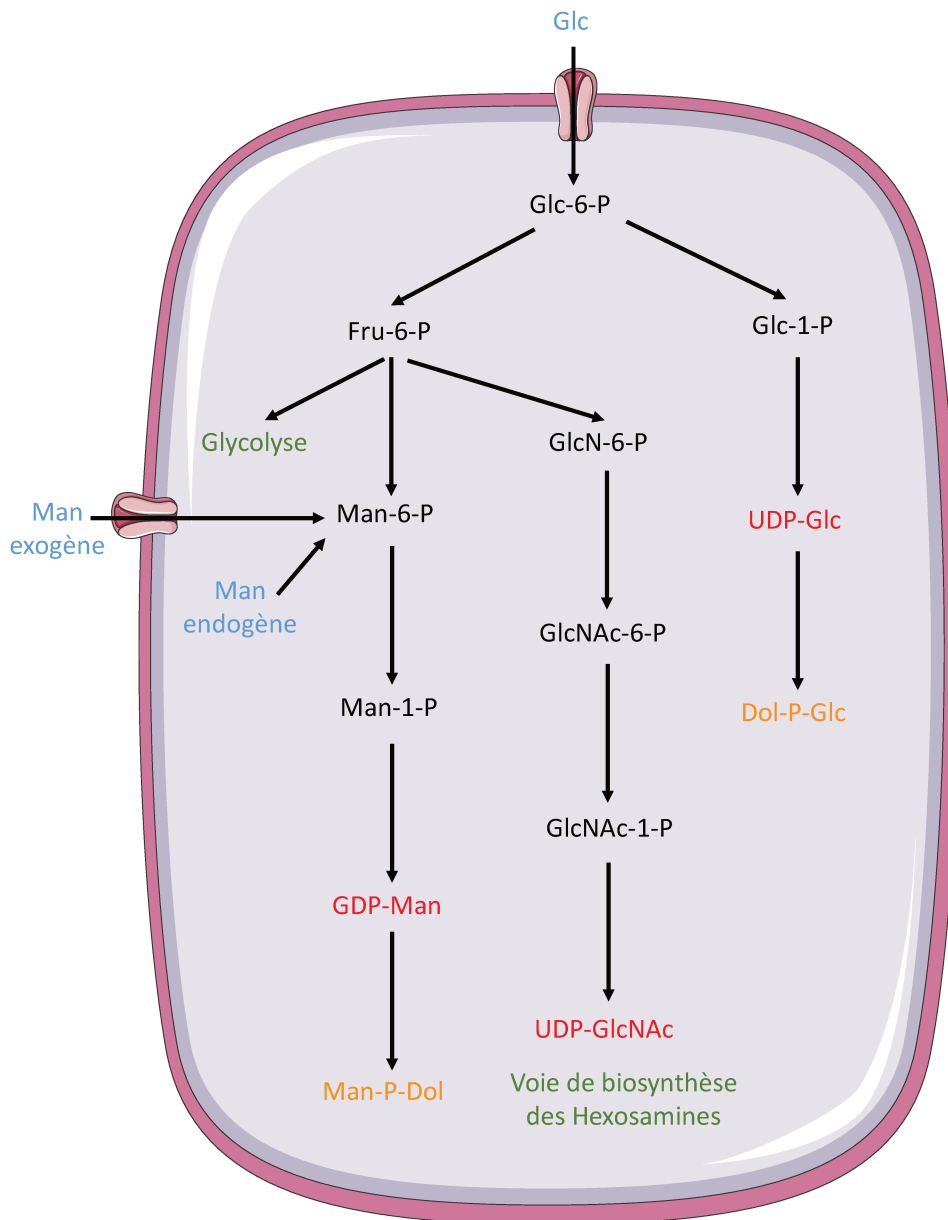


Figure 1: Voies simplifiées de biosynthèse des nucléotides-sucres et intermédiaires lipidiques associés.

Le glucose (Glc) est à l'origine des différentes voies métaboliques. En effet, le Glc est métabolisé en Glc-6-P puis en Glc-1-P, qui pourra réagir avec l'UTP pour former l'UDP-Glc (Daran et al. 1995). Le Glc-6-P est également à l'origine du GDP-Man et de l'UDP-GlcNAc grâce à la conversion du Glc-6-P en Fru-6-P dans la première étape de la glycolyse. Ce Fru-6-P peut, par conversion, donner le Man-6-P, précurseur du GDP-Man et du Dol-P-Man, mais il peut également, via la voie de biosynthèse des hexosamines donner l'UDP-GlcNAc (Burda and Aebi 1999).

Le GDP-Man ainsi que le Dol-P-Man peuvent également dériver directement du Man (Alton et al. 1998) provenant de 2 origines distinctes : (i) une origine exogène via des transporteurs spécifiques du Man (Panneerselvam and Freeze 1995) ou des transporteurs du Glc (Rodríguez et al. 2005) ou (ii) une origine endogène par recyclage du Man à partir de la dégradation des N-glycoprotéines mal conformées (Panneerselvam and Freeze 1995).

b) Le cycle des dolichols

Le cycle des dolichols permet la synthèse d'un précurseur oligosaccharidique composé de 2 résidus de N-AcétyleGlucosamine (GlcNAc), 9 résidus de Mannose (Man) et 3 résidus de Glucose (Glc) (Figure 2).

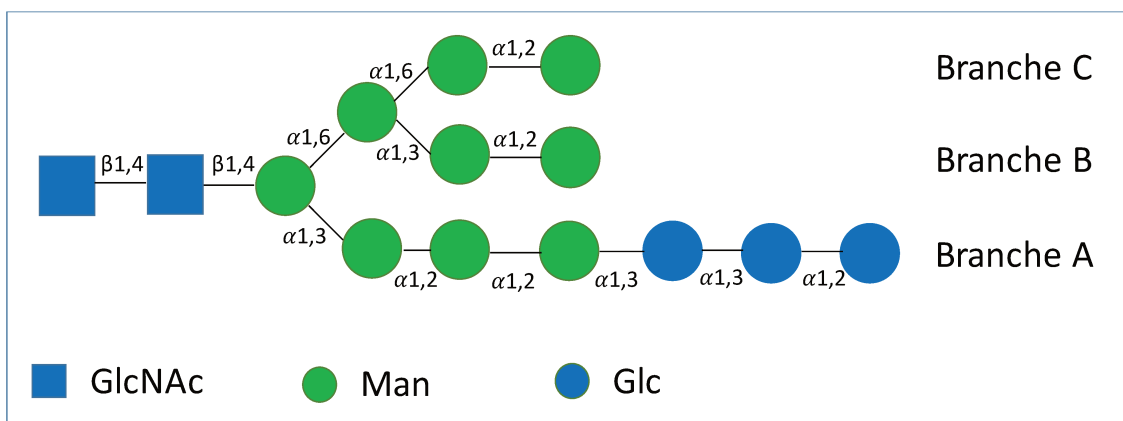


Figure 2: Structure du précurseur oligosaccharidique

Ce précurseur oligosaccharidique est lié sur un lipide de type polyisoprénique ancré dans la membrane du RE, le Dolichol retrouvé sous forme phosphorylé (Dol-P). C'est sur ce composé que les différents monosaccharides seront ajoutés séquentiellement via le cycle des Dolichols. (Kornfeld and Kornfeld 1985) (Figure 3).

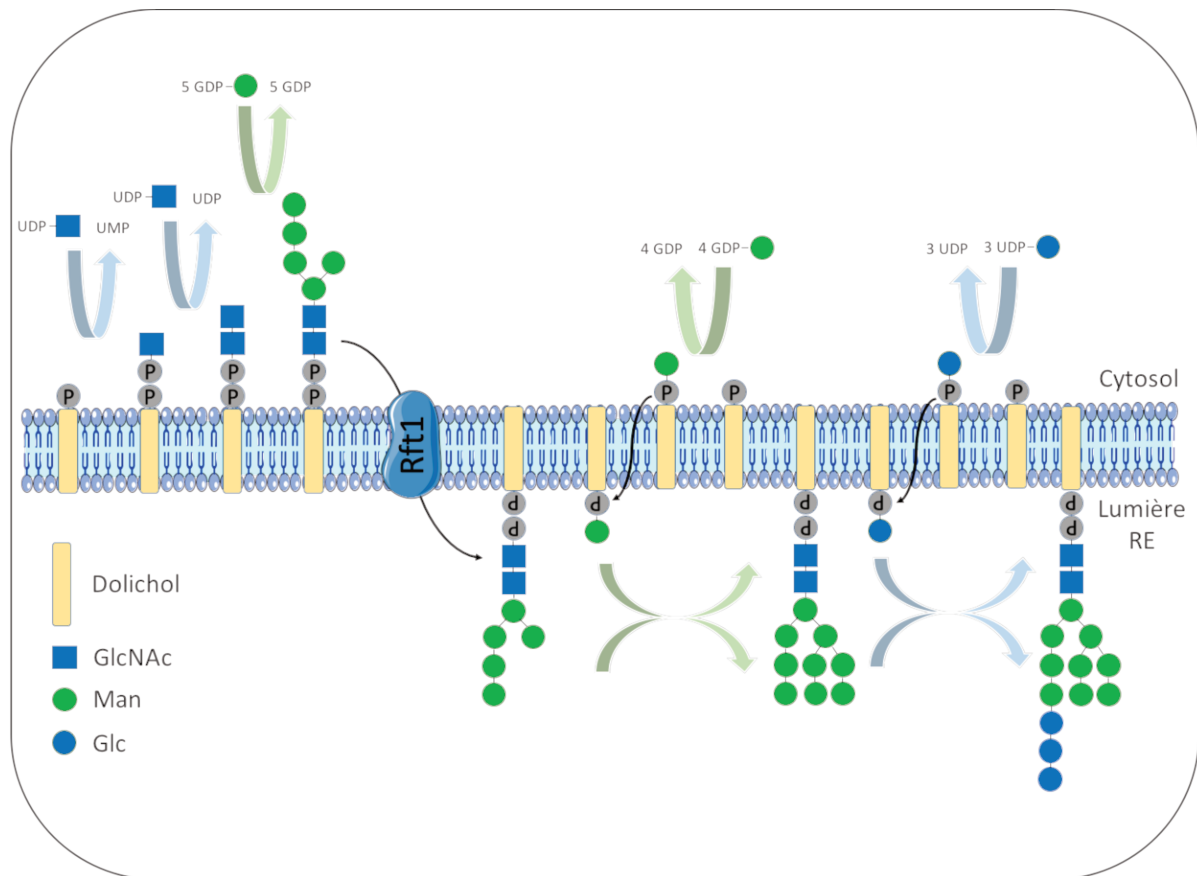


Figure 3: Le cycle des Dolichols

Le modèle levure a été très largement utilisé pour permettre l'identification des enzymes impliquées dans le cycle des dolichols ainsi que leurs fonctions : les ALG (Asparagine-Linked Glycosylation) (Burda and Aebi 1999). La première enzyme intervenant dans le cycle des dolichols est ALG7, une GlcNAc-1-phosphotransférase qui va permettre le transfert de GlcNAc-P à partir de l'UDP-GlcNAc sur le Dol-P pour aboutir au Dol-P-P-GlcNAc. Un second résidu de GlcNAc va être transféré à partir d'UDP-GlcNAc par un complexe hétérodimérique ALG13/ALG14. Le GlcNAc₂-P-P-Dol subit l'action de diverses mannosyltransférases-GDP-Man dépendantes pour former le Man₅-GlcNAc₂-P-P-Dol sur la face cytoplasmique du RE. A partir de ce composé, l'ajout des résidus de mannose ne pourra être réalisé qu'au niveau de la face luminale du RE (Snider and Rogers 1984; Abeijon and Hirschberg 1990). Le Man₅GlcNAc₂-P-P-Dol va subir une étape de translocation à travers la membrane du RE grâce à une flippase, Rft1 (J. Helenius et al. 2002). Chez l'Homme, une déficience en Rft1 conduit à l'accumulation de Man₅-GlcNAc₂-P-P-Dol et à une hypoglycosylation (Vleugels et al. 2009). La synthèse de l'oligosaccharide précurseur va

ensuite se poursuivre dans la lumière réticulaire par l'ajout de résidus de mannose grâce à différentes mannosyltransférases à partir de Man-P-Dol (Snider and Rogers 1984). Finalement, 2 glucosyltransférases vont permettre l'ajout de trois résidus de glucose à partir de Dol-P-Glc (Staneloni, Ugalde, and Leloir 1980) afin d'obtenir le précurseur final de type $\text{Glc}_3\text{-Man}_9\text{-GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ (Burda and Aebi 1999) (Figure 3). Ce précurseur sera ensuite transféré « en bloc » sur une protéine en cours de synthèse par l'oligosaccharyltransférase (OST) en libérant le Dol-P-P.

c) Transfert sur une protéine naissante : l'OST

L'OST va permettre le transfert du précurseur oligosaccharidique de type $\text{Glc}_3\text{-Man}_9\text{-GlcNAc}_2$ sur un résidu d'Asparagine (Asn) d'une protéine dans une séquence consensus de type Asn-X-Ser/Thr où X peut représenter tous les acides aminés sauf la proline (Marshall 1972). Plus récemment, Sun *et al.* (2015) ont suggéré l'existence de nouveaux sites potentiels de N-glycosylation Asn-X-Cys et Asn-X-Val (Sun and Zhang 2015).

L'OST est un complexe protéique dont la composition a été largement décrite chez la levure (Knauer and Lehle 1999; Yan, Prestwich, and Lennarz 1999; Schwarz, Knauer, and Lehle 2005). L'OST est associée au translocon Sec61, permettant l'entrée de la protéine en cours de synthèse dans le RE en s'associant aux ribosomes (Harada et al. 2009) (Figure 4).

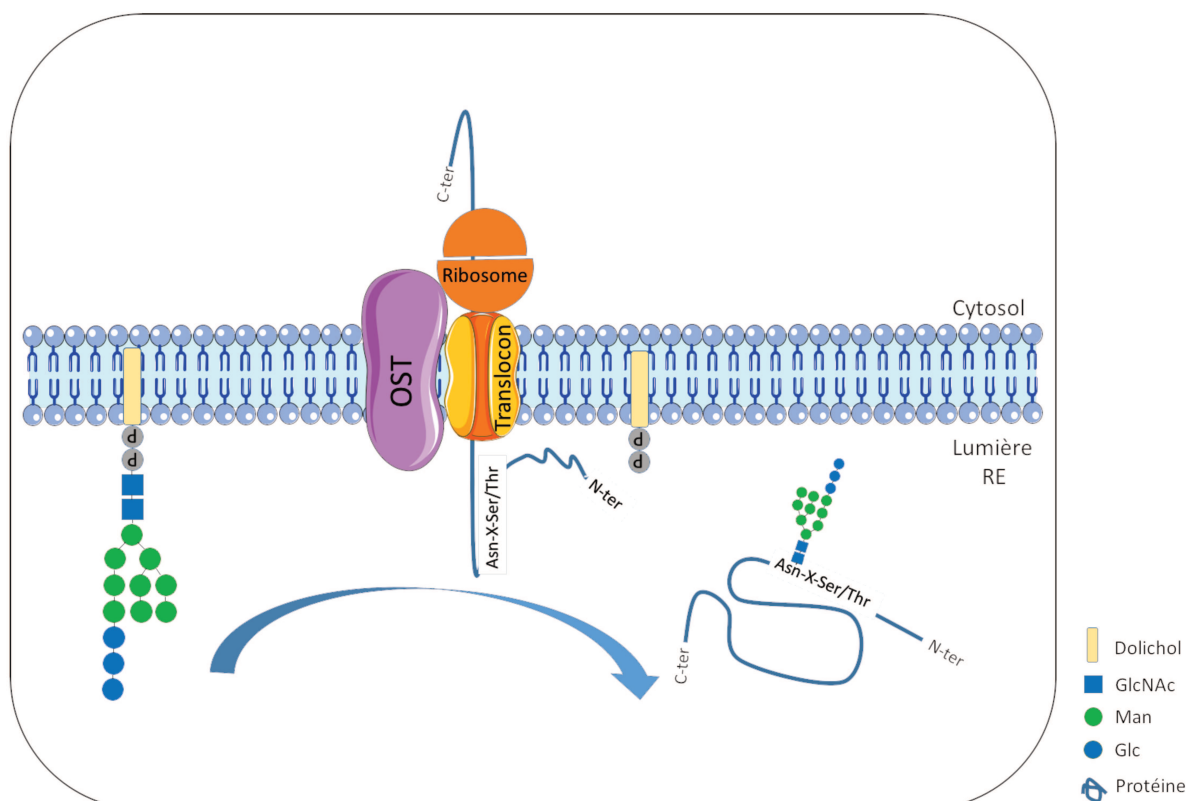


Figure 4 : Transfert co-traductionnel du précurseur oligosaccharidique sur la séquence consensus Asn-X-Ser/Thr par l'Oligosaccharyltransférase

Respectivement, l'OST est composé de 8 sous-unités chez la levure: Ost1p, Ost2p, Wbp1p, Swp1p, Stt3p, Ost3/Ost6p, Ost4p et Ost5p (Kelleher and Gilmore 2006). Chez la levure, il existe 2 isoformes de l'OST par l'existence de 2 complexes, l'un contenant Ost6 et l'autre contenant Ost3 (Schwarz, Knauer, and Lehle 2005).

Durant l'évolution on observe la disparition d'une sous-unité, Ost5p chez les mammifères mais une conservation des 7 autres sous-unités : ribophorine I, DAD1, OST48, ribophorine II, STT3A ou 3B, N33/IAP et OST4. Chez les mammifères, on retrouve 2 isoformes de l'OST, STT3A et STT3B qui présentent des spécificités d'action et de substrat. En effet, l'isoforme STT3A permet le transfert co-traductionnel du précurseur oligosaccharidique alors que STT3B va permettre un transfert post-traductionnel du précurseur oligosaccharidique sur les sites de glycosylation oubliés par STT3A (Ruiz-Canada, Kelleher, and Gilmore 2009; Shrimal, Cherepanova, and Gilmore 2015).

Chaque sous-unité de l'OST présente des fonctions différentes résumées dans le tableau 1.

Levure	Homme	Fonction
Ost1p	Ribophorine I	Reconnaissance du substrat
Swp1p	Ribophorine II	Stabilisation du complexe de l'OST
Wbp1p	OST48	Stabilisation du complexe de l'OST
Ost2p	DAD1	Stabilisation du complexe de l'OST
Ost3p/Ost6p	N33/IAP	Interaction avec la partie protéique
Stt3p	STT3A/STT3B	Transfert co-/post- traductionnel
Ost4p	OST4	Stabilisation de l'OST
Ost5p		Interaction avec Ost1p et Stt3p

Tableau 1 : Les différentes sous-unités de l'OST chez la levure et chez l'Homme et fonctions associées

Les glycoprotéines ainsi synthétisées vont ensuite subir une étape de mise en conformation de leur partie protéique ainsi qu'un contrôle qualité.

3) La maturation réticulaire

a) Les Glucosidases I et II

La maturation réticulaire est une étape essentielle dans le processus de N-glycosylation puisqu'elle va permettre de veiller à une mise en conformation correcte des N-glycoprotéines en partie via leurs résidus glycaniques. Cette maturation est réalisée par diverses enzymes comme les glucosidases ou encore les protéines chaperonnes.

La première étape se déroule immédiatement après le transfert du précurseur oligosaccharidique sur le résidu d'asparagine de la protéine et consiste en un clivage du dernier résidu de Glc lié en $\alpha 1,2$ par la Glucosidase I (Hubbard and Robbins 1979). La Glucosidase I est une protéine transmembranaire de 82 kDa, présentant 1 seul domaine transmembranaire, une courte extrémité N-terminale cytosolique et un ectodomaine luminal portant l'activité glucosidase. La N-glycoprotéine va ensuite pouvoir subir l'action de la Glucosidase II qui va dans un premier temps cliver le second résidu de Glc lié en $\alpha 1,3$, pour donner le $\text{Glc}_1\text{-Man}_9\text{-Gn}_2$, puis dans un deuxième temps, va cliver le dernier résidu de Glc lié en $\alpha 1,3$ après le passage de la protéine dans le cycle Calnexine/Calréticuline qui va conduire à une structure non glucosylée de type Man_9Gn_2 . La Glucosidase II est une protéine soluble composée de 2 chaînes α et β , respectivement de 107 et 54 kDa (A. Helenius and Aebi 2004). Les Glucosidases I et II sont inhibées par la castanospermine et par les dérivés alcaloïdes indolizidine polyhydroxylés qui permettent donc d'empêcher la maturation réticulaire et l'entrée des glycoprotéines néosynthétisées dans le cycle Calnexine/Calréticuline (Elbein 1983).

b) Les acteurs du « contrôle qualité »

Dans le RE, des chaperonnes et des enzymes vont permettre la mise en conformation des protéines nouvellement synthétisées. Pour les N-glycoprotéines, des lectines vont également interagir avec la partie glycanique et réaliser un « contrôle qualité ».

a. Les chaperonnes

BiP :

La chaperonne BiP ou « Binding Immunoglobulin Protein » est un membre de la famille des « Heat Shock Protein » (HSP). Son activité catalytique est dépendante de l'ATP. En effet, l'hydrolyse de l'ATP permet la fixation de la chaperonne sur les acides aminés aromatiques ou hydrophobes des N-glycoprotéines nouvellement synthétisées et ainsi permettre la mise en conformation. L'échange ADP-ATP permet la libération de la protéine conformée (Schmid et al. 1994; Hendershot 2004).

Erp57 :

La protéine Erp57 est un homologue de la « protein disulfide isomerase » (PDI) et est caractérisée par la présence de quatre domaines thioredoxin-like. Cette protéine permet une oxydation ainsi qu'une isomérisation des ponts disulfures en interagissant à la fois avec les lectines et les N-glycoprotéines néosynthétisées (Molinari and Helenius 1999).

b. Les enzymes de mise en conformation protéique

PPI (Peptidyl Prolyl Isomerase):

C'est une enzyme qui facilite l'isomérisation des liaisons peptidiques en *cis* ou en *trans* entre un acide aminé quelconque et une proline juxtaposée (Tannous et al. 2015).

PDI (Protein Disulfide Isomerase) :

Cette enzyme est caractérisée par son activité oxydoréductase qui permet une réduction, une oxydation ou une isomérisation des ponts disulfures (Määttänen et al. 2010).

c. Les lectines

La calnexine et la calréticuline :

Dans le RE, deux lectines possèdent un rôle central dans la mise en conformation spécifique des N-glycoprotéines, la calnexine (CNX), protéine transmembranaire de type I, et son homologue soluble, la calréticuline (CRT). Elles possèdent toutes deux un domaine de fixation du calcium dans leur extrémité C-terminale qui permet leur rétention dans la lumière du RE. Ces 2 lectines possèdent également une séquence signale de rétention réticulaire, la séquence KDEL (Booth and Koch 1989).

La CNX et la CRT présentent une grande spécificité de substrat. En effet, elles possèdent un domaine organisé en sandwich β qui porte l'activité lectinique et permet l'interaction avec la partie glycanique qui doit être composée d'un résidu de Glc ainsi que de trois résidus de mannose sur la branche A (Figure 2) (Vassilakos et al. 1998).

La CNX et la CRT possèdent également un troisième domaine appelé domaine P, au niveau de leur extrémité N-terminale. Ce domaine est riche en résidu de Proline et permet l'association des deux lectines avec deux protéines impliquées dans la mise en conformation, la Cyclophiline B (Kozlov et al. 2010) et Erp57 (Jessop et al. 2009). C'est l'interaction CNX/CRT-Erp57 qui est impliquée dans le cycle Calnexine/Calréticuline.

La malectine :

Cette lectine, ancrée dans la membrane du RE, se fixe spécifiquement aux structures de type $\text{Glc}_2\text{-Man}_9\text{-Gn}_2$ issues du clivage du premier résidu de Glc par la Glucosidase I (Schallus et al. 2010). Son rôle dans le processus de N-glycosylation n'est pas encore bien établi mais des études tendent à montrer son implication potentielle dans le recrutement de la Glucosidase II mais également dans la prévention de l'agrégation des protéines néosynthétisées dans le RE (Schallus et al. 2008).

c) L'UDP-Glc:Glycoprotéine-Glucosyltransférase : UGGT

L'UGGT est une protéine soluble résidente du RE de 180 kDa. Elle est composée de deux domaines, un domaine en position N-terminale permettant la reconnaissance de la partie glycanique des N-glycoprotéines mal conformées et un domaine en position C-terminale portant l'activité catalytique. L'UGGT reconnaît le noyau pentasaccharidique du N-glycane des N-glycoprotéines n'ayant pas acquis leur conformation native (Trombetta and Parodi 2003), mais également les séquences hydrophobes de la partie protéique à proximité du N-glycane. Comme nous le verrons ci-après, l'UGGT est intimement impliquée dans le cycle calnexine/calréticuline puisqu'elle permet, en ajoutant un résidu de Glc à partir d'UDP-Glc, l'entrée d'une glycoprotéine immature dans un nouveau cycle de mise en conformation.

d) Le cycle CNX/CRT

Après l'action des Glucosidases I et II, la structure de type $\text{Glc}_1\text{-Man}_9\text{-Gn}_2$ portée par la N-glycoprotéine est reconnue par les lectines CNX ou CRT. L'association CNX/CRT permet le recrutement de Erp57 au sein de complexe. Cette dernière assure ainsi l'étape de mise en conformation de la N-glycoprotéine. Le retrait du Glc en position terminale par la Glucosidase II permet une dissociation du complexe CNX/CRT-Erp57 de la glycoprotéine.

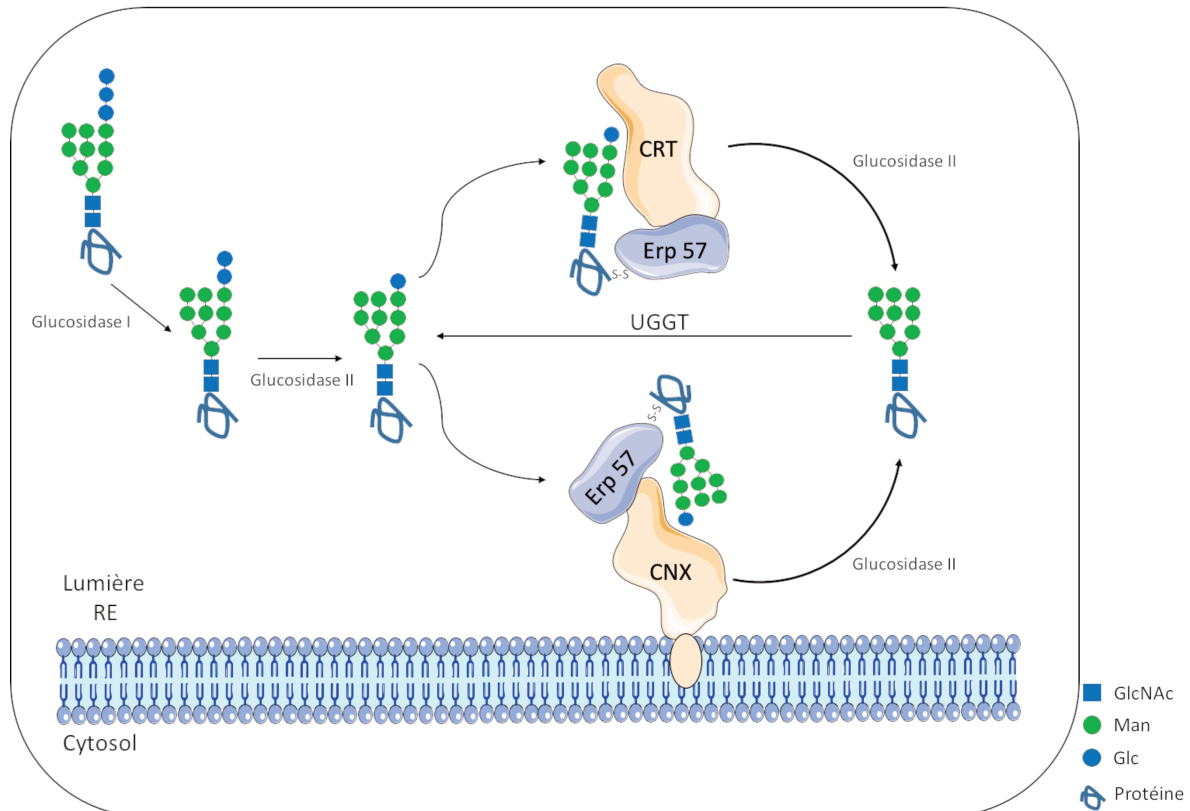


Figure 5: Cycle Calnexine/Calréticuline

La glycoprotéine qui présente une structure glycanne de type Man_9Gn_2 aura alors deux destinées possibles :

- Soit la protéine possède sa conformation native, dans ce cas, elle va subir l'action de la ER mannosidase I qui va cliver le résidu de Mannose lié en $\alpha 1,2$ sur la branche B (Figure 2) et sera envoyée vers l'appareil de Golgi pour subir la maturation de sa partie glycanne.
- Soit la N-glycoprotéine demeure mal conformée, elle pourra être à nouveau glucosylée par l'UGGT, et subir un nouveau cycle de mise en conformation (Figure 5).

Cependant, malgré la présence des divers acteurs favorisant l'étape de mise en conformation des N-glycoprotéines, 30% d'entre elles n'arriveront pas à acquérir une conformation native et seront dégradées via un processus spécifique, le processus ERAD (« Endoplasmic reticulum-associated degradation ») (Schubert et al. 2000).

4) La maturation golgienne

Les N-glycoprotéines natives sont envoyées dans l'appareil de Golgi afin de subir la maturation de leur partie glycanique grâce à l'action de glycosidases et de glycosyltransférases qui conduiront à la diversité des N-glycannes représentée par trois types de N-glycannes : les types oligomannosidique, hybride et complexe (Figure 6).

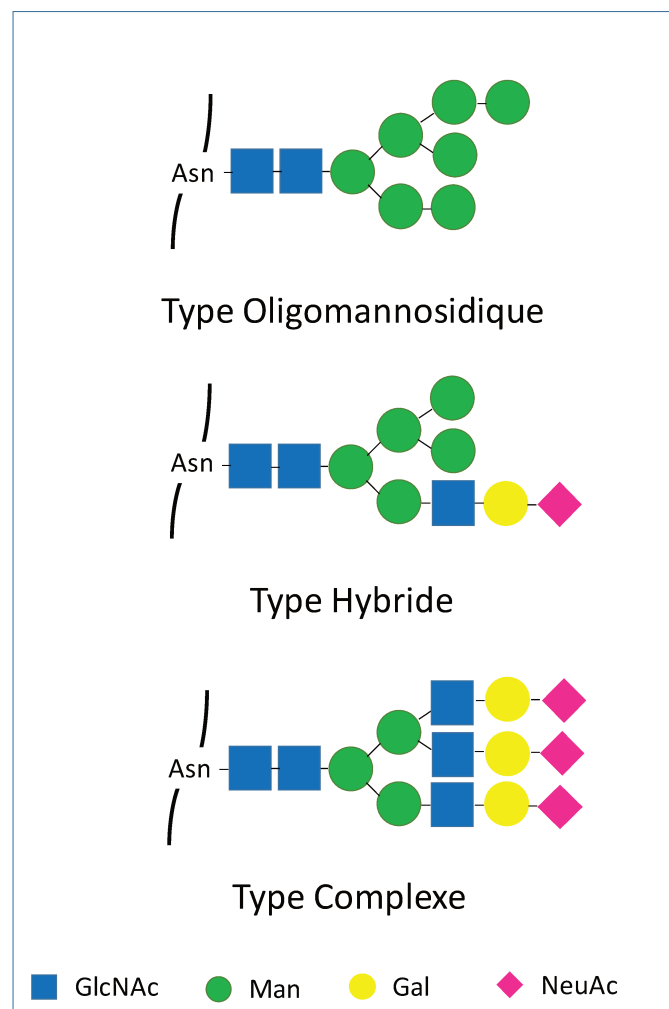


Figure 6: Les différents types de structures obtenues par le processus de maturation golgienne

a) ERGIC-53/VIPL/VIP-36

La maturation golgienne débute dans un compartiment intermédiaire, l'ERGIC (« ER/Golgi intermediate compartment »). En effet, les N-glycoprotéines interagissent avec les lectines ERGIC-53, VIPL et VIP-36, protéines transmembranaires de type I, possédant un domaine luminal d'interaction avec les glycanes (Kamiya et al. 2008). Ces lectines sont calcium-dépendantes et possèdent des similarités de structure au niveau de leurs sites de fixation des N-glycanes, mais on observe néanmoins une différence dans la composition des N-glycanes que ces différentes protéines peuvent fixer. En effet, VIP-36 et VIPL vont préférentiellement interagir avec des oligosaccharides déglucosylés sur la branche A alors que ERGIC-53 peut fixer, à la fois, des glycanes glucosylés et déglucosylés (Kamiya et al. 2008).

Ces lectines servent de cargos et permettent aux glycoprotéines d'être transportées par l'intermédiaire de vésicules de type COP II, intervenant dans le transport antérograde, jusqu'au *Cis*-Golgi où débute la maturation de leur partie glycanique (Schekman and Orci 1996).

b) Les glycosyltransférases golgiennes

Le processus de maturation de la partie glycanique est réalisé de façon séquentielle en fonction de la localisation des différentes glycosylhydrolases et glycosyltransférases dans les différents saccules de l'appareil de Golgi (Figure 7).

Les glycosylhydrolases sont classées, selon la classification CaZy (Carbohydrate-Active enZYmes) (Henrissat and Bairoch 1996), en fonction de leur capacité à cliver les liaisons, soit en $\alpha 1,2$ uniquement, dans ce cas on parle de glycosylhydrolases de la famille GH47, soit de leur capacité à cliver les liaisons en $\alpha 1,2/\alpha 1,3$ ou $\alpha 1,6$, dans ce cas on parle de glycosylhydrolases de la famille GH38.

Les glycosyltransférases (dont les gènes représentent 1 à 2% du génome) assurent le transfert de monosaccharides à partir de nucléotides-sucres. Les glycosyltransférases golgiennes sont des protéines transmembranaires de type II possédant leur domaine catalytique en position C-terminale, du côté luminal. Elles présentent une spécificité de substrat vis-à-vis du nucléotide-sucres donneur, de la structure glycanique acceptrice et de la liaison.

La maturation golgienne débute dans le *Cis*-Golgi par l'action de la Golgi mannosidase I appartenant à la famille GH47, caractérisée par sa capacité à cliver des liaisons en $\alpha 1,2$ et par son inhibition spécifique par des analogues pyraniques du mannose tels que la kifunensine. L'action de cette enzyme conduit à la structure $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ encore appelée Man_5 « branché ». La glycoprotéine est ensuite envoyée vers le Golgi-*median* où une première glycosyltransférase, la GlcNAc transférase I va pouvoir agir. Cette enzyme va ajouter un résidu de GlcNAc en $\beta 1,2$ sur le résidu de mannose lié en $\alpha 1,3$. C'est l'ajout de ce résidu de GlcNAc qui donne le signal d'action de la mannosidase golgienne II (Schachter 1991).

La Golgi- α -mannosidase II appartenant à la famille GH38, est caractérisée par sa capacité à cliver les liaisons en $\alpha 1,2$; $\alpha 1,3$ et $\alpha 1,6$ ainsi que sa capacité à être inhibée par des analogues furaniques du mannose tels que la swainsonine. L'action de cette enzyme permet de discriminer les structures de type hybride et complexe (Moremen and Robbins 1991).

Les N-glycannes de type complexe pourront alors subir l'action de plusieurs GlcNAc transférases, les GlcNAcT-IV, GlcNAcT-V et GlcNAcT-VI, qui donneront naissance à des structures, bi- ; tri- ; tétra- ou penta-antennées mais également à des structures présentant un résidu de GlcNAc intercalaire grâce à l'action de la GlcNAcT-III.

Le résidu de GlcNAc, lié à l'Asn, pourra être fucosylés par une $\alpha 1,6$ -fucosyltransférase.

Les β -galactosyltransférases, localisées dans le *Trans*-Golgi, permettent l'ajout des résidus de Galactose en $\beta 1,4$ sur un résidu de GlcNAc. La dernière étape consiste en l'ajout des sucres périphériques représentés par les résidus de fucose en $\alpha 1,3$ et $\alpha 1,4$ et les résidus d'acides sialiques sur les galactoses terminaux par l'intermédiaire de $\alpha 2,3$; $\alpha 2,6$ ou $\alpha 2,8$ sialyltransférases.

Les glycoprotéines pourront alors être envoyées vers leur destination finale.

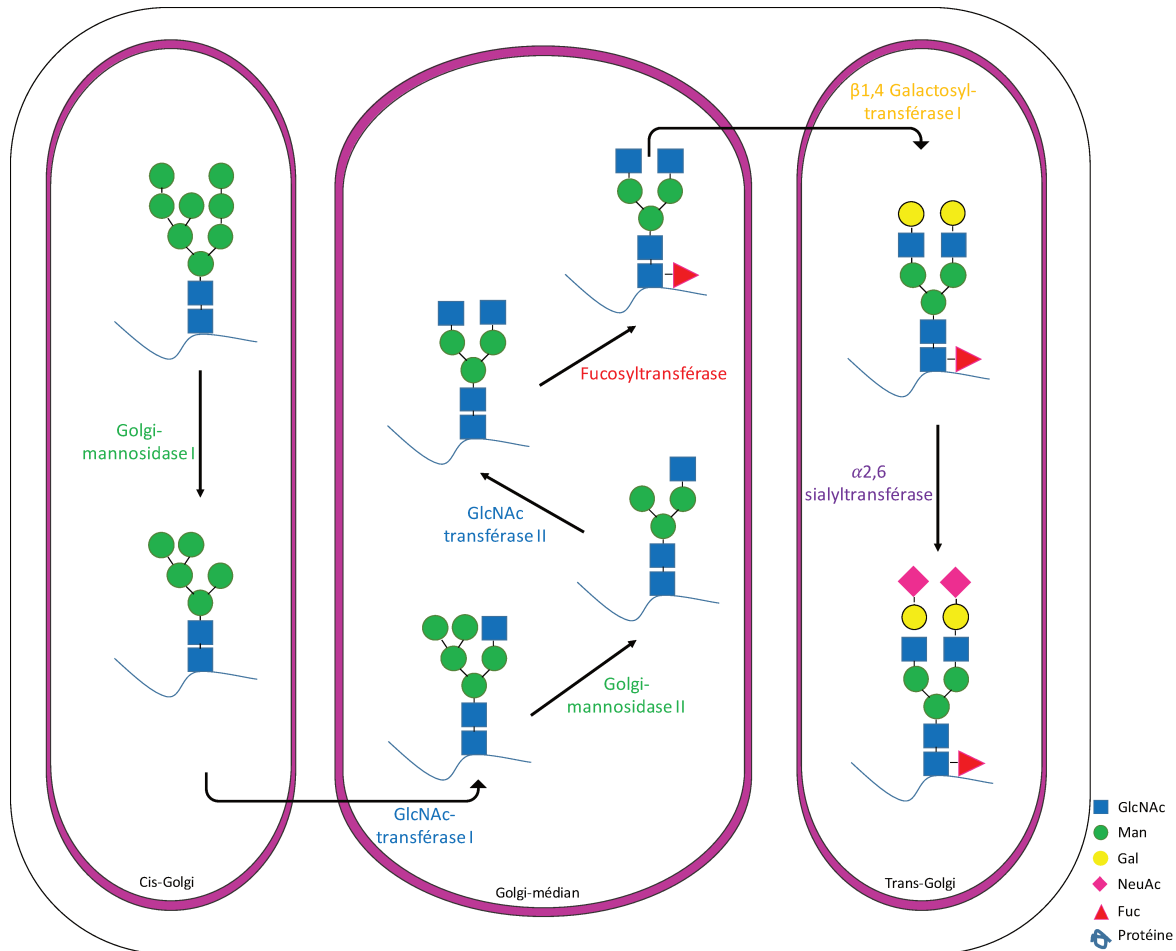


Figure 7: La maturation golgienne

5) N-glycosylation et pathologies associées

a) Les CDG

Les « Congenital Disorders of Glycosylation » ou CDG sont des pathologies congénitales qui affectent la synthèse des N-glycannes, O-glycannes et des glycolipides (Jaeken and Matthijs 2007). Les patients atteints d'un CDG possèdent des anomalies qui peuvent aboutir à un retard psychomoteur plus ou moins important ainsi que des déficiences cérébrales. On note également la présence dans la majorité des cas de dysfonctionnements du foie et du système de coagulation sanguine. Les patients atteints d'un CDG possèdent également des dysmorphies ainsi que des troubles du développement (Freeze et al. 2015).

Le diagnostic des CDG est réalisé en analysant le profil de migration par isoélectrofocalisation de la transferrine qui va permettre la séparation des glycoformes en fonction de leurs charges négatives portées par les acides sialiques des N-glycannes. La transferrine est une protéine contenant deux sites de N-glycosylation occupés par des

structures bi- ou tri-antennées conduisant à la détection de glycoformes contenant 4-, 5- ou 6- acides sialiques dans un profil normal de migration. L'analyse du profil de migration de la transferrine va donc permettre de distinguer deux types de CDG :

Les CDG de type I, dont la déficience conduit à un défaut dans la synthèse du précurseur oligosaccharidique et/ou son transfert dans le RE. Cette déficience conduit à une sous-occupation des sites de N-glycosylation. L'isoélectrofocalisation de la transferrine de CDG-I conduit à l'apparition de glycoformes asialylées ou bi-sialylées.

On estime à 800 le nombre de patients atteints de CDG dans le monde, dont la pathologie principale est un CDG de type I, PMM2-CDG (Freeze et al. 2014). A ce jour, il existe 19 déficiences à l'origine de CDG de type I (Tableau 2).

Type de CDG	Enzyme
ALG1-CDG	GDP-Man: GlcNAc2-PP-Dol mannosyltransférase
ALG2-CDG	Dol-P-Man:Man1GlcNAc2-PP-Dol mannosyltransférase
ALG3-CDG	Dol-P-Man:Man5GlcNAc2-PP-Dol mannosyltransférase
ALG6-CDG	Dol-P-Glc:Man9GlcNAc2-PP-Dol glucosyltransférase
ALG7-CDG	UDP-GlcNAc: Dol-P-GlcNAc-P transférase
ALG8-CDG	Dol-P-Glc:Glc1Man9GlcNAc2-PP-Dol glucosyltransférase
ALG9-CDG	Dol-P-Man: Man6/8GlcNAc2-PP-Dol mannosyltransférase
ALG11-CDG	GDP-Man: Man3GlcNAc2-PP-Dol mannosyltransférase
ALG12-CDG	Dol-P-Man:Man7GlcNAc2-PP-Dol mannosyltransférase
ALG13-CDG	UDP-GlcNAc transférase
DDOST-CDG	Sous-unité de l'OST
DK1-CDG	Dolichol kinase
DPM 1-CDG	Dol-P-Man synthase 1
DPM 3-CDG	Dol-P-Man synthase 3
MPDU1-CDG	Enzyme impliquée dans l'utilisation du Dol-P-Man
PMI-CDG	Phosphomannoisomérase
PMM2-CDG	Phosphomannomutase 2
RFT1-CDG	Flippase
SRD5A3-CDG	Stéroïde 5-alpha réductase 3

Tableau 2 : Classification des déficiences conduisant à un CDG de type I

Les CDGs de type II sont caractérisés par une déficience dans la maturation golgienne de la partie glycanique (Aebi et al. 1999). Cette déficience est caractérisée par la présence de structures glycaniques tronquées. Le profil de migration de la transferrine présente une augmentation des structures a-, mono-, bi-, et tri-sialylées. Les CDG de type II incluent les enzymes impliquées directement dans la maturation glycanique mais également d'autres enzymes dont la déficience conduit à une perturbation du trafic vésiculaire et/ou de l'homéostasie Golgienne, créant ainsi un défaut de glycosylation (Tableau 3).

Type de CDG	Protéine
ATP6VOA2-CDG	Pompe H ⁺ /ATPase
B4GALT1-CDG	B-1,4 Galactosyltransférase
COG-CDG	Protéine impliquée dans le transport rétrograde Golgi-RE
GCS1-CDG	Glucosidase I
MAN1B1-CDG	α -1,2 mannosidase
MGAT2-CDG	GlcNAc transférase II
SLC35A1-CDG	Transporteur CMP-NeuAc
SLC35A2-CDG	Transporteur UDP-Galactose
SLC35C1-CDG	Transporteur de GDP-Fucose
TMEM165-CDG	Protéine impliquée dans l'homéostasie golgienne

Tableau 3 : Classification des principales déficiences conduisant à un CDG type II

b) N-Glycosylation et cancer

Le processus de N-glycosylation est impliqué dans de nombreuses fonctions physiologiques telles que les interactions cellule-cellule et les interactions cellule-matrice. Ces interactions sont importantes au sein du phénomène de cancérisation puisqu'elles sont impliquées dans les phénomènes de prolifération et de migration tumorale. L'étude du processus de N-glycosylation dans la cancérisation, et plus particulièrement de l'expression des glycosyltransférases, a permis de mettre en évidence une augmentation de l'expression de certaines glycosyltransférases dans les phénomènes de cancérisation et plus particulièrement de la GlcNAcT-V, impliquée dans le branchement d'un résidu de GlcNAc en β 1,6 sur un résidu de mannose, ce qui augmente le nombre de branchements présents sur la partie glycanique (Dennis, Granovsky, and Warren 1999). On observe également une augmentation de la sialylation en α 2,6 dans le processus de cancérisation (Yamashita et al.

1995). La fucosylation a été montrée comme pouvant être modifiée dans le carcinome hépatique avec une augmentation de l'expression de FUT8, enzyme permettant la fucosylation en α 1-6 du résidu de GlcNAc lié à l'Asn (Noda et al. 1998). Cette modification conduit à une augmentation de la prolifération cellulaire (Chen et al. 2013). Des études portant sur l'inhibition de la maturation glycanique par la castanospermine, enzyme inhibant les Glucosidase I et II intervenant lors du contrôle qualité dans le RE, ont montré une protection du phénomène d'angiogenèse tumorale mais également une inhibition de la croissance tumorale (Pili et al. 1995; Girnita et al. 2000).

6) Le processus de dégradation ERAD

Dans 30% des cas, les glycoprotéines n'arrivent pas à acquérir une conformation native et sont dégradées via un processus spécifique, le processus ERAD. Ce processus nécessite la mise en place de signaux de dégradation spécifiques et l'intervention de nombreuses enzymes.

a) La formation du signal de dégradation

a. La ER Mannosidase I

La première enzyme intervenant dans ce processus est la ER Mannosidase I (ou Man1B1), une protéine transmembranaire de type II de 72 kDa dont l'activité catalytique permet le ciblage des résidus de mannose liés en α 1,2. Selon la classification CaZy elle appartient à la famille GH47, et elle est inhibée spécifiquement par la Kifunensine.

Le rôle exact de la ER mannosidase I dans le processus de N-glycosylation est aujourd'hui encore controversé. Cependant, la majorité des études tendent à montrer une implication majeure de la ER mannosidase I dans l'émission du signal de dégradation des N-glycoprotéines via le processus ERAD. En effet, une augmentation d'expression de la Man1B1 conduit à une accélération du processus de dégradation (Wu et al. 2003), l'inhibition de son activité catalytique par la Kifunensine ou par l'introduction d'une mutation au sein de son site catalytique conduit à une diminution du processus de dégradation ERAD (Y. Liu et al. 1999).

La ER Mannosidase I, va cliver un résidu de mannose lié en α 1,2 sur la branche B du résidu glycanique. *In vitro*, une augmentation de sa concentration (Aikawa, Matsuo, and Ito 2012)

ou du temps d'incubation peut conduire l'enzyme à cliver jusqu'à 3 résidus supplémentaires de mannose (Annette Herscovics, Romero, and Tremblay 2002).

De récentes études ont montré la présence de la ER mannosidase I au niveau de vésicules périnucléaires, les « ER Quality Control » ou ERQC, vésicules qui vont contenir les N-glycoprotéines mal conformées qui ont échappées au contrôle qualité réticulaire afin de les renvoyer au RE via des vésicules COP-I (Benyair et al. 2015).

Le signal réticulaire émis par la démannosylation par la ER mannosidase I permet aux lectines résidentes du RE, les protéines de la famille EDEM, de s'associer aux N-glycoprotéines mal conformées pour les envoyer vers le processus ERAD (Pan et al. 2011).

b. EDEM

Les EDEM ou « ER degradation enhancing α -mannosidase-like protein » sont des protéines du RE présentant 30% d'homologie de séquence avec la ER mannosidase I (Mast et al. 2005). On dénombre trois protéines appartenant à la famille EDEM et potentiellement impliquées dans le processus de reconnaissance des N-glycoprotéines mal conformées.

La première est EDEM1, une protéine ancrée dans la membrane du RE et directement impliquée dans le cycle Calnexine/Calréticuline par son association avec les protéines SEL1L et ERdj5 (Roth et al. 2010). La surexpression de cette protéine conduit à une accélération du processus ERAD par le clivage d'un résidu de mannose sur la branche C (Figure 2) (Hosokawa et al. 2010) alors que la diminution de son expression ralentit le processus de dégradation en augmentant le nombre de cycle CNX/CRT (Molinari 2003).

EDEM2 est le deuxième membre de cette famille également ancré à la membrane du RE. En revanche, elle ne présente pas d'activité mannosidase décrite à ce jour mais elle semble bien impliquée dans le processus ERAD puisque sa surexpression conduit à une accélération de la dégradation des N-glycoprotéines mal conformées (Mast et al. 2005).

EDEM3 est une lectine soluble présentant une séquence KDEL, signal de rétention réticulaire des protéines. La surexpression de cette protéine a été montrée comme augmentant le clivage des résidus de mannose sur les N-glycoprotéines pour obtenir des structures $\text{Man}_{6-7}\text{Gn}_2$ (Hirao et al. 2006).

b) Rétrotranslocation dans le cytosol

La dégradation des N-glycoprotéines mal conformées se poursuit dans le cytosol. Une étape de rétrotranslocation est donc nécessaire et se fait par l'intermédiaire d'un complexe protéique, le complexe ubiquitine ligase Hrd1. Ce complexe est composé de la protéine adaptatrice SEL1L, de Hrd1 qui porte l'activité ubiquitine ligase et des lectines OS-9 et XTP3-B. Cet ensemble de protéines permet la reconnaissance de la N-glycoprotéine, son transport à travers la membrane du RE via le canal Sec61 et son ubiquitinylation (Wang and Ng 2008). La première étape concerne la reconnaissance du substrat à dégrader par des lectines réticulaires, OS-9 et XTP3-B. La lectine OS-9 reconnaît préférentiellement des glycanes de type $\text{Man}_{5-7}\text{GlcNAc}_2$ et le type $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ où le mannose de la branche C a été clivé par l'action de la ER Mannosidase I. Contrairement à OS-9, la lectine XTP3-B reconnaît les glycanes de type $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$. Ces lectines vont ensuite interagir avec la protéine adaptatrice SEL1L, qui permet une interaction entre la glycoprotéine à dégrader et le complexe protéique Hrd1 (Christianson et al. 2008). Le complexe Hrd1 est un complexe ubiquitine ligase qui permet le transfert d'une ubiquitine pendant la rétrotranslocation dans le cytosol sur la glycoprotéine à dégrader (Figure 8).

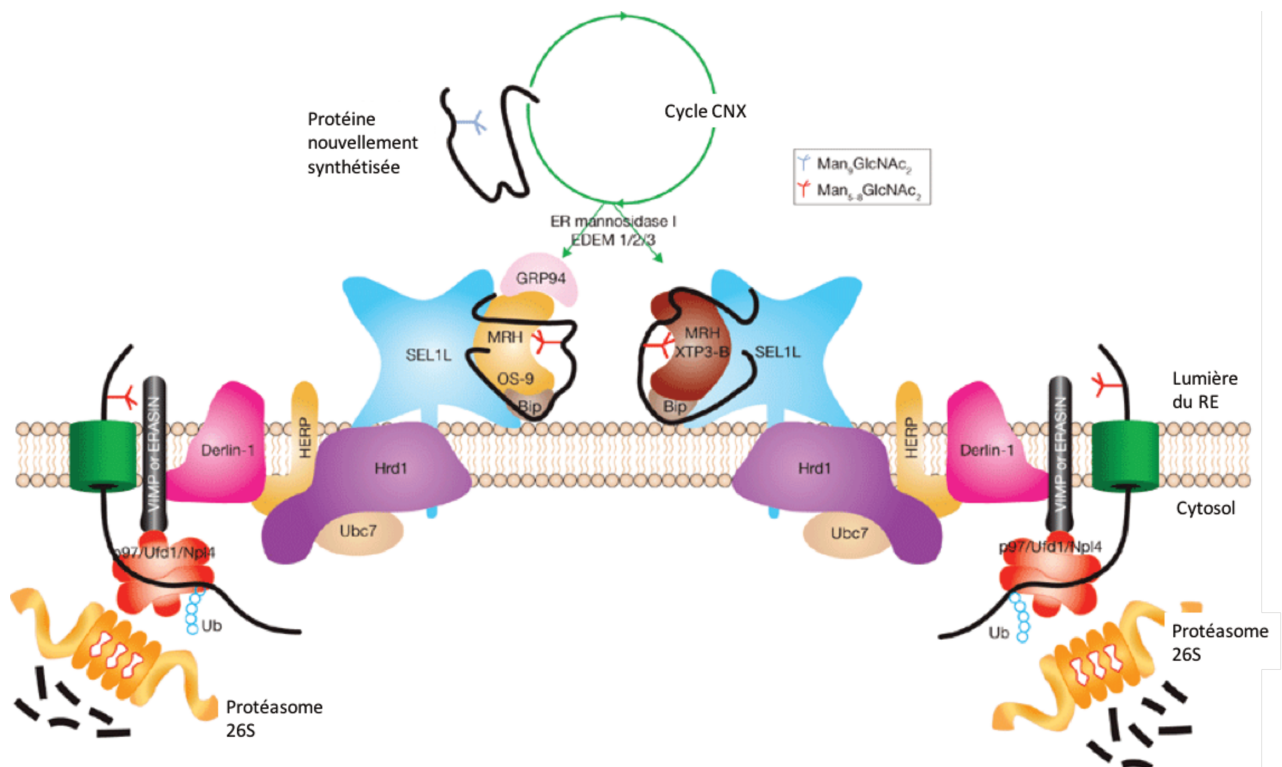


Figure 8 : Translocation de la glycoprotéine à travers la membrane du RE et les différents partenaires de ce transport (adapté d'après Wang et Ng, 2008)

c) Catabolisme

Le catabolisme des N-glycoprotéines commence par l'action d'une première enzyme, la peptide: N-glycanase ou PNGase (Suzuki, Park, and Lennarz 2002) qui permet de cliver le glycanne de la partie protéique. Celle-ci est rapidement dégradée par le protéasome après polyubiquitinylation. La partie glycanne sous forme $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ subit quant à elle, l'action de deux enzymes cytosoliques, l'ENGase et la Man2C1 (Figure 9).

L'Endo- β -N-Acétlylgucosaminidase ou ENGase clive le résidu de GlcNAc terminal et conduit ainsi à la formation du $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_1$, substrat de dégradation de la mannosidase cytosolique ou Man2C1, qui permet la démannosylation des oligosaccharides solubles jusqu'à son produit de dégradation final, le $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_1$.

Cet oligosaccharide est ensuite transporté dans les lysosomes par un transporteur spécifique dont l'activité est ATP-dépendante et dont la spécificité de transport est définie par la présence d'un seul résidu de GlcNAc (Saint-Pol, Codogno, and Moore 1999). L'oligosaccharide est entièrement dégradé par 3 enzymes, la LAMAN, spécifique des liaisons $\alpha 1,2$ et $\alpha 1,3$, une mannosidase spécifique des liaisons $\alpha 1,6$ et la β -mannosidase qui va cliver le résidu de mannose lié au résidu de GlcNAc.

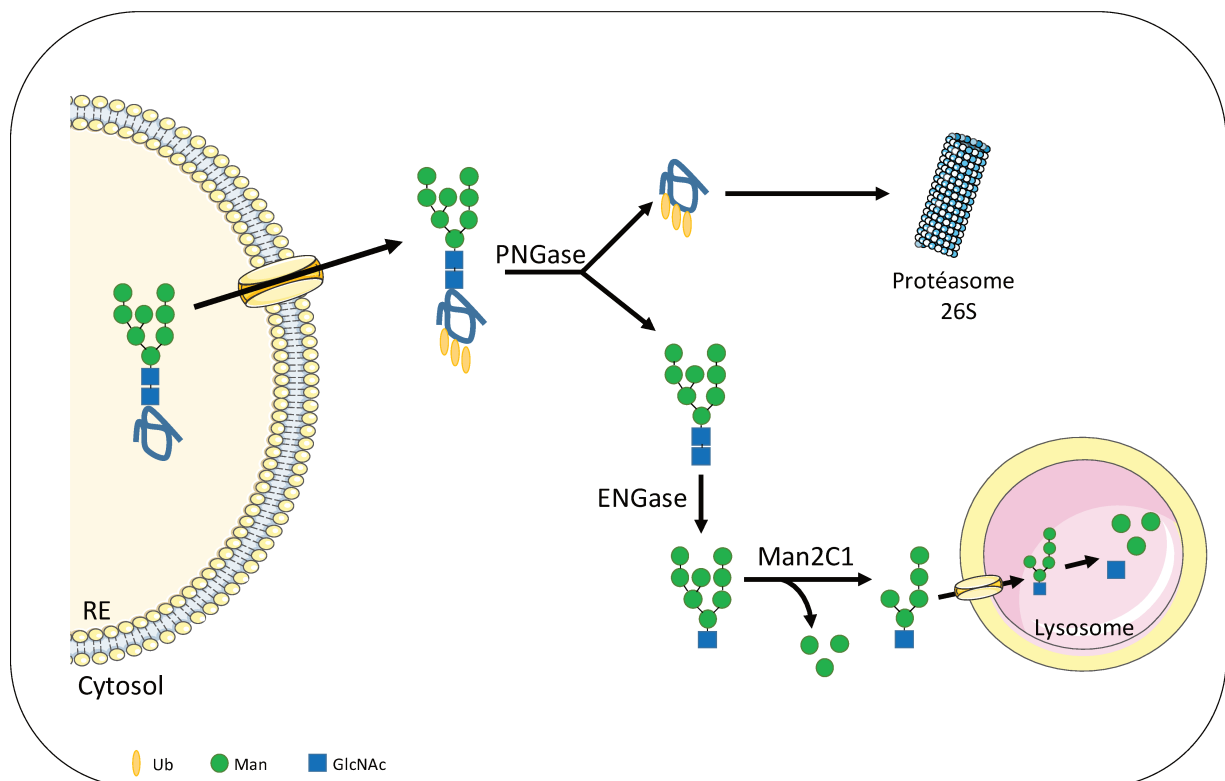


Figure 9: Le processus de dégradation ERAD

B/ La Mannosidase cytosolique et le Cancer de la Prostate

1) Généralités

a) Caractéristiques de la Man2C1

La Man2C1 est une α -mannosidase soluble et cytosolique appartenant à la famille GH38 selon la classification CaZy. Cette enzyme est donc caractérisée par sa capacité à cliver les liaisons $\alpha 1,2$; $\alpha 1,3$ et $\alpha 1,6$ et par sa sensibilité aux inhibiteurs des analogues furaniques du mannose comme la swainsonine (SW) ou encore le 1,4 dideoxy-imino-D-mannitol (DIM) (Suzuki et al. 2006). Plus récemment, il a été montré que l'activité catalytique de la Man2C1 pouvait être spécifiquement inhibée par un alcaloïde dérivé des plantes, la Calystegine B3 (Kato et al. 2011). La Man2C1 est une enzyme Co^{2+} -dépendante : le cobalt augmente à la fois sa stabilité et son activité enzymatique (Haeuw et al. 1991).

Comme toute enzyme, la Man2C1 présente une spécificité vis-à-vis de son substrat. En effet, l'oligosaccharide soluble ne doit présenter qu'un seul résidu de GlcNAc en position terminale réductrice, ce qui nécessite l'intervention préalable de l'ENGase (Haeuw et al. 1991). La Man2C1 hydrolyse les liaisons $\alpha 1,6$ et $\alpha 1,2$ sur la branche C et les liaisons $\alpha 1,3$ et $\alpha 1,2$ sur la branche B conduisant à la structure $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_1$ (Figure 10). Mais elle est également capable d'hydrolyser les résidus de mannose liés en $\alpha 1,2$ sur la branche A en cas de surexpression (Bernon et al. 2011).

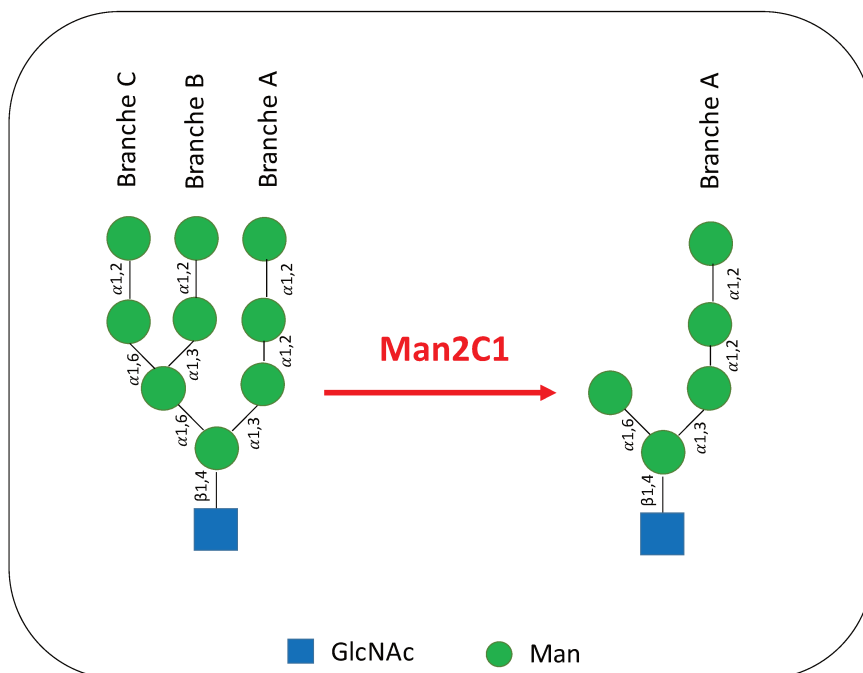


Figure 10: Activité catalytique et produit de la Man2C1

Chez l'Homme, la Man2C1 est une protéine de 1040 acides aminés possédant 3 domaines :

- Un domaine de fixation de la partie glycanique
- Un domaine de fixation des ions Zn^{2+}
- Un domaine catalytique

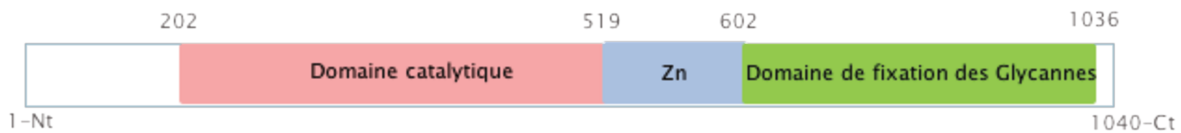


Figure 11 : Domaines fonctionnels de la Man2C1

b) Rôles de la Man2C1 dans les processus physiologiques

a. Importance de l'expression de la Man2C1 dans la biosynthèse des N-glycoprotéines

Bernon *et al.* (2011) ont étudié l'impact de la surexpression de la Man2C1 sur le processus de N-glycosylation dans la lignée cellulaire HeLa (Bernon et al. 2011). Cette étude a montré, dans un premier temps, que la surexpression de la Man2C1 conduit à l'apparition de petites espèces glycaniques ($Man_{2-4}Gn_1$) dans le cytosol, issues du processus ERAD. Cette étude a également montré que la surexpression de la Man2C1 conduit à une augmentation de la quantité de glycoprotéines engagées dans la voie ERAD et de la quantité des espèces oligosaccharidiques. L'analyse du profil de glycosylation des protéines a montré une sous-occupation des sites de N-glycosylation des protéines, liée à la synthèse d'un précurseur oligosaccharidique incomplet non glucosylé sous la forme Man_9Gn_2 . Cette étude a donc permis de montrer l'importance de la régulation de l'expression de la Man2C1, puisqu'une surexpression perturbe la synthèse du précurseur oligosaccharidique et donc le processus de N-glycosylation des protéines.

b. Rôle de la Man2C1 dans l'apoptose

Wang and Suzuki (2013) ont montré que l'inhibition de l'expression de la Man2C1 entraîne une augmentation d'expression de CHOP (C/EBP homologous protein), un facteur de transcription impliqué dans la mise en place de l'apoptose induite lors d'un stress réticulaire.

c. Implication de la Man2C1 dans le processus de cancérisation

Comme nous l'avons énoncé, le processus de N-glycosylation est modifié dans de nombreuses pathologies et plus particulièrement dans certains cancers. En effet, une augmentation de structures tri- ou tétra-antennées ou encore une augmentation de la sialylation ou de la fucosylation ont été clairement mises en évidence (Yamashita et al. 1995; Noda et al. 1998; Dennis, Granovsky, and Warren 1999; Arnold et al. 2008). Ces modifications sont, dans la plupart des cas, liées à des changements d'expression des glycosyltransférases golgiennes. La seule glycosidase ayant été montrée comme pouvant être impliquée dans le processus de cancérisation est la Man2C1 (Tableau 4).

Expression de la Man2C1	Résultats	Références
Inhibition de l'expression Man2C1	Augmentation de l'adhésion des cellules Jurkat	(Qu et al. 2006)
Inoculation de souris transgéniques pour la Man2C1 humaine	Favorise la croissance, l'invasion et les métastases	(Jiang et al. 2007)(Xiang et al. 2010)
Inhibition de l'expression de la Man2C1	Diminution de l'expression de CD44 et diminution de la malignité dans le carcinome nasopharyngé	(Shi et al. 2007)
Inhibition de l'expression de la Man2C1	Diminution de la croissance cellulaire (arrêt mitotique et induction de l'apoptose) dans le carcinome oesophagien	(Tian et al. 2008)
Inhibition de l'expression de la Man2C1	Diminution de la survie cellulaire dans des cellules PTEN-positives	(He et al. 2011)

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des différentes études portant sur l'implication de la Man2C1 dans le phénomène de cancérisation

Les études récentes menées par He *et al.* (2011) ont suggéré une implication potentielle de la Man2C1 dans la cancérogenèse prostatique et plus particulièrement dans les mécanismes d'activation de la voie PI3K/Akt.

c) Rôle dans le cancer de la prostate

a. Le cancer de la prostate

Le cancer de la prostate est le cancer masculin le plus fréquent en France et dans les pays occidentaux, largement devant celui des poumons et le cancer colo-rectal. Néanmoins, il n'est qu'à la 3^{ème} position des causes de mortalité par cancer en Europe (Ferlay et al. 2013). C'est un cancer avec une évolution lente qui touche principalement des personnes de plus de 65 ans (70% des cas de cancer de la prostate).

Classification :

Les différents stades du cancer de la prostate ainsi que le risque d'évolution sont classés en fonction de la classification TNM, qui va permettre de définir le stade de cancérisation en fonction de la taille de la tumeur (T), de la présence ou non de cellules cancéreuses dans les ganglions (N) et par la présence ou non de métastases (M).

On va donc distinguer 4 stades dans le cancer de la prostate :

- Le cancer de la prostate localisé
- Le cancer de la prostate localement avancé, qui s'étend au-delà de la capsule prostatique ou aux organes adjacents
- Le cancer de la prostate avec atteinte ganglionnaire pelvienne
- Le cancer de la prostate métastatique

Il existe aussi une classification des cancers localisés en fonction de leur risque d'évolution :

- Le cancer de la prostate localisé à faible risque
- Le cancer de la prostate à risque intermédiaire
- Le cancer de la prostate localisé à risque élevé

Diagnostic :

Le cancer de la prostate est généralement suspecté lors de l'augmentation de la concentration sérique de PSA (Antigène Prostatique Sérique). Le PSA est une glycoprotéine présente sous 2 formes, une forme libre dans la circulation sanguine et une forme liée à des inhibiteurs de protéases (Björk et al. 1998). Une augmentation de la concentration sérique du PSA à des valeurs supérieures à 4 ng/mL peut être un marqueur d'une anomalie au

niveau de la prostate. Afin de confirmer la présence ou non d'une tumeur au niveau de la prostate, un toucher rectal est effectué. Dans le cas de la confirmation de la présence d'une tumeur, des examens plus approfondis (IRM, Scanner) peuvent être effectués.

Néanmoins, le test PSA est controversé puisque l'on estime à 70% le nombre de patients présentant un taux de PSA élevé mais ne présentant pas de tumeur au niveau de la prostate après toucher rectal.

b. La Man2C1 dans le cancer de la prostate

La Man2C1 a été montrée comme étant potentiellement impliquée dans la cancérogenèse de la prostate. En effet, He *et al.* (2011) ont montré que la Man2C1 favorise l'activation de la voie Akt dans des cellules DU145, « Phosphatase and TENSin homolog » (PTEN) positives, mais pas dans les cellules LnCaP, PTEN négatives, suggérant un rôle de régulateur négatif de la Man2C1 sur PTEN (Figure 12). Ces auteurs ont également suggéré que cette régulation se ferait par une interaction entre la partie C-terminale de la Man2C1 et PTEN. Les auteurs ont alors émis l'hypothèse d'un mécanisme d'action selon lequel la Man2C1 inhibe l'activité PIP₃ phosphatase de PTEN, ce qui favorise l'activation de Akt et donc la croissance et la prolifération cellulaire (He et al. 2011).

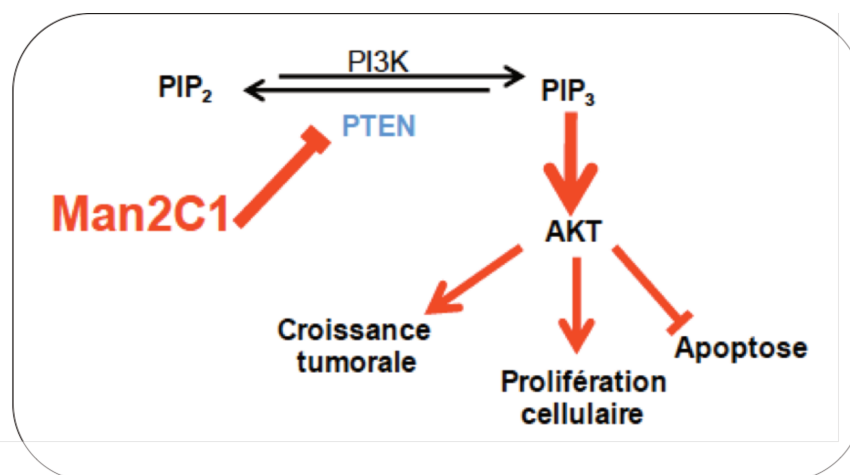


Figure 12: Mécanisme d'activation de la voie PI3K/Akt par la Man2C1 via l'inhibition de l'activité PIP₃ phosphatase de PTEN (proposé par He et al., 2011)

d) Problématique et objectifs du projet de thèse

Comme nous l'avons exposé, la Man2C1 possède un rôle majeur dans le processus de dégradation des N-glycoprotéines mal conformées via le processus ERAD. Le contrôle de son expression semble essentiel. En effet, une surexpression conduit à une perturbation générale du processus de glycosylation par la synthèse et le transfert d'un précurseur oligosaccharidique incomplet ainsi que par l'augmentation du processus de dégradation ERAD. D'autre part, une diminution de l'expression de la Man2C1 provoque une diminution de la croissance cellulaire ainsi qu'une diminution du potentiel métastatique.

Néanmoins, aucune corrélation n'a été faite entre le rôle physiologique de la Man2C1 dans la N-glycosylation des protéines et celui qui lui est suggéré dans la cancérogenèse.

Dans cette première partie de mon travail de thèse, nous nous sommes intéressés à préciser l'implication de la Man2C1 dans le processus de cancérisation de la prostate.

Nous disposons au laboratoire de différentes lignées cellulaires d'origine humaine correspondant à différents stades cancéreux de la prostate. Nous avons donc dans un premier temps étudié l'expression de la Man2C1 dans ces différentes lignées. Nous avons étudié l'impact de ces différents niveaux d'expression de la Man2C1 sur le processus de N-glycosylation en commençant par l'analyse des produits de dégradation de la Man2C1, les oligosaccharides solubles par spectrométrie de masse de type MALDI-Tof. Nous avons également déterminé par marquage métabolique la structure du précurseur oligosaccharidique synthétisé et transféré sur les N-glycoprotéines en cours de synthèse. Enfin, nous avons analysé le profil de N-glycosylation golgienne des protéines dans les différentes lignées cancéreuses prostatiques. Le niveau d'expression de la Man2C1 ainsi que le processus de glycosylation ont également été étudié dans des parties saines et tumorales de biopsies de patients atteints d'un cancer de la prostate grâce à une collaboration avec la Tumorothèque de Lille. Enfin, nous avons étudié l'impact d'une modification d'expression de la Man2C1 sur l'activation de la voie PI3K/Akt (inhibition et/ou surexpression) ainsi que l'influence de l'activité catalytique de la Man2C1 sur l'activation de la voie PI3K/Akt.

2) Matériels et Méthodes

a) Culture Cellulaire

Lignées cellulaires prostatiques humaines

Pour la réalisation de cette étude, 3 lignées cellulaires d'origine prostatique ont été utilisées :

- DU145 : lignée cellulaire issue de cellules de métastases cérébrales d'un patient âgé de 69 ans atteint d'un cancer prostatique.
- PC-3 : lignée cellulaire issue de cellules de métastases osseuses d'un patient âgé de 62 ans atteint d'un cancer de la prostate.

Ces 2 lignées sont insensibles aux androgènes.

- LNCaP : lignée cellulaire issue d'un ganglion lymphatique supraclaviculaire métastasé prélevé sur un patient de 50 ans atteint d'un cancer de la prostate. Cette lignée présente une sensibilité aux androgènes.

Lignées HeLa

Au sein du laboratoire, nous disposons également de lignées cellulaires HeLa exprimant de façon stable différents niveaux d'expression de la Man2C1 (Bernon et al. 2011). La lignée HeLa NAM a été générée à l'aide d'un plasmide pcDNA3.1 contenant la séquence codant pour la Man2C1 humaine. Deux autres lignées ont été générées à partir de la lignée HeLa NAM, les lignées HeLa Rev2 et HeLa Rev 3, obtenues par shRNA-Man2C1. Ces 3 clones présentent différents niveaux d'expression de la Man2C1.

Conditions de culture

Les lignées cancéreuses prostatiques DU145, PC-3 et LNCaP sont cultivées dans le milieu RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) (Lonza, Bâle, Suisse) et les lignées HeLa sont cultivées dans un milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) riche en Glucose (4,5 g/L) (Gibco, Life Technology, France). Les milieux sont supplémentés par 10 % de sérum de

veau foetal (Dutscher). Les cellules sont cultivées dans un incubateur à 37°C dans une atmosphère enrichie à 5% de CO₂.

Transfection transitoire

Les cellules sont platées dans des plaques 6 puits la veille pour obtenir environ 60 % de confluence le jour de la transfection. Deux lavages à l'Ultra-MEM sont réalisés avant d'ajouter 500 µL du mélange contenant la lipofectamine 2000 (Invitrogen) et les plasmides/siRNA correspondants. Incubation 4h à 37°C puis ajout de 1 mL de milieu de culture et récupération des cellules aux différents temps indiqués.

b) Western Blot

Lyse cellulaire et dosage protéique

Les cellules sont lysées dans 300 µL de tampon de lyse NET (50 mM Tris-HCl pH 7.4 ; 150 mM NaCl ; 5 mM EDTA ; 1% Triton X-100) contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche diagnostics). Un dosage protéique est réalisé sur chaque lysat cellulaire à l'aide du kit Micro BCA Protein Assay (Thermo Scientific).

SDS-PAGE et Immunodétection des protéines

Les protéines sont séparées sur un gel d'acrylamide en gradient 4-12 % (Invitrogen, USA) dans des conditions dénaturantes. La migration est réalisée dans le tampon d'électrophorèse MOPS (3-N-morpholino propanesulfonic acid) (50 mM MOPS pH 7.7 ; 50 mM Tris base, 0.1 % SDS ; 1 mM EDTA) (Invitrogen, USA). Le transfert sur membrane de nitrocellulose est un transfert semi-sec réalisé dans le tampon NuPAGE (Bicine 500 mM, Bis-Tris 500 mM, EDTA 20 mM, Novex, USA, additionné de 10 % méthanol). La membrane est saturée 1 nuit à 4°C dans une solution de lait préparée à 5 % dans du TBS-Tween 20 (15 mM Tris, 140 mM NaCl, 0.05 % (V/V) Tween 20). L'incubation avec les anticorps primaires et secondaires est réalisée à température ambiante pendant 1h. La révélation est réalisée à l'aide de l'ECL-plus (Perkin Elmer).

c) Analyse structurale du précurseur oligosaccharidique par marquage métabolique au [2-³H] mannose

Marquage métabolique au [2-³H] mannose

Les cellules sont pré-incubées pendant 1 h à 37°C (5 % de CO₂) dans le milieu de culture α -MEM contenant 0,5 mM de glucose puis incubées en présence de 3,7 MBq de [2-³H]-mannose. Après 1 h d'incubation, le milieu de marquage est retiré et 2 lavages successifs sont réalisés avec un milieu neuf.

Extraction des N-Glycoprotéines et traitement à la PNGase

Après extraction de Folch (Folch *et al.*, 1957), la crêpe protéique est récupérée et les N-glycoprotéines radiomarquées sont extraites à l'aide du mélange chloroforme/méthanol/eau en proportions 10/10/3 v/v/v. Le culot protéique contenant les N-glycoprotéines est repris dans 300 μ L de tampon bicarbonate d'ammonium (50 mM, pH 8) contenant 1 mg/mL de trypsine bovine. L'incubation est réalisée 1 nuit à température ambiante. La trypsine est ensuite dénaturée 10 min à 100°C. Après évaporation sous azote, 100 μ L de tampon phosphate de sodium (20 mM, pH 7) et 500 mU de peptide N-glycanase F (PNGase F) sont ajoutés. L'incubation est réalisée 1 nuit à 37°C. Les N-glycannes sont purifiés sur gel-filtration Biogel P2 avant d'être analysés par HPLC (High Performance Liquid Chromatography).

Analyse HPLC

Les échantillons purifiés sur Biogel P2 sont repris dans un mélange acétonitrile/eau (70/30, v/v) et analysés par HPLC sur une colonne amino (Asahipak). L'élution est réalisée à l'aide d'un gradient acétonitrile/eau passant de 70/30 (v/v) à 50/50 (v/v) sur une durée de 90 minutes. La détection de la radioactivité est réalisée en continu par un détecteur de type Flo-One (Packard, France) à l'aide du liquide scintillant Ultima Flo M.

d) Analyse structurale des N-glycannes par spectrométrie de masse

Préparation des échantillons pour l'analyse MALDI

- **Extraction des Oligosaccharides Solubles (OS) issus du processus ERAD**

Les cellules sont lavées 2 fois au DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) puis 1 fois au tampon KMH (Hepes 50 mM pH 7.2 ; Acétate de potassium 110 mM ; Acétate de magnésium 2 mM), contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche diagnostics). Les cellules sont ensuite grattées dans 2 mL de tampon KMH puis centrifugées 10 min à 2200 g. Le culot cellulaire est repris dans 200 µL de tampon KMH et homogénéisé à l'aide d'un appareil de type Potter. Les OS sont extraits selon le protocole de Folch par un mélange de KMH/Méthanol/Chloroforme (1/2/3, rapport v/v/v) et 10 min de centrifugation à 3900 g. La phase aqueuse contenant les OS est récupérée et évaporée sous azote. L'échantillon est lyophilisé pour être perméthylé.

- **Extraction des N-glycoprotéines**

Lors de l'extraction de Folch, la crêpe protéique contenant les N-glycoprotéines est récupérée et resuspendue dans 200 µL de bicarbonate d'ammonium 50 mM (pH 8.3) contenant 0,1 g/mL de SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) et 0,1 % de β-mercaptoéthanol. Après une étape de dénaturation (20 min à 100°C), 175 µL de tampon bicarbonate d'ammonium et 25 µL de NP-40 à 10 % (v/v) sont ajoutés.

Les échantillons sont ensuite traités à la PNGase F (1 unité), 1 nuit à 37°C. Après évaporation, 1 mL d'ATFA (Anhydride trifluoroacétique) 0,1 % (v/v) est ajouté à l'échantillon. Celui-ci est ensuite purifié sur une colonne carbograph (Carbograph Alltech 150 mg/4.0 mL) et élué par 4 mL d'acétonitrile 25 % (v/v) dans ATFA 0,1 % (v/v) et lyophilisé.

- **Perméthylation des OS et des N-glycoprotéines**

Afin de réaliser la perméthylation, 500 µL de DMSO (Diméthyl Sulfoxide), une pointe de spatule de soude pilée puis 500 µL d'iodure de méthyle sont ajoutés à l'échantillon lyophilisé. L'échantillon est saturé sous argon et la perméthylation est réalisée sous agitation pendant 45 min à température ambiante. La réaction est arrêtée en ajoutant 1 mL d'acide acétique à 5 %. Les produits perméthylés sont récupérés en ajoutant 2 fois 500 µL de chloroforme. La phase chloroformique, contenant les oligosaccharides solubles, est récupérée et quatre lavages successifs de la phase chloroformique sont ensuite réalisés par 500 µL d'eau. Une évaporation sous azote est réalisée.

Purification des échantillons

Les échantillons sont purifiés sur colonne C18 Sep-Pak (Alltech, Deerfield, IL). La colonne est tout d'abord conditionnée par 5 mL de méthanol et 10 mL d'eau. Avant d'être déposé sur la colonne, l'échantillon sec est repris par 300 µL de méthanol puis déposé. Des lavages sont réalisés par 4 x 5 mL d'eau puis 2 mL d'acétonitrile 10 % (v/v). L'échantillon perméthylé est élué par 3 mL d'acétonitrile 80 % (v/v). Les échantillons sont ensuite lyophilisés.

Analyse par spectrométrie de masse (MALDI-TOF)

Les échantillons sont repris dans 20 µL d'un mélange eau/méthanol (1 /1 ; V/V). La matrice, l'acide dihydroxybenzoïque (DHB), est préparée à une concentration de 20 mg/mL dans le mélange eau/méthanol (1/1 v/v). 0,5 µL d'échantillon puis 0,5 µL de matrice sont déposés sur la cible MALDI. L'analyse spectrométrique est réalisée à l'aide d'un spectromètre de masse de type MALDI-TOF (4800 MALDI-TOF Analyzer, Applied Biosystems). L'analyse est réalisée dans une gamme de masse de m/z de 500 à 2500 pour les oligosaccharides solubles et de 1100 à 5000 pour les N-glycannes portés par les glycoprotéines, avec un nombre de tir égal à 5000.

3) Résultats

a) Etude de l'expression de la Man2C1 dans les lignées cancéreuses prostatiques

He *et al.* (2011), ont suggéré une implication potentielle de la Man2C1 dans la cancérogenèse prostatique. Nous avons donc, dans un premier temps, analysé le profil d'expression de la Man2C1 par Western Blot, dans les lignées cancéreuses prostatiques, DU145, PC-3 et LNCaP.

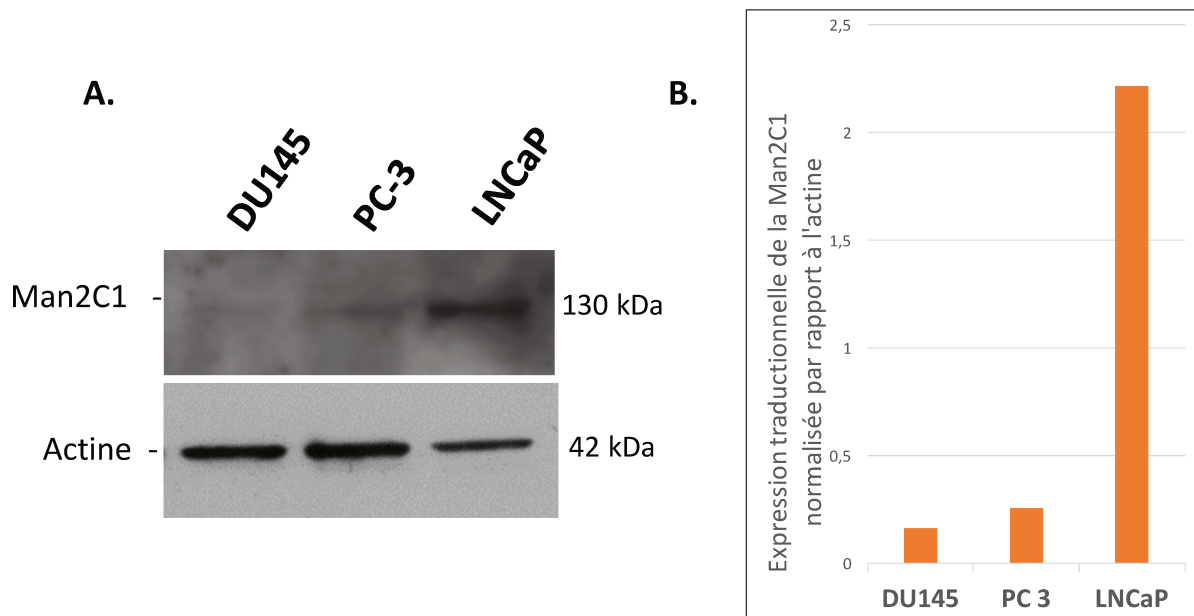


Figure 13: Etude de l'expression traductionnelle de la Man2C1 dans les lignées cancéreuses prostatiques

A : Western Blot de l'expression protéique de la Man2C1 dans les lignées DU145, PC-3 et LNCaP

B : Quantification de l'expression protéique de la Man2C1 normalisée par rapport à l'actine

Nos résultats montrent un faible niveau d'expression de la Man2C1 dans les lignées DU145 et PC-3 insensibles aux androgènes et de façon contrastée, un niveau nettement plus élevé dans la lignée LNCaP sensible aux androgènes.

b) Etude du processus de N-glycosylation dans les lignées cancéreuses prostatiques

a. Analyse structurale des oligosaccharides solubles cytosoliques

Nous avons analysé les oligosaccharides solubles, produits de dégradation de la Man2C1, par spectrométrie de masse de type MALDI-Tof après extraction et perméthylation (Figure 14).

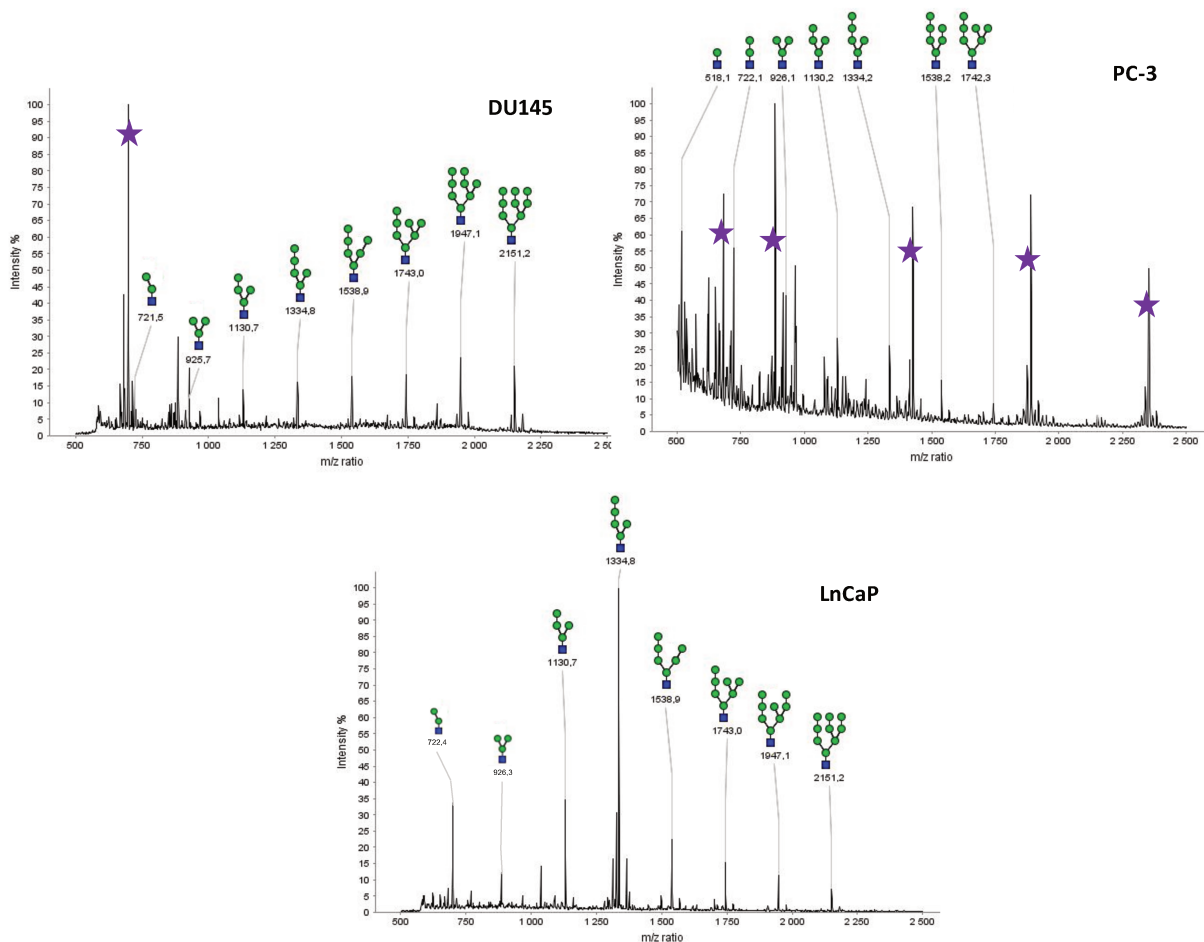


Figure 14: Analyse des oligosaccharides solubles par spectrométrie de masse de type MALDI-Tof dans les lignées cancéreuses prostatiques (■ : GlcNAc ; ● : Man ; ★ : polyhexoses)

Dans la lignée DU145, présentant la plus faible expression de la Man2C1, nous observons la présence d'espèces de type $Man_{5-9}Gn_1$, espèces normalement retrouvées dans des lignées contrôles. Nous observons également la présence de plus petites espèces de type $Man_{2-4}Gn_1$. Pour la lignée PC-3, nous observons la perte des espèces $Man_{8-9}Gn_1$ au profit de l'augmentation de la proportion des plus petites espèces de type $Man_{2-4}Gn_1$. Pour la lignée LNCaP, exprimant la Man2C1 à un niveau plus important, nous observons la

présence d'espèces de type $\text{Man}_{6-9}\text{Gn}_1$ et d'un pic majoritaire de type Man_5Gn_1 . On conserve également de plus petites espèces de type $\text{Man}_{2-4}\text{Gn}_1$. Ces résultats semblent donc en adéquation avec les résultats obtenus par Bernon *et al.* (2011) qui montrent qu'une augmentation d'expression de la Man2C1 conduit à l'apparition de plus petites espèces issues de l'activité catalytique de la Man2C1.

Afin de confirmer que ces espèces proviennent bien de l'activité catalytique de la Man2C1, nous avons traité nos différentes lignées cellulaires pendant 48h avec un inhibiteur spécifique, la swainsonine (SW) (Figure 15).

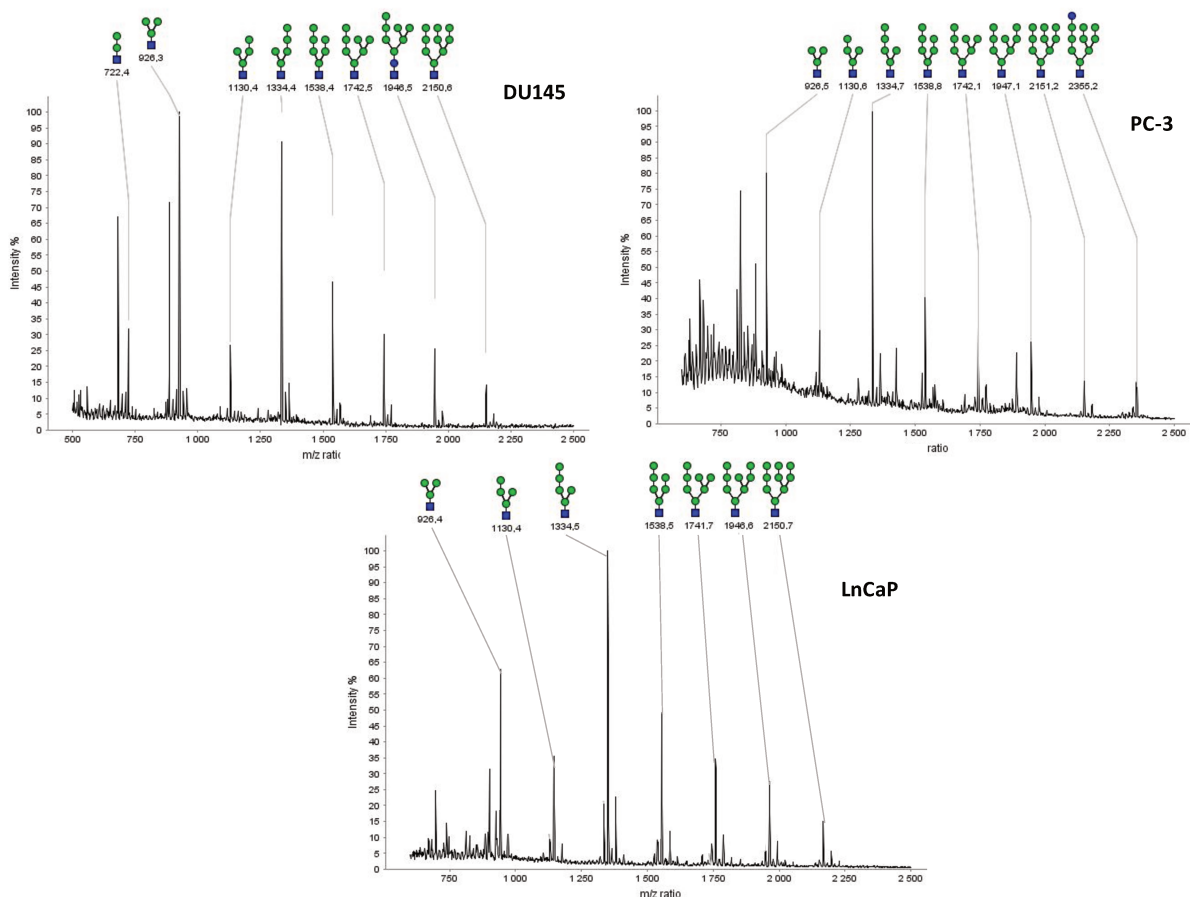


Figure 15 : Analyse des oligosaccharides solubles par spectrométrie de masse de type MALDI-Tof dans les lignées cancéreuses prostatiques après 48h de traitement en présence de SW (■ : GlcNAc ; ● : Man)

Dans un profil normal, en présence de SW, une disparition des produits de dégradation de la Man2C1 est observée avec présence uniquement d'espèces de type $\text{Man}_{8-9}\text{Gn}_1$. Dans les lignées DU145, PC-3 et LNCaP, nous observons la présence de ces espèces de type $\text{Man}_{8-9}\text{Gn}_1$. Néanmoins, nous conservons la présence de plus petites espèces de type

Man₅₋₇Gn₁ avec une augmentation de la proportion de Man₅Gn₁ en comparaison aux lignées non traitées par la SW (Figure 14).

La présence des espèces de type Man₅₋₇Gn₁, après traitement à la SW, nous suggère que ces espèces proviennent directement sous cette forme du RE et sont donc présentes sur les N-glycoprotéines mal conformées envoyées dans le processus ERAD.

b. Analyse du précurseur oligosaccharidique synthétisé et transféré sur les N-glycoprotéines

Comme énoncé précédemment, les travaux de Bernon *et al.* (2011) ont montré qu'une augmentation d'expression de la Man2C1 conduit à la synthèse et au transfert d'un précurseur oligosaccharidique incomplet de type Man₉Gn₂ sur les protéines en cours de synthèse. Nous avons donc analysé la nature du précurseur oligosaccharidique transféré sur les N-glycoprotéines par marquage métabolique au [2-³H]-Mannose.

Comme indiqué figure 16 A, après 1h de marquage métabolique, nous observons dans les cellules HeLa (lignée contrôle) la présence de pics correspondant aux Man₈Gn₂ et au Glc₁Man₉Gn₂ ainsi qu'un pic majoritaire composé de Man₉Gn₂. Ce profil chromatographique est obtenu dans des conditions classiques c'est-à-dire lorsque le précurseur oligosaccharidique transféré sur les N-glycoprotéines en cours de synthèse est de type Glc₃Man₉Gn₂. Dans les lignées DU145, PC-3 et LNCaP, nous observons également la présence de ces 3 espèces Man₈Gn₂, Man₉Gn₂ et Glc₁Man₉Gn₂. Cependant, nous observons également la présence de plus petites espèces composées de Man₃Gn₂ à Man₇Gn₂.

Ainsi, nous observons des structures anormalement présentes de type Man₃₋₇Gn₂ et surtout de type Glc₁Man₅Gn₂ dans les lignées cancéreuses prostatiques. Ces résultats suggèrent la synthèse et le transfert d'un ou de plusieurs précurseurs oligosaccharidiques incomplets. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé la même expérience en présence d'un inhibiteur spécifique des glucosidases réticulaires, la castanospermine (Cst), inhibiteur des Glucosidases I et II impliquées dans le processus de maturation du précurseur oligosaccharidique après transfert sur les N-glycoprotéines (Figure 16 B).

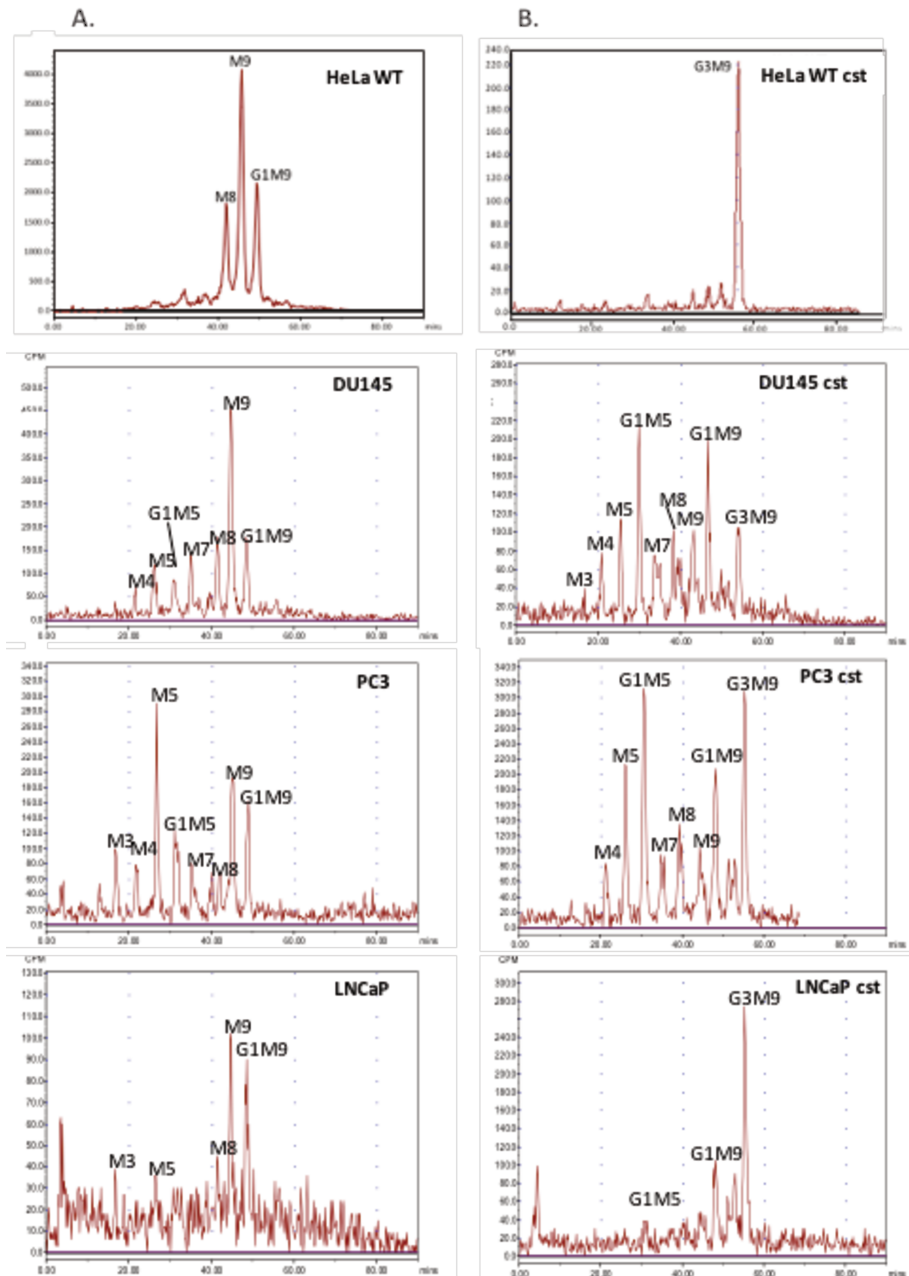


Figure 16: Analyse par marquage métabolique au mannose tritié du précurseur oligosaccharidique synthétisé et transféré sur les N-glycoprotéines en cours de synthèse (A : sans castanospermine B : Avec castanospermine)

Dans la lignée contrôle HeLa, nous observons la présence d'un pic unique composé de $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{Gn}_2$ qui représente bien le précurseur oligosaccharidique complet. Dans les lignées DU145, PC3 et LNCaP, nous observons également la présence de plus petites espèces :

- Dans la lignée DU145 : les espèces de type $\text{Man}_{3-9}\text{Gn}_2$, $\text{Glc}_1\text{Man}_5\text{Gn}_2$ et $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{Gn}_2$.

- Dans la lignée PC-3 : les espèces de type $\text{Man}_{4-9}\text{Gn}_2$, et un pic majoritaire de $\text{Glc}_1\text{Man}_5\text{Gn}_2$.

- Dans la lignée LNCaP : la présence de $\text{Glc}_1\text{Man}_5\text{Gn}_2$ et de $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{Gn}_2$.

Ainsi, en présence de Cst, nous observons des structures anormalement présentes dans les lignées cancéreuses prostatiques notamment des structures mono-glucosylées de type $\text{Glc}_1\text{Man}_5\text{Gn}_2$ et $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{Gn}_2$. Leur présence confirme la synthèse et le transfert de précurseurs oligosaccharidiques incomplets de type Man_5Gn_2 et Man_9Gn_2 . En effet, la présence de structures mono-glucosylées en présence de Cst résulte de l'action de l'UDPGlc : glycoprotéine-glucosyltransférase, qui permet l'ajout d'un résidu de Glc sur les N-glycoprotéines mal conformées, leur permettant ainsi de subir un nouveau cycle Calnexine/Calréticuline (voir Figure 5, page 10). En ce qui concerne les petites structures de type $\text{Man}_{3-8}\text{Gn}_2$, l'hypothèse la plus probable serait l'accélération du processus de maturation avec augmentation de l'activité catalytique de la ER mannosidase I présente dans le RE.

c. Etude du processus de maturation golgienne

Nous nous sommes ensuite intéressés au processus de maturation golgienne des glycanes qui, comme nous l'avons décrit, est perturbé au cours du phénomène de cancérisation. Nous avons donc analysé par spectrométrie de masse de type MALDI-Tof le N-glycome des différentes lignées cellulaires DU145, PC-3 et LNCaP (Figure 17).

Ainsi, nous observons :

- dans la lignée **DU145** :

- une proportion importante de structures oligomannosidiques dont l'espèce majoritaire est représentée par le Man_6Gn_2 .

- la présence de structures de type complexe tétra-antennées sialylées.

- dans la lignée **PC-3** :

- une proportion importante de structures oligomannosidiques dont l'espèce majoritaire est cette fois représentée par le Man_8Gn_2 .

- la présence de structures de type complexe tétra-antennées sialylées

- dans la lignée **LNCaP** :

- des structures complexes majoritairement asialylées tri- ou tétra-antennées, avec un pic majoritaire correspondant à une structure tétra-antennées asialylée mono-fucosylée.

- des structures de type oligomannosidiques dans des proportions similaires au type complexe.

Dans les 3 lignées cellulaires DU145, PC-3 et LNCaP, nous remarquons que la grande majorité des espèces sont fucosylées ce qui est en accord avec la littérature qui montre une augmentation de la fucosylation dans le processus de cancérisation (Kizuka and Taniguchi 2016).

Ces résultats suggèrent donc une modification du processus de glycosylation avec une diminution de l'anténnarisation et de la sialylation des protéines lorsque l'expression de la Man2C1 augmente.

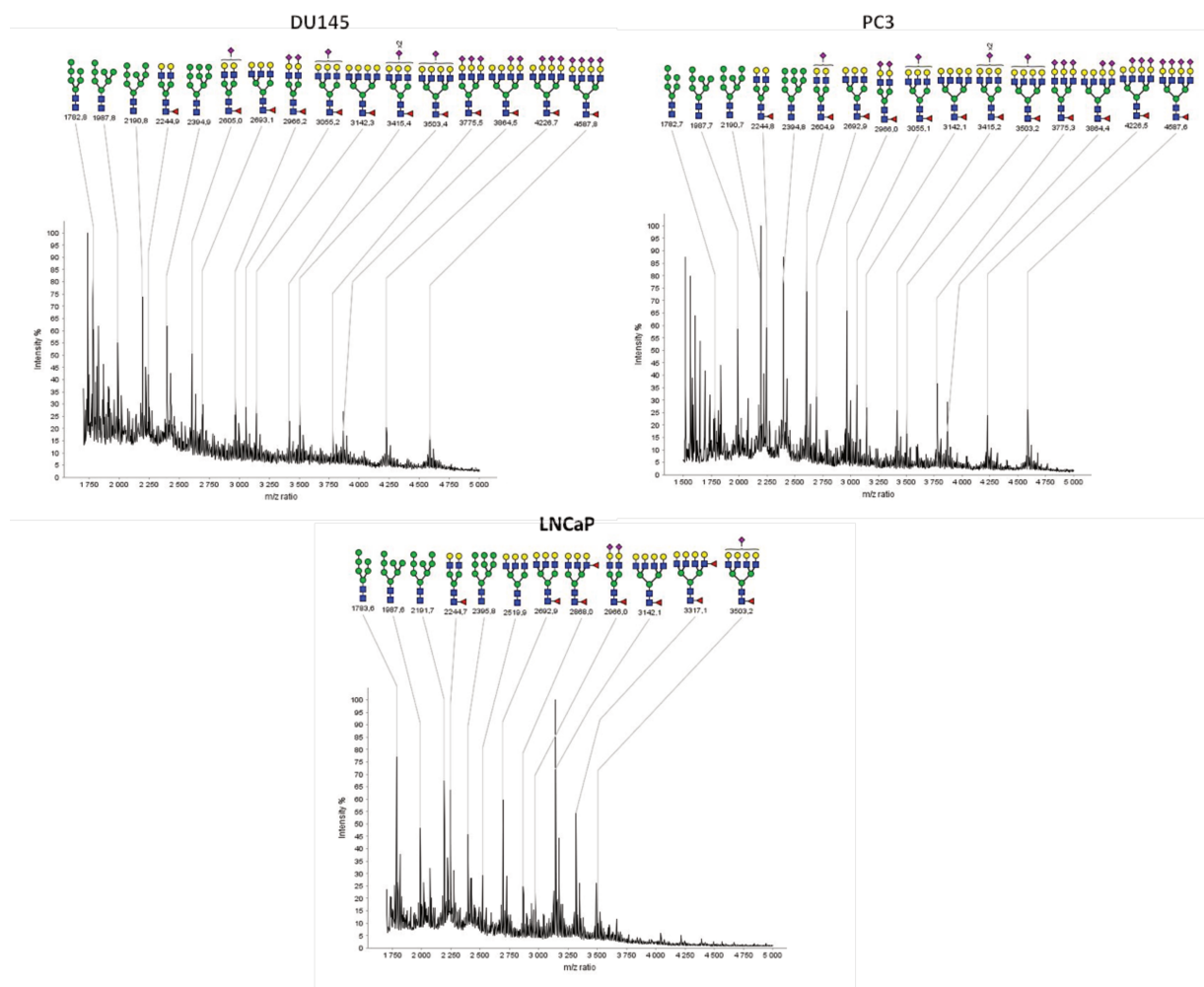


Figure 17: Analyse des N-glycannes par spectrométrie de masse de type MALDI-ToF
 (■ : GlcNAc ; ● : Man ; ● : Gal ; ◆ : acide sialique ; ► : fucose)

c) Etude de l'influence de l'expression de la Man2C1 sur l'activation de la voie PI3K/Akt

a. Etude de l'activation de Akt en fonction de l'expression de la Man2C1 dans les lignées cancéreuses prostatiques

Le développement et la progression tumorale sont régulés par différentes voies de signalisation intracellulaires et plus particulièrement par l'activation de la voie Akt. Des dérégulations dans l'activation de cette voie sont observées dans certains cancers comme le cancer du pancréas ou le cancer de la prostate (Nakatani et al. 1999; Xu et al. 2004).

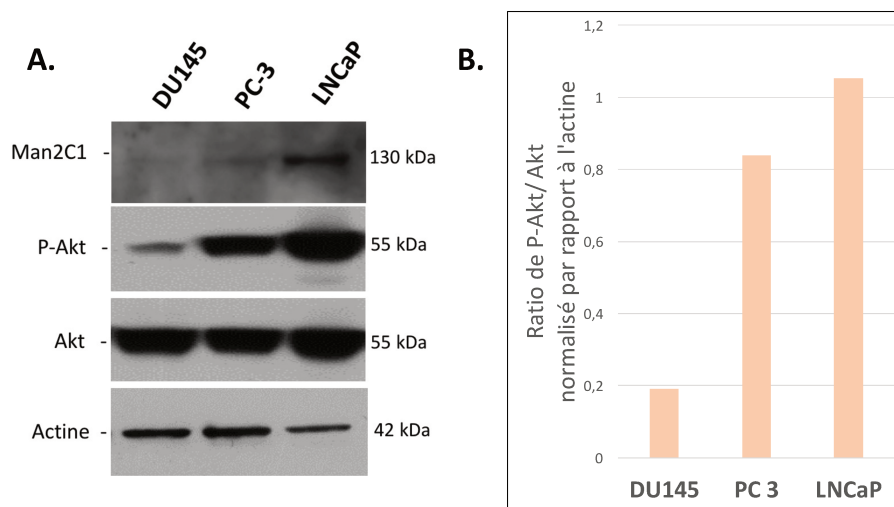


Figure 18: Etude de l'expression traductionnelle de la Man2C1 et de l'activation de la voie PI3K/Akt dans les lignées cancéreuses prostatiques

A : Western Blot de l'expression traductionnelle de la Man2C1, P-Akt et Akt dans les lignées DU145, PC-3 et LNCaP

B : Ratio de l'expression de la forme active de Akt, P-Akt / la forme totale de Akt normalisée par rapport à l'actine

La lignée DU145, présente une activation de Akt plus faible et donc un phénotype cancéreux moins avancé, ainsi qu'un taux d'expression plus faible de la Man2C1. En revanche, dans la lignée LNCaP, où le niveau d'activation de Akt est le plus élevé et donc que le phénotype cancéreux invasif est plus important, nous observons une très forte augmentation de l'expression de la Man2C1. Un niveau d'expression intermédiaire de la Man2C1 est observé dans la lignée PC-3, en corrélation avec l'activation de Akt et donc avec le phénotype de cancérisation. Ces résultats montrent donc une expression différentielle de la Man2C1 dans nos lignées cancéreuses prostatiques en fonction du stade de cancérisation ce qui tend à suggérer l'existence d'un lien entre l'expression de la Man2C1 et l'activation de la voie PI3K/Akt dans la cancérisation prostatique.

b. Influence de l'expression de la Man2C1 sur l'activation de Akt dans les lignées HeLa

L'analyse de l'expression traductionnelle de la Man2C1 ainsi que de l'activation de la voie PI3K/Akt suggèrent l'existence d'un lien entre l'expression de la Man2C1 et l'activation de Akt. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons également analysé l'expression de la Man2C1 ainsi que l'activation de Akt par Western Blot (Figure 19) dans des lignées HeLa surexprimant de façon stable la Man2C1, les lignées HeLa Rev2, HeLa Rev3 et HeLa NAM.

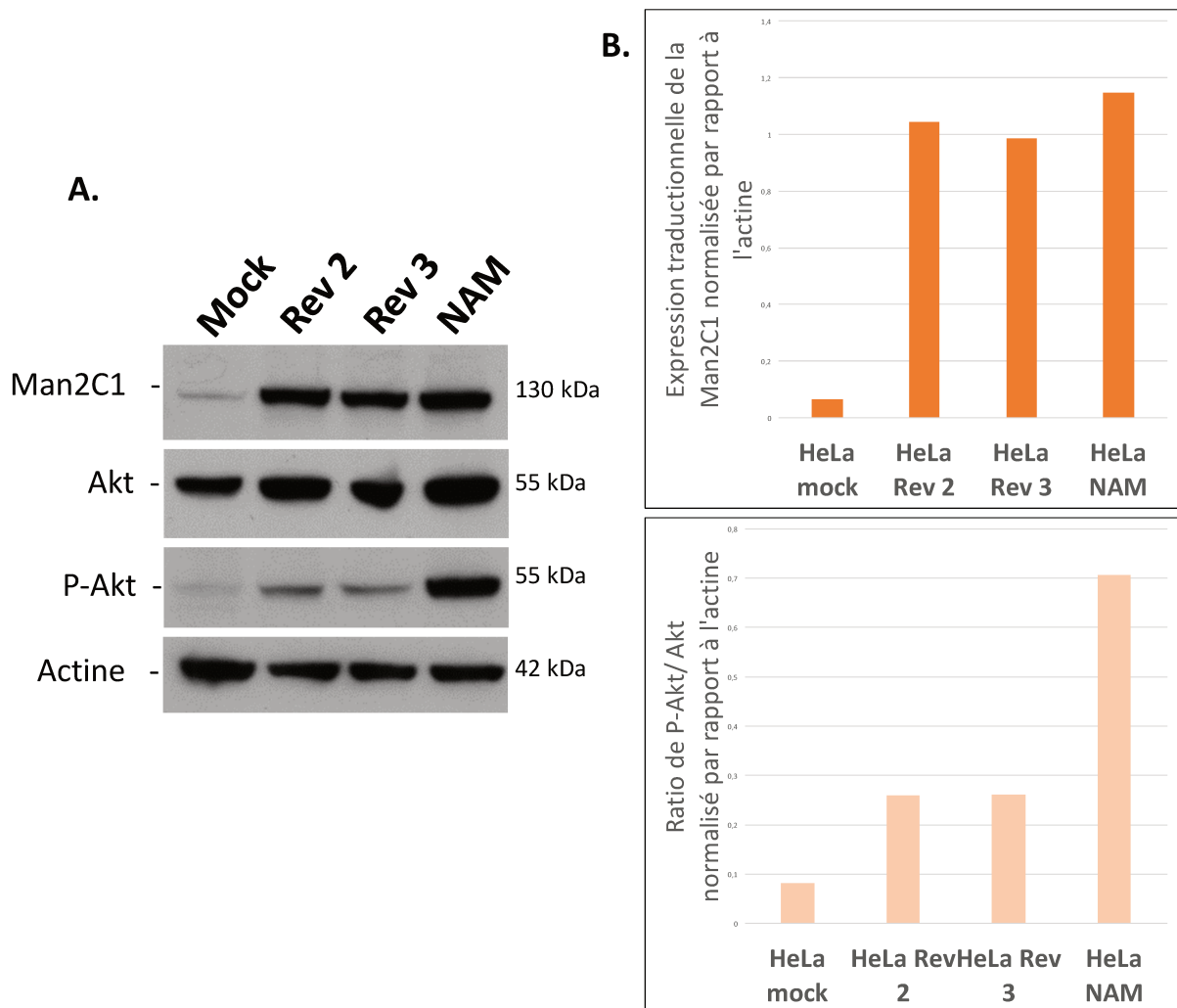


Figure 19: Analyse de l'expression traductionnelle de la Man2C1 et de l'activation de la voie PI3K/Akt dans des lignées HeLa surexprimant la Man2C1

A : Western Blot de l'expression traductionnelle de la Man2C1, P-Akt et Akt dans les lignées HeLa mock / Rev 2 / Rev 3 / NAM

B : Quantification de l'expression de la Man2C1 normalisée par rapport à l'actine et Ratio de l'expression de la forme active de Akt, P-Akt / la forme totale de Akt normalisée par rapport à l'actine

Les résultats obtenus montrent que dans la lignée contrôle (Hela mock), nous observons un niveau très faible d'expression de la Man2C1 et que la forme phosphorylée de Akt n'est pas détectable. En revanche, dans les lignées HeLa Rev2, Rev3 et NAM, l'augmentation d'expression de la Man2C1 est bien accompagnée d'une augmentation de l'activation de Akt. Ces résultats confirment donc l'existence d'un lien entre l'augmentation de l'expression de la Man2C1 et l'activation de la voie PI3K/Akt.

c. Etude de l'influence de l'augmentation d'expression de la Man2C1 sur l'activation de la voie Akt dans les lignées cancéreuses prostatiques

Toujours dans le même objectif, nous avons étudié le niveau d'activation de la voie Akt dans les lignées DU145 et PC-3 dans lesquelles nous avons surexprimé de façon transitoire la Man2C1.

Les résultats (Figure 20A) montrent que lorsque l'on augmente l'expression de la Man2C1 dans les 2 lignées cancéreuses prostatiques DU145 et PC-3, nous n'observons pas d'augmentation de l'activation de Akt en comparaison aux lignées DU145 et PC-3 d'origine. Nous avons procédé de la même façon avec la lignée LNCaP qui, comme nous l'avons montré, présente déjà un taux basal d'expression élevé de la Man2C1 (voir figure 11). Les résultats exprimés Figure 20B montrent que le fait de surexprimer la Man2C1 dans les LNCaP ne conduit pas à une activation supplémentaire de la voie PI3K/Akt.

De plus, l'inhibition de l'expression de la Man2C1 par siRNA ne montre aucun effet sur l'activation de la voie Akt. L'ensemble de ces résultats suggère donc que la modification du taux d'expression de la Man2C1 dans les lignées cancéreuses de prostate n'a pas d'impact sur l'activation de la voie PI3K/Akt.

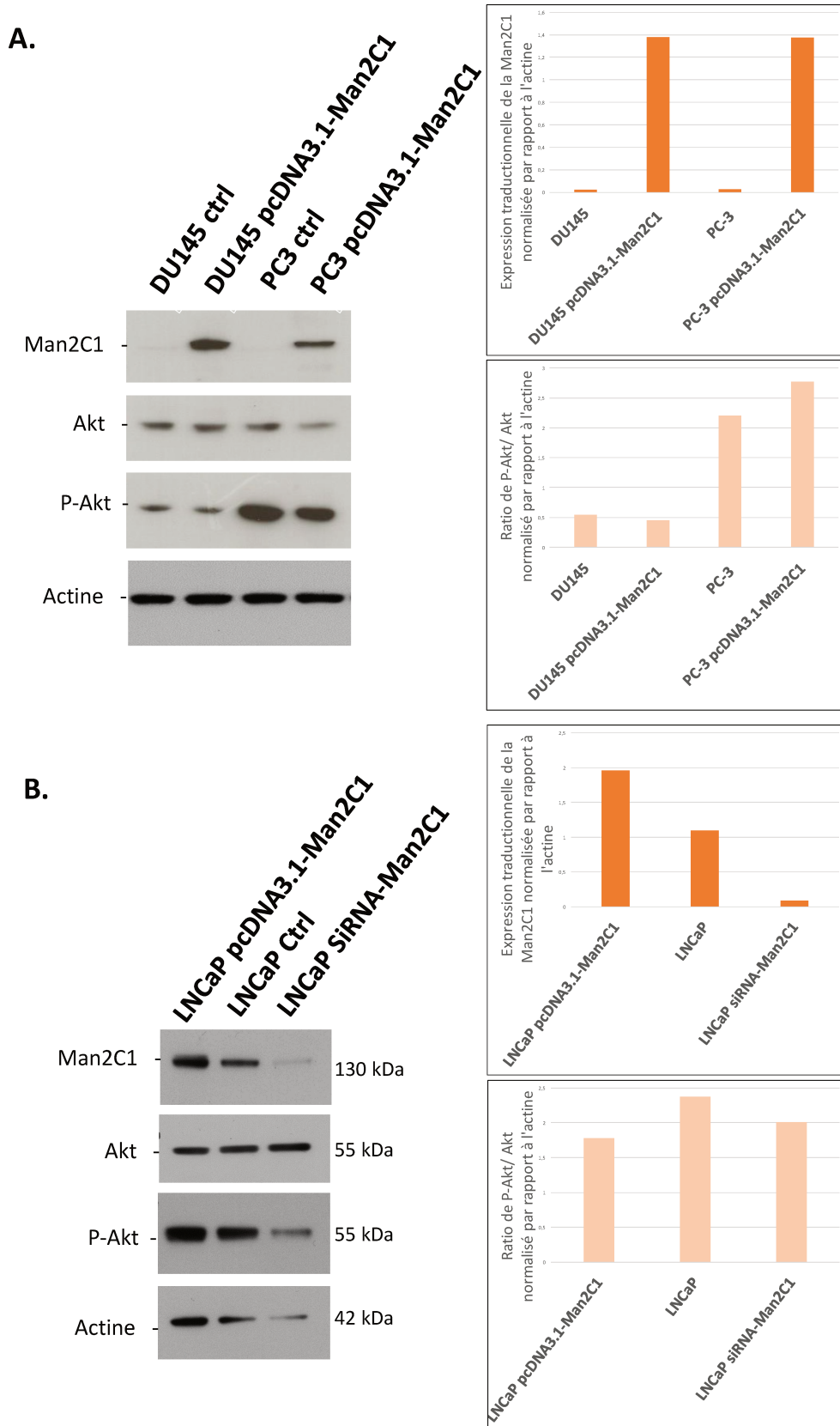


Figure 20: Analyse par Western Blot de l'influence de la surexpression de la Man2C1 sur l'activation de la voie PI3K/Akt

A : Lignées cancéreuses prostatiques DU145 et PC-3

B : Lignée cancéreuse prostatique LNCaP

d) Etude de l'influence de l'activité catalytique de la Man2C1 sur l'activation de la voie PI3K/Akt

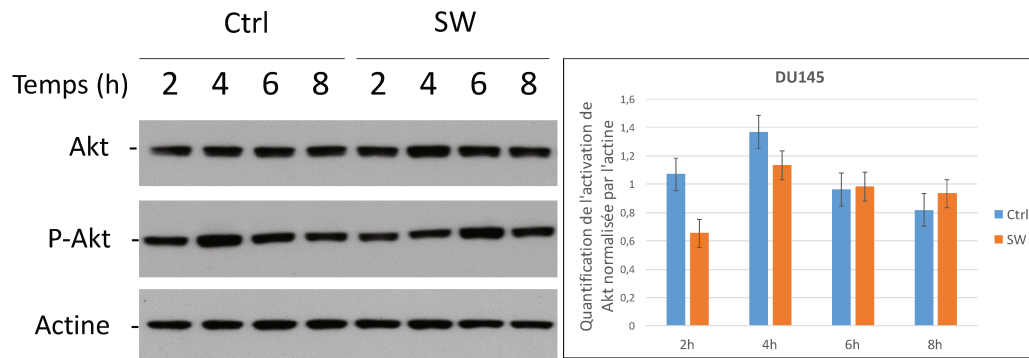
a. Dans les lignées cancéreuses prostatiques

Les résultats présentés précédemment suggèrent que le niveau d'expression de la Man2C1 n'est pas impliqué dans l'activation de la voie PI3K/Akt malgré l'existence d'un lien dans les lignées cancéreuses prostatiques.

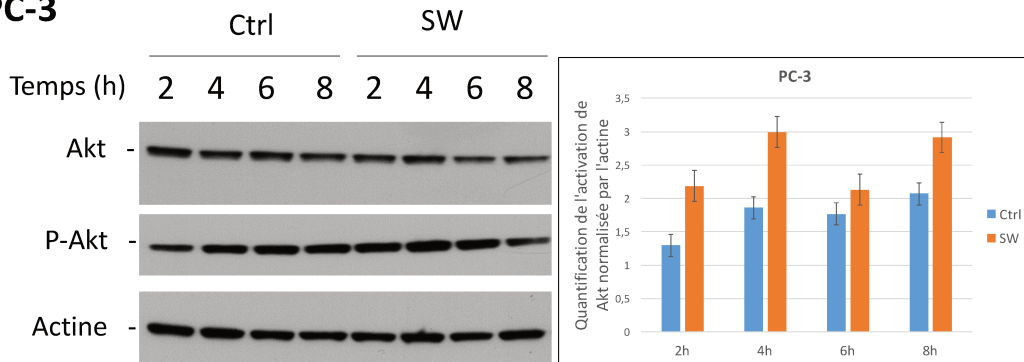
Dans un deuxième temps, nous avons regardé si l'activité enzymatique de la Man2C1 pouvait avoir une influence sur l'activation de la voie PI3K/Akt. En effet, on peut envisager que l'augmentation de l'activité catalytique, liée à la surexpression de la Man2C1, soit accompagnée d'une augmentation de l'interaction avec PTEN conduisant à une augmentation de l'activation de la voie PI3K/Akt.

Pour ce faire, nous avons cultivé nos différentes lignées cancéreuses prostatiques en présence d'un inhibiteur spécifique des mannosidases de classe II, la swainsonine (SW). Nous avons étudié l'activation de Akt par Western Blot après différents temps de traitement à la swainsonine (Figure 21).

DU145



PC-3



LNCaP

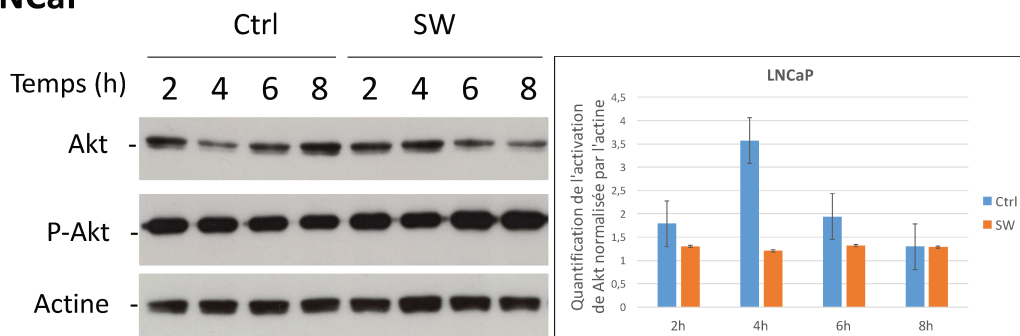


Figure 21: Etude de l'activation de Akt avec ou sans traitement à la swainsonine dans les lignées DU145, PC-3 et LNCaP

Les résultats obtenus montrent dans la lignée DU145 une diminution de l'activation de la voie PI3K/Akt après 2h et 4h de traitement. Pour des temps d'incubation plus long, nous observons des niveaux d'activation similaires entre les cellules contrôles et les cellules traitées avec la SW (Figure 21). Pour la lignée LNCaP, cette diminution d'activation est également observable jusqu'à 6h de traitement à la swainsonine. Néanmoins, après 8h de traitement, nous retrouvons également des taux d'activation de Akt similaires entre les cellules traitées ou non à la swainsonine (Figure 21). En revanche, dans la lignée PC-3, nous

observons un phénomène inverse, en effet, les cellules traitées en présence de swainsonine présente une plus forte activation de Akt en présence de swainsonine jusqu'à 8h de traitement.

Les résultats ne montrent pas de différences significatives dans l'activation de la voie PI3K/Akt et ne permettent donc pas de conclure quant à l'implication réelle de l'activité enzymatique de la Man2C1 sur l'activation de Akt.

b. Dans les lignées HeLa surexprimant la Man2C1

Nos résultats précédents ont montré une corrélation entre l'expression de la Man2C1 et l'activation de Akt dans les lignées HeLa. Nous avons donc étudié l'influence de l'activité catalytique de la Man2C1 dans ces 3 lignées HeLa Rev 2, HeLa Rev 3 et HeLa NAM. Nous avons donc cultivé nos cellules en présence de SW et nous avons analysé l'activation de la voie PI3K/Akt (Figure 22).

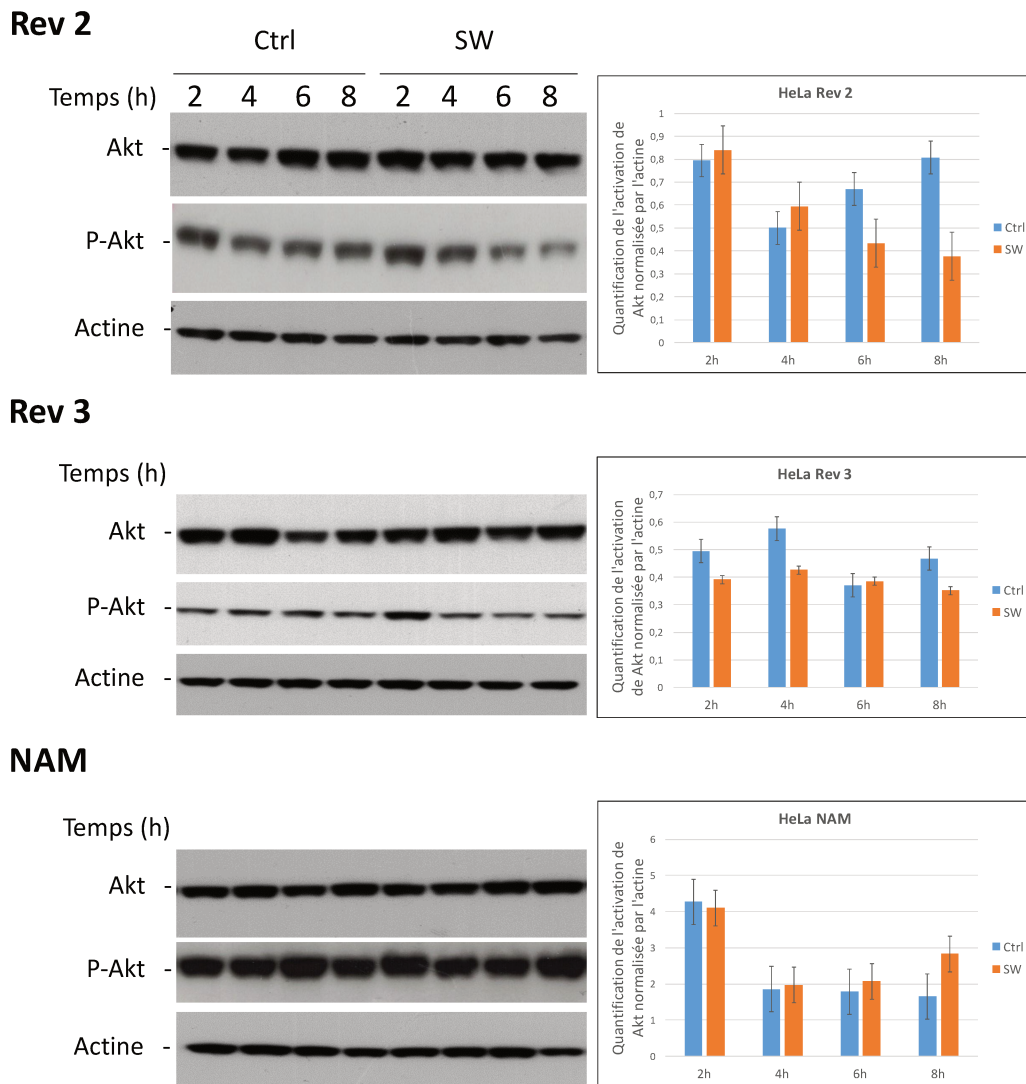


Figure 22: Etude de l'activation de Akt avec ou sans traitement à la swainsonine dans les lignées HeLa Rev 2, Rev 3 et NAM

Les résultats montrent, dans la lignée HeLa Rev 2, une diminution de l'activation de Akt à partir de 6h de traitement à la swainsonine. Pour la lignée HeLa Rev 3, nous observons une diminution d'activation de Akt dès le début de traitement à la swainsonine jusqu'à 8h. Pour la lignée HeLa NAM, nous observons une augmentation de l'activation de Akt en présence de SW en comparaison aux cellules non traitées.

Pour les lignées HeLa Rev 2 et HeLa Rev 3, les résultats sont en accord avec l'hypothèse selon laquelle l'activation de la voie PI3K/Akt dépend de la Man2C1. En revanche, pour la lignée HeLa NAM, les résultats sont en désaccord avec cette hypothèse puisque nous observons une augmentation de l'activation de Akt lorsque l'activité catalytique de la Man2C1 est inhibée par la SW. Ces résultats ne permettent donc pas de conclure quant à l'implication de l'activité catalytique de la Man2C1 dans l'activation de Akt.

e) Etude des variations d'expression de la Man2C1 et du processus de N-glycosylation dans des biopsies de patients atteints du cancer de la prostate

Nous avons bénéficié d'une collaboration avec le Centre de Biologie et Pathologie (CBP) de Lille et plus particulièrement avec la tumorotheque de Lille (Dr. Marie-Christine COPIN). Celle-ci nous a permis de disposer de biopsies de patients atteints d'un cancer de la prostate à un stade plus ou moins avancé dans la maladie. L'intérêt de ces échantillons reposait sur le fait que nous avons à la fois une partie saine et tumorale d'un même patient. Ces biopsies nous ont permis d'étudier par Western-Blot l'expression traductionnelle de la Man2C1 ainsi que le profil de N-glycosylation des protéines.

a. Etude de l'expression traductionnelle de la Man2C1 dans des parties saines et tumorales de patients

Nous avons dans un premier temps analysé l'expression traductionnelle de la Man2C1 par western-blot (Figure 23).

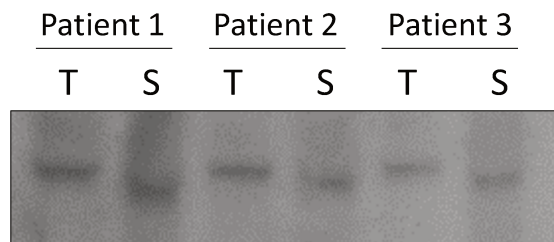


Figure 23: Analyse par Western Blot de l'expression de la Man2C1 dans des biopsies de parties saines et tumorales de patients atteints d'un cancer de la prostate

Les résultats exprimés dans la Figure 23, ne montrent pas de différence dans le niveau d'expression de la Man2C1 sur les 3 biopsies de patients atteints d'un cancer de la prostate. Par contre, nous observons une différence dans le profil de migration de la Man2C1 entre les parties saines et tumorales. En effet, nous observons une augmentation de la masse moléculaire apparente de la Man2C1 dans les parties tumorales en comparaison aux parties saines. Cette différence pourrait s'expliquer par la présence d'une modification post-traductionnelle. La Man2C1 est composée de 3 sites potentiels d'ubiquitinylation et de 10 sites potentiels de phosphorylation/O-GlcNAcylation. Seuls 2 résidus ont pu être clairement identifiés comme phosphorylés sur la Man2C1, en position S480 et T482 (Olsen et al. 2006). Nous avons essayé de mettre en évidence l'une et l'autre de ces modifications

post-traductionnelles, en réalisant des essais d'immuno-précipitation de la Man2C1 endogène présente dans les biopsies. Malheureusement à ce jour aucun résultat n'a pu confirmer la présence ou non de ces modifications et si ces modifications étaient à l'origine de la différence de masse moléculaire apparente de la Man2C1 observée entre les parties saines et tumorales des biopsies de patients.

b. Etude de la N-glycosylation dans les biopsies de patients

Afin de confirmer les résultats obtenus dans les lignées cancéreuses prostatiques, nous avons analysé le profil de glycosylation par spectrométrie de masse de type MALDI-Tof (Figure 24).

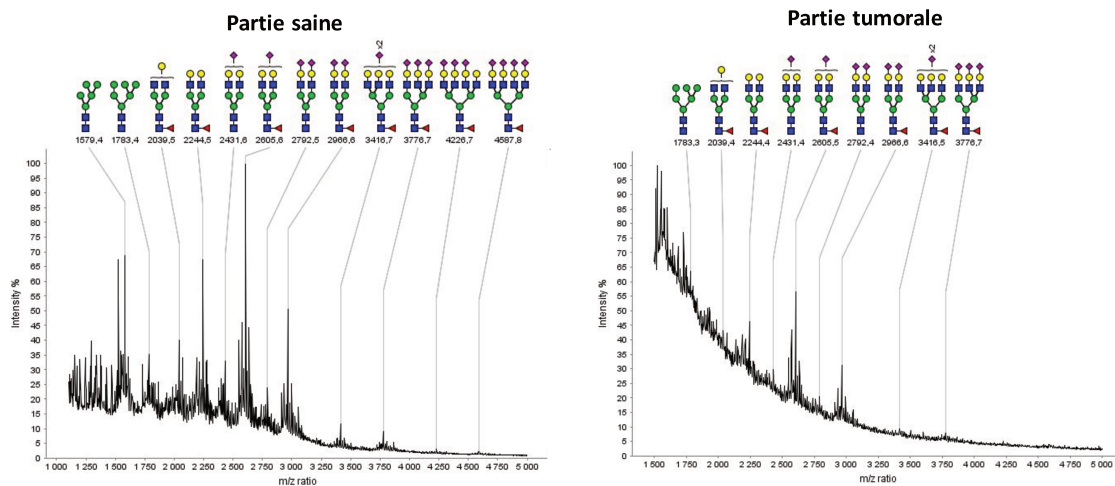


Figure 24 : Profil glycanne des N-glycoprotéines issues de parties saines et tumorales de biopsies de patients

Dans la partie saine, nous observons la présence d'un pic majoritaire bi-antenné, mono-sialylé, mono-fucosylé. Nous observons également la présence de structures tétra-antennées sialylées. Nous remarquons également que la grande majorité des structures sont mono-fucosylées. Dans la partie tumorale, le pic majoritaire est identique bi-antenné, mono-sialylé et fucosylé. En revanche, nous observons une disparition des structures tétra-antennées et une très forte diminution des structures tri-antennées. Nous remarquons également que la majorité des structures sont fucosylées.

Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus sur les lignées cancéreuses prostatiques montrant une diminution de l'antennarisation associée à une diminution de la sialylation ainsi qu'une augmentation de la fucosylation dans les biopsies de partie tumorale en comparaison aux parties saines.

4) Conclusion et Perspectives

De nombreuses enzymes impliquées dans la biosynthèse des N-glycoprotéines ont été montrées comme pouvant être modifiées dans le phénomène de cancérisation et plus particulièrement les glycosyltransférases. En effet, des études ont montré une augmentation de l'expression ou de l'activité de certaines glycosyltransférases dans le phénomène de cancérisation, la GlcNAc-T V dans le cancer hépatique ou encore FUT8 dans le cancer gastrique (Kizuka and Taniguchi 2016). Récemment, il a été montré pour la première fois l'implication d'une glycosidase dans le phénomène de cancérisation. En effet, He *et al.* (2011) ont suggéré l'implication de la Man2C1 dans le cancer de la prostate et plus particulièrement dans l'activation de la voie PI3K/Akt. Les auteurs ont suggéré une interaction entre la Man2C1 et PTEN ce qui activerait la voie PI3K/Akt et donc favoriserait la prolifération et la croissance cellulaire et inhiberait l'apoptose. De plus, la Man2C1 est une enzyme du catabolisme des N-glycoprotéines mal conformées envoyées dans le processus de dégradation ERAD. Des études portant sur la Man2C1 ont montré que l'augmentation de son expression conduit à la synthèse d'un précurseur oligosaccharidique tronqué dans le RE ainsi qu'à une augmentation du processus de dégradation ERAD. C'est dans ce contexte que nous avons initié l'étude de l'implication de la Man2C1 dans la cancérisation prostatique.

La première partie de mon travail de thèse a consisté en l'étude de l'expression de la Man2C1 dans différentes lignées cancéreuses prostatiques DU145, PC-3 et LNCaP. Ces lignées sont issues de métastases de patients atteints d'un cancer de la prostate. Nos résultats ont montré une expression différentielle de la Man2C1 avec une augmentation de son expression en corrélation avec le phénomène de cancérisation via l'étude de l'activation de la voie PI3K/Akt. Ces résultats ont donc suggéré une implication potentielle de la Man2C1 dans le phénomène de cancérisation. Cette étude a également été réalisée dans des cellules présentant différents niveaux d'expression de la Man2C1. Les résultats obtenus ont montré une augmentation de l'activation de Akt en corrélation avec l'expression de la Man2C1. De plus, des études portant sur l'expression de la Man2C1 ont montré qu'une inhibition de son expression conduit à l'adhésion des cellules Jurkat (Qu et al. 2006) et à une diminution de la croissance ainsi qu'une induction de l'apoptose (Tian et al. 2008). Nous nous sommes donc intéressés au niveau d'expression de la Man2C1 ainsi qu'à l'activation de la voie PI3K/Akt

dans les lignées cancéreuses prostatiques. L'induction d'une surexpression (dans les lignées DU145 et PC3) ou d'une diminution d'expression (lignée LNCaP) n'ont pas permis de mettre en évidence une corrélation entre le niveau d'expression de la Man2C1 et l'activation de Akt. De la même façon, nous avons étudié l'influence de l'activité catalytique de la Man2C1 sur l'activation de la voie PI3K/Akt en utilisant la SW, un inhibiteur spécifique de la Man2C1. Les résultats obtenus ne permettent pas de conclure quant à l'implication potentielle de l'activité catalytique de la Man2C1 dans l'activation de Akt. Des études précédentes menées par Bernon *et al.* (2010) montrent que la surexpression de la Man2C1 dans la lignée cellulaire HeLa conduit à une augmentation du pool cytoplasmique en Man-6-P ainsi qu'à une diminution de l'UDP-Glc. De plus, une étude portant sur l'influence de la quantité de Glc cytoplasmique a montré qu'une diminution de la quantité de Glc conduit à la phosphorylation de Akt et donc à son activation (Gao et al. 2014). Un autre phénomène, « l'effet Warburg » est connu pour être associé au processus de cancérisation. L'effet Warburg est mis en place dans les cellules cancéreuses pour favoriser la production énergétique à partir de Glc (Cairns, Harris, and Mak 2011). Il a également été montré dans les cellules cancéreuses présentant une forte augmentation d'expression de Akt une augmentation de la consommation de Glc par stimulation de la glycolyse (Elstrom et al. 2004). En tenant compte de ces études et de nos résultats, l'hypothèse la plus probable serait que l'augmentation de Akt, dans les lignées cancéreuses prostatiques et plus particulièrement dans la lignée LNCaP, favorise la diminution du pool de Glc cytoplasmique et donc conduit à une perturbation du pool de Glc nécessaire à la synthèse des précurseurs nucléotidiques. Afin de confirmer cette hypothèse, une quantification de la quantité de Glc cytoplasmique pourrait être envisagée en présence ou non de MK-2206, un inhibiteur de Akt.

Dans ce travail, nous avons focalisé notre étude sur l'impact de l'expression de la Man2C1 sur l'activation de Akt. Nous pouvons nous poser la question inverse : n'est-ce pas l'activation de Akt qui influence l'expression de la Man2C1 ? Pour cela, nous nous proposons d'étudier l'influence de Akt sur l'expression de la Man2C1 en utilisant un inhibiteur spécifique de Akt, le MK-2206 qui va permettre d'inhiber la phosphorylation de Akt et ainsi inhiber l'activation de la voie de signalisation induite par Akt. Nous pourrions ainsi observer l'effet de cette inhibition sur l'expression de la Man2C1.

Néanmoins, la voie PI3K/Akt n'est pas la seule voie de signalisation impliquée dans les phénomènes de cancérisation. En effet, d'autres voies peuvent avoir un impact sur la prolifération cellulaire, la croissance ou encore l'inhibition de l'apoptose, c'est le cas de Erk1/2, protéines de la voie des MAP-kinases, impliquée dans la croissance cellulaire ou encore NF- κ B, facteur de transcription, impliqué dans la mise en place des signaux apoptotiques. Il serait très intéressant d'étudier ces différentes voies dans nos différentes lignées cellulaires et d'étudier l'impact de l'expression et/ou de l'activité catalytique de la Man2C1 sur l'activation de ces différentes voies de signalisation.

La Man2C1 est une enzyme du catabolisme cytosolique de la partie glycanique des N-glycoprotéines envoyées vers le processus de dégradation ERAD. Les résultats obtenus montrent la présence de 3 espèces pouvant être transférées sur les N-glycoprotéines, le Glc₃Man₉Gn₂, espèce normalement retrouvée, le Man₉Gn₂, espèces ayant été montrée comme pouvant être transférée sur les protéines en cours de synthèse lors d'une surexpression de la Man2C1 (Bernon et al. 2011), et le Man₅Gn₂, espèces ayant été montrée comme pouvant être transférée sur les N-glycoprotéines en cours de synthèse lorsque les cellules sont soumises à un stress et que la réponse UPR est activée (Foulquier et al. 2002). L'analyse des oligosaccharides solubles présents dans le cytosol nous a également confirmé ce résultat puisque nous observons la présence d'espèces de type Man₅₋₈Gn₁ ne provenant pas de l'action de la Man2C1 puisque l'inhibition de son activité catalytique nous montre une conservation de ces espèces. En ce qui concerne les plus petites espèces présentes dans le cytosol, de type Man₃₋₄Gn₁, il a été montré qu'elles pouvaient provenir de l'action de la Man2C1. En effet, la surexpression de la Man2C1 conduit à une augmentation de son activité catalytique et donc à une activité enzymatique pouvant permettre la dégradation des oligosaccharides solubles jusqu'au Man₃Gn₁ (Bernon et al. 2011). De plus, des études ont montré que des enzymes de glycosylation peuvent être sensibles aux androgènes, c'est le cas de EDEM3 dont l'expression est augmentée en présence d'androgènes ce qui conduit à l'augmentation de l'apparition de structures anormales envoyées vers la voie de dégradation ERAD (Munkley et al. 2016). C'est donc la sensibilité aux androgènes de la lignée LNCaP qui pourrait expliquer l'apparition des structures glycaniques tronquées.

Nous avons également analysé le processus de glycosylation golgien par spectrométrie de masse de type MALDI-Tof. Cette analyse a montré des différences entre nos résultats et la littérature. En effet, le processus de cancérisation est connu pour s'accompagner d'une augmentation de l'antennarisation via l'augmentation de la GlcNAc-T V et l'augmentation de la fucosylation par augmentation de l'expression de FUT8. Nos résultats montrent une diminution de l'antennarisation avec disparition des espèces tétra-antennées dans la lignée cellulaire LNCaP, présentant la plus forte activation de Akt. Dans les lignées DU145 et PC-3, les résultats obtenus n'ont pas montré de réelle différence puisque l'antennarisation ainsi que la fucosylation semblent être en accord avec ceux observés dans la littérature. Une explication à cette différence majeure dans la lignée LNCaP pourrait provenir du fait que cette lignée est la seule lignée androgéno-dépendante.

La dernière partie de ce travail a consisté en l'étude de l'implication de la Man2C1 dans la cancérogenèse prostatique dans des biopsies de patients. Les résultats obtenus ont montré une augmentation de la masse moléculaire apparente de la Man2C1 dans les parties tumorales en comparaison aux parties saines. Cette différence de masse moléculaire apparente est faible et nous supposons qu'elle puisse avoir pour origine une modification post-traductionnelle. L'étude de la séquence protéique de la Man2C1 montre la présence de 3 résidus de Lysine pouvant être modifiés par ubiquitinylation et de 10 résidus de Sérine/Thréonine pouvant être modifiés par phosphorylation ou O-GlcNAcylation. De nombreuses études ont montré l'importance de la O-GlcNAcylation dans le processus de cancérisation prostatique. En effet, il a montré une augmentation de la O-GlcNAcylation des protéines impliquées dans les voies de signalisation intracellulaires (de Queiroz, Carvalho, and Dias 2014) ou encore dans l'invasion et la progression tumorale prostatique (Lynch et al. 2012). De plus, il a été démontré que dans « l'effet Warburg », l'augmentation de la glycolyse conduisait à une augmentation de l'entrée de Glc via GLUT1 et ainsi favoriserait la voie de biosynthèse des hexosamines et donc favoriserait la O-GlcNAcylation (Józwiak et al. 2014). Nous pouvons donc supposer que la modification post-traductionnelle de la Man2C1 soit une O-GlcNAcylation qui modifie son activité enzymatique ou qui permette son interaction avec d'autres protéines impliquées dans la régulation de la voie PI3K/Akt. L'étude de cette modification post-traductionnelle semble être la clé pour comprendre le

mécanisme par lequel l'expression de la Man2C1 est modifiée dans les biopsies de patients atteints d'un cancer de la prostate.

Nous avons finalement étudié la structure des N-glycannes retrouvés au sein des biopsies de patients. Pour cela, nous avons réalisé une étude préliminaire de la glycosylation golgienne par spectrométrie de masse de type MALDI-Tof. Les premiers résultats ont montré une diminution de l'antennarisation dans les parties tumorales en comparaison aux parties saines. Ces premiers résultats sont encourageants et semblent être en accords avec ceux obtenus dans les lignées cancéreuses prostatiques. Afin de poursuivre ce travail, une étude statistique sera nécessaire afin de confirmer ces premiers résultats.

Dans son ensemble, ce travail a permis de mettre en évidence une augmentation de l'expression de la Man2C1 en relation avec le degré de progression du processus de cancérisation de la prostate à partir de lignées cellulaires humaines. Nous avons également montré une altération du processus de N-glycosylation liée à un transfert de précurseurs oligosaccharidiques incomplets sur les protéines en voie de synthèse. Enfin, ce travail a permis de suggérer l'existence d'une modification post-traductionnelle sur la Man2C1 dans les parties tumorales de biopsies de patients. Malheureusement, à ce jour, nos résultats ne nous ont pas permis de conclure sur l'implication potentielle de la Man2C1 dans la cancérogenèse prostatique.

C/ Analyse fonctionnelle de Gdt1p chez *Saccharomyces cerevisiae*

Comme nous l'avons énoncé, des perturbations du processus de N-glycosylation peuvent conduire à l'apparition de pathologies congénitales parmi lesquelles nous retrouvons les Congenital Disorders of Glycosylation (CDG) divisées en 2 groupes. Les CDG de type I sont liées à la déficience d'une enzyme impliquée dans la synthèse du précurseur oligosaccharidique transféré sur les protéines en cours de synthèse dans le RE. Les CDG de type II dont la déficience concerne un facteur impliqué dans la maturation golgienne glycanique des N-glycoprotéines (Jaeken 2013). A l'heure actuelle, la déficience d'une vingtaine de protéines a été mise en évidence, la plupart d'entre elles sont des glycosyltransférases impliquées dans la maturation golgienne. Cependant, depuis quelques années, d'autres déficiences concernant des protéines impliquées dans l'homéostasie ionique golgienne conduisent également à un CDG de type II. C'est dans ce contexte, que Foulquier *et al.* (2012) ont identifié une nouvelle protéine impliquée dans un CDG II, TMEM165-CDG, la fonction de TMEM165 est inconnue mais les mutations de cette protéine semblent avoir un impact dans le processus de glycosylation.

1) Généralités

a) La N-glycosylation

a. Le processus de N-glycosylation chez *Saccharomyces cerevisiae*

Le modèle levure a longtemps été utilisé afin d'étudier le processus de glycosylation et plus particulièrement la glycosylation réticulaire. En effet, le modèle levure a permis la découverte des enzymes impliquées dans la biosynthèse du précurseur oligosaccharidique lors du cycle des dolichols (Burda and Aebi 1999). L'étude du processus de glycosylation réticulaire a permis de montrer que les étapes et les enzymes impliquées sont les mêmes chez l'Homme et chez *Saccharomyces cerevisiae*. C'est à partir de cette étape que les étapes de glycosylation divergent entre l'Homme et la levure. En effet, nous avons vu précédemment chez l'Homme, la présence de glycosyltransférases qui vont permettre

l'ajout séquentiel de résidus de N-acétylglucosamine, de galactose, d'acides sialiques et de fucoses conduisant à l'apparition de structures de type complexe.

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, nous observons uniquement la présence de structures mannosylées qui peuvent être de 2 types, le « core-type » ou le type polymannosylé. Le « core-type » sera plus souvent retrouvé sur les glycoprotéines présentes dans les différents organites intracellulaires et les structures hautement mannosylées seront portées par des glycoprotéines périsplasmiques ou localisées dans la paroi (Munro 2001).

Le processus de glycosylation golgien débute par l'ajout d'un résidu de mannose en $\alpha 1,6$ sur la partie N-glycannique de la N-glycoprotéine nouvellement synthétisée composée de 8 résidus de Mannose. Cette étape nécessite l'intervention d'une mannosyltransférase, Och1p. C'est à partir de cette structure que le processus de glycosylation golgien va former le « core-type » et le type polymannosylé (Figure 25) :

- **Le « core-type »** : est issu de l'action d'une $\alpha 1,2$ mannosyltransférase suivie d'une $\alpha 1,3$ mannosyltransférase (Mnn1p), qui vont permettre d'obtenir un glycanne composé de 11 résidus de mannose et 2 résidus de GlcNAc.
- **Le type polymannosylé** : la première étape est réalisée par le complexe M-Pol I, composé de 2 enzymes, Mnn9p et Van1p, responsable de l'ajout d'une dizaine de résidus de mannose liés en $\alpha 1,6$. Un second complexe, M-Pol II (Mnn9p, Anp1p, Mnn10p, Mnn11p et Hoc1p), va poursuivre cette élongation en ajoutant jusqu'à une cinquantaine de résidus de mannose liés en $\alpha 1,6$ (Jungmann and Munro 1998). L'étape d'élongation de la chaîne centrale se termine par l'action d'une $\alpha 1,2$ mannosyltransférase, Mnn2p, qui ajoute des résidus de mannose liés en $\alpha 1,2$ sur la chaîne principale. Une deuxième $\alpha 1,2$ -mannosyltransférase, Mnn5p va ensuite permettre l'addition de résidus supplémentaires de mannose en $\alpha 1,2$ sur la chaîne principale (Rayner and Munro 1998). Sur certaines branches on peut avoir fixation d'un phosphomannose grâce à 2 enzymes, Mnn6p et Mnn4p. La maturation glycannique se termine par l'action d'une $\alpha 1,3$ -mannosyltransférase, Mnn1p, qui ajoute un dernier résidu de mannose sur chaque résidu de mannose en position terminale. Ainsi, l'action de ces diverses mannosyltransférases permet de transférer jusqu'à 200 résidus de

mannose ce qui confère une très grande hétérogénéité N-glycannique chez la levure (A. Herscovics and Orlean 1993).

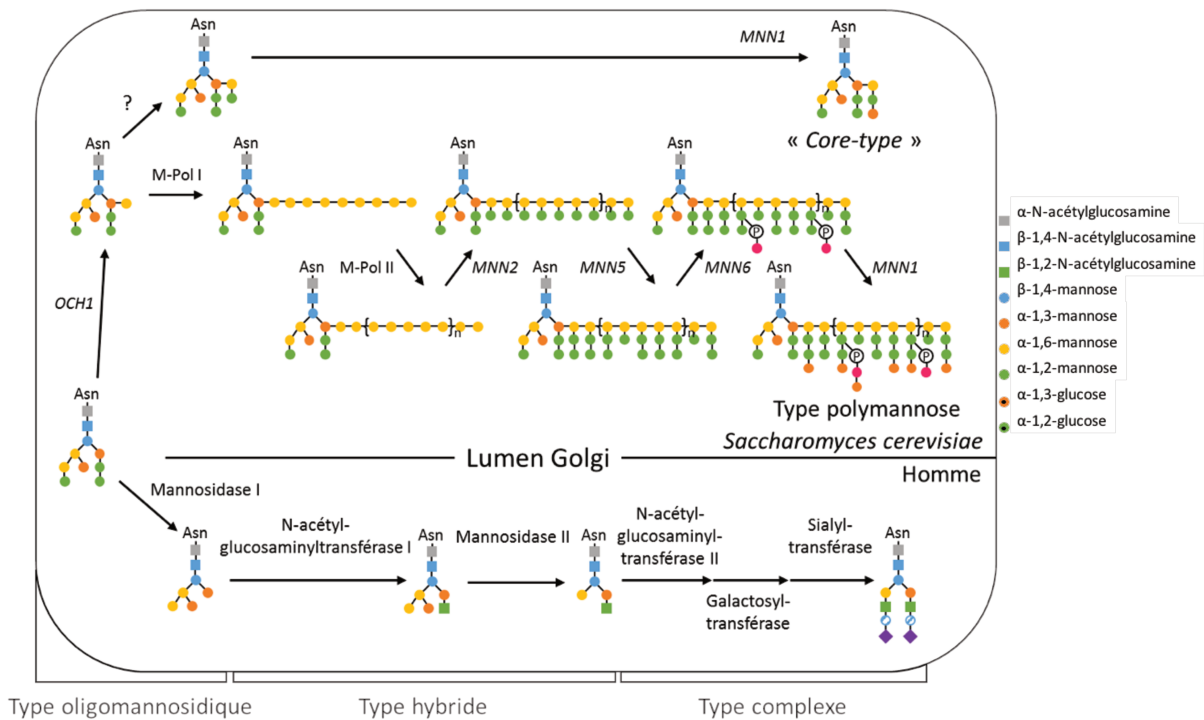


Figure 25 : Comparaison de la maturation glycanique golgienne chez *Saccharomyces cerevisiae* et chez l'Homme

Les mannosyltransférases de levure sont des enzymes possédant un segment transmembranaire permettant leur ancrage dans la membrane de l'appareil de Golgi. Elles possèdent également un motif DxD, motif catalytique, présent chez toutes les mannosyltransférases de levure (Wiggins and Munro 1998). L'activité catalytique de ces enzymes a été montrée comme étant Mn^{2+} -dépendante (Rayner and Munro 1998; Striebeck et al. 2013).

b. Un modèle d'étude de la N-glycosylation : l'invertase

L'extrême hétérogénéité N-glycannique ne facilite pas l'étude du processus de maturation golgienne chez la levure. Néanmoins, il existe une technique permettant l'analyse de la glycosylation d'une protéine rapportrice : l'invertase. L'invertase est une protéine présente sous 2 formes chez *Saccharomyces cerevisiae*, une forme cytosolique non glycosylée et une forme sécrétée dans l'espace périplasmique situé entre la membrane

plasmique et la paroi, hautement glycosylée qui possède 13 sites potentiels de N-glycosylation. L'invertase est une β -fructofuranosidase qui utilise le saccharose comme substrat, mais également le raffinose. En absence de glucose, elle va donc permettre la libération de fructose, source de carbone nécessaire pour la croissance. Il existe 2 voies d'incorporation différentes pour ces 2 substrats. En effet, le saccharose peut directement entrer dans la cellule par des transporteurs. Il pourra donc être clivé par l'invertase cytosolique, exprimée de façon constitutive au sein de la cellule. En revanche, le raffinose ne peut pas entrer directement sous cette forme dans la cellule. La levure a donc mis en place un mécanisme de sécrétion d'une forme hautement glycosylée de l'invertase qui permet l'hydrolyse du raffinose et libère le fructose qui pourra entrer dans la cellule (Gascón, Neumann, and Lampen 1968).

En 1990, Ballou *et al.* ont mis au point une séparation électrophorétique de l'invertase sur gel natif permettant la mise en évidence d'un défaut de glycosylation. Afin de mettre en évidence l'état de glycosylation de l'invertase présente dans une souche de levure, il faut induire sa sécrétion. Pour cela, les levures sont placées en culture dans un milieu YPR, contenant pour unique source de carbone le raffinose. La levure va donc induire la transcription du gène SUC2, codant pour l'invertase. L'invertase hautement glycosylée sera alors sécrétée dans l'espace périplasmique pour permettre l'hydrolyse du raffinose. L'électrophorèse sur gel natif des lysats cellulaires est ensuite réalisée et l'invertase est révélée grâce à son activité enzymatique (Figure 26). La forme cytosolique non glycosylée présente une masse moléculaire apparente faible et donc une vitesse de migration plus rapide et est donc localisée en bas du gel. La forme hautement glycosylée, dont la partie glycanique de l'invertase représente environ 50% de sa masse totale, est localisée en haut du gel. Lors d'un défaut de glycosylation de l'invertase, on observe une perte de masse conduisant à une migration plus rapide de l'invertase qui se retrouve dans une position intermédiaire entre la forme cytosolique et la forme hautement glycosylée. Cette technique permet donc d'identifier facilement la présence de défauts de glycosylation dans une souche de levure.

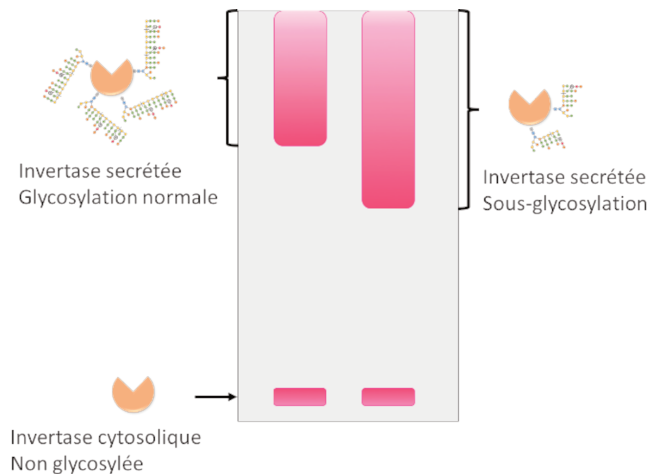


Figure 26 : Représentation schématique d'un profil de migration de l'invertase

b) Homéostasie cellulaire chez *Saccharomyces cerevisiae*

L'homéostasie cellulaire et plus particulièrement l'homéostasie golgienne est importante dans le processus de N-glycosylation. En effet, certains CDG ont été montrés comme conduisant à une perturbation de l'homéostasie de l'appareil de Golgi, c'est le cas de ATP6VOA2-CDG ou encore TMEM199-CDG (Kornak et al. 2008; Jansen et al. 2016).

a. L'homéostasie calcique et les transporteurs

- **L'homéostasie calcique**

Le Ca^{2+} est impliqué dans de nombreuses fonctions physiologiques et plus particulièrement dans l'émission de signaux intracellulaires nécessaires à la prolifération cellulaire ou encore à la mort cellulaire programmée (Berridge, Lipp, and Bootman 2000). Une régulation fine de la concentration en calcium cytosolique est nécessaire afin d'y maintenir une concentration basale comprise entre 50 et 200 nM (Cui et al. 2009). Il existe donc différents organites de stockage du calcium dans la cellule.

Chez la levure, 90 % du pool calcique contenu dans la cellule va être stocké dans la vacuole (3 mM) dont 99% est sous forme couplée au phosphate (Dunn, Gable, and Beeler 1994). En ce qui concerne la voie de sécrétion, on observe la présence d'un gradient de concentration calcique entre le RE et l'appareil de Golgi allant respectivement de 10 μM à 300 μM (Strayle, Pozzan, and Rudolph 1999)(Pinton, Pozzan, and Rizzuto 1998) (Figure 27).

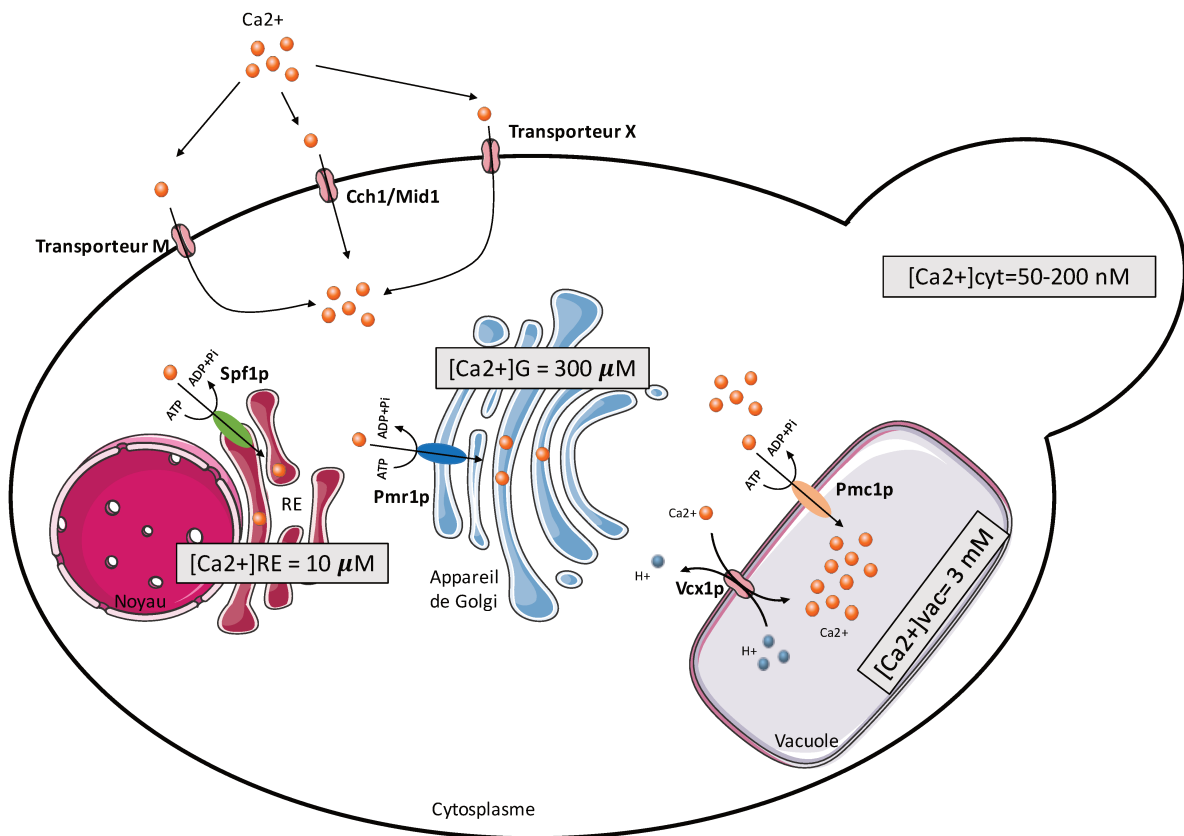


Figure 27: L'homéostasie calcique et les transporteurs de Ca²⁺ chez *Saccharomyces cerevisiae*

- **Les transporteurs de Ca²⁺**

Les transporteurs de Ca²⁺ sont présents à la membrane plasmique mais également dans les différents organites permettant ainsi de maintenir la concentration cytosolique faible et permettre le stockage du Ca²⁺ dans les différents organites. Différents transporteurs ont été mis en évidence et caractérisés chez *Saccharomyces cerevisiae* (Figure 27) :

- **Transporteur X** : localisé au niveau de la membrane plasmique. Il va permettre l'import de Ca²⁺ à travers la membrane plasmique. Son activité est Mg²⁺-dépendante.
- **Transporteur M** : il présente les mêmes caractéristiques que le transporteur X mais son activité présente une plus forte sensibilité au Mg²⁺.
- **Cch1p/Mid1p** : son activité va permettre de combler le déficit des stocks calciques après un relargage massif de Ca²⁺ par la vacuole.
- **Pmc1p** : Ca²⁺-ATPase permettant l'import de Ca²⁺ dans la vacuole.

- **Vcx1p** : échangeur $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ localisé dans la membrane de la vacuole. Il permet le stockage du Ca^{2+} dans la vacuole en utilisant le gradient de protons généré par une pompe ATPase.
- **Cod1p/Spf1p** : ATPase de type P permettant l'import de Ca^{2+} dans la lumière du RE.
- **Pmr1p** : Ca^{2+} -ATPase golgienne permettant l'import de Ca^{2+} dans l'appareil de Golgi.

b. L'homéostasie du Mn^{2+} et ses transporteurs associés

• L'homéostasie du Mn^{2+}

Le manganèse est un ion divalent qui intervient dans la fonctionnalité de nombreuses protéines. En effet, il est le cofacteur d'enzymes telles que les oxydoréductases ou encore les mannosyltransférases (Sigel and Sigel 1998). Cependant, cet élément est retrouvé à l'état de trace dans la cellule car il présente une grande toxicité à concentration élevée ce qui conduit à une dérégulation mitotique des cellules (Garcia-Rodriguez et al. 2012).

• Les transporteurs de manganèse

Au sein de la levure, il existe donc des transporteurs spécifiques du manganèse permettant son import mais également son stockage pour permettre la détoxification du cytosol (Figure 28) :

- **Smf1p** : transporteur localisé à la membrane plasmique. Il permet l'import du Mn^{2+} mais il permet également l'import d'autres ions divalents comme le Fe^{2+} , le Zn^{2+} et le Cd^{2+} .
- **Pho84p** : transporteur de groupements phosphates couplés au Mn^{2+} au niveau de la membrane plasmique.
- **Smf2p** : transporteur de Mn^{2+} localisé dans des vésicules apparentées aux endosomes, permet l'import du Mn^{2+} nécessaire aux enzymes Mn^{2+} -dépendantes.
- **Ccc1p** : permet l'import de Mn^{2+} dans la vacuole.
- **Spf1p** : ATPase de type permettant l'import de Mn^{2+} dans la lumière du RE. Cette protéine permet également le transport du Ca^{2+} .
- **Pmr1p** : $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -ATPase, permet l'import de Mn^{2+} et de Ca^{2+} dans l'appareil de Golgi.

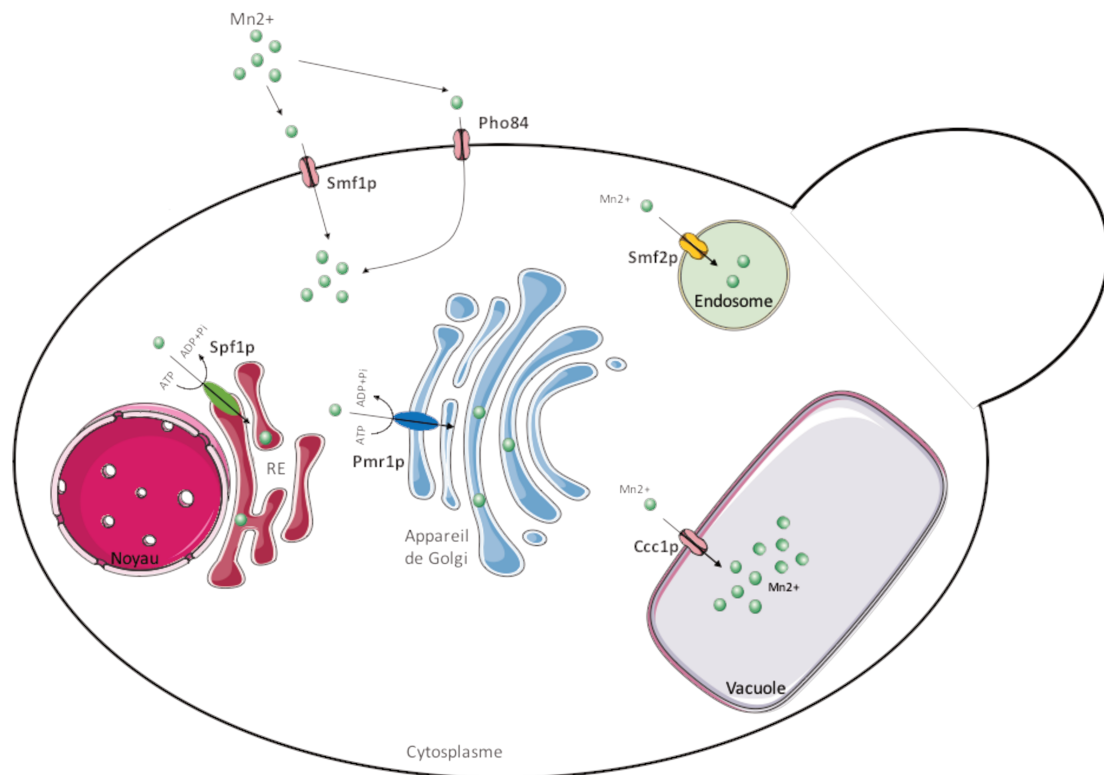


Figure 28 : les transporteurs de Mn^{2+} chez *Saccharomyces cerevisiae*

- **La régulation de l'expression des transporteurs de Mn^{2+}**

Des études ont déterminé l'impact d'une augmentation de la concentration en Mn^{2+} dans le milieu extérieur et ont mis en évidence la présence de mécanismes de régulation de l'expression de certains transporteurs à la membrane plasmique permettant ainsi de réguler l'import de Mn^{2+} dans la cellule. En effet, une étude menée par Liu *et al.* (1999) a montré que l'augmentation de la concentration en Mn^{2+} du milieu conduit à une dégradation rapide de Smf1p (X. F. Liu and Culotta 1999). Il a également été montré une dégradation de Smf2p en présence de fortes concentrations en Mn^{2+} dans le milieu (Au et al. 2009). En revanche, pour Pho84p, Atx2p, Pmr1p et Ccc1p, aucun lien n'a été montré entre la concentration en Mn^{2+} cytosolique et le niveau d'expression de ces protéines. Il semble donc que la cellule met en place des mécanismes de régulation d'expression des importeurs de Mn^{2+} au sein de la membrane plasmique afin de diminuer l'import de Mn^{2+} mais également sa toxicité.

c. Pmr1p

- **Généralités**

A ce jour, l'unique transporteur connu de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ dans l'appareil de Golgi est Pmr1p. Pmr1p est une protéine transmembranaire de 105 kDa composée de 8 segments transmembranaires et localisée dans le Golgi médian. Cette protéine est l'unique source d'entrée de Ca^{2+} dans l'appareil de Golgi décrite à ce jour. Dans une souche délétée en PMR1 ($\text{pmr1}\Delta$), on observe une accumulation de Ca^{2+} cytosolique confirmant le rôle de Pmr1p dans la « détoxification » du Ca^{2+} cytosolique (Halachmi and Eilam 1996). Dans une souche $\text{pmr1}\Delta$, on observe également un important retard de croissance sur un milieu pauvre en Ca^{2+} (Rudolph et al. 1989). Ce phénotype de retard de croissance peut être supprimé par l'ajout de Ca^{2+} dans le milieu (Cunningham and Fink 1994), ce qui confirme bien le rôle de pmr1p dans l'import de Ca^{2+} nécessaire à la croissance cellulaire. Pmr1p a également été montré comme intervenant dans l'import de Mn^{2+} dans la lumière de l'appareil de Golgi. En absence de pmr1p , on observe une augmentation de la concentration cytosolique en manganèse, ce qui suggère un rôle de pmr1p dans la détoxification du cytosol (Lapinskas et al. 1995).

- **Mutants pmr1p**

Pmr1p est connu comme étant le seul transporteur de Ca^{2+} et de Mn^{2+} dans la membrane de l'appareil de Golgi. La présence de motifs spécifiques et plus particulièrement les AA impliqués spécifiquement dans le transport du Ca^{2+} et du Mn^{2+} ont été décrits. En effet, 3 mutants ont été définis comme assurant spécifiquement le transport du Ca^{2+} , du Mn^{2+} ou ne permettant plus aucun transport, respectivement les mutants, pmr1p-Q783A , pmr1p-D53A et pmr1p-D778A (Wei et al. 1999; Mandal, Woolf, and Rao 2000)(Figure 29). L'utilisation de ces mutants se révèle donc essentielle pour permettre l'analyse de l'homéostasie golgienne.

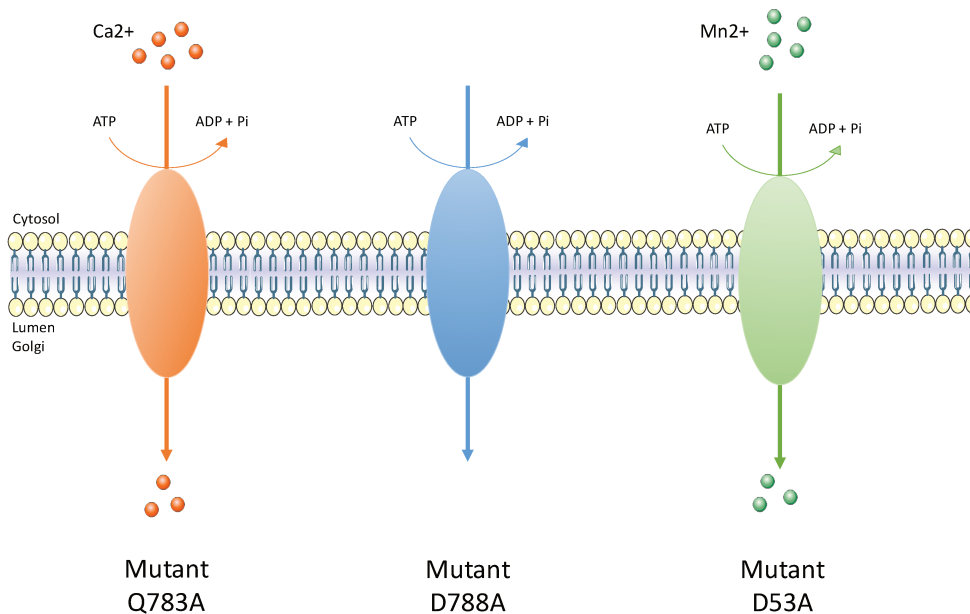


Figure 29 : les différents mutants de pmr1p

c) TMEM165-CDG

a. Topologie et domaines

TMEM165 (Transmembrane protein 165) est une protéine humaine composée de 324 acides aminés. Cette protéine a été décrite comme étant insérée dans la membrane de l'appareil de Golgi (Foulquier et al. 2012). Les prédictions de topologie ont montré que TMEM165 est organisé en 7 segments transmembranaires, 3 boucles cytosoliques et 3 boucles luminales. L'analyse de la séquence protéique a également montré la présence de motifs spécifiques pouvant conférer une fonction à TMEM165 (Figure 30) :

- Séquence Y₁₂₄NRL₁₂₇ : cette séquence a été décrite comme pouvant être une séquence d'adressage aux lysosomes (YXXØ) (Brulke and Bonifacino 2009). Cette séquence est localisée dans la 1^{ère} boucle cytosolique.
- Séquence L₂₀₉L₂₁₀ : cette séquence appartient à une séquence non canonique [DE]XXXL[LI]. Elle est située dans la grande boucle cytosolique organisée en domaine coiled-coil.
- Motifs EXGDK/R : situés à la fin du 2^{ème} et du 5^{ème} segment transmembranaire. Ces motifs sont composés d'AA acides qui pourraient jouer un rôle dans la reconnaissance des cations. Ces motifs sont caractéristiques de la famille Uncharacterized Protein Family 0016 (UPF0016).

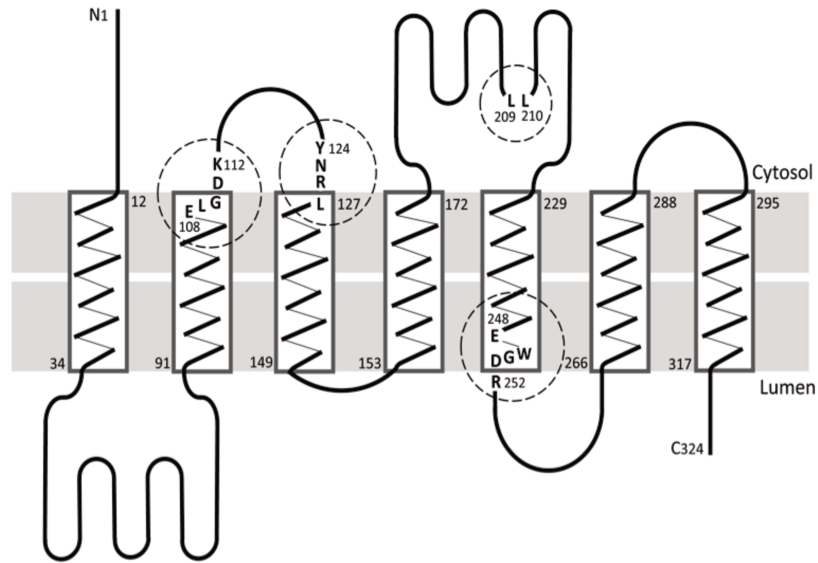


Figure 30: Prédiction de la topologie de TMEM165 et motifs conservés
(D'après Dulary et al. (2016))

b. TMEM165-CDG

Les patients atteints de TMEM165-CDG présentent un important retard de croissance et psychomoteur, de l'ostéoporose ainsi qu'une scoliose marquée. Quatre mutations dans la protéine TMEM165 ont été identifiées chez 6 patients (Figure 31) :

- Mutation c.792+182G>A : cette mutation est présente chez 3 premiers patients et va conduire à la présence de 2 isoformes, l'isoforme wild-type et une isoforme supplémentaire dans laquelle l'exon 4 a été remplacé par une séquence de 117pb.
- Mutation c.377G>A : mutation faux-sens homozygote d'une Arginine en Histidine (p.Arg126His) (patient 4).
- Mutations c.377C>T et c.910G>A : mutations faux-sens hétérozygotes qui vont conduire à 2 mutations dans la séquence protéique p.Arg126Cys et p.Gly282His (patient 5).
- Mutation c.323A>G : cette mutation va conduire à la substitution d'un acide glutamique en glycine (p.Glu108Gly) dans le motif ELGDK du 2^{ème} segment transmembranaire (patient 6).

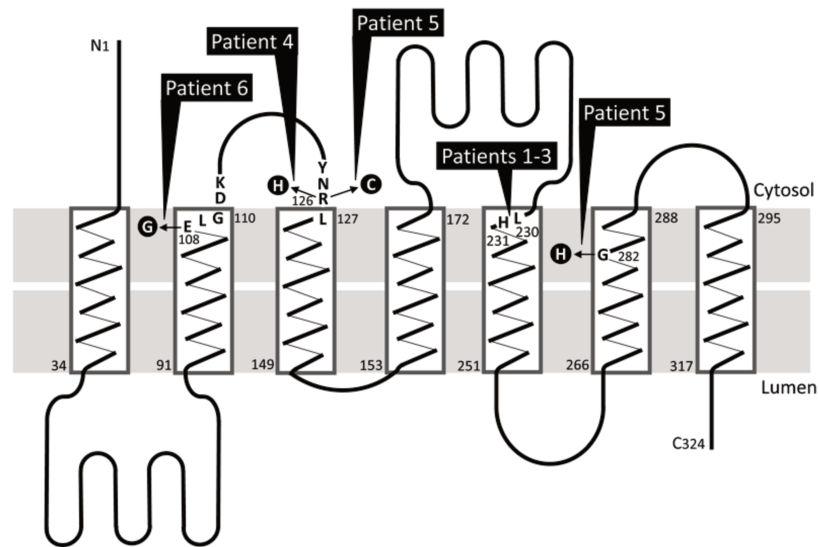


Figure 31: Mutations protéiques de TMEM165 identifiées chez 6 patients atteints d'un TMEM165-CDG
(Dulary et al. (2016))

TMEM165 est exprimée de façon ubiquitaire. Chez les patients atteints d'un TMEM165-CDG on observe une absence de l'expression protéique de TMEM165 pour les patients 1-3 et une diminution d'expression pour les patients 4-6. La protéine a été montrée comme possédant une localisation golgienne. La surexpression de TMEM165 dans des cellules HeLa a montré la présence d'une faible proportion de TMEM165 à la membrane plasmique (Rosnoblet et al. 2013).

Afin d'appréhender la fonction de TMEM165, une étude du processus de glycosylation golgien a été réalisée dans les fibroblastes de patients. Cette étude a permis de mettre en évidence des défauts dans différents types de glycosylation : la N-Glycosylation, la O-Glycosylation, les Glycosaminoglycans (GAG) et les glycolipides :

- L'étude du processus de N-glycosylation a permis de montrer une diminution de la maturation des N-glycannes (Foulquier et al. 2012; Xia et al. 2013). Une diminution de la galactosylation des protéines a également été mise en évidence (Althoff et al. 2015; Potelle et al. 2016). En 2013, Zeevaert *et al.* ont également montré une diminution de la fucosylation dans le cas des TMEM165-CDG.
- La O-glycosylation a également été montrée comme pouvant être affectée dans le cas des TMEM165-CDG. En effet, une diminution de la galactosylation affectant les

O-glycoprotéines a été observée entraînant ainsi une diminution de la sialylation (Foulquier et al. 2012; Xia et al. 2013).

- Des modifications dans la partie glycanique portée par les glycolipides et les GAG ont pu être observées, notamment avec une diminution de la galactosylation des glycolipides ainsi qu'une disparition des glycosaminoglycanes dans les cellules HEK293 KO-TMEM165 (données non publiées).

Ces données montrent une modification générale des processus de glycosylation lors d'une mutation ou d'une déficience en TMEM165 ce qui tend à suggérer un rôle majeur de TMEM165 dans le processus de glycosylation golgien.

L'étude des domaines fonctionnels de TMEM165 n'a pas révélé la présence de domaines impliqués directement dans le processus de glycosylation golgien tels que des domaines de fixation de glycannes ou d'interactions avec les nucléotides-sucre indiquant que TMEM165 n'est pas un transporteur de nucléotides-sucre. La présence des motifs EXGDK/R, caractéristiques de la famille UPF0016, tend à suggérer un rôle de TMEM165 dans le transport de cations à travers la membrane de l'appareil de Golgi. C'est donc sur la base de cette hypothèse que différentes études ont été menées pour définir le rôle précis de TMEM165 en tant que transporteur golgien (Foulquier et al. 2012; Rosnoblet et al. 2013).

Les premières études fonctionnelles de TMEM165 ont montré que sa surexpression dans des cellules HeLa conduit à une délocalisation partielle de la protéine au niveau de la membrane plasmique, accompagnée d'une diminution de la concentration en calcium cytosolique. Ces mêmes auteurs ont également montré que l'absence de TMEM165 conduit à la diminution de pH des compartiments acides intracellulaires (endosomes tardifs/lysosomes). Les auteurs ont alors suggéré l'implication de TMEM165 à la fois dans le transport de Ca^{2+} et dans le maintien du pH intracellulaire (Demaegd et al. 2013).

c. L'orthologue fonctionnel de TMEM165 chez *Saccharomyces cerevisiae* : Gdt1p

TMEM165 est une protéine conservée au cours de l'évolution. En effet, sa présence a été observée chez 919 espèces procaryotes différentes et 409 espèces eucaryotes (Demaegd et al. 2013). Chez *Saccharomyces cerevisiae*, un orthologue fonctionnel de TMEM165 a été décrit et étudié, GDT1. Gdt1p (Gcr1 dependent translation factor 1) possède 280 AA et

présente 34% d'identité avec TMEM165 (Figure 32). L'homologie de séquence concerne essentiellement les segments transmembranaires. La principale différence provient de l'absence des 55 premiers AA de TMEM165 chez Gdt1p ce qui conduit à la disparition du 1^{er} segment transmembranaire chez la levure. On observe également la conservation des motifs caractéristiques de la famille UPF0016, ELGDK/EWGDR et EIGDK/ELGDR, respectivement chez l'Homme et la levure. Nous notons également une conservation de la grande boucle cytosolique organisée en « coil-coiled » chez ces 2 espèces. Des études menées parallèlement sur TMEM165 et Gdt1p ont permis de mettre en évidence une orientation identique de ces 2 protéines avec la présence de la grande boucle du côté cytosolique (Rosnoblet et al. 2013).

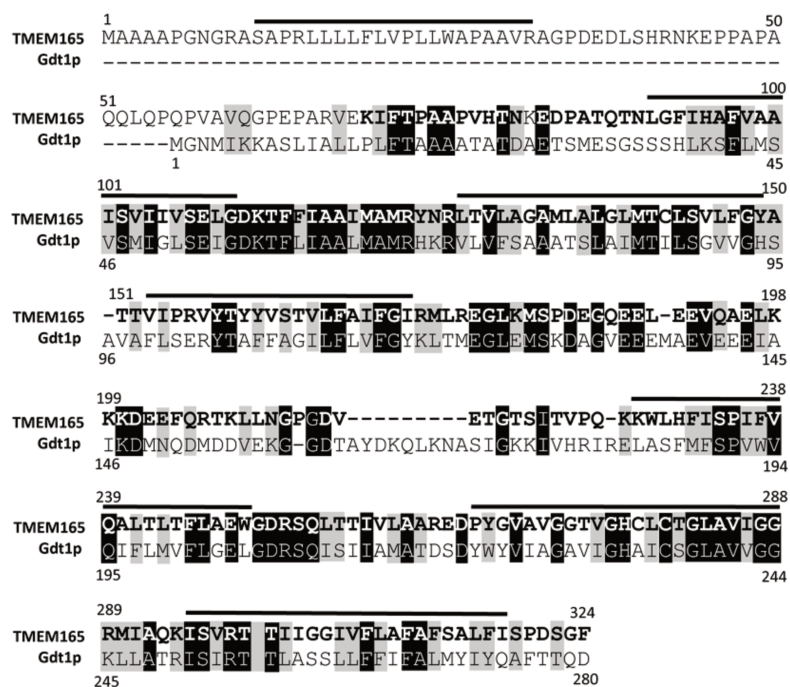


Figure 32: Alignement des séquences protéiques entre TMEM165 et Gdt1p
(Dulary et al. 2016)

Rosnoblet *et al.* (2013) ont montré un important retard de croissance de la souche délétée en GDT1 (*gdt1Δ*) sur un milieu riche en CaCl₂ (900 mM). Des essais de complémentation des levures *gdt1Δ* par la forme humaine de TMEM165 ont été réalisés. Les résultats obtenus se sont révélés assez surprenants puisque la forme WT de TMEM165 ne complémente pas le défaut de croissance observé pour la souche *gdt1Δ* alors que la forme TMEM165 délétée des 55 premiers AA complémente partiellement le défaut de croissance. Les auteurs ont alors émis l'hypothèse que les 2 protéines, TMEM165 et Gdt1p, possèdent la même fonction mais

que l'expression de TMEM165 (forme wild-type) présenterait une localisation incorrecte dans la souche *gdt1Δ* (Demaegd et al. 2013). Récemment, Colinet *et al.* (2016) ont montré que l'expression de Gdt1p chez *Lactococcus lactis* conduit à une augmentation de la concentration cytosolique en Ca^{2+} . Les auteurs ont alors émis l'hypothèse selon laquelle *gdt1p* serait un transporteur de Ca^{2+} .

L'étude du processus de N-glycosylation dans des souches délétées en GDT1 a montré, sous forte pression calcique, l'existence d'un défaut de glycosylation. Il a également été montré que ce défaut de glycosylation est restauré par l'ajout de 1 mM de MnCl_2 dans le milieu de culture (Potelle et al. 2016).

A partir de cette étude, Gdt1p est suggéré être impliqué à la fois dans l'homéostasie calcique et dans l'homéostasie du Mn^{2+} de l'appareil de Golgi. Plusieurs hypothèses ont alors été émises (figure 33) :

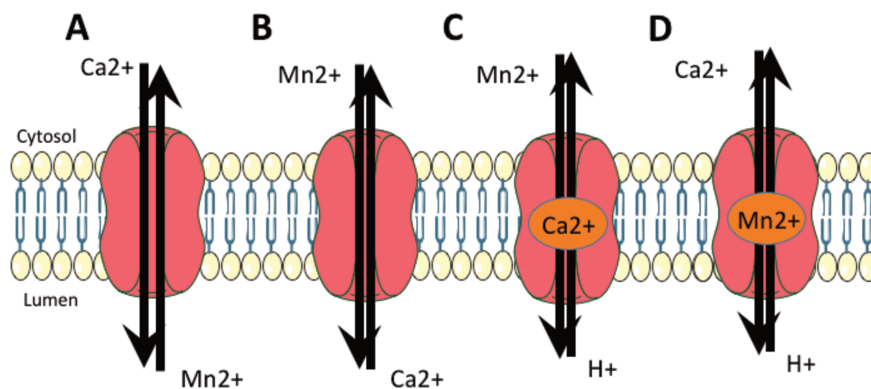


Figure 33: rôles hypothétiques de GDT1/TMEM165 dans l'homéostasie golgienne
 Gdt1p est un antiporteur $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ (A et B) ; Gdt1p est un antiporteur $\text{Mn}^{2+}/\text{H}^+$ dont l'activité est dépendante du Ca^{2+} (C) ; Gdt1p est un antiporteur $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ dont l'activité dépend du Mn^{2+} (D) (Dulary et al. 2016)

d) Problématique et Objectifs

Le modèle levure a été un outil indispensable pour la compréhension du processus de glycosylation réticulaire puisqu'il est le même chez l'Homme et la levure. Par contre, du fait que la nature des glycosyltransférases golgiennes est différente, entre l'Homme et la levure, le modèle levure a largement été délaissé pour l'étude des déficiences affectant la glycosylation golgienne. Cependant, il existe plusieurs points communs, la présence de transporteurs de nucléotide-sucre, de glycosyltransférases mais surtout la nécessité d'une régulation fine de l'homéostasie ionique.

L'origine de ce travail concerne l'étude de TMEM165, une protéine golgienne dont la déficience conduit à l'apparition d'un CDG de type II. Des études préliminaires ont suggéré un rôle de TMEM165 dans le transport de Ca^{2+} ou Mn^{2+} permettant un contrôle de l'homéostasie golgienne, nécessaire au bon fonctionnement des glycosyltransférases.

Pour toutes ces raisons, nous nous sommes proposés d'étudier la fonction de Gdt1p orthologue de TMEM165 chez *Saccharomyces cerevisiae* afin d'appréhender la fonction de TMEM165 chez l'Homme.

2) Travaux personnels

a) Introduction

Le processus de biosynthèse des N-glycoprotéines, qu'il soit humain ou de levure, nécessite l'intervention des mêmes acteurs : un nucléotide-sucré, un transporteur de nucléotide-sucré dans la membrane golgienne et une glycosyltransférase. Tous ces éléments nécessitent une homéostasie particulière et notamment celle qui concerne le Mn^{2+} . Or, pmr1p a été montré comme le seul transporteur de Mn^{2+} dans l'appareil de Golgi.

Récemment, les travaux de Potelle *et al.* (2016), ont décrit l'existence d'un nouveau transporteur de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ dans la membrane de l'appareil de Golgi, gdt1p, dont la déficience conduit à l'apparition d'un défaut de glycosylation en présence de fortes concentrations calciques et que ce défaut pouvait être restauré par l'ajout de Mn^{2+} dans le milieu (Potelle et al. 2016).

b) Travaux de recherche

a. La suppression du défaut de glycosylation observé dans une souche pmr1Δ par le Ca^{2+} dépend de Gdt1p

Dans un premier temps, nous avons étudié l'influence du Ca^{2+} sur la glycosylation dans différentes souches de levure : WT, gdt1Δ, pmr1Δ et gdt1Δpmr1Δ. Nous avons donc cultivé nos différentes souches avec des concentrations croissantes en CaCl_2 (10 mM à 300 mM) et nous avons analysé le profil de migration de l'invertase (Figure 34).

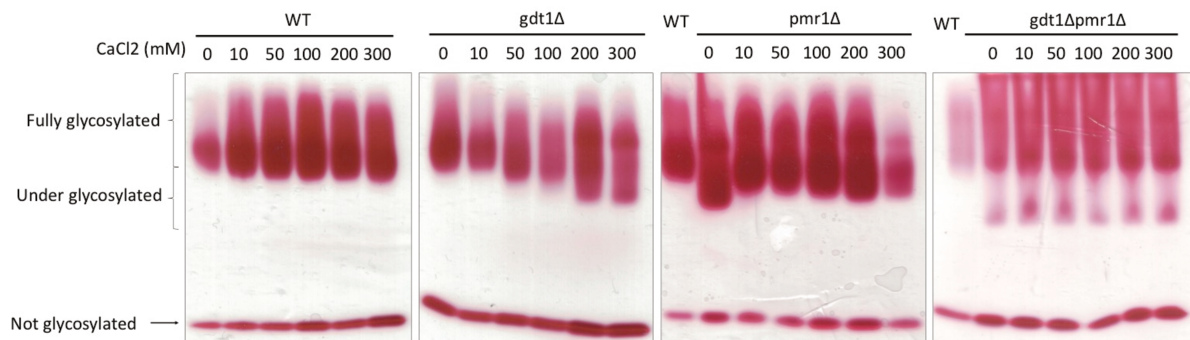


Figure 34 : Profil de glycosylation de l'invertase en présence de concentrations croissantes en CaCl₂ (10 mM à 300 mM)
(Dulary et al. 2017)

Les résultats obtenus montrent l'apparition d'un défaut de glycosylation dans la souche *gdt1Δ* dès 50 mM de CaCl₂ dans le milieu, ce défaut de glycosylation est total à 200 mM. Par contre, dans la souche *pmr1Δ*, le défaut de glycosylation de l'invertase observé en absence de CaCl₂, est supprimé en présence de 10 mM CaCl₂. Pour la souche *gdt1Δpmr1Δ*, nous n'observons pas de restauration du défaut de glycosylation de l'invertase en présence de concentrations croissantes en CaCl₂. Ce résultat suggère donc que la restauration du défaut de glycosylation de l'invertase dans une souche *pmr1Δ* nécessite le Ca²⁺ mais également la présence de *gdt1p*, ce qui évoque donc la présence d'un lien fonctionnel entre *gdt1p* et *pmr1p* dans le maintien de l'homéostasie golgienne.

b. La fonction de Gdt1p dans la glycosylation est dépendante de la fonction de pmr1p.

Afin d'évaluer la contribution du transport du Ca²⁺ et du Mn²⁺ par *pmr1p* dans le processus de glycosylation, des mutants de *pmr1p* ont été générés. Ces mutants sont connus pour ne permettre que le transport du Mn²⁺ (*pmr1p*-D53A) ou que le transport du Ca²⁺ (*pmr1p*-Q783A). Dans un premier temps, nous avons exprimé nos différents mutants de *pmr1p* dans une souche *pmr1Δ* et nous avons analysé le profil de migration de l'invertase (Figure 35).

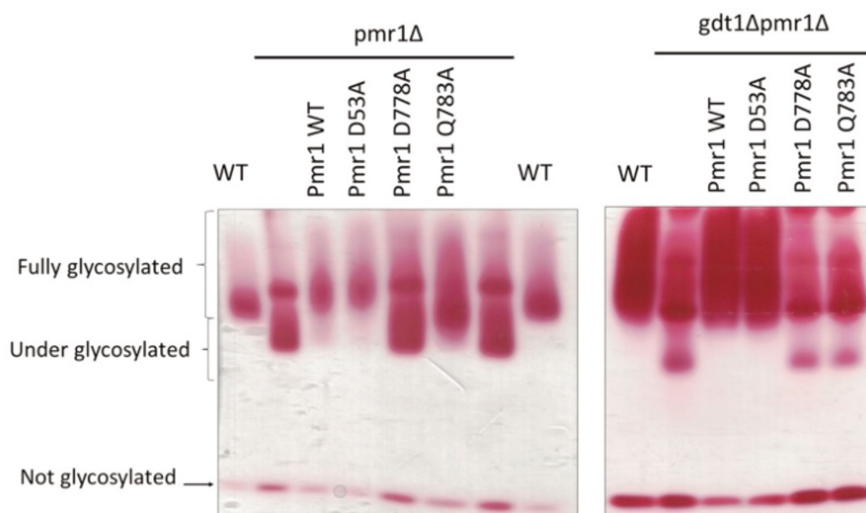


Figure 35: Analyse du profil de glycosylation de l'invertase dans les souches $\Delta pmr1$ et $\Delta gdt1\Delta pmr1$ après complémentation avec les mutants de $pmr1p$

En présence de $gdt1p$, le défaut de glycosylation observé dans la souche $pmr1\Delta$ est complètement restauré par les formes $pmr1p$ -WT et $pmr1p$ -D53A. Le mutant $pmr1p$ -Q783A ne semble restaurer que partiellement le défaut de glycosylation. En revanche, le mutant $pmr1p$ -D778A, ne transportant ni le Ca^{2+} , ni le Mn^{2+} , ne restaure pas la glycosylation. Nous avons réalisé la même expérience en exprimant les différents mutants de $pmr1p$ dans une souche présentant la double délétion $gdt1\Delta pmr1\Delta$. Dans ces conditions, en absence de $gdt1p$, on observe une restauration complète de la glycosylation lorsque $pmr1p$ -WT et $pmr1p$ -D53A sont exprimés. Par contre, l'expression du mutant $pmr1p$ -Q783A et $pmr1p$ -D778A ne permet pas la restauration de la glycosylation. Ces résultats suggèrent que la fonction de $pmr1p$ influence celle de $gdt1p$.

c. La fonction de $Pmr1p$ conditionne l'expression de $Gdt1p$

Nos résultats indiquent un lien fonctionnel entre $gdt1p$ et $pmr1p$. Pour préciser ce lien, nous avons voulu voir si la fonction de $pmr1p$ pouvait avoir un impact sur l'expression de $gdt1p$. Dans un premier temps, nous avons analysé le niveau d'expression de $gdt1p$ dans une souche contenant les différents mutants de $pmr1p$. Pour cela, nous avons généré une souche $gdt1\Delta pmr1\Delta$ complétementée par une $gdt1p$ -HA (forme fonctionnelle de $gdt1p$) puis nous avons complétementé cette souche avec les différents mutants de $pmr1p$ (Figure 36).

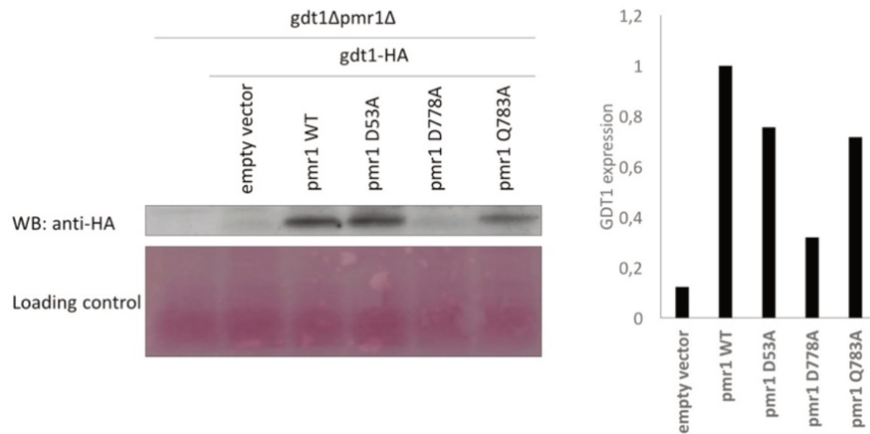


Figure 36: Etude de l'expression de *gdt1p* en présence des différents mutants de *pmr1p*.

Dans une souche $\Delta pmr1$, le niveau d'expression de *gdt1p* est diminué de 80% en comparaison à une souche exprimant la forme WT de *pmr1p*. Lorsque la souche est complétée par *pmr1p*-D53A et *pmr1p*-Q783A, nous observons une restauration de l'expression de *gdt1p* à un niveau semblable à celui observé dans la souche complétée par *pmr1p*-WT. En revanche, lorsque nous complétons nos souches avec le mutant *pmr1p*-D778A, nous observons une restauration de l'expression de *gdt1p* mais dans une très faible proportion. Ces résultats suggèrent donc que l'expression de *gdt1p* est dépendante de la fonction de transport du Ca^{2+} ou du Mn^{2+} de *pmr1p* et qu'il existe des mécanismes de régulation de l'expression de *gdt1p*.

Nous avons ensuite étudié le niveau d'expression de *gdt1p* en présence d'une forte concentration en Mn^{2+} . Pour cela, nous avons complété une souche *gdt1Δ* avec un plasmide codant pour *gdt1p*-Myc (forme non fonctionnelle), dont l'expression est sous le contrôle de son promoteur endogène, et nous avons analysé l'expression de *gdt1p*-myc en présence ou non de $MnCl_2$ (Figure 37).

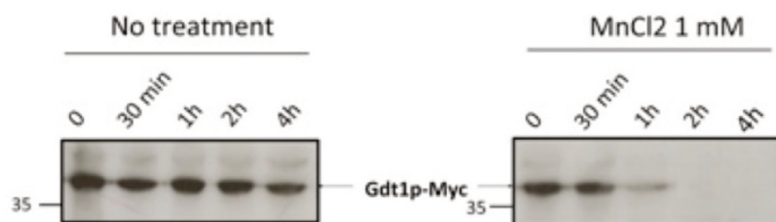


Figure 37: Influence de l'exposition au $MnCl_2$ (1 mM) sur l'expression de *gdt1p*.
(Potelle, Dulary *et al.* 2017)

Les résultats exprimés dans la Figure 40 montrent que l'expression de *gdt1p* est stable dans le temps dans une souche *gdt1Δ* complétée avec *gdt1p-myc*. En revanche, en présence 1mM de $MnCl_2$, nous observons une diminution de l'expression de *gdt1p* à 1h de traitement et une disparition complète de l'expression protéique de *gdt1p* après 2h de traitement avec 1mM $MnCl_2$. Ce résultat indique que *gdt1p* est une protéine sensible au Manganèse.

d. Quantification du manganèse dans les différentes souches de levure

Comme l'expression de *gdt1p* semble dépendante de la concentration en Mn^{2+} , nous avons analysé la concentration totale en Mn^{2+} dans nos différentes lignées WT, *gdt1Δ*, *pmr1Δ* et *gdt1Δpmr1Δ* en présence ou non de 50 μM de $MnCl_2$. Cette étude a été réalisée par ICP-MS en collaboration avec le Dr. Allorge (CBP-Lille) (Figure 38).

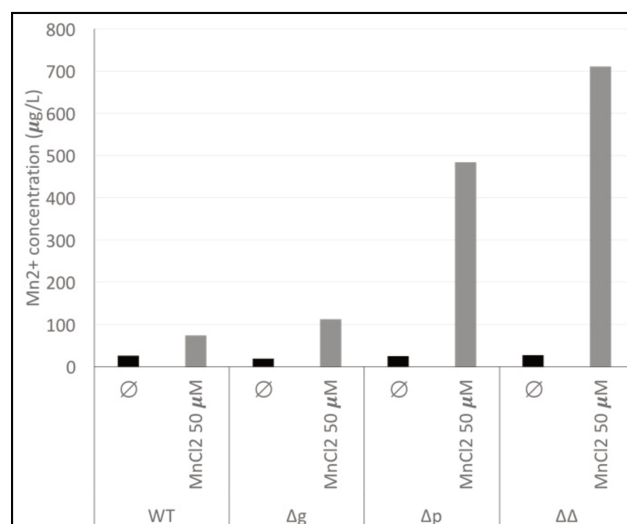


Figure 38 : Quantification du Mn^{2+} total présent dans les différentes souches par ICP-MS

En absence de Mn^{2+} dans le milieu de culture, on observe une concentration faible et stable de Mn^{2+} dans nos différentes souches ($\approx 25 \mu g/L$). En revanche, lorsque l'on applique une pression en Mn^{2+} dans le milieu de culture, nous observons une nette augmentation de la concentration en Mn^{2+} dans les souches mutantes par rapport à la souche WT : souche *gdt1Δ* (x2), *pmr1Δ* (x5) et *gdt1Δpmr1Δ* (x10). Ces résultats suggèrent donc que *pmr1p* et *gdt1p* sont 2 protéines impliquées dans le maintien de l'homéostasie totale en Mn^{2+} au sein de la levure, il semblerait que ces 2 protéines participent à la détoxification du cytosol en Mn^{2+} via la voie de sécrétion.

e. Analyse structurale des polymannanes issus des différentes souches WT/gdt1Δ/pmr1Δ/gdt1Δpmr1Δ en présence de Ca²⁺ et/ou Mn²⁺

Afin de préciser le défaut de glycosylation observé sur l'invertase et d'identifier les mannosyltransférases impliqués, nous avons réalisé l'analyse structurale par RMN des polymannanes de nos différentes souches cultivées en présence de Ca²⁺ et/ou Mn²⁺ en collaboration avec l'équipe du Dr. Yann Guérardel (UGSF-Lille).

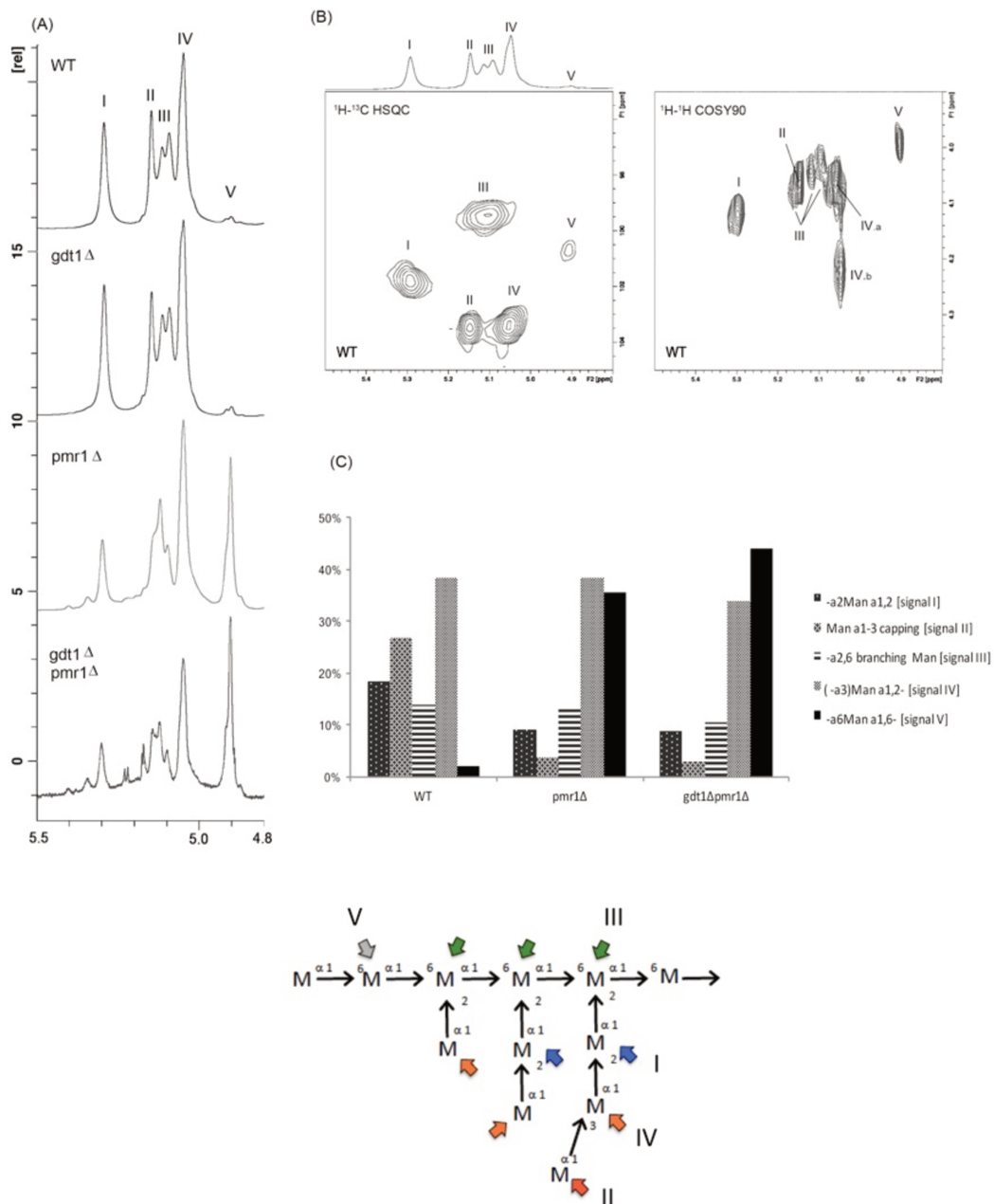


Figure 39: Analyse des spectres ¹H-RMN des différentes souches cultivées dans un milieu YPD

Les spectres obtenus par ^1H -RMN permettent d'identifier les différentes espèces présentes. Ainsi, le pic I correspond aux Man liés en $\alpha 1,2$ sur le squelette principal, le pic II correspond aux Man terminaux liés en $\alpha 1,3$, le pic III correspond aux Man du squelette principal portant une ramification, le pic IV correspond au Man lié en $\alpha 1,2$ sur un autre résidu de Man lié en $\alpha 1,2$. Le dernier pic, correspond aux Man liés en $\alpha 1,6$ du squelette principal mais non substitué.

Les résultats exprimés dans la figure 39 nous montrent une diminution des Man terminaux liés en $\alpha 1,3$ dans les souches $\text{pmr1}\Delta$ et $\text{gdt1}\Delta\text{pmr1}\Delta$ (pic II). Nous observons également une diminution des mannoses liés en $\alpha 1,2$ (pic I) sur le squelette principal corrélée à une augmentation de la proportion de mannose en $\alpha 1,6$ (pic V). Ces résultats nous suggèrent donc que le défaut de glycosylation observé dans des conditions normales dans les souches $\text{pmr1}\Delta$ et $\text{gdt1}\Delta\text{pmr1}\Delta$ provient d'un défaut de branchement de résidus mannosyl en $\alpha 1,3$.

De la même façon, nous avons étudié l'influence du calcium et du manganèse sur la restauration du défaut de glycosylation dans nos différentes souches par ^1H -RMN (Figure 40).

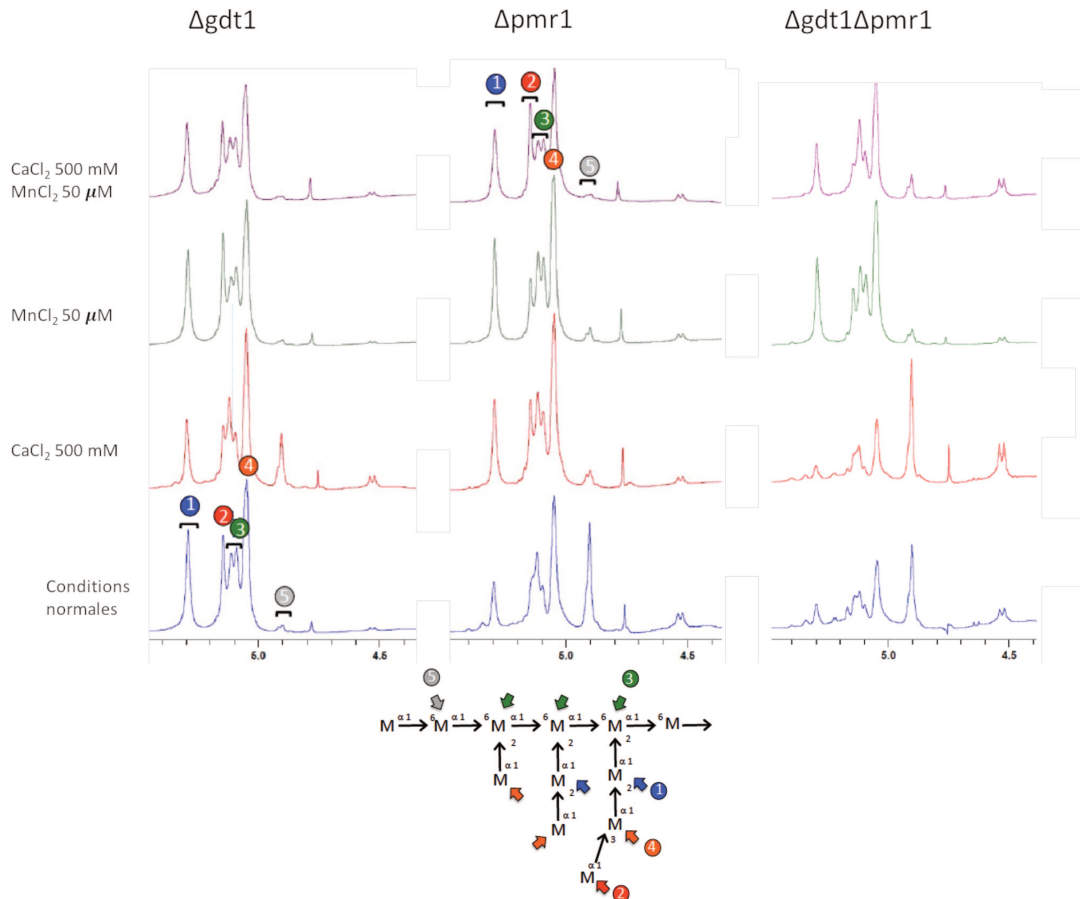


Figure 40: Spectres 1H-RMN des souches Δ gdt1 / Δ pmr1 et Δ gdt1 Δ pmr1 cultivées en présence de 500 mM CaCl_2 et/ou 50 μM MnCl_2

Dans la souche $\text{gdt1}\Delta$, nous confirmons que la présence de 500 mM de CaCl_2 conduit à l'apparition d'un défaut de glycosylation, identique à celui observé dans la souche $\text{pmr1}\Delta$ en conditions normales, à savoir une diminution de la proportion des Man liés en α 1,3 et une augmentation du pic correspondant aux espèces liées en α 1,6. L'ajout de 50 μM de MnCl_2 dans le milieu de culture conduit à la restauration totale du profil de glycosylation. Dans la souche $\text{pmr1}\Delta$, nous observons une restauration partielle du défaut de glycosylation observé en conditions normales avec une augmentation partielle des mannoses liés en α 1,3 et une diminution de ceux liés en α 1,6. En revanche, nous observons une restauration complète lorsque les souches sont cultivées en présence de 500 mM de CaCl_2 et 50 μM de MnCl_2 . Ces résultats confirment donc que le Ca^{2+} peut conduire à une restauration partielle de la glycosylation dans une souche $\text{pmr1}\Delta$. En ce qui concerne la souche $\text{gdt1}\Delta\text{pmr1}\Delta$, les spectres obtenus montrent la présence d'un défaut de glycosylation dans toutes conditions. Seule la souche cultivée en présence de 50 μM de MnCl_2 présente une restauration partielle de la glycosylation.

Nous avons ensuite réalisé la quantification par GC-MS du nombre de résidus de mannose présents dans nos différentes chaînes glycaniques dans les différentes souches en présence ou non de CaCl_2 et/ou MnCl_2 (Figure 41).

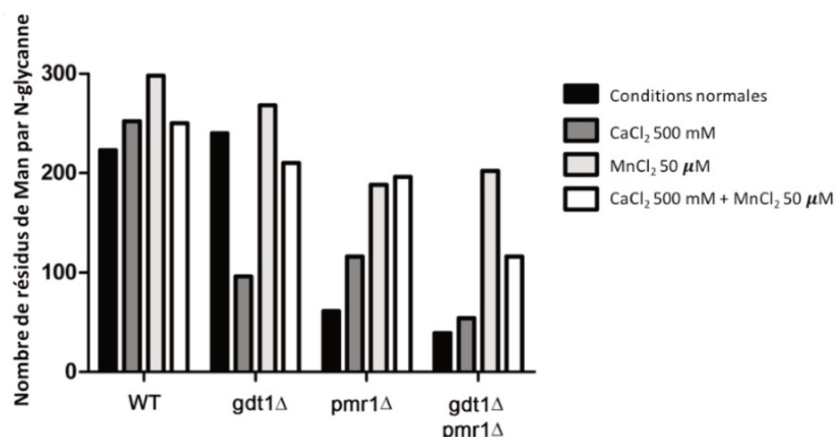


Figure 41: Quantification par GC/MS du nombre de résidus de Mannose par chaîne dans les souches WT / Δ gdt1 / Δ pmr1 et Δ gdt1 Δ pmr1 dans les différentes conditions de culture

Les résultats obtenus confirment la diminution du nombre de résidus de mannose présents dans la souche $\text{gdt1}\Delta$ cultivé en présence de 500 mM CaCl_2 , ainsi que dans les souches

pmr1Δ et gdt1Δpmr1Δ cultivées en conditions normales. La présence de CaCl₂ dans le milieu de culture permet une restauration partielle du nombre de résidus de mannose dans la souche pmr1Δ. Le nombre de résidus de mannose augmente lorsque l'on ajoute du MnCl₂ dans le milieu pour les souches gdt1Δ, pmr1Δ et gdt1Δpmr1Δ.

Les analyses des structures présentes dans les différentes souches WT / gdt1Δ / pmr1Δ et gdt1Δpmr1Δ permettent donc de préciser le défaut de glycosylation à savoir une diminution des mannoses liés en α1,2 et des mannoses terminaux liés en α1,3. Ces résultats suggèrent que le défaut de glycosylation observé touche les enzymes impliquées dans la glycosylation terminale, les mannosyltransférases MNN2 / MNN5 et MNN1 (figure 25).

f. Etude de l'implication des motifs EXGDK/R dans la fonction de gdt1p

La dernière partie de mon travail a concerné l'étude des motifs impliqués dans le transport des cations et plus particulièrement du Mn²⁺. Pour cela, nous avons réalisé des mutations au niveau des motifs EXGDK/R, motifs caractéristiques de la famille UPF0016 et probablement impliqués dans le transport de cations. Nous avons muté les résidus acides présents dans ces motifs et nous avons analysé le profil de migration de l'invertase (Figure 42).

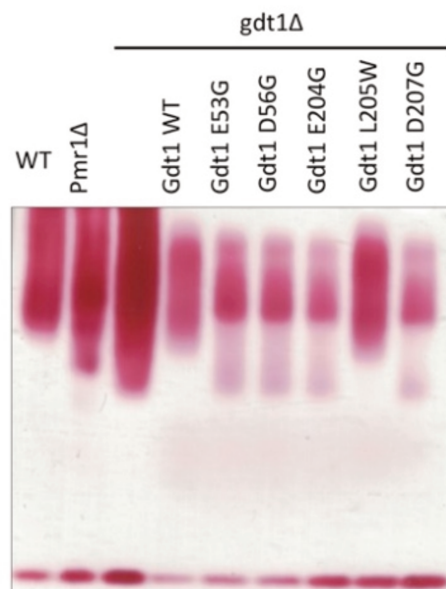


Figure 42: Profil de migration de l'invertase dans une souche gdt1Δ transformée avec les différents mutants de gdt1p en présence de 200 mM CaCl₂.

Les résultats obtenus montrent que l'expression des mutants E53G, D56G, E204G et D207G de gdt1p ne permet pas de restaurer la glycosylation de l'invertase. Le mutant gdt1p-L205W

permet de restaurer le profil de glycosylation de l'invertase. Ces résultats suggèrent donc que les résidus d'acides aminés acides présents dans ces motifs sont intimement impliqués dans l'import ou l'export de cations par *gdt1p*.

Nous avons réalisé la même expérience mais dans des souches exprimant les mutants de *pmr1p*, *pmr1p*-D53A ne transportant que le manganèse et *pmr1p*-Q783A, ne transportant que le calcium (Figure 43).

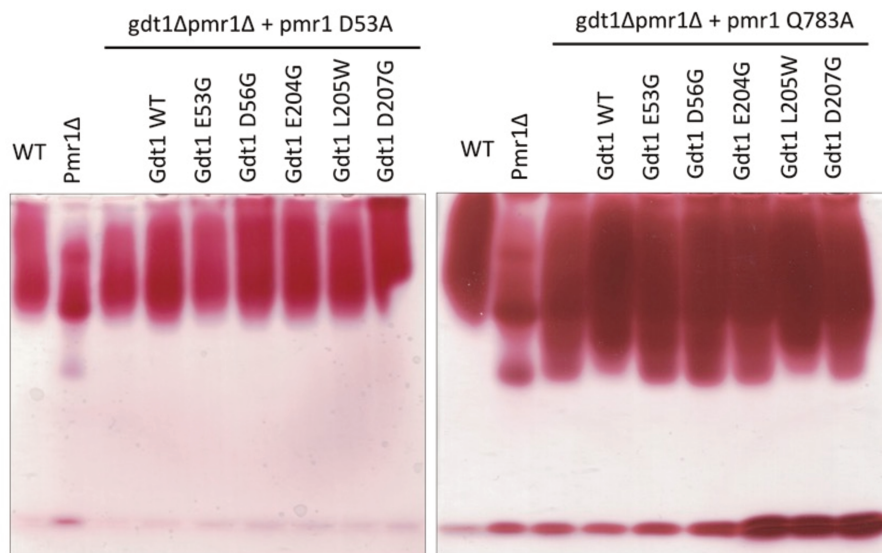


Figure 43: Profil de migration de l'invertase dans une souche *gdt1Δpmr1Δ* complétementée par *pmr1p*-D53A (à gauche) ou *pmr1p*-Q783A (à droite) et par les différents mutants de *gdt1p*.

L'expression du mutant *pmr1p*-D53A dans la souche $\Delta gdt1\Delta pmr1$, en présence des différents mutants de *gdt1p* ne permet pas d'identifier la présence de défaut de glycosylation de l'invertase. En revanche, lorsque *pmr1p* ne transporte que du Ca^{2+} , l'expression des mutants de *gdt1p* conduit à l'apparition d'un défaut de glycosylation de l'invertase, tout comme observé dans la souche *gdt1Δ*. Ces résultats montrent qu'en absence de *gdt1p* ou lorsque les mutations non fonctionnelles de *gdt1p* sont exprimées, et que *pmr1p* transporte uniquement du Mn^{2+} , nous n'observons pas de défaut de glycosylation. En revanche, lorsque *pmr1p* ne transporte que du Ca^{2+} , on observe la présence d'un défaut de glycosylation uniquement lorsque *gdt1p* est absent ou non fonctionnel mais pas lorsqu'il est présent. Ce résultat confirme donc que *gdt1p* est dispensable lorsque *pmr1p* ne transporte que du Mn^{2+} alors qu'il est indispensable lorsque *pmr1p* ne transporte que du Ca^{2+} .

c) Publications

TMEM165/Gdt1p ont fait l'objet d'une revue intitulée « **TMEM165 Deficiencies in Congenital Disorders of Glycosylation Type II (CDG-II): Clues and Evidences for Roles of the Protein in Golgi Functions and Ion Homeostasis** », présentée en annexe 1.

(Dulary, Eudoxie, et al. 2016. "TMEM165 Deficiencies in Congenital Disorders of Glycosylation Type II (CDG-II): Clues and Evidences for Roles of the Protein in Golgi Functions and Ion Homeostasis." *Tissue and Cell*, June. doi:10.1016/j.tice.2016.06.006.)

Les résultats obtenus sur la dégradation de gdt1p par le manganèse sont résumés dans la publication : « **Manganese-induced turnover of TMEM165** » présentée en annexe 2. (Potelle, Sven, Eudoxie Dulary, et al. 2017. "Manganese-Induced Turnover of TMEM165." *The Biochemical Journal*, March. doi:10.1042/BCJ20160910.)

Les résultats obtenus sur l'étude de l'impact de la fonction de Gdt1 sur la glycosylation golgienne sont résumés dans la publication : « **Investigating the function of Gdt1p in yeast Golgi glycosylation** » présentée en annexe 3. (Soumise dans *BBA General Subject*)

d) Discussion

Les premières études portant sur Gdt1p ont montré qu'une déficience en gdt1p conduit à l'apparition d'un défaut de glycosylation de l'invertase en présence de fortes concentrations calciques et que ce défaut de glycosylation peut être restauré par l'ajout de Mn^{2+} dans le milieu de culture. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, le seul transporteur de Ca^{2+}/Mn^{2+} connu dans l'appareil de Golgi est pmr1p, une ATPase de type P. Nous avons donc analysé le profil de migration de l'invertase dans différentes souches, WT, gdt1 Δ , pmr1 Δ et gdt1 Δ pmr1 Δ en présence de concentrations calciques croissantes. Les résultats obtenus ont montré une diminution du défaut de glycosylation de l'invertase en présence de $CaCl_2$ dans une souche pmr1 Δ . Ce résultat indique donc que le calcium pourrait être à l'origine de la restauration d'une glycosylation normale dans la souche pmr1 Δ . Or, nous avons vu que ce n'est pas le manque de calcium qui est à l'origine du défaut de glycosylation puisque lorsque l'on réalise la même expérience avec des mutants de pmr1p ne transportant que du Mn^{2+} (mutant pmr1p-D53A) ou que du Ca^{2+} (mutant pmr1p-Q783A), et en absence de gdt1p, nous observons une restauration de la glycosylation uniquement en présence du mutant transportant le Mn^{2+} . Ces résultats suggèrent donc que ce n'est pas le Ca^{2+} qui est à l'origine de la restauration de la glycosylation mais que le Ca^{2+} joue un rôle dans cette restauration. En effet, l'hypothèse la plus probable serait que pmr1p est le transporteur principal de Mn^{2+} dans l'appareil de Golgi. C'est pour cela que l'absence de gdt1p ne provoque pas de défaut de glycosylation, alors que l'absence de pmr1p provoque un défaut de glycosylation dans des conditions normales. En revanche, lorsque pmr1p ne transporte que du Ca^{2+} , gdt1p devient de ce fait l'unique transporteur de Mn^{2+} , ce qui expliquerait le défaut de glycosylation observé dans un mutant gdt1 Δ en présence d'une pression calcique (figure 44).

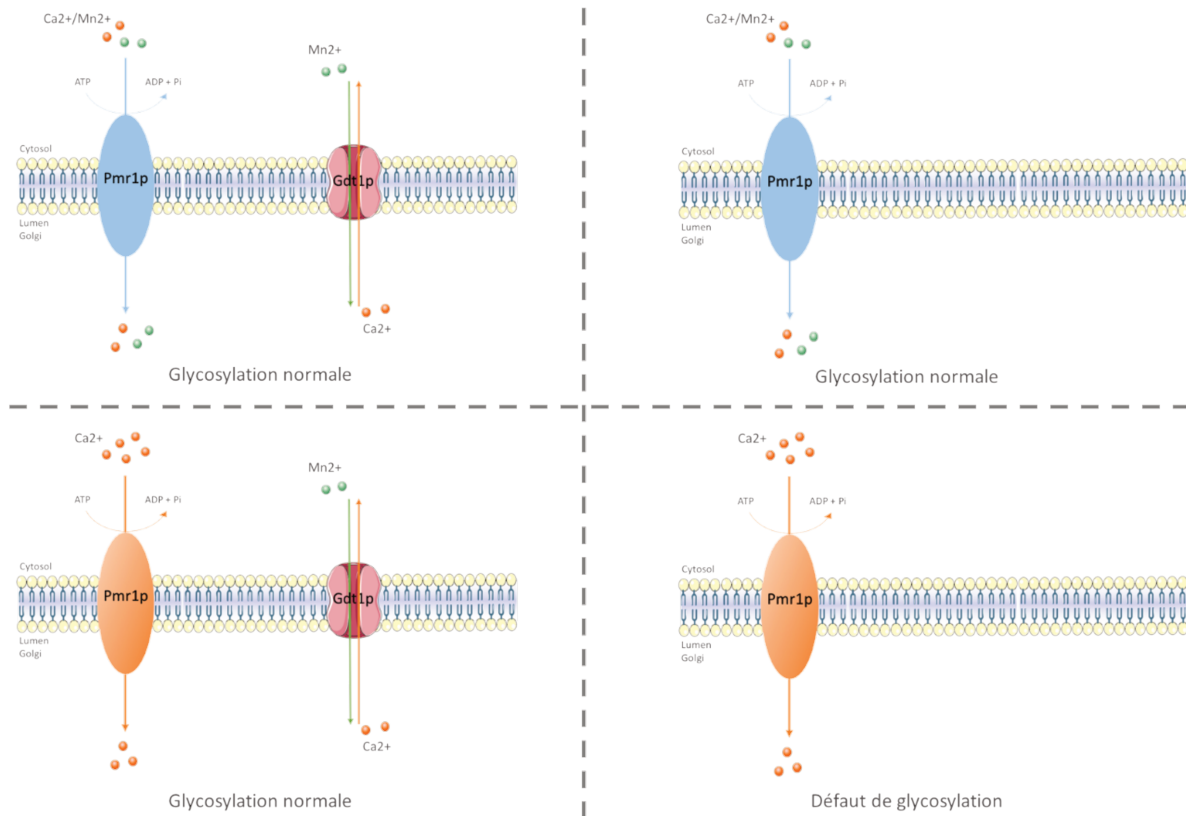


Figure 44 : Hypothèses de transport de gdt1p et pmr1p

Ces résultats suggèrent donc que gdt1p serait un antiport $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ permettant l'import de Mn^{2+} dans la lumière de l'appareil de Golgi en utilisant le gradient de Ca^{2+} généré par pmr1p (Figure 45).

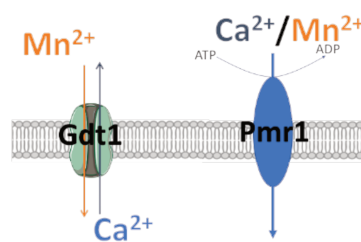


Figure 45: Hypothèse de transport de gdt1p et de pmr1p dans la lumière de l'appareil de Golgi

La seconde partie de ce travail a permis l'identification des enzymes impliquées dans le défaut de glycosylation observé dans les souches gdt1Δ, pmr1Δ et gdt1Δpmr1Δ. L'analyse de la structure des polymannes montre que le défaut de glycosylation de l'invertase sur

gel natif est un défaut de glycosylation général. En effet, les analyses RMN ont montré une diminution de la proportion de résidus liés en $\alpha 1,3$ et en $\alpha 1,2$. Ces espèces peuvent être ajoutés par 3 enzymes, MNN2 / MNN5 et MNN1. Ces résultats permettent d'émettre l'hypothèse selon laquelle le défaut de glycosylation affecte principalement MNN2, responsable de l'ajout des résidus de mannose liés en $\alpha 1,2$ sur le squelette principal contenant les résidus de mannose liés en $\alpha 1,6$.

Ces analyses structurales ont également montré une restauration partielle de la glycosylation dans une souche *gdt1Δpmr1Δ* cultivée en présence de 1mM $MnCl_2$. Or, Garcia-Rodriguez (2015), ont montré que la délétion en *pmr1p* conduit à une augmentation de la concentration en Ca^{2+} cytosolique ce qui conduit à une augmentation du trafic vésiculaire et donc à une redistribution du Mn^{2+} présent dans les différents organites de stockage. La provenance de ce Mn^{2+} pourrait donc s'expliquer par la redistribution des stocks en Mn^{2+} dans la cellule. De plus, nous avons vu que dans le RE, il existe un transporteur de Ca^{2+}/Mn^{2+} , *Spf1p*. L'augmentation de la concentration en Mn^{2+} dans le cytosol pourrait donc créer une augmentation de la concentration en Mn^{2+} dans le RE. Ce Mn^{2+} pourrait ensuite rejoindre l'appareil de Golgi via la voie de sécrétion. Afin de poursuivre ce travail, il pourrait être envisagé d'étudier l'impact de l'expression des différents transporteurs de Ca^{2+} et/ou Mn^{2+} (*Spf1p* / *Gdt1p* et *pmr1p*) de la voie de sécrétion sur le processus de N-glycosylation. Cette étude permettra également de déterminer l'implication de *Spf1p* dans la restauration de la glycosylation par le Mn^{2+} dans une souche *gdt1Δpmr1Δ* et ainsi déterminer l'origine du Mn^{2+} permettant la restauration de la glycosylation dans cette souche.

La dernière partie de mon travail de thèse a porté sur l'étude de la sensibilité de *gdt1p* au Mn^{2+} . En effet, nous avons montré qu'une augmentation de la concentration en Mn^{2+} dans le milieu de culture conduit à la dégradation de *gdt1p* (Potelle et al. 2017). Notre étude a été faite dans l'objectif de montrer le rôle de *pmr1p* dans la régulation de l'expression de *gdt1p*. Nous avons clairement montré une diminution de l'expression de *gdt1p* lorsque *pmr1p* ne transporte que du Mn^{2+} . Ces résultats suggèrent donc que la sensibilité de *gdt1p* semble dépendante de la concentration en Mn^{2+} dans l'appareil de Golgi. Néanmoins, aucun élément ne nous permet à ce jour de confirmer cette hypothèse. L'analyse de la concentration en Mn^{2+} totale a montré une augmentation de cette concentration de 2 fois lorsque *gdt1p* est absent et de 10 fois lorsque cette absence est

accompagnée de celle de *pmr1p*. Néanmoins, nous ne pouvons pas en déduire si l'augmentation de la concentration totale en Mn^{2+} est accompagnée d'une augmentation de la concentration cytosolique et/ou de la voie de sécrétion. L'étude de la répartition du Mn^{2+} dans les souches *gdt1Δ / pmr1Δ* et *gdt1Δpmr1Δ* pourrait s'avérer cruciale pour la compréhension des mécanismes de dégradation de *gdt1p*. Pour cela, nous pourrions envisager la création de sondes permettant de mesurer la concentration en Mn^{2+} en fonction du compartiment cellulaire ou la réalisation de fractionnement cellulaire par ultracentrifugation sur gradient de densité. Néanmoins, l'existence du Mn^{2+} libre dans la cellule et la présence de la paroi cellulaire semble être un frein à la mise en place de cette étude.

Nous avons vu que l'expression de *gdt1p* est régulée au sein de la levure. Cependant, le mécanisme de dégradation de *gdt1p* est inconnu. Le seul transporteur de Mn^{2+} ayant été décrit comme étant dégradé de façon manganèse-dépendante est *Smf2p*, il est dégradé par la voie *Bsd2* (Au et al. 2009). Nous pouvons donc imaginer que la dégradation de *gdt1p* passe par cette même voie.

Enfin, notre étude a permis d'identifier des motifs potentiellement impliqués dans la fonction de *gdt1p*, les motifs EXGDK/R. Ces motifs ont été décrits comme responsables du transport de cations. Notre étude a montré que ces motifs étaient impliqués dans la fonctionnalité de *gdt1p* puisque la mutation des acides aminés de ces motifs conduit à une perte de la restauration de la glycosylation de l'invertase. De plus, Colinet *et al.* (2017), ont montré que les mutations de ces mêmes AA étaient impliquées dans le phénotype de croissance sur milieu riche en $CaCl_2$. Ces résultats nous permettent de suggérer que ces acides aminés sont impliqués dans la fonction de *gdt1p* et plus particulièrement dans la reconnaissance et/ou le transport des cations.

Ces résultats nous permettent de confirmer que le défaut de glycosylation observé sur l'invertase est un défaut de glycosylation général, affectant plus particulièrement les enzymes impliquées dans l'ajout des résidus de mannose liées en $\alpha 1,2$ sur le squelette principal. Nous avons également confirmé que ce défaut de glycosylation résulte d'une perturbation de l'homéostasie en Mn^{2+} dans la levure. L'ensemble de ces résultats permet donc de confirmer l'hypothèse selon laquelle *gdt1p* est un transporteur de Ca^{2+}/Mn^{2+} dans l'appareil de Golgi.

L'ensemble de ce travail a également permis de confirmer la nécessité de l'utilisation du modèle levure pour la compréhension des mécanismes impliqués dans la régulation de l'homéostasie golgienne dans le cas de CDG de type II. Les résultats obtenus sur *gdt1p* ont permis d'orienter l'étude portant sur TMEM165 et ainsi montrer que tout comme *gdt1p*, TMEM165 est impliqué dans l'homéostasie du Mn^{2+} , que les résidus acides présents dans les motifs EXGDK/R sont également important dans la fonctionnalité de TMEM165 et que tout comme *gdt1p*, TMEM165 est une protéine sensible au Mn^{2+} . Nos travaux suggèrent donc une fonction similaire entre *gdt1p* et TMEM165, ce qui renforce l'utilisation du modèle levure afin d'appréhender la fonction d'une protéine dont la déficience est impliquée dans une CDG de type II et dont le lien avec la glycosylation est indirect.

Bibliographie

- Abeijon, C., and C. B. Hirschberg. 1990. "Topography of Initiation of N-Glycosylation Reactions." *The Journal of Biological Chemistry* 265 (24): 14691–95.
- Aebi, M., A. Helenius, B. Schenk, R. Barone, A. Fiumara, E. G. Berger, T. Hennet, et al. 1999. "Carbohydrate-Deficient Glycoprotein Syndromes Become Congenital Disorders of Glycosylation: An Updated Nomenclature for CDG. First International Workshop on CDGS." *Glycoconjugate Journal* 16 (11): 669–71.
- Aikawa, Jun-ichi, Ichiro Matsuo, and Yukishige Ito. 2012. "In Vitro Mannose Trimming Property of Human ER α -1,2 Mannosidase I." *Glycoconjugate Journal* 29 (1): 35–45. doi:10.1007/s10719-011-9362-1.
- Althoff, S. Schulte, M. Grüneberg, J. Reunert, J. H. Park, S. Rust, C. Mühlhausen, Y. Wada, R. Santer, and T. Marquardt. 2015. "TMEM165 Deficiency: Postnatal Changes in Glycosylation." *JIMD Reports*, August. doi:10.1007/8904_2015_455.
- Alton, G., M. Hasilik, R. Niehues, K. Panneerselvam, J. R. Etchison, F. Fana, and H. H. Freeze. 1998. "Direct Utilization of Mannose for Mammalian Glycoprotein Biosynthesis." *Glycobiology* 8 (3): 285–95.
- Arnold, James N., Radka Saldova, Umi M. Abd Hamid, and Pauline M. Rudd. 2008. "Evaluation of the Serum N-Linked Glycome for the Diagnosis of Cancer and Chronic Inflammation." *PROTEOMICS* 8 (16): 3284–93. doi:10.1002/pmic.200800163.
- Au, Catherine, Alexandre Benedetto, Joel Anderson, Arnaud Labrousse, Keith Erikson, Jonathan J. Ewbank, and Michael Aschner. 2009. "SMF-1, SMF-2 and SMF-3 DMT1 Orthologues Regulate and Are Regulated Differentially by Manganese Levels in *C. Elegans*." *PloS One* 4 (11): e7792. doi:10.1371/journal.pone.0007792.
- Benyair, Ron, Navit Ogen-Shtern, Niv Mazkereth, Ben Shai, Marcelo Ehrlich, and Gerardo Z. Lederkremer. 2015. "Mammalian ER Mannosidase I Resides in Quality Control Vesicles, Where It Encounters Its Glycoprotein Substrates." *Molecular Biology of the Cell* 26 (2): 172–84. doi:10.1091/mbc.E14-06-1152.
- Bernon, Coralie, Yoann Carré, Elina Kuokkanen, Marie-Christine Slomianny, Anne-Marie Mir, Frédéric Krzewinski, René Cacan, et al. 2011. "Overexpression of Man2C1 Leads to Protein Underglycosylation and Upregulation of Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation Pathway." *Glycobiology* 21 (3): 363–75. doi:10.1093/glycob/cwq169.
- Berridge, M. J., P. Lipp, and M. D. Bootman. 2000. "The Versatility and Universality of Calcium Signalling." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 1 (1): 11–21. doi:10.1038/35036035.
- Björk, T., B. Ljungberg, T. Piironen, P. A. Abrahamsson, K. Pettersson, A. T. Cockett, and H. Lilja. 1998. "Rapid Exponential Elimination of Free Prostate-Specific Antigen Contrasts the Slow, Capacity-Limited Elimination of PSA Complexed to Alpha 1-Antichymotrypsin from Serum." *Urology* 51 (1): 57–62.
- Booth, Catherine, and Gordon L.E. Koch. 1989. "Perturbation of Cellular Calcium Induces Secretion of Luminal ER Proteins." *Cell* 59 (4): 729–37. doi:10.1016/0092-8674(89)90019-6.

- Brandenburg, Fabian, Hanan Schoffman, Samantha Kurz, Ute Krämer, Nir Keren, Andreas P. M. Weber, and Marion Eisenhut. 2017. "The Synechocystis Manganese Exporter Mnx Is Essential for Manganese Homeostasis in Cyanobacteria." *Plant Physiology* 173 (3): 1798–1810. doi:10.1104/pp.16.01895.
- Braulke, Thomas, and Juan S. Bonifacino. 2009. "Sorting of Lysosomal Proteins." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1793 (4): 605–14. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.10.016.
- Burda, P., and M. Aebi. 1999. "The Dolichol Pathway of N-Linked Glycosylation." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1426 (2): 239–57.
- Cairns, Rob A., Isaac S. Harris, and Tak W. Mak. 2011. "Regulation of Cancer Cell Metabolism." *Nature Reviews Cancer* 11 (2): 85–95. doi:10.1038/nrc2981.
- Chen, Chien-Yu, Yi-Hua Jan, Yi-Hsiu Juan, Chih-Jen Yang, Ming-Shyan Huang, Chong-Jen Yu, Pan-Chyr Yang, Michael Hsiao, Tsui-Ling Hsu, and Chi-Huey Wong. 2013. "Fucosyltransferase 8 as a Functional Regulator of Nonsmall Cell Lung Cancer." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (2): 630–35. doi:10.1073/pnas.1220425110.
- Christianson, John C., Thomas A. Shaler, Ryan E. Tyler, and Ron R. Kopito. 2008. "OS-9 and GRP94 Deliver Mutant alpha1-Antitrypsin to the Hrd1-SEL1L Ubiquitin Ligase Complex for ERAD." *Nature Cell Biology* 10 (3): 272–82. doi:10.1038/ncb1689.
- Colinet, Anne-Sophie, Palanivelu Sengottaiyan, Antoine Deschamps, Marie-Lise Colsoul, Louise Thines, Didier Demaegd, Marie-Clémence Duchêne, François Foulquier, Pascal Hols, and Pierre Morsomme. 2016. "Yeast Gdt1 Is a Golgi-Localized Calcium Transporter Required for Stress-Induced Calcium Signaling and Protein Glycosylation." *Scientific Reports* 6 (April): 24282. doi:10.1038/srep24282.
- Colinet, Anne-Sophie, Louise Thines, Antoine Deschamps, Gaëlle Flémal, Didier Demaegd, and Pierre Morsomme. 2017. "Acidic and Uncharged Polar Residues in the Consensus Motifs of the Yeast Ca(2+) Transporter Gdt1p Are Required for Calcium Transport." *Cellular Microbiology*, January. doi:10.1111/cmi.12729.
- Cui, Jiangjun, Jaap A. Kaandorp, Peter M. A. Slood, Catherine M. Lloyd, and Max V. Filatov. 2009. "Calcium Homeostasis and Signaling in Yeast Cells and Cardiac Myocytes." *FEMS Yeast Research* 9 (8): 1137–47. doi:10.1111/j.1567-1364.2009.00552.x.
- Cunningham, K. W., and G. R. Fink. 1994. "Ca²⁺ Transport in *Saccharomyces Cerevisiae*." *The Journal of Experimental Biology* 196 (November): 157–66.
- Daran, J. M., N. Dallies, D. Thines-Sempoux, V. Paquet, and J. François. 1995. "Genetic and Biochemical Characterization of the UGP1 Gene Encoding the UDP-Glucose Pyrophosphorylase from *Saccharomyces Cerevisiae*." *European Journal of Biochemistry / FEBS* 233 (2): 520–30.
- Demaegd, Didier, Anne-Sophie Colinet, Antoine Deschamps, and Pierre Morsomme. 2014. "Molecular Evolution of a Novel Family of Putative Calcium Transporters." *PloS One* 9 (6): e100851. doi:10.1371/journal.pone.0100851.
- Demaegd, Didier, François Foulquier, Anne-Sophie Colinet, Louis Gremillon, Dominique Legrand, Pascal Mariot, Edgar Peiter, Emile Van Schaftingen, Gert Matthijs, and Pierre Morsomme. 2013. "Newly Characterized Golgi-Localized Family of Proteins Is Involved in Calcium and pH Homeostasis in

- Yeast and Human Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (17): 6859–64. doi:10.1073/pnas.1219871110.
- Dennis, J. W., M. Granovsky, and C. E. Warren. 1999. "Glycoprotein Glycosylation and Cancer Progression." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1473 (1): 21–34.
- Dulary, Eudoxie, Sven Potelle, Dominique Legrand, and François Foulquier. 2016. "TMEM165 Deficiencies in Congenital Disorders of Glycosylation Type II (CDG-II): Clues and Evidences for Roles of the Protein in Golgi Functions and Ion Homeostasis." *Tissue and Cell*, June. doi:10.1016/j.tice.2016.06.006.
- Dunn, T., K. Gable, and T. Beeler. 1994. "Regulation of Cellular Ca²⁺ by Yeast Vacuoles." *The Journal of Biological Chemistry* 269 (10): 7273–78.
- Elbein, A. D. 1983. "Inhibitors of Glycoprotein Synthesis." *Methods in Enzymology* 98: 135–54.
- Elstrom, Rebecca L., Daniel E. Bauer, Monica Buzzai, Robyn Karnauskas, Marian H. Harris, David R. Plas, Hongming Zhuang, et al. 2004. "Akt Stimulates Aerobic Glycolysis in Cancer Cells." *Cancer Research* 64 (11): 3892–99. doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-2904.
- Ferlay, J., E. Steliarova-Foucher, J. Lortet-Tieulent, S. Rosso, J. W. W. Coebergh, H. Comber, D. Forman, and F. Bray. 2013. "Cancer Incidence and Mortality Patterns in Europe: Estimates for 40 Countries in 2012." *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 49 (6): 1374–1403. doi:10.1016/j.ejca.2012.12.027.
- Foulquier, François, Mustapha Amyere, Jaak Jaeken, Renate Zeevaert, Els Schollen, Valérie Race, Riet Bammens, et al. 2012. "TMEM165 Deficiency Causes a Congenital Disorder of Glycosylation." *American Journal of Human Genetics* 91 (1): 15–26. doi:10.1016/j.ajhg.2012.05.002.
- Foulquier, François, Anne Harduin-Lepers, Sandrine Duvet, Ingrid Marchal, Anne Marie Mir, Philippe Delannoy, Frédéric Chirat, and René Cacan. 2002. "The Unfolded Protein Response in a Dolichyl Phosphate Mannose-Deficient Chinese Hamster Ovary Cell Line Points out the Key Role of a Demannosylation Step in the Quality-Control Mechanism of N-Glycoproteins." *The Biochemical Journal* 362 (Pt 2): 491–98.
- Freeze, Hudson H., Jessica X. Chong, Michael J. Bamshad, and Bobby G. Ng. 2014. "Solving Glycosylation Disorders: Fundamental Approaches Reveal Complicated Pathways." *American Journal of Human Genetics* 94 (2): 161–75. doi:10.1016/j.ajhg.2013.10.024.
- Freeze, Hudson H., Erik A. Eklund, Bobby G. Ng, and Marc C. Patterson. 2015. "Neurological Aspects of Human Glycosylation Disorders." *Annual Review of Neuroscience* 38 (July): 105–25. doi:10.1146/annurev-neuro-071714-034019.
- Gao, M., J. Liang, Y. Lu, H. Guo, P. German, S. Bai, E. Jonasch, X. Yang, G. B. Mills, and Z. Ding. 2014. "Site-Specific Activation of AKT Protects Cells from Death Induced by Glucose Deprivation." *Oncogene* 33 (6): 745–55. doi:10.1038/onc.2013.2.
- Garcia-Rodriguez, N., M. d. C. Diaz de la Loza, B. Andreson, F. Monje-Casas, R. Rothstein, and R. E. Wellinger. 2012. "Impaired Manganese Metabolism Causes Mitotic Misregulation." *Journal of Biological Chemistry* 287 (22): 18717–29. doi:10.1074/jbc.M112.358309.
- Gascón, S., N. P. Neumann, and J. O. Lampen. 1968. "Comparative Study of the Properties of the Purified Internal and External Invertases from Yeast." *The Journal of Biological Chemistry* 243 (7):

1573–77.

Girnita, L., M. Wang, Y. Xie, G. Nilsson, A. Dricu, J. Wejde, and O. Larsson. 2000. "Inhibition of N-Linked Glycosylation down-Regulates Insulin-like Growth Factor-1 Receptor at the Cell Surface and Kills Ewing's Sarcoma Cells: Therapeutic Implications." *Anti-Cancer Drug Design* 15 (1): 67–72.

Haeuw, J. F., G. Strecker, J. M. Wieruszkeski, J. Montreuil, and J. C. Michalski. 1991. "Substrate Specificity of Rat Liver Cytosolic Alpha-D-Mannosidase. Novel Degradative Pathway for Oligomannosidic Type Glycans." *European Journal of Biochemistry / FEBS* 202 (3): 1257–68.

Halachmi, D., and Y. Eilam. 1996. "Elevated Cytosolic Free Ca²⁺ Concentrations and Massive Ca²⁺ Accumulation within Vacuoles, in Yeast Mutant Lacking PMR1, a Homolog of Ca²⁺ -ATPase." *FEBS Letters* 392 (2): 194–200.

Harada, Y., H. Li, H. Li, and W. J. Lennarz. 2009. "Oligosaccharyltransferase Directly Binds to Ribosome at a Location near the Translocon-Binding Site." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (17): 6945–49. doi:10.1073/pnas.0812489106.

He, Lizhi, Catherine Fan, Anil Kapoor, Alistair J. Ingram, Adrian P. Rybak, Richard C. Austin, Jeffery Dickhout, Jean-Claude Cutz, James Scholey, and Damu Tang. 2011. "α-Mannosidase 2C1 Attenuates PTEN Function in Prostate Cancer Cells." *Nature Communications* 2: 307. doi:10.1038/ncomms1309.

Helenius, Ari, and Markus Aebi. 2004. "Roles of N-Linked Glycans in the Endoplasmic Reticulum." *Annual Review of Biochemistry* 73: 1019–49. doi:10.1146/annurev.biochem.73.011303.073752.

Helenius, Jonne, Davis T. W. Ng, Cristina L. Marolda, Peter Walter, Miguel A. Valvano, and Markus Aebi. 2002. "Translocation of Lipid-Linked Oligosaccharides across the ER Membrane Requires Rft1 Protein." *Nature* 415 (6870): 447–50. doi:10.1038/415447a.

Hendershot, Linda M. 2004. "The ER Function BiP Is a Master Regulator of ER Function." *The Mount Sinai Journal of Medicine, New York* 71 (5): 289–97.

Henrissat, B., and A. Bairoch. 1996. "Updating the Sequence-Based Classification of Glycosyl Hydrolases." *The Biochemical Journal* 316 (Pt 2) (June): 695–96.

Herscovics, A., and P. Orlean. 1993. "Glycoprotein Biosynthesis in Yeast." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 7 (6): 540–50.

Herscovics, Annette, Pedro A. Romero, and Linda O. Tremblay. 2002. "The Specificity of the Yeast and Human Class I ER Alpha 1,2-Mannosidases Involved in ER Quality Control Is Not as Strict Previously Reported." *Glycobiology* 12 (4): 14G–15G.

Hirao, Kazuyoshi, Yuko Natsuka, Taku Tamura, Ikuo Wada, Daisuke Morito, Shunji Natsuka, Pedro Romero, et al. 2006. "EDEM3, a Soluble EDEM Homolog, Enhances Glycoprotein Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation and Mannose Trimming." *The Journal of Biological Chemistry* 281 (14): 9650–58. doi:10.1074/jbc.M512191200.

Hosokawa, Nobuko, Linda O. Tremblay, Barry Sleno, Yukiko Kamiya, Ikuo Wada, Kazuhiro Nagata, Koichi Kato, and Annette Herscovics. 2010. "EDEM1 Accelerates the Trimming of alpha1,2-Linked Mannose on the C Branch of N-Glycans." *Glycobiology* 20 (5): 567–75. doi:10.1093/glycob/cwq001.

Hubbard, S. C., and P. W. Robbins. 1979. "Synthesis and Processing of Protein-Linked Oligosaccharides in Vivo." *The Journal of Biological Chemistry* 254 (11): 4568–76.

- JÄ³Ä°wiak, PaweÄ¸, Ewa Forma, Magdalena BryÄ¸, and Anna KrzeÄ¸lak. 2014. "O-GlcNAcylation and Metabolic Reprogramming in Cancer." *Frontiers in Endocrinology* 5 (September). doi:10.3389/fendo.2014.00145.
- Jaeken, J. 2013. "Congenital Disorders of Glycosylation." *Handbook of Clinical Neurology* 113: 1737–43. doi:10.1016/B978-0-444-59565-2.00044-7.
- Jaeken, Jaak, and Gert Matthijs. 2007. "Congenital Disorders of Glycosylation: A Rapidly Expanding Disease Family." *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 8: 261–78. doi:10.1146/annurev.genom.8.080706.092327.
- Jansen, Jos C., Sharita Timal, Monique van Scherpenzeel, Helen Michelakakis, Dorothée Vicogne, Angel Ashikov, Marina Moraitou, et al. 2016. "TMEM199 Deficiency Is a Disorder of Golgi Homeostasis Characterized by Elevated Aminotransferases, Alkaline Phosphatase, and Cholesterol and Abnormal Glycosylation." *American Journal of Human Genetics* 98 (2): 322–30. doi:10.1016/j.ajhg.2015.12.011.
- Jessop, C. E., T. J. Tavender, R. H. Watkins, J. E. Chambers, and N. J. Bulleid. 2009. "Substrate Specificity of the Oxidoreductase ERp57 Is Determined Primarily by Its Interaction with Calnexin and Calreticulin." *Journal of Biological Chemistry* 284 (4): 2194–2202. doi:10.1074/jbc.M808054200.
- Jiang, Dong-dong, Yu-qin Liu, Bei Gu, Zhi-guang Xiang, Yun Tian, Yi-qun Zhou, Ji-yu Ju, Yin Liu, Lian-feng Zhang, and Li-ping Zhu. 2007. "[Effects of human alpha-mannosidase Man2c1 transgene on growth and metastasis of transplanted tumor in mice]." *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao. Acta Academiae Medicinae Sinicae* 29 (4): 528–32.
- Jungmann, J., and S. Munro. 1998. "Multi-Protein Complexes in the Cis Golgi of *Saccharomyces Cerevisiae* with Alpha-1,6-Mannosyltransferase Activity." *The EMBO Journal* 17 (2): 423–34. doi:10.1093/emboj/17.2.423.
- Kamiya, Yukiko, Daiki Kamiya, Kazuo Yamamoto, Beat Nyfeler, Hans-Peter Hauri, and Koichi Kato. 2008. "Molecular Basis of Sugar Recognition by the Human L-Type Lectins ERGIC-53, VIPL, and VIP36." *The Journal of Biological Chemistry* 283 (4): 1857–61. doi:10.1074/jbc.M709384200.
- Kato, Atsushi, Li Wang, Kumiko Ishii, Junichi Seino, Naoki Asano, and Tadashi Suzuki. 2011. "Calystegine B3 as a Specific Inhibitor for Cytoplasmic Alpha-Mannosidase, Man2C1." *Journal of Biochemistry* 149 (4): 415–22. doi:10.1093/jb/mvq153.
- Kelleher, Daniel J., and Reid Gilmore. 2006. "An Evolving View of the Eukaryotic Oligosaccharyltransferase." *Glycobiology* 16 (4): 47R–62R. doi:10.1093/glycob/cwj066.
- Kizuka, Yasuhiko, and Naoyuki Taniguchi. 2016. "Enzymes for N-Glycan Branching and Their Genetic and Nongenetic Regulation in Cancer." *Biomolecules* 6 (2). doi:10.3390/biom6020025.
- Knauer, Roland, and Ludwig Lehle. 1999. "The Oligosaccharyltransferase Complex from Yeast." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1426 (2): 259–73. doi:10.1016/S0304-4165(98)00128-7.
- Kornak, Uwe, Ellen Reynders, Aikaterini Dimopoulou, Jeroen van Reeuwijk, Bjoern Fischer, Anna Rajab, Birgit Budde, et al. 2008. "Impaired Glycosylation and Cutis Laxa Caused by Mutations in the Vesicular H⁺-ATPase Subunit ATP6V0A2." *Nature Genetics* 40 (1): 32–34. doi:10.1038/ng.2007.45.
- Kornfeld, R., and S. Kornfeld. 1985. "Assembly of Asparagine-Linked Oligosaccharides." *Annual*

Review of Biochemistry 54: 631–64. doi:10.1146/annurev.bi.54.070185.003215.

Kozlov, Guennadi, Sara Bastos-Aristizabal, Pekka Määttänen, Angelika Rosenauer, Fenglin Zheng, April Killikelly, Jean-François Trempe, David Y. Thomas, and Kalle Gehring. 2010. "Structural Basis of Cyclophilin B Binding by the Calnexin/Calreticulin P-Domain." *The Journal of Biological Chemistry* 285 (46): 35551–57. doi:10.1074/jbc.M110.160101.

Lapinskas, P. J., K. W. Cunningham, X. F. Liu, G. R. Fink, and V. C. Culotta. 1995. "Mutations in PMR1 Suppress Oxidative Damage in Yeast Cells Lacking Superoxide Dismutase." *Molecular and Cellular Biology* 15 (3): 1382–88.

Liu, X. F., and V. C. Culotta. 1999. "Post-Translation Control of Nramp Metal Transport in Yeast. Role of Metal Ions and the BSD2 Gene." *The Journal of Biological Chemistry* 274 (8): 4863–68.

Liu, Y., P. Choudhury, C. M. Cabral, and R. N. Sifers. 1999. "Oligosaccharide Modification in the Early Secretory Pathway Directs the Selection of a Misfolded Glycoprotein for Degradation by the Proteasome." *The Journal of Biological Chemistry* 274 (9): 5861–67.

Lynch, Thomas P., Christina M. Ferrer, S. RaElla Jackson, Kristina S. Shahriari, Keith Vosseller, and Mauricio J. Reginato. 2012. "Critical Role of O-Linked β -N-Acetylglucosamine Transferase in Prostate Cancer Invasion, Angiogenesis, and Metastasis." *The Journal of Biological Chemistry* 287 (14): 11070–81. doi:10.1074/jbc.M111.302547.

Määttänen, Pekka, Kalle Gehring, John J.M. Bergeron, and David Y. Thomas. 2010. "Protein Quality Control in the ER: The Recognition of Misfolded Proteins." *Seminars in Cell & Developmental Biology* 21 (5): 500–511. doi:10.1016/j.semcd.2010.03.006.

Mandal, D., T. B. Woolf, and R. Rao. 2000. "Manganese Selectivity of pmr1, the Yeast Secretory Pathway Ion Pump, Is Defined by Residue gln783 in Transmembrane Segment 6. Residue Asp778 Is Essential for Cation Transport." *The Journal of Biological Chemistry* 275 (31): 23933–38. doi:10.1074/jbc.M002619200.

Marshall, R. D. 1972. "Glycoproteins." *Annual Review of Biochemistry* 41 (1): 673–702. doi:10.1146/annurev.bi.41.070172.003325.

Mast, Steven W., Krista Diekman, Khanita Karaveg, Ann Davis, Richard N. Sifers, and Kelley W. Moremen. 2005. "Human EDEM2, a Novel Homolog of Family 47 Glycosidases, Is Involved in ER-Associated Degradation of Glycoproteins." *Glycobiology* 15 (4): 421–36. doi:10.1093/glycob/cwi014.

Molinari, M. 2003. "Role of EDEM in the Release of Misfolded Glycoproteins from the Calnexin Cycle." *Science* 299 (5611): 1397–1400. doi:10.1126/science.1079474.

Molinari, M., and A. Helenius. 1999. "Glycoproteins Form Mixed Disulphides with Oxidoreductases during Folding in Living Cells." *Nature* 402 (6757): 90–93. doi:10.1038/47062.

Moremen, K. W., and P. W. Robbins. 1991. "Isolation, Characterization, and Expression of cDNAs Encoding Murine Alpha-Mannosidase II, a Golgi Enzyme That Controls Conversion of High Mannose to Complex N-Glycans." *The Journal of Cell Biology* 115 (6): 1521–34.

Munkley, Jennifer, Daniel Vodak, Karen E. Livermore, Katherine James, Brian T. Wilson, Bridget Knight, Paul McCullagh, et al. 2016. "Glycosylation Is an Androgen-Regulated Process Essential for Prostate Cancer Cell Viability." *EBioMedicine* 8 (June): 103–16. doi:10.1016/j.ebiom.2016.04.018.

Munro, Sean. 2001. "What Can Yeast Tell Us about N-Linked Glycosylation in the Golgi Apparatus?"

FEBS Letters 498 (2–3): 223–27. doi:10.1016/S0014-5793(01)02488-7.

Nakatani, K., D. A. Thompson, A. Barthel, H. Sakaue, W. Liu, R. J. Weigel, and R. A. Roth. 1999. “Up-Regulation of Akt3 in Estrogen Receptor-Deficient Breast Cancers and Androgen-Independent Prostate Cancer Lines.” *The Journal of Biological Chemistry* 274 (31): 21528–32.

Noda, K., E. Miyoshi, N. Uozumi, S. Yanagidani, Y. Ikeda, C. Gao, K. Suzuki, et al. 1998. “Gene Expression of alpha1-6 Fucosyltransferase in Human Hepatoma Tissues: A Possible Implication for Increased Fucosylation of Alpha-Fetoprotein.” *Hepatology (Baltimore, Md.)* 28 (4): 944–52. doi:10.1002/hep.510280408.

Olsen, Jesper V., Blagoy Blagoev, Florian Gnad, Boris Macek, Chanchal Kumar, Peter Mortensen, and Matthias Mann. 2006. “Global, in Vivo, and Site-Specific Phosphorylation Dynamics in Signaling Networks.” *Cell* 127 (3): 635–48. doi:10.1016/j.cell.2006.09.026.

Pan, Shujuan, Shufang Wang, Budi Utama, Lu Huang, Neil Blok, Mary K. Estes, Kelley W. Moremen, and Richard N. Sifers. 2011. “Golgi Localization of ERManI Defines Spatial Separation of the Mammalian Glycoprotein Quality Control System.” *Molecular Biology of the Cell* 22 (16): 2810–22. doi:10.1091/mbc.E11-02-0118.

Panneerselvam, K., and H.H. Freeze. 1995. “Enzymes Involved in the Synthesis of Mannose-6-Phosphate from Glucose Are Normal in Carbohydrate Deficient Glycoprotein Syndrome Fibroblasts.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 208 (2): 517–22. doi:10.1006/bbrc.1995.1369.

Pili, R., J. Chang, R. A. Partis, R. A. Mueller, F. J. Chrest, and A. Passaniti. 1995. “The Alpha-Glucosidase I Inhibitor Castanospermine Alters Endothelial Cell Glycosylation, Prevents Angiogenesis, and Inhibits Tumor Growth.” *Cancer Research* 55 (13): 2920–26.

Pinton, Paolo, Tullio Pozzan, and Rosario Rizzuto. 1998. “The Golgi Apparatus Is an Inositol 1,4,5-Trisphosphate-Sensitive Ca²⁺ Store, with Functional Properties Distinct from Those of the Endoplasmic Reticulum.” *The EMBO Journal* 17 (18): 5298–5308. doi:10.1093/emboj/17.18.5298.

Potelle, Sven, Eudoxie Dulary, Leslie Climer, Sandrine Duvet, Willy Morelle, Dorothée Vicogne, Elodie Lebredonchelle, et al. 2017. “Manganese-Induced Turnover of TMEM165.” *The Biochemical Journal*, March. doi:10.1042/BCJ20160910.

Potelle, Sven, Willy Morelle, Eudoxie Dulary, Sandrine Duvet, Dorothée Vicogne, Corentin Spriet, Marie-Ange Krzewinski-Recchi, et al. 2016. “Glycosylation Abnormalities in Gdt1p/TMEM165 Deficient Cells Result from a Defect in Golgi Manganese Homeostasis.” *Human Molecular Genetics* 25 (8): 1489–1500. doi:10.1093/hmg/ddw026.

Qu, Li, Ji Yu Ju, Shuang Ling Chen, Yan Shi, Zhi Guang Xiang, Yi Qun Zhou, Yun Tian, Yin Liu, and Li Ping Zhu. 2006. “Inhibition of the Alpha-Mannosidase Man2c1 Gene Expression Enhances Adhesion of Jurkat Cells.” *Cell Research* 16 (7): 622–31. doi:10.1038/sj.cr.7310065.

Queiroz, Rafaela Muniz de, Erika Carvalho, and Wagner Barbosa Dias. 2014. “O-GlcNAcylation: The Sweet Side of the Cancer.” *Frontiers in Oncology* 4: 132. doi:10.3389/fonc.2014.00132.

Rayner, J. C., and S. Munro. 1998. “Identification of the MNN2 and MNN5 Mannosyltransferases Required for Forming and Extending the Mannose Branches of the Outer Chain Mannans of *Saccharomyces Cerevisiae*.” *The Journal of Biological Chemistry* 273 (41): 26836–43.

- Rodríguez, Patricio, Coralia I. Rivas, Alejandro Godoy, Marcela Villanueva, Jorge Fischbarg, Juan Carlos Vera, and Alejandro M. Reyes. 2005. "Redefining the Facilitated Transport of Mannose in Human Cells: Absence of a Glucose-Insensitive, High-Affinity Facilitated Mannose Transport System." *Biochemistry* 44 (1): 313–20. doi:10.1021/bi048923k.
- Rosnoblet, Claire, Dominique Legrand, Didier Demaegd, Hêla Hacine-Gherbi, Geoffroy de Bettignies, Riet Bammens, Cindy Borrego, et al. 2013. "Impact of Disease-Causing Mutations on TMEM165 Subcellular Localization, a Recently Identified Protein Involved in CDG-II." *Human Molecular Genetics* 22 (14): 2914–28. doi:10.1093/hmg/ddt146.
- Roth, Jürgen, Christian Zuber, Sujin Park, Insook Jang, Yangsin Lee, Katarina Gaplovska Kysela, Valérie Fourn, Roger Santimaria, Bruno Guhl, and Jin Won Cho. 2010. "Protein N-Glycosylation, Protein Folding, and Protein Quality Control." *Molecules and Cells* 30 (6): 497–506. doi:10.1007/s10059-010-0159-z.
- Rudolph, H. K., A. Antebi, G. R. Fink, C. M. Buckley, T. E. Dorman, J. LeVitre, L. S. Davidow, J. I. Mao, and D. T. Moir. 1989. "The Yeast Secretory Pathway Is Perturbed by Mutations in PMR1, a Member of a Ca²⁺ ATPase Family." *Cell* 58 (1): 133–45.
- Ruiz-Canada, Catalina, Daniel J. Kelleher, and Reid Gilmore. 2009. "Cotranslational and Posttranslational N-Glycosylation of Polypeptides by Distinct Mammalian OST Isoforms." *Cell* 136 (2): 272–83. doi:10.1016/j.cell.2008.11.047.
- Saint-Pol, A., P. Codogno, and S. E. Moore. 1999. "Cytosol-to-Lysosome Transport of Free Polymannose-Type Oligosaccharides. Kinetic and Specificity Studies Using Rat Liver Lysosomes." *The Journal of Biological Chemistry* 274 (19): 13547–55.
- Schachter, H. 1991. "The 'Yellow Brick Road' to Branched Complex N-Glycans." *Glycobiology* 1 (5): 453–61.
- Schallus, T., C. Jaechh, K. Feher, A. S. Palma, Y. Liu, J. C. Simpson, M. Mackeen, et al. 2008. "Malectin: A Novel Carbohydrate-Binding Protein of the Endoplasmic Reticulum and a Candidate Player in the Early Steps of Protein N-Glycosylation." *Molecular Biology of the Cell* 19 (8): 3404–14. doi:10.1091/mbc.E08-04-0354.
- Schallus, Thomas, Krisztina Fehér, Ulrich Sternberg, Vladimir Rybin, and Claudia Muhle-Goll. 2010. "Analysis of the Specific Interactions between the Lectin Domain of Malectin and Diglucosides." *Glycobiology* 20 (8): 1010–20. doi:10.1093/glycob/cwq059.
- Schekman, R., and L. Orci. 1996. "Coat Proteins and Vesicle Budding." *Science (New York, N.Y.)* 271 (5255): 1526–33.
- Schmid, D., A. Baici, H. Gehring, and P. Christen. 1994. "Kinetics of Molecular Chaperone Action." *Science (New York, N.Y.)* 263 (5149): 971–73.
- Schneider, Anja, Iris Steinberger, Andrei Herdean, Chiara Gandini, Marion Eisenhut, Samantha Kurz, Anna Morper, et al. 2016. "The Evolutionarily Conserved Protein PHOTOSYNTHESIS AFFECTED MUTANT71 Is Required for Efficient Manganese Uptake at the Thylakoid Membrane in Arabidopsis." *The Plant Cell*, March, tpc.00812.2015. doi:10.1105/tpc.15.00812.
- Schubert, U., L. C. Antón, J. Gibbs, C. C. Norbury, J. W. Yewdell, and J. R. Bennink. 2000. "Rapid Degradation of a Large Fraction of Newly Synthesized Proteins by Proteasomes." *Nature* 404 (6779):

770–74. doi:10.1038/35008096.

Schwarz, Markus, Roland Knauer, and Ludwig Lehle. 2005. "Yeast Oligosaccharyltransferase Consists of Two Functionally Distinct Sub-Complexes, Specified by Either the Ost3p or Ost6p Subunit." *FEBS Letters* 579 (29): 6564–68. doi:10.1016/j.febslet.2005.10.063.

Shi, Y., Y. Tian, Y. Zhou, J. Ju, L. Qu, S. Chen, Z. Xiang, Y. Liu, and L. Zhu. 2007. "Inhibition of Malignant Activities of Nasopharyngeal Carcinoma Cells with High Expression of CD44 by siRNA." *Oncology Reports*, August. doi:10.3892/or.18.2.397.

Shrimal, Shiteshu, Natalia A. Cherepanova, and Reid Gilmore. 2015. "Cotranslational and Posttranslational N-Glycosylation of Proteins in the Endoplasmic Reticulum." *Seminars in Cell & Developmental Biology* 41 (May): 71–78. doi:10.1016/j.semcdb.2014.11.005.

Sigel, A., and H. Sigel. 1998. "Metal Ions in Biological Systems, Volume 35: Iron Transport and Storage Microorganisms, Plants, and Animals." *Metal-Based Drugs* 5 (5): 262. doi:10.1155/MBD.1998.262a.

Snider, M. D., and O. C. Rogers. 1984. "Transmembrane Movement of Oligosaccharide-Lipids during Glycoprotein Synthesis." *Cell* 36 (3): 753–61.

Staneloni, R. J., R. A. Ugalde, and L. F. Leloir. 1980. "Addition of Glucose to Dolichyl Diphosphate Oligosaccharide and Transfer to Protein." *European Journal of Biochemistry / FEBS* 105 (2): 275–78.

Strayle, J., T. Pozzan, and H. K. Rudolph. 1999. "Steady-State Free Ca(2+) in the Yeast Endoplasmic Reticulum Reaches Only 10 microM and Is Mainly Controlled by the Secretory Pathway Pump pmr1." *The EMBO Journal* 18 (17): 4733–43. doi:10.1093/emboj/18.17.4733.

Striebeck, Alexander, David A. Robinson, Alexander W. Schüttelkopf, and Daan M. F. van Aalten. 2013. "Yeast Mnn9 Is Both a Priming Glycosyltransferase and an Allosteric Activator of Mannan Biosynthesis." *Open Biology* 3 (9): 130022. doi:10.1098/rsob.130022.

Sun, Shisheng, and Hui Zhang. 2015. "Identification and Validation of Atypical N -Glycosylation Sites." *Analytical Chemistry* 87 (24): 11948–51. doi:10.1021/acs.analchem.5b03886.

Suzuki, Tadashi, Izumi Hara, Miyako Nakano, Masaki Shigeta, Takatoshi Nakagawa, Akihiro Kondo, Yoko Funakoshi, and Naoyuki Taniguchi. 2006. "Man2C1, an α -Mannosidase, Is Involved in the Trimming of Free Oligosaccharides in the Cytosol." *Biochemical Journal* 400 (1): 33–41. doi:10.1042/BJ20060945.

Suzuki, Tadashi, Hangil Park, and William J. Lennarz. 2002. "Cytoplasmic peptide:N-Glycanase (PNGase) in Eukaryotic Cells: Occurrence, Primary Structure, and Potential Functions." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16 (7): 635–41. doi:10.1096/fj.01-0889rev.

Tannous, Abla, Giorgia Brambilla Pisoni, Daniel N. Hebert, and Maurizio Molinari. 2015. "N-Linked Sugar-Regulated Protein Folding and Quality Control in the ER." *Seminars in Cell & Developmental Biology* 41 (May): 79–89. doi:10.1016/j.semcdb.2014.12.001.

Tian, Yun, Ji Yu Ju, Yi Qun Zhou, Yin Liu, and Li Ping Zhu. 2008. "Inhibition of α -Mannosidase *Man2c1* Gene Expression Suppresses Growth of Esophageal Carcinoma Cells through Mitotic Arrest and Apoptosis." *Cancer Science* 99 (12): 2428–34. doi:10.1111/j.1349-7006.2008.01019.x.

Trombetta, E. Sergio, and Armando J. Parodi. 2003. "Quality Control and Protein Folding in the Secretory Pathway." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 19: 649–76.

doi:10.1146/annurev.cellbio.19.110701.153949.

Vassilakos, Aikaterini, Marek Michalak, Mark A. Lehrman, and David B. Williams. 1998. "Oligosaccharide Binding Characteristics of the Molecular Chaperones Calnexin and Calreticulin[†]." *Biochemistry* 37 (10): 3480–90. doi:10.1021/bi972465g.

Vinogradov, E., B. Petersen, and K. Bock. 1998. "Structural Analysis of the Intact Polysaccharide Mannan from *Saccharomyces Cerevisiae* Yeast Using ¹H and ¹³C NMR Spectroscopy at 750 MHz." *Carbohydrate Research* 307 (1–2): 177–83.

Vleugels, Wendy, Micha A. Haeuptle, Bobby G. Ng, Jean-Claude Michalski, Roberta Battini, Carlo Dionisi-Vici, Mark D. Ludman, et al. 2009. "RFT1 Deficiency in Three Novel CDG Patients." *Human Mutation* 30 (10): 1428–34. doi:10.1002/humu.21085.

Wang, Li, and Tadashi Suzuki. 2013. "Dual Functions for Cytosolic α -Mannosidase (Man2C1): Its down-Regulation Causes Mitochondria-Dependent Apoptosis Independently of Its α -Mannosidase Activity." *The Journal of Biological Chemistry* 288 (17): 11887–96. doi:10.1074/jbc.M112.425702.

Wang, Songyu, and Davis T. W. Ng. 2008. "Lectins Sweet-Talk Proteins into ERAD." *Nature Cell Biology* 10 (3): 251–53. doi:10.1038/ncb0308-251.

Wei, Y., V. Marchi, R. Wang, and R. Rao. 1999. "An N-Terminal EF Hand-like Motif Modulates Ion Transport by Pmr1, the Yeast Golgi Ca(2+)/Mn(2+)-ATPase." *Biochemistry* 38 (44): 14534–41.

Wiggins, C. A., and S. Munro. 1998. "Activity of the Yeast MNN1 Alpha-1,3-Mannosyltransferase Requires a Motif Conserved in Many Other Families of Glycosyltransferases." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (14): 7945–50.

Wu, Ying, Matthew T. Swulius, Kelley W. Moremen, and Richard N. Sifers. 2003. "Elucidation of the Molecular Logic by Which Misfolded Alpha 1-Antitrypsin Is Preferentially Selected for Degradation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (14): 8229–34. doi:10.1073/pnas.1430537100.

Xia, Baoyun, Wenyue Zhang, Xueli Li, Rong Jiang, Tisa Harper, Rengpeng Liu, Richard D. Cummings, and Miao He. 2013. "Serum N-Glycan and O-Glycan Analysis by Mass Spectrometry for Diagnosis of Congenital Disorders of Glycosylation." *Analytical Biochemistry* 442 (2): 178–85. doi:10.1016/j.ab.2013.07.037.

Xiang, Z. G., D. D. Jiang, Y. Liu, L. F. Zhang, and L. P. Zhu. 2010. "hMan2c1 Transgene Promotes Tumor Progress in Mice." *Transgenic Research* 19 (1): 67–75. doi:10.1007/s11248-009-9299-3.

Xu, Xundi, Masato Sakon, Hiroaki Nagano, Nobuaki Hiraoka, Hirofumi Yamamoto, Nobuyasu Hayashi, Keizo Dono, et al. 2004. "Akt2 Expression Correlates with Prognosis of Human Hepatocellular Carcinoma." *Oncology Reports* 11 (1): 25–32.

Yamashita, K., K. Fukushima, T. Sakiyama, F. Murata, M. Kuroki, and Y. Matsuoka. 1995. "Expression of Sia Alpha 2-->6Gal Beta 1-->4GlcNAc Residues on Sugar Chains of Glycoproteins Including Carcinoembryonic Antigens in Human Colon Adenocarcinoma: Applications of Trichosanthes Japonica Agglutinin I for Early Diagnosis." *Cancer Research* 55 (8): 1675–79.

Yan, Q., G. D. Prestwich, and W. J. Lennarz. 1999. "The Ost1p Subunit of Yeast Oligosaccharyl Transferase Recognizes the Peptide Glycosylation Site Sequence, -Asn-X-Ser/Thr-." *The Journal of Biological Chemistry* 274 (8): 5021–25.

Annexe 1

TMEM165 deficiencies in Congenital Disorders of Glycosylation type II (CDG-II): clues and evidences for roles of the protein in Golgi functions and ion homeostasis.

Eudoxie Dulary*, Sven Potelle*, Dominique Legrand[‡] and François Foulquier[‡]

Univ. Lille, CNRS, UMR 8576 – UGSF - Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, F- 59000
Lille, France

* ED and SP contributed equally to this work

[‡] Corresponding authors:

Dr. François Foulquier / Dr. Dominique Legrand

Univ. Lille, CNRS, UMR 8576 – UGSF - Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, F-59000
Lille, France

Tel. + 33 3 20 43 44 30

Fax. + 33 3 20 43 65 55

E-mail. francois.foulquier@univ-lille1.fr / dominique.legrand@univ-lille1.fr

Abstract

Congenital Disorders of Glycosylation (CDG) are rare inherited diseases causing glycosylation defects responsible for severe growth and psychomotor retardations in patients. Whereas most genetic defects affect enzymes directly involved in the glycosylation process, like glycosyltransferases or sugar transporters, recent findings revealed the impact of gene mutations on proteins implicated in both Golgi vesicular trafficking and ion homeostasis. TMEM165 is one of these deficient Golgi proteins found in CDG patients whose function in the secretory pathway has been deduced from several recent studies using TMEM165 deficient mammalian cells or yeast cells deficient in Gdt1p, the yeast TMEM165 ortholog. These studies actually confirm previous observations based on both sequence and predicted topology of this transmembrane protein and the phenotypes of human and yeast cells, namely that TMEM165 is very probably a transporter involved in ion homeostasis. Whereas the exact function of TMEM165 remains to be fully characterized, several studies hypothesize that TMEM165 could be a Golgi localized $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiporter. However, recent data also support the role of TMEM165 in Golgi Mn^{2+} homeostasis then arguing for a putative role of Mn^{2+} transporter for TMEM165 essential to achieve the correct N-glycosylation process of proteins in the secretory pathway. This manuscript is a review of the current state of knowledge on TMEM165 deficiencies in Congenital Disorders of Glycosylation as well as new data on function of TMEM165 and some speculative models on TMEM165/Golgi functions are discussed.

Highlights

- TMEM165 is a Golgi ion transporter.
- TMEM165 is involved in Golgi manganese homeostasis.
- TMEM165 deficiency causes major Golgi glycosylation defects.
- Manganese supplementation rescues glycosylation defects.

Keywords

TMEM165, Gdt1p, congenital disorders of glycosylation, N-glycosylation, manganese and calcium Golgi homeostasis.

Abbreviations

CDG: Congenital Disorders of Glycosylation; UPF0016: Uncharacterized Protein Family 0016; Ca²⁺: calcium; Mn²⁺: manganese; GAG: glycosaminoglycans; IEF: isoelectrofocalisation; COG : Conserved Oligomeric Golgi;

Acknowledgements

We are indebted to the Research Federation FRABio (Univ. Lille, CNRS, FR 3688, FRABio, Biochimie Structurale et Fonctionnelle des Assemblages Biomoléculaires) for providing the scientific and technical environment conducive to achieving this work. This Research was carried out within the scope of the International Associated Laboratory “Laboratory for the Research on Congenital Disorders of Glycosylation – from cellular mechanisms to cure – GLYCOLAB4CDG”.

1. Introduction

Congenital Disorders of Glycosylation (CDG) are rare and severe inherited disorders in which glycosylation is affected. CDGs are divided into two groups: CDG type I characterized by defects in N-linked protein glycosylation due to deficiencies in the assembly of the dolichylpyrophosphate linked oligosaccharides and/or their transfer to asparagine residues on the nascent polypeptides; and CDG type II where defects are in the processing of N-glycans (Aebi et al., 1999). The CDG family comprises nearly one hundred disorders (Freeze et al., 2014). CDG type II group not only includes defects in enzymes or transporters involved in glycosylation but also in vesicular trafficking and/or Golgi pH homeostasis caused by deficiencies in key proteins like the COG complex or the vesicular H⁺-ATPase subunit ATP6V0A2 (Wu et al., 2004 ; Foulquier et al., 2006 ; Kranz et al., 2007 ; Kornak et al., 2008; Paesold-Burda et al., 2009). More recently, Foulquier et al. (2012) identified a new disorder, namely TMEM165-CDG, caused by a primarily uncharacterized Golgi protein whose role(s) in Golgi homeostasis, protein trafficking and glycosylation is(are) now being unraveled in several recent studies. This paper aims to review our current knowledge on the structure/function relationships, the localization, the expression and the putative functions of TMEM165 in Golgi functions.

2. Sequence and topology of TMEM165 and of its yeast ortholog Gdt1p

TMEM165 is a human hydrophobic protein of 324 amino acids containing 7 predicted transmembrane domains (Foulquier et al., 2012) (Figure 1 and Figure 2A). This protein belongs to the Uncharacterized Protein Family 0016 (UPF0016), family of integral membrane proteins of unknown function. According to the database, the members of this family are composed by one or two EXGDK/R motifs (X is any hydrophobic residue) flanked by two hydrophobic regions at the end of the second and the fifth transmembrane domains with an antiparallel orientation (Figure 2A). Both ELGDK and EWGDR motifs contain acidic residues that could play a role in putative cation recognition and these two homologous regions are probably due to a duplication gene event (Demaegd et al., 2014). TMEM165 also presents a cytosolic central loop organized in a coiled-coil domain encompassing 52 amino acids several of which are acidic (Rosnoble et al., 2013). This central loop contains one leucine pair

(L₂₀₉L₂₁₀), found in a non-canonical [DE]XXXL[LI] signal (Figure 2A). Some studies of the central loop in another member of the UPF0016 family, Vcxp1, suggests that the acidic loop may have a Ca²⁺-dependent regulatory function (Gifford et al., 2007). In addition, the first cytosolic loop contains a putative lysosomal-targeting sequence Y₁₂₄NRL₁₂₇ (belonging to the classical YXXØ lysosomal targeting signal) (Braulke and Bonifacino, 2009) (Figure 2A).

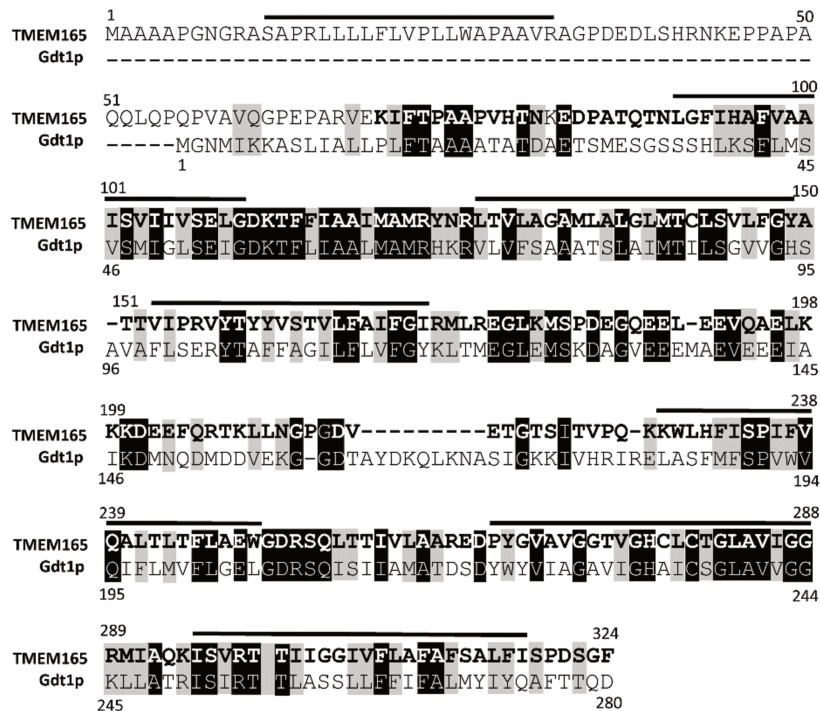


Figure 1: Protein sequence alignment of TMEM165 and Gdt1p. Black boxes indicate the amino acid residues which are identical in both sequences whereas grayed boxes show the homologous amino acid residues. The bold characters in TMEM165 sequence correspond to the amino acid residues which are found conserved in the sequences of the full-length TMEM165 sequences of mammals (SwissProt Database) using the Cobalt-NCBI multiple alignment tool (NCBI). The thick horizontal bars on the top of the sequences indicate the amino acid stretches which are predicted as potential transmembrane domains (TMHMM v2.0 server tool).

TMEM165 is well conserved between prokaryotes (919 different species) and eukaryotes (409 species) (Demaegd et al., 2013). Some orthologs of TMEM165 have been identified and used to study the function of this protein such as the yeast ortholog, Gdt1p (Gcr1 dependent translation factor 1). Gdt1p is a 280 amino acid residues membrane protein whose sequence identity with TMEM165 reaches 38%, concerning more particularly the transmembrane domains and the two EXGDK/R motifs (Figure 1). The two major differences between TMEM165 and Gdt1p lie in both the N-terminus and the central loop. Indeed, the first 55 amino acid residues containing the first transmembrane domain is absent in Gdt1p, whereas the central loop is 10 amino acid residues longer in Gdt1p than in TMEM165 (Figure

1). According to the predictions, the central loop was demonstrated to be in the cytosol (Demaegd et al., 2014 ; Potelle et al., 2016, submitted).

3. TMEM165/Gdt1p expression and localization in wild type tissues and cells

Database analyses of TMEM165 expression (BioGPS Database) indicate that TMEM165 is ubiquitously expressed with an observed higher expression in smooth muscle, small intestine and colon. In mice, Reinhardt et al. (2014) have demonstrated a distinct pattern of TMEM165 with increased expression during lactation returning to baseline during mammary involution.

While the amino acid sequence of TMEM165/Gdt1p does not contain any ER-retention KDEL/ HDEL signal, its cellular localization presents a Golgi distribution in both mammalian and yeast cells. Unlike Gdt1p which localizes in the cis- and medial Golgi of yeast (Demaegd et al., 2014), TMEM165 colocalizes with the beta 1,4 galactosyltransferase, a glycosyltransferase located in the trans-Golgi better than with GM130, a cis-medial marker (Foulquier et al., 2012). In addition, TMEM165 may also be found, in a lower extent, in late endosomes/lysosomes and at the plasma membrane (Rosnoblet et al., 2013 ; Demaegd et al., 2013).

4. TMEM165 deficiencies in CDG-II: impact on patients and on the cellular expression, localization and stability of the protein

In 2012, five patients with a CDG-II IEF transferrin pattern were identified in TMEM165-CDG (Foulquier et al., 2012). These patients have similarities in their phenotypes (Foulquier et al, 2012 ; Zeevaert et al., 2013). Patient 1 is a boy from a Georgian Jewish family with no consanguinity. He was affected by growth retardation with severe dwarfism, psychomotor retardation, osteoporosis, epi-, meta- and diaphyseal dysplasia, muscular weakness, fat excess, joint laxity and hepatosplenomegaly. Patient 2, the sister of patient 1, presented the similar phenotype as her brother but had also fever episodes. The third patient showed the same clinical, biochemical and radiological features as cases 1 and 2. In all three patients, mutation (c.792+182G>A) of TMEM165 was identified (Figure 2B). This

mutation activates a cryptic splice donor site and leads to two isoforms: the wild-type one and an additional one resulting in the replacement of exon 4 with a 117 bp intronic sequence. As a consequence, a decreased TMEM165 protein expression was observed in the fibroblasts of these three patients. Patient 4 is a Turkish boy with consanguinity in his family. Although this patient grew normally without hepatosplenomegaly, epilepsy or skeletal abnormalities, he suffered severe psychomotor retardation. This patient possessed a homozygous missense mutation (c.377G>A) that leads to the substitution of an arginine to a histidine [p.Arg126His] in TMEM165 (Figure 2B). Interestingly, whereas the expression level of TMEM165 was found decreased in fibroblasts, striking disturbances of the protein localization was observed with the R126H TMEM165-GFP fusion protein as it colocalized predominantly with dense lysosomal/endosomal compartments. The last patient (patient 5) is an American girl presenting the same clinical features than patients 1-3 with dwarfism, abnormal fat distribution and skeletal abnormalities such as osteoporosis. In this patient, two mutations in TMEM165 were found: a heterozygous missense mutation (c.377C>T) which leads to a distinct missense mutation [p.Arg126Cys] and a missense mutation (c.910G>A [p.Gly304Arg]) (Foulquier et al., 2012) (Figure 2B). In fibroblasts of patient 5, TMEM165 expression was slightly decreased and its localization was exclusively found at the Golgi level. Moreover, patients with the splice mutation displayed no expression level of TMEM165 and thus have more severe phenotypes than the others (Zeevaert et al., 2013). Interestingly, TMEM165-deficient zebrafish generated by a morpholino strategy were recently used to analyze the consequences of disruption in TMEM165 expression. This study demonstrates defects in morphant structures and more particularly abnormalities in craniofacial phenotypes (alterations in the growth and development of the head and facial bones). These are similar to malformations observed in human patients (Bammens et al., 2014). More recently, a new TMEM165-CDG patient was described (Althoff et al., 2015). This patient was the second child of consanguineous parents. Their first child had died from TMEM165 deficiency at the age of 5 months. The patient presents facial dysmorphism, nephrotic syndrome, cardiac defects, enlarged cerebral ventricles and neurological involvement. In this patient (patient 6), a new mutation [p.Glu108Gly] was found in the conserved ELGDK sequence of TMEM165 (Figure 2B). Interestingly, strong glycosylation defects only appeared in this patient after a few weeks, thus highly suggesting mother's protecting effect on neonatal glycosylation.

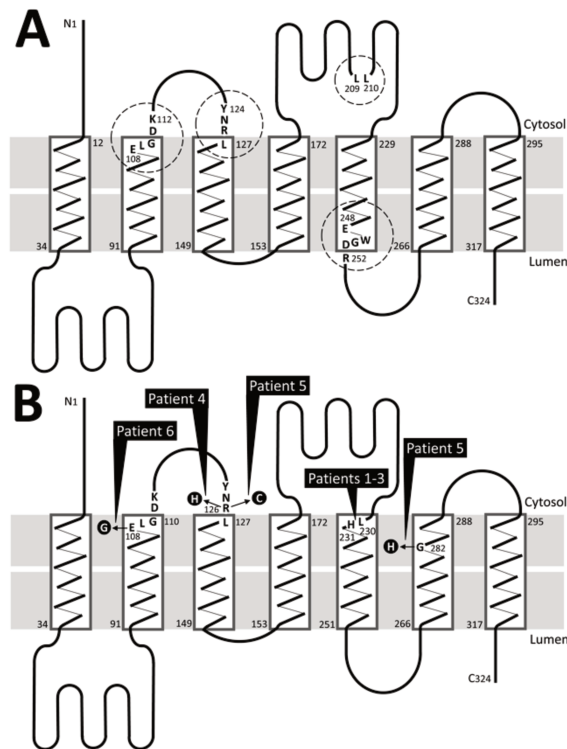


Figure 2: Predicted transmembrane TMEM165 topology showing (A) the sequence motifs which may play roles in both function and intracellular targeting of the protein (see text), and (B) the protein mutations identified in the six TMEM165-CDG patients discovered so far (see text). The seven predicted transmembrane helices are mapped in rectangles spanning the membrane (in gray). Numbers indicate the positions of amino acid residues on the predicted topology model. The topology model was predicted using the TMHMM v2.0 server tool.

From the mutations found in TMEM165-deficient patients, it appears that not only a decreased level of expression of TMEM165 has severe consequences on cells and tissues physiology, but also that several sequence motifs of the protein are crucial for its cellular localization and hence presumably for its stability and function(s). Importance of these sequence motifs, most particularly the putative lysosomal-targeting sequence $_{124}YNRL_{127}$, were confirmed by Rosnoblet et al. (2013) through experiments with HeLa cells overexpressing mutated TMEM165 GFP-tagged protein forms. They indeed demonstrated that mutations R126H and R126C lead to preferential TMEM165 targeting to the lysosomal/endosomal compartments and also to the plasma membrane. They also demonstrated that Y124 is crucial for TMEM165 exit from the Golgi, whereas R126 is involved in protein internalization from the plasma membrane.

5. TMEM165 deficiencies in CDG-II: impact on Golgi glycosylation

At the Golgi level, different glycosylation processes coexist: N-, O-glycosylation and glycosaminoglycans (GAG) and glycolipids synthesis (Moremen et al., 2012). Most of these processes were found altered in TMEM165-deficient cells.

First, TMEM165-CDG patients exhibit abnormal isoelectrofocalisation (IEF) transferrin patterns revealing defects in the maturation of N-glycans in the Golgi (Foulquier et al., 2012 ; Zeevaert et al., 2013). This technique is based on the separation of transferrin glycoforms differing from each other by the number of negative charges caused by sialic acids (Jaeken et al., 1984). Plasma transferrin is indeed known to contain two N-glycosylation sites fully occupied by bi-triantennary sialylated N-glycan structures in control individuals. In a normal profile, 4-, 5- and 6-sialo transferrin glycoforms may be detected. In all TMEM165-CDG patients, there are both an increase of 0-, 1-, 2-, and 3-sialo transferrin glycoforms and a concomitant decrease of 6-, 5-, and 4-sialo transferrin glycoforms then arguing for a severe Golgi processing defects. To confirm this decrease of N-glycosylation, experiments in siRNA TMEM165 HEK293 cells were conducted with fluorescent lectins, more particularly SNA (*Sambicus nigra* lectin) that recognizes the terminal sialic acid. Compared to control cells, a strong decrease in sialylation was revealed (Foulquier et al., 2012). To identify the affected structures, analyses by MALDI-TOF mass spectrometry of glycoproteins from patient serum were performed. Results showed an increase in the undersialylated and undergalactosylated glycans (Foulquier et al., 2012 ; Zeevaert et al., 2013 ; Xia et al., 2013 ; van Scherpenzeel et al., 2015), in fucosylation (Zeevaert et al., 2013), and an increase in high-mannose type N-glycans suggesting a decrease in N-glycans maturation (Xia et al., 2013). Such accumulation of undergalactosylated glycan structures was also observed in the last discovered TMEM165-CDG patient (Althoff et al., 2015). Very recently, a detailed analysis of N-linked glycans from glycoproteins of TMEM165 depleted HEK293 cells by MALDI-TOF MS confirmed a severe disruption of the galactosylation process of the N-linked glycan structures (Potelle et al., 2016). This galactosylation defect has been shown to be general by affecting the different other glycosylation processes such as the O-glycosylation as well as the glycolipids glycosylation and GAGs synthesis. Moreover, and besides this galactosylation defect, we also demonstrate that the transfer of Gal/ GalNAc residues on glycolipids is severely impaired in TMEM165 depleted cells where a strong accumulation of Glc-Cer is observed. These recent

data highlight the crucial involvement of TMEM165 in both the galactosylation glycosylation process and the transfer of GalNAc residues on glycoconjugates.

Second, TMEM165-CDG patients exhibit potential defects in protein O-glycosylation, as assessed by IEF assay of Apolipoprotein-C-III (Apo CIII). This glycoprotein possesses a single O-glycan terminally modified by up to two sialic acids (Wopereis et al., 2003). Using the standard IEF assay, a defect in O-glycans was demonstrated in Apo CIII, with both a decrease of the monosialo- and an increase of the asialo-forms of the protein (Foulquier et al., 2012). This defect was confirmed by LC-MS/MS analyses showing a significant increase in T-antigen (Gal β 1-3GalNAc- α -Ser/Thr), slightly/mildly reduced ST-antigen (NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc- α -Ser/Thr) and increased T/ST-antigen ratio suggesting O-glycan undersialylation (Xia et al., 2013).

At last, the glycosaminoglycans also seem to be affected by TMEM165 defect. Indeed, in TMEM165-knockdown zebrafish, analyses by immunohistochemical staining of cartilage demonstrated alterations in chondroitin sulfate proteoglycan expression with changes in either core protein expression or GAG chain composition (Bammens et al., 2015). These results thus suggest that TMEM165 defect also impairs GAG synthesis.

All together, these results indicate disruption in Golgi glycosylation in TMEM165-CDG with alterations in N-, O-glycosylation and in GAG synthesis, thus confirming the importance of TMEM165 in Golgi glycosylation process.

Recently, the gel mobility of secreted invertase, a protein exclusively N-glycosylated, was assessed in *gdt1 Δ* null mutants. A defect in invertase mobility was only observed in the presence of high Ca²⁺ chloride concentration, arguing for an increase in underglycosylated forms (Potelle et al., 2016 ; Colinet et al., 2016).

6. Role(s) of TMEM165/Gdt1p in Golgi structure and functions

Significant alterations of Golgi morphology were found in fibroblasts of TMEM165-CDG patients using immunofluorescence labeling and Golgi markers like TGN46 for trans-Golgi network, and GM130 for cis- median-Golgi. The Golgi apparatus was indeed found dilated, and the trans-Golgi network markedly fragmented (Foulquier et al., 2012). Such disturbances in Golgi morphology were also reported in CDG patients with defects in the

Conserved Oligomeric Golgi (COG) complex that is known to be involved in the vesicular Golgi retrograde trafficking (Ungar et al., 2002). Although it could not be totally excluded that TMEM165 may influence Golgi trafficking, like COG, no direct effect of TMEM165 deficiency on Golgi trafficking has been demonstrated to date.

Both topology predicted from the amino acid sequence of TMEM165 and compared phylogeny strongly suggest that TMEM165 is an ion transporter, most probably a cation and/or proton transporter (Foulquier et al., 2012). A couple of experimental evidences concerning both TMEM165 and its yeast ortholog Gdt1p came early in support to the hypothesis that the proteins are involved in Ca^{2+} and pH homeostasis (Demaegd et al., 2013). It was indeed demonstrated that *gdt1* Δ yeast cells display a strong growth defect when cultured in the presence of high concentrations of Ca^{2+} chloride (700 mM). Interestingly, a truncated version of TMEM165, lacking the first 55 amino acid residues, partially restored yeast growth in presence of Ca^{2+} , suggesting that these proteins have similar functions in their respective hosts. Electrophysiological assessment of Ca^{2+} efflux in yeast overexpressing Gdt1p but not expressing Pmr1p, the Golgi $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -ATPase responsible for the Ca^{2+} supply in the secretory pathway, actually showed that Gdt1p regulates the rate of the Ca^{2+} uptake from the cytosol. In human cells, when TMEM165 is overexpressed and reaches the plasma membrane, patch-clamp analyses showed currents which could be due to cation efflux from cells, whereas the concentration of Ca^{2+} in the cytosol of those TMEM165 overexpressing cells is lower than in normal cells (Demaegd et al., 2013). In addition to putatively regulate Ca^{2+} homeostasis, TMEM165/Gdt1p was reported to influence pH homeostasis, and hence it was proposed as a $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ antiporter. In support to this assertion is the observation that TMEM165 deficiency in patient fibroblasts and siRNA targeted Hela cells strongly disturb lysosomes/late endosomes pH homeostasis (Demaegd et al., 2013). In addition, Colinet et al. (2016), demonstrated a pH dependent Ca^{2+} uptake activity by using a heterologous expression of Gdt1p in *Lactococcus lactis*.

Although many clues indicate that TMEM165 could play an important role in Ca^{2+} and pH homeostasis thus explaining both osteoporosis and bone dysplasia found in TMEM165-CDG patients (Zeevaert et al., 2013), the hypothesis that TMEM165/Gdt1p itself could be a $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ antiporter is questioned by a very recent study. This study indeed demonstrated a link between Golgi glycosylation abnormalities due to TMEM165/Gdt1p deficiencies, and a

defect in Golgi Mn²⁺ homeostasis (Potelle et al., 2016). The experiments were conducted in both yeasts and mammalian TMEM165/Gdt1p knockdown cells. To evaluate the glycosylation status in *gdt1Δ* knock-out yeast, the electrophoretic mobility of invertase, a heavily-glycosylated protein, was studied. Interestingly, it revealed a glycosylation defect of invertase at high Ca²⁺ concentration (500 mM) which was totally cancelled in a medium supplemented with 1 mM MnCl₂, whereas other cations were ineffective. Similar effects were observed in mammalian TMEM165-depleted cells by studying the glycosylation defect of LAMP2 and TGN46, two heavily glycosylated proteins, and by mass spectrometry comparative analysis of N-glycans. Moreover, the Golgi protein GPP130, the stability of which is strictly dependent on the Golgi Mn²⁺ concentration, was used as a specific Mn²⁺ sensor in these cells. Taken as a whole, the experiments thus strongly suggest that the Golgi Mn²⁺ homeostasis is impaired in TMEM165 depleted cells, therefore perturbing the glycosylation process. Mn²⁺ is actually an essential cofactor of several glycosyltransferases using UDP sugars as donors such as galactosyltransferases in mammalian cells (Bai et al., 2006) and mannosyltransferases MNN1, MNN2 and MNN5 in yeasts (Wiggins and Munro, 1998; Rayner and Munro, 1998). These results open the way to the use of therapeutic Mn²⁺ trials in TMEM165-deficient patients (Potelle et al., 2016).

To add an extra layer of complexity, recent results highlighted that low concentrations of extracellular Mn²⁺ lead to a rapid lysosomal degradation of TMEM165. We demonstrate that the ELGDK motif, one of the two EXGDK/R highly-conserved sequences (Figure 2A), is the key motif conferring the Mn²⁺ sensitivity. These data not only reinforce the link between TMEM165 and Mn²⁺ but also confer a new cellular function of TMEM165 as a novel Mn²⁺ cytosolic sensor of mammalian cells (Potelle et al., 2016, submitted).

7. Putative role of TMEM165/Gdt1p in Golgi ion transport

In yeasts, it was clearly demonstrated that Gdt1p was involved in Ca²⁺ homeostasis (Demaegd et al., 2013) while in humans TMEM165 was recently shown to be involved in Golgi Mn²⁺ homeostasis maintenance (Potelle et al., 2016). Although the exact cellular function of TMEM165/ Gdt1p remains to be fully characterized, the results on yeast and

mammalian cells bring us to hypothesize that TMEM165/Gdt1p could be somehow a Golgi $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ antiporter (Figure 3,A and B). The direction of ion transport is however still controversial and may depend on the ion concentration gradient between the cytosol and the Golgi compartment. Concerning Ca^{2+} and Mn^{2+} ions, their intake in the Golgi lumen is accomplished by SPCA1 and SPCA2 in mammalian cells. These SPCA proteins are Golgi P-type ATPase proteins whose tissue expression is different. While SPCA1 is ubiquitously expressed, SPCA2 is interestingly restricted to some specific tissues. Similarly, Pmr1p is the Golgi P-type ATPase known to import cytosolic Ca^{2+} and Mn^{2+} inside the Golgi lumen in yeasts (Van baelen et al.,2001). As such, we could expect that this Ca^{2+} gradient, generated by SPCA/Pmr1p, could be used for Golgi Mn^{2+} import. In the other way, around and if SPCA/Pmr1p for some reasons mainly pumps Mn^{2+} instead of Ca^{2+} , we could expect that TMEM165/Gdt1p would use the generated Golgi Mn^{2+} gradient to then import Ca^{2+} inside the Golgi lumen. Further experiments are needed to solve. This could explain why TMEM165 is degraded by extracellular concentrations of Mn^{2+} . It is indeed well known that accumulation of cytosolic Mn^{2+} is toxic for the cells (Olanow,2004; Milatovic et al.,2009). TMEM165 degradation caused by an increased cytosolic Mn^{2+} concentration would thus prevent the action of TMEM165 in the opposite way, and then provoke the Ca^{2+} Golgi exit into the cytosol. This degradation would then engage SPCA in the way of cytosolic Mn^{2+} detoxification. This would also prevent the recapture of the Golgi Mn^{2+} back into the cytosol that would definitely annihilate the SPCA1 efforts.

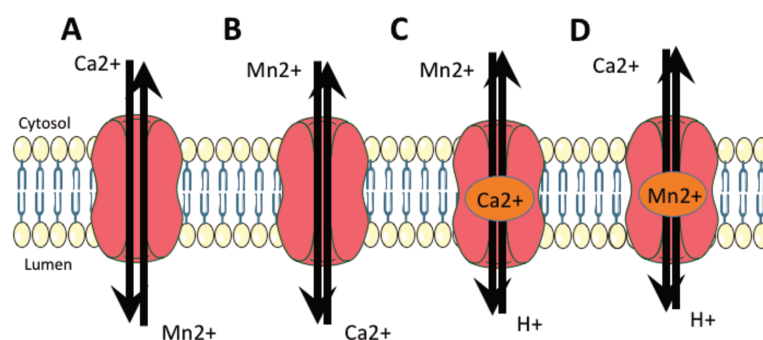


Figure 3: Hypotheses on the role of TMEM165/Gdt1p in ion homeostasis. According to the current experimental results (see text), the scheme illustrates the four possible functions of TMEM165 as ion transporter: TMEM165 could be an antiporter either importing Ca^{2+} into the Golgi while exporting Mn^{2+} in the cytosol (A) or the contrary (B), or TMEM165 could be a $\text{Mn}^{2+}/\text{H}^+$ (C) or $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ (D) antiporter whose function is dependent on Ca^{2+} or Mn^{2+} , respectively.

While elegant, these working models do not take into account the pH hypothesis. To unify the different observations, we could imagine a more complicated model where the used counter ion is H^+ , thus involving the pH gradient generated by the Golgi V0-ATPase. Hence, it could be hypothesized that TMEM165/ Gdt1p would serve as a Golgi Mn^{2+} and or Ca^{2+} importer by using the Golgi pH gradient. One could imagine, this is pure speculation, that this transport (Ca^{2+}/ H^+ or Mn^{2+}/ H^+) could also be regulated by either Mn^{2+} or Ca^{2+} respectively (figure 3, C and D).

8. Conclusion

Complex glycosylation is one of the major functions of the Golgi compartment. It requires not only the right enzymes and substrates at the right places but also correct pH and ionic conditions for which TMEM165 is, without a doubt, plays an important role. Although the function of TMEM165 in controlling Golgi ion homeostasis is still not fully elucidated, strong evidences indicate that it plays a key role in Mn^{2+} homeostasis and also probably influences Ca^{2+} and pH homeostasis. Since Mn^{2+} is a cofactor of galactosyltransferases and that TMEM165 deficiency leads to severe galactosylation defect, it may be assumed that the glycosylation defect in TMEM165 deficient patients is a consequence of an impaired Golgi Mn^{2+} homeostasis. Figure 4 thus illustrates the possible links between the Mn^{2+} concentration in Golgi, in the presence or absence of functional TMEM165, and its impact on protein N- glycosylation. Much needs to be done to fully characterize the putative antiporter or transporter function of TMEM165 for Mn^{2+} , Ca^{2+} and H^+ . Interestingly, the recent discovery that Mn^{2+} may rescue the glycosylation defects in TMEM-CDG patients opens the way to future therapies for these patients.

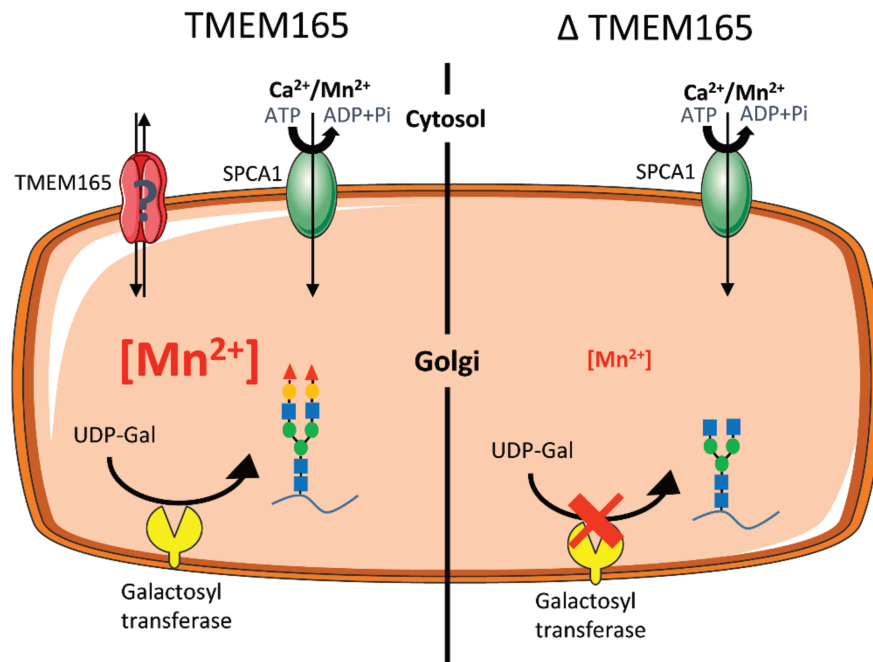


Figure 4: Schematic representation of the impact of TMEM165 deficiency on Golgi Mn^{2+} homeostasis and N-glycosylation defects. The left part of the scheme shows the normal situation where TMEM165 may function, together with the Ca^{2+}/Mn^{2+} ATPase SPCA1, as an ion transporter regulating Golgi Mn^{2+} homeostasis. In this case, the Mn^{2+} concentration in the Golgi permits the Mn^{2+} -dependent galactosyltransferases to transfer galactose residues from UDP-Gal to the N-glycans of proteins. The right part of the scheme illustrates the impact of a TMEM165 deficiency on the entry of Mn^{2+} in the Golgi. The lower Mn^{2+} concentration in the Golgi thus results in a decreased activity of the galactosyltransferases and the undergalactosylation of N-glycoproteins. Blue square: N-acetylglucosamine; green circle : Mannose; yellow circle : Galactose; red triangle: N-Acetylneuraminic acid.

References

- Aebi, M., Helenius, A., Schenk, B., Barone, R. Fiumara, A., Berger, E.G., Hennet, T., Imbach, T., Stutz, A., Bjursell, C., Uller, A., Wahlstrom, J.G., Briones, P., Cardo, E., Clayton, P., Winchester, B., Cormier-Dalre, V., de Lonlay, P., Cuer, M., Dupre, T., Seta, N., de Koning, T., Dorland, L., de Loos, F., Kupers, L., 1999. Carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes become congenital disorders of glycosylation: an updated nomenclature for CDG. First International Workshop on CDGS. *Glycoconj. J.* 16, 669–671.
- Althoff, S.S., Grüneberg, M., Reunert, J., Park, J.H., Rust, S., Mühlhausen, C., Wada, Y., Santer, R., Marquardt, T., 2015. TMEM165 Deficiency: Postnatal Changes in Glycosylation. *JIMD Rep.* 26, 2-29.
- Bai, C., Xu, X.L., Chan, F.Y., Lee, R.T.H., Wang, Y., 2006. MNN5 encodes an iron- regulated alpha-1,2-mannosyltransferase important for protein glycosylation, cell wall integrity, morphogenesis, and virulence in *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* 5, 238–247.
- Bammens, R., Mehta, N., Race, V., Foulquier, F., Jaeken, J., Tiemeyer, M., Steet, R., Matthijs, G., Flanagan-Steet, H. 2015. Abnormal cartilage development and altered N-glycosylation in Tmem165-deficient zebrafish mirrors the phenotypes associated with TMEM165-CDG. *Glycobiology* 25, 669–682.
- Braulke, T., Bonifacino, J.S., 2009. Sorting of lysosomal proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 605–614.
- Colinet, A.S., Sengottaiyan, P., Deschamps, A., Colsoul, M.L., Thines, L., Demaegd, D., Duchêne, M.C., Foulquier, F., Hols, P., Morsomme, P., 2016. Yeast Gdt1 is a Golgi-localized calcium transporter required for stress-induced calcium signaling and protein glycosylation. *Sci. Rep.* 6, 24282.
- Demaegd, D., Colinet, A.S., Deschamps, A., Morsomme, P., 2014. Molecular Evolution of a Novel Family of Putative Calcium Transporters. *PLoS ONE* 9, e100851.
- Demaegd, D., Foulquier, F., Colinet, A.S., Gremillon, L., Legrand, D., Mariot, P., Peiter, E., Van Schaftingen, E., Matthijs, G., Morsomme, P., 2013. Newly characterized Golgi-localized family of proteins is involved in calcium and pH homeostasis in yeast and human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 110, 6859–6864.
- Foulquier, F., Amyere, M., Jaeken, J., Zeevaert, R., Schollen, E., Race, V., Bammens, R., Morelle, W., Rosnoblet, C., Legrand, D., Demaegd, D., Buist, N., Cheillan, D., Guffon, N., Morsomme, P., Annaert, W., Freeze, H.H., Van Schaftingen, E., Vikkula, M., Matthijs, G., 2012. TMEM165 Deficiency Causes a Congenital Disorder of Glycosylation. *Am. J. Hum. Genet.* 91, 15–26.
- Foulquier, F., Vasile, E., Schollen, E., Callewaert, N., Raemaekers, T., Quelhas, D., Jaeken, J., Mills, P., Winchester, B., Krieger, M., Annaert, W., Matthijs, G., 2006. Conserved oligomeric Golgi complex subunit 1 deficiency reveals a previously uncharacterized congenital disorder of glycosylation type II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 3764–3769.
- Freeze, H.H., Chong, J.X., Bamshad, M.J., Ng, B.G., 2014. Solving glycosylation disorders: fundamental approaches reveal complicated pathways. *Am. J. Hum. Genet.* 94, 161–175.
- Gifford, J.L., Walsh, M.P., Vogel, H.J., 2007. Structures and metal-ion-binding properties of the Ca²⁺-

binding helix-loop-helix EF-hand motifs. *Biochem. J.* 405, 199–221.

Jaeken, J., van Eijk, H. G., van der Heul, C., Corbeel, L., Eeckels, R., Eggermont, E., 1984. Sialic Acid-Deficient Serum and Cerebrospinal Fluid Transferrin in a Newly Recognized Genetic Syndrome. *Clin. Chim. Acta* 144, 245–247.

Kornak, U., Reynders, E., Dimopoulou, A., van Reeuwijk, J., Fischer, B., Rajab, A., Budde, B., Nürnberg, P., Foulquier, F., ARCL Debré-type Study Group, Lefeber, D., Urban, Z., Gruenewald, S., Annaert, W., Brunner, H.G., van Bokhoven, H., Wevers, R., Morava, E., Matthijs, G., Van Maldergem, L., Mundlos, S., 2008. Impaired glycosylation and cutis laxa caused by mutations in the vesicular H⁺-ATPase subunit ATP6V0A2. *Nat Genet.* 40, 32–34.

Kranz, C., Ng, B.G., Sun, L., Sharma, V., Eklund, E.A., Miura, Y., Ungar, D., Lupashin, V., Winkel, R.D., Cipollo, J.F., Costello, C.E., Loh, E., Hong, W., Freeze, H.H., 2007. COG8 deficiency causes new congenital disorder of glycosylation type IIh. *Hum. Mol. Genet.* 16, 731–741.

Milatovic, D., Zaja-Milatovic, S., Gupta, R.C., Yu, Y., Aschner, M., 2009. Oxidative damage and neurodegeneration in manganese-induced neurotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 240, 219–225.

Olanow, C.W., 2004. Manganese-induced parkinsonism and Parkinson's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1012, 209–223.

Paesold-Burda, P., Maag, C., Troxler, H., Foulquier, F., Kleinert, P., Schnabel, S., Baumgartner, M., Hennet, T., 2009. Deficiency in COG5 causes a moderate form of congenital disorders of glycosylation. *Hum. Mol. Genet.* 18, 4350–4356.

Potelle, S., Morelle, W., Dulary, E., Duvet, S., Vicogne, D., Spriet, C., Krzewinski-Recchi, M.A., Morsomme, P., Jaeken, J., Matthijs, G., de Bettignies, G., Foulquier, F., 2016. Glycosylation abnormalities in Gdt1p/TMEM165 deficient cells result from a defect in Golgi manganese homeostasis. *Hum. Mol. Genet.* 25, 1489–500.

Rayner, J.C., Munro, S., 1998. Identification of the MNN2 and MNN5 mannosyltransferases required for forming and extending the mannose branches of the outer chain mannans of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 273, 26836–26843.

Reinhardt, T.A., Lippolis, J.D., Sacco, R.E., 2014. The Ca²⁺/H⁺ antiporter TMEM165 expression, localization in the developing, lactating and involuting mammary gland parallels the secretory pathway Ca²⁺ ATPase (SPCA1). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 445, 417–421

Rosnoblet, C., Legrand, D., Demaegd, D., Hacine-Gherbi, H., de Bettignies, G., Bammens, R., Borrego, C., Duvet, S., Morsomme, P., Matthijs, G., Foulquier, F., 2013. Impact of disease-causing mutations on TMEM165 subcellular localization, a recently identified protein involved in CDG-II. *Hum. Mol. Genet.* 22, 2914–2928.

Ungar, D., Oka, T., Brittle, E.E., Vasile, E., Lupashin, V.V., Chatterton, J.E., Heuser, J.E., Krieger, M., Waters, M.G., 2002. Characterization of a Mammalian Golgi-Localized Protein Complex, COG, that is required for normal Golgi morphology and function. *J. Cell Biol.* 157, 405–415.

Van Baelen, K., Vanoevelen, J., Missiaen, L., Raeymaekers, L., Wuytack, F., 2001. The Golgi PMR1 P-type ATPase of *Caenorhabditis elegans*. Identification of the gene and demonstration of calcium and manganese transport. *J. Biol. Chem.* 276, 10683–10691.

Van Scherpenzeel, M., Steenbergen, G., Morava, E., Wevers, R.A., Lefeber, D.J., 2015. High-resolution

mass spectrometry glycoprofiling of intact transferrin for diagnosis and subtype identification in the congenital disorders of glycosylation. *Transl. Res.* 166, 639-649.

Wiggins, C.A., Munro, S., 1998. Activity of the yeast MNN1 α -1,3-mannosyltransferase requires a motif conserved in many other families of glycosyltransferases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 7945–7950.

Wopereis, S., Grünewald, S., Morava, E., Penzien, J.M., Briones, P., García-Silva, M.T., Demacker, P.N., Huijben, K.M., Wevers, R.A., 2003. Apolipoprotein C-III Isofocusing in the Diagnosis of Genetic Defects in O-Glycan Biosynthesis. *Clin. Chem.* 49, 1839–1845.

Wu, X., Steet, R.A., Bohorov, O., Bakker, J., Newell, J., Krieger, M., Spaapen, L., Kornfeld, S., Freeze, H.H., 2004. Mutation of the COG complex subunit gene COG7 causes a lethal congenital disorder. *Nat. Med.* 10, 518–523.

Xia, B., Zhang, W., Li, X., Jiang, R., Harper, T., Liu, R., Cummings, R.D., He, M., 2013. Serum N-Glycan and O-Glycan Analysis by Mass Spectrometry for Diagnosis of Congenital Disorders of Glycosylation. *Anal. Biochem.* 442, 178–85.

Zeevaert, R., de Zegher, F., Sturiale, L., Garozzo, D., Smet, M., Moens, M., Matthijs, G., Jaeken, J., 2013. Bone Dysplasia as a Key Feature in Three Patients with a Novel Congenital Disorder of Glycosylation (CDG) Type II Due to a Deep Intronic Splice Mutation in TMEM165. *JIMD Reports* 8, 145–152.

Annexe 2

Manganese-induced turnover of TMEM165

Sven Potelle¹, Eudoxie Dulary¹, Leslie Climer², Sandrine Duvet¹, Willy Morelle¹, Dorothée Vicogne¹, Elodie Lebretonchel¹, Marine Houdou¹, Corentin Spriet¹, Marie-Ange Krzewinski-Recchi¹, Romain Peanne³, André Klein¹, Geoffroy de Bettignies¹, Pierre Morsomme⁴, Gert Matthijs³, Thorsten Marquardt⁵, Vladimir Lupashin² and François Foulquier¹

¹CNRS, UMR 8576 – UGSF – Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Université de Lille, Lille F-59000, France;

²Department of Physiology and Biophysics, College of Medicine, University of Arkansas for Medical Sciences, Biomed 261-2, Slot 505, 200 South Cedar St., Little Rock, AR 72205, U.S.A.; ³Center for Human Genetics, KU Leuven, Leuven, Belgium;

⁴Institut des Sciences de la Vie, Université catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve B-1348, Belgium;

⁵Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Universitätsklinikum Münster, Albert-Schweitzer-Campus 1, Gebäude A 1, Münster 48149, Germany

Correspondance : François Foulquier (francois.foulquier@univ-lille1.fr)

TMEM165 deficiencies lead to one of the congenital disorders of glycosylation (CDG), a group of inherited diseases where the glycosylation process is altered. We recently demonstrated that the Golgi glycosylation defect due to TMEM165 deficiency resulted from a Golgi manganese homeostasis defect and that Mn²⁺ supplementation was sufficient to rescue normal glycosylation. In the present paper, we highlight TMEM165 as a novel Golgi protein sensitive to manganese. When cells were exposed to high Mn²⁺ concentrations, TMEM165 was degraded in lysosomes. Remarkably, while the variant R126H was sensitive upon manganese exposure, the variant E108G, recently identified in a novel TMEM165-CDG patient, was found to be insensitive. We also showed that the E108G mutation did not abolish the function of TMEM165 in Golgi glycosylation. Altogether, the present study identified the Golgi protein TMEM165 as a novel Mn²⁺-sensitive protein in mammalian cells and pointed to the crucial importance of the glutamic acid (E108) in the cytosolic ELGDK motif in Mn²⁺-induced degradation of TMEM165.

Introduction

Manganese is a trace element essential for life. It is involved in the catalytic domain of many enzymes such as Golgi glycosyltransferases, mitochondrial enzymes, and DNA and RNA polymerases. Regulation of its homeostasis is therefore particularly important. Manganese overexposure has been shown to induce neurological symptoms that can result in a Parkinson-like disorder called manganism [1–3]. On the contrary, a decrease in cellular Mn²⁺ has recently been shown to cause congenital disorders of glycosylation (CDG). Mutations in SLC39A8, a putative plasma membrane manganese transporter, lead to severe glycosylation defects [4]. We recently reported that TMEM165 deficiency was also linked with Golgi Mn²⁺ homeostasis [5]. Although progress has been made in identifying cellular Mn²⁺ transporters in mammals, the mechanisms of Mn²⁺ homeostasis are still unclear. Several different transporters have been involved in manganese transport mechanisms, including the divalent metal transporter 1 (DMT1/NRAMP2/SLC11A2) [1,6], NRAMP1 [7], the transferrin receptor, and the transporters SLC30A10/ZNT8 [8], SLC39A8/ZIP8 [4], and SLC30A14/ZIP14 [9,10]. At the cellular level, most of these transporters are localized at the plasma membrane and/or in endosomes. The secretory pathway consisting of the ER, the Golgi and associated vesicles is

also crucial in regulating cellular Mn^{2+} homeostasis. In addition, the secretory pathway requires luminal Mn^{2+} concentration for quality control, proper targeting and processing of proteins. Current knowledge supports that this supply is realized via the action of SPCA1 (secretory pathway Ca-ATPase 1: ATP2C1) and SPCA2 (ATP2C2). SPCA1 is ubiquitously expressed and mediates the import of Ca^{2+}/Mn^{2+} into the Golgi lumen [11,12]. The tissue expression of SPCA2 is more restricted. However, the importance of the dual transport function in cellular processes is not yet completely deciphered [11]. Overexpression of SPCA1 has been shown to facilitate Mn^{2+} accumulation into the Golgi [13] and it was thus proposed that SPCA1 was a way to detoxify cytosolic Mn^{2+} accumulation by sequestering it into the secretory pathway.

In 2012, we identified TMEM165 as a novel Golgi transmembrane protein causing CDG [14]. It belongs to an uncharacterized family of membrane proteins named UPF0016 (Uncharacterized Protein Family 0016; Pfam PF01169). We recently demonstrated that the observed Golgi glycosylation defect resulted from Golgi Mn^{2+} homeostasis impairment [5]. Based on these results, we hypothesized that TMEM165 could be a novel Golgi Mn^{2+} transporter. As studies of Mn^{2+} homeostasis in yeasts have indicated that most of the proteins involved in regulating intracellular Mn^{2+} concentrations are differentially targeted and/or degraded in response to Mn^{2+} , the role of TMEM165 was tested. The aim of the present study was to decipher the impact of high extracellular Mn^{2+} concentrations on the subcellular localization and stability of TMEM165. The present study demonstrates that high concentrations of extracellular Mn^{2+} lead to a rapid lysosomal degradation of TMEM165. We identified the glutamic acid (E108) in the highly conserved motif ELGDK, oriented toward the cytosol, as being crucial in the Mn-induced degradation of TMEM165.

Results

TMEM165 is rapidly and specifically degraded in response to Mn^{2+}

Our previous work highlighted a link between TMEM165 and Golgi Mn^{2+} homeostasis [5]. As many proteins involved in regulating intracellular Mn^{2+} homeostasis are directly impacted in their stability by cellular Mn^{2+} homeostasis changes, the effect of Mn^{2+} on TMEM165 was tested. For this, a concentration of 500 mM of $MnCl_2$ was first used for different times and the stability of TMEM165 was assessed both by western blot and immunofluorescence

experiments. We observed that in response to Mn^{2+} , TMEM165 levels were significantly reduced (Figure 1A,B). Interestingly, the same sensitivity to Mn^{2+} was observed for Gdt1p, the yeast ortholog of TMEM165 (Figure 1D). The effects of other ions were also tested (Supplementary Figure S1). Remarkably, we observed that TMEM165 degradation only occurred after $MnCl_2$ exposure, pointing to the specificity of TMEM165 for Mn^{2+} . As GPP130 has also been shown to be sensitive to high Mn^{2+} concentrations, we compared its time course degradation with TMEM165 (Figure 1A–C). Quantification indicated that TMEM165 loss exceeded 95% after 8 h of Mn^{2+} treatment, while only a 40% decrease was seen for GPP130. To further tackle the minimal Mn^{2+} concentration able to induce a loss of TMEM165, we analyzed the stability of TMEM165 with low $MnCl_2$ concentrations (1–50 mM). While 100 mM $MnCl_2$ was sufficient to induce GPP130 degradation [15], our results showed that 1–25 mM of Mn^{2+} was already sufficient to induce a destabilization of TMEM165 (Figure 1B). Altogether these results indicate that TMEM165, compared with GPP130, is more sensitive

to manganese and probably suggests the existence of different degradation mechanisms in response to Mn^{2+} . The impact of Mn^{2+} on TMEM165 was also seen by immunofluorescence where a decrease in TMEM165 fluorescence associated with Golgi was seen (Supplementary Figure S2A,B). We previously demonstrated that TMEM165 could be found at the plasma membrane [14]. To assess the impact of Mn^{2+} on the plasma membrane targeted form of TMEM165, surface protein biotinylation was performed in the absence and presence of 500 mM of $MnCl_2$. Interestingly biotin-labeled cell surface TMEM165 displayed the same sensitivity to Mn^{2+} as the cellular TMEM165. This either suggests that the Mn^{2+} -induced degradation mechanism is not only dedicated to the Golgi pool of TMEM165 or that less TMEM165 traffics to the plasma membrane from the Golgi when the Golgi pool of TMEM165 has been depleted upon excess manganese exposure (Figure 2A). Previous studies have also demonstrated that in yeast, high environmental Ca^{2+} concentrations in *gdt1Δ* led to strong N-glycosylation deficiencies [5]. The impact of Ca^{2+} on Mn^{2+} -induced degradation of TMEM165 was assessed by western blot and immunofluorescence (Figure 2B,C). Ca^{2+} alone had no significant effect on the stability of TMEM165. However, its combined presence with Mn^{2+} clearly decreased the Mn^{2+} -induced degradation of TMEM165 (80% decrease for the Mn^{2+} treatment alone compared with 40% decrease for both Ca^{2+} and Mn^{2+} ; Figure 2B). This was confirmed by confocal microscopy (Figure 2C).

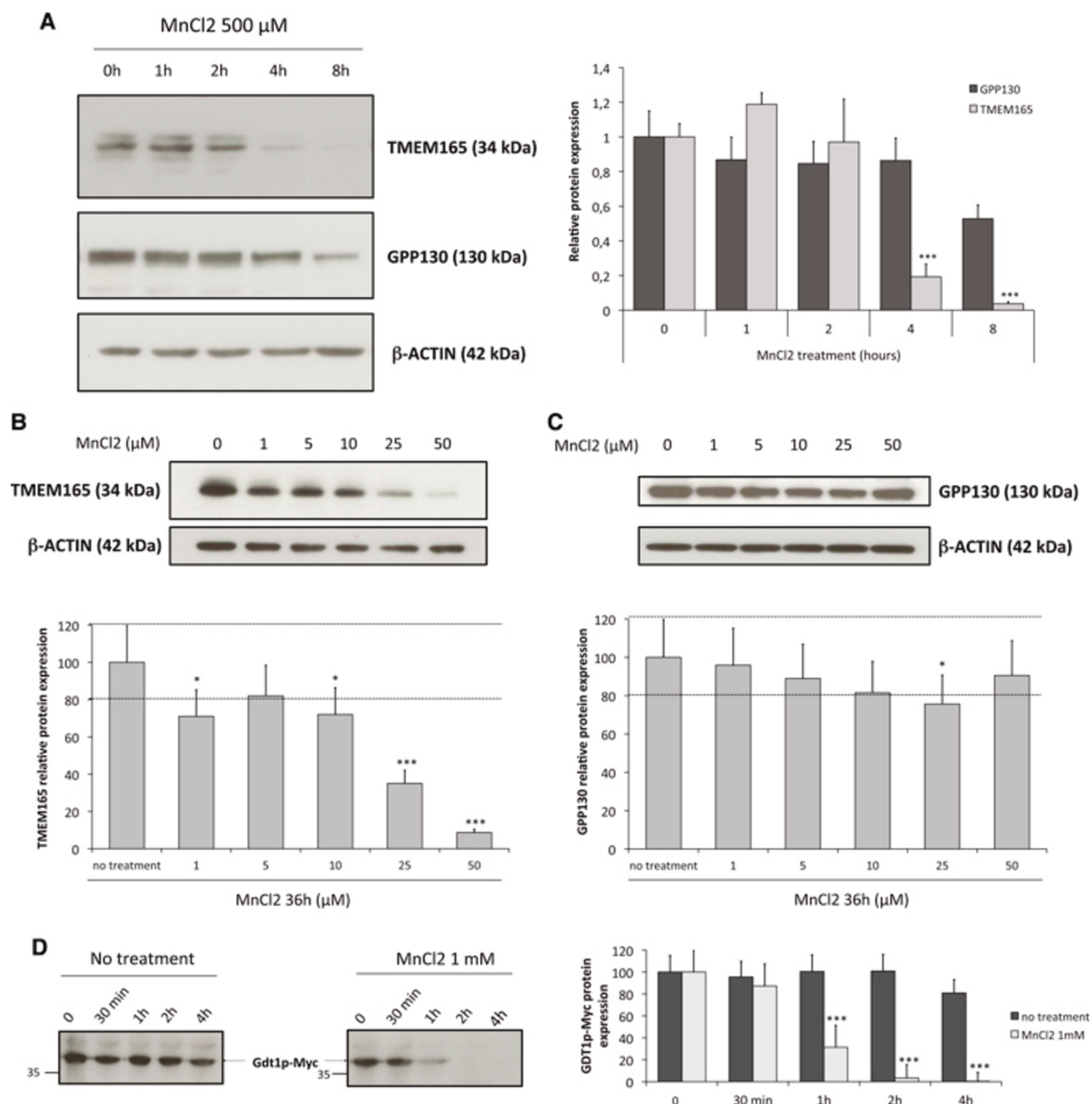


Figure 1. TMEM is rapidly degraded in response to Mn²⁺.

(A) Steady-state cellular level of TMEM165 and GPP130. HeLa cells were treated with MnCl₂ 500 mM for 0–8 h. Total cell lysates were prepared, and subjected to SDS–PAGE and western blot with the indicated antibodies. Right panel shows the quantification of TMEM165 and GPP130 protein levels after normalization with actin [Number of experiments (N) = 2; ***P-value < 0.001]. (B) Steady-state cellular level of TMEM165. HEK293 cells were treated with MnCl₂ from 0 to 50 mM for 36 h. Total cell lysates were prepared, and subjected to SDS–PAGE and western blot with the indicated antibodies. Lower panel shows the quantification of TMEM165 protein levels after normalization with actin (N = 2; ***P-value < 0.001). (C) Steady-state cellular level of GPP130 in the same experimental conditions as described in (B). (D) Gdt1 Δ yeasts expressing Gdt1p-Myc were cultured in the absence or presence of 1 mM MnCl₂. Yeast lysates were then subjected to SDS–PAGE and western blot analysis with the indicated antibodies. Right panel shows the quantification of the Gdt1p-Myc protein levels (N = 2; ***P-value < 0.001).

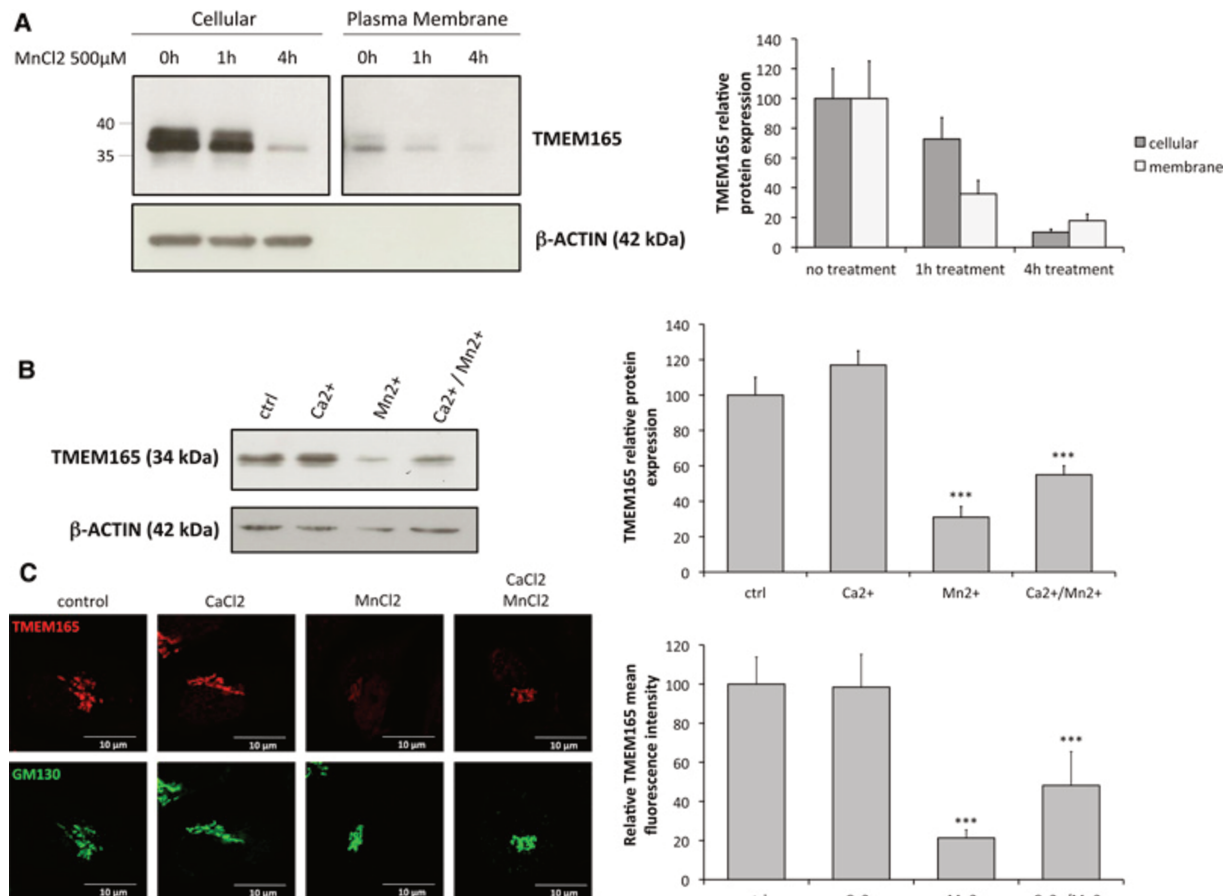


Figure 2. Plasma membrane TMEM165 is also degraded by Mn²⁺ and Ca²⁺ compete with Mn²⁺ for TMEM165 degradation.

(A) Cell surface biotinylation was performed in the absence and presence of MnCl₂ 500 mM. Samples were prepared as described in the materials and methods section and subjected to SDS-PAGE and western blot with the indicated antibodies. Lower panel shows the quantification of TMEM165 protein levels. The plasma membrane panel is separated from the cellular panel as we had to expose films longer to reveal the bands. (B) HEK293 cells were incubated with 500 mM MnCl₂ and/or 2 mM CaCl₂ for 4 h, and then subjected to SDS-PAGE and western blot with the indicated antibodies. Right panel shows the quantification of TMEM165 protein levels after normalization with actin (N = 2; ***P-value < 0.001). (C) HEK293 cells were incubated with 500 mM MnCl₂ and/or 2 mM CaCl₂ for 4 h, and then fixed and labeled with antibodies against TMEM165 and GM130 before confocal microscopy visualization (N = 2; ***P-value < 0.001). Right panel shows the quantification of the associated TMEM165 fluorescence intensity (N = 2; n = 50; ***P-value < 0.001).

Lysosomal degradation of TMEM165

As shown by Mukhopadhyay et al. [16], 500 mM MnCl₂ treatment induces rapid redistribution of GPP130 in vesicles before their lysosomal degradation. At the opposite of GPP130, no redistribution from the Golgi to peripheral punctate structures was observed for TMEM165 in response to high Mn²⁺ concentration (Supplementary Figure S2C). This absence of vesicles could be explained by an extremely fast degradation. To test this hypothesis, the stability of TMEM165 in response to Mn²⁺ was studied by

immunofluorescence in the presence of chloroquine, a lysosomal inhibitor (Figure 3A). Although cells treated with Mn²⁺ alone showed a dramatic loss of TMEM165, those treated in the presence of chloroquine exhibited an accumulation of TMEM165 in punctate structures (Figure 3A). Immunofluorescence experiments with LAMP2, a lysosomal marker, confirmed the presence of TMEM165 in LAMP2-positive structures in chloroquine- and Mn²⁺ -treated cells. The level of co-localization was determined using Manders' overlap coefficient and revealed a co-localization of TMEM165 with LAMP2 ($72 \pm 9\%$). Same experiments were also done with EEA1 as a specific marker of early endosomes and the quantification revealed no significant co-localization of TMEM165 with EEA1 ($7 \pm 1\%$; data not shown). This result shows that TMEM165 is specifically targeted to lysosomal degradation followed Mn²⁺ exposure. To confirm the lysosomal Mn²⁺ -induced degradation of TMEM165, an immunoblotting experiment was also performed. As shown in Figure 3B , the Mn-induced degradation of TMEM165 was completely blocked by chloroquine. As chloroquine is known to both shut down endosomal trafficking and inhibit lysosomal proteases, we also tested the effects of leupeptin, a lysosomal protease inhibitor, on the stability of TMEM165 in response to Mn²⁺ (Supplementary Figure S3). The experiment confirmed the localization of TMEM165 in LAMP2-positive structure as a co-localization of TMEM165 with LAMP2 ($62 \pm 1\%$) and the absence of co-localization of TMEM165 with EEA1 ($3 \pm 1\%$; data not shown) was observed.

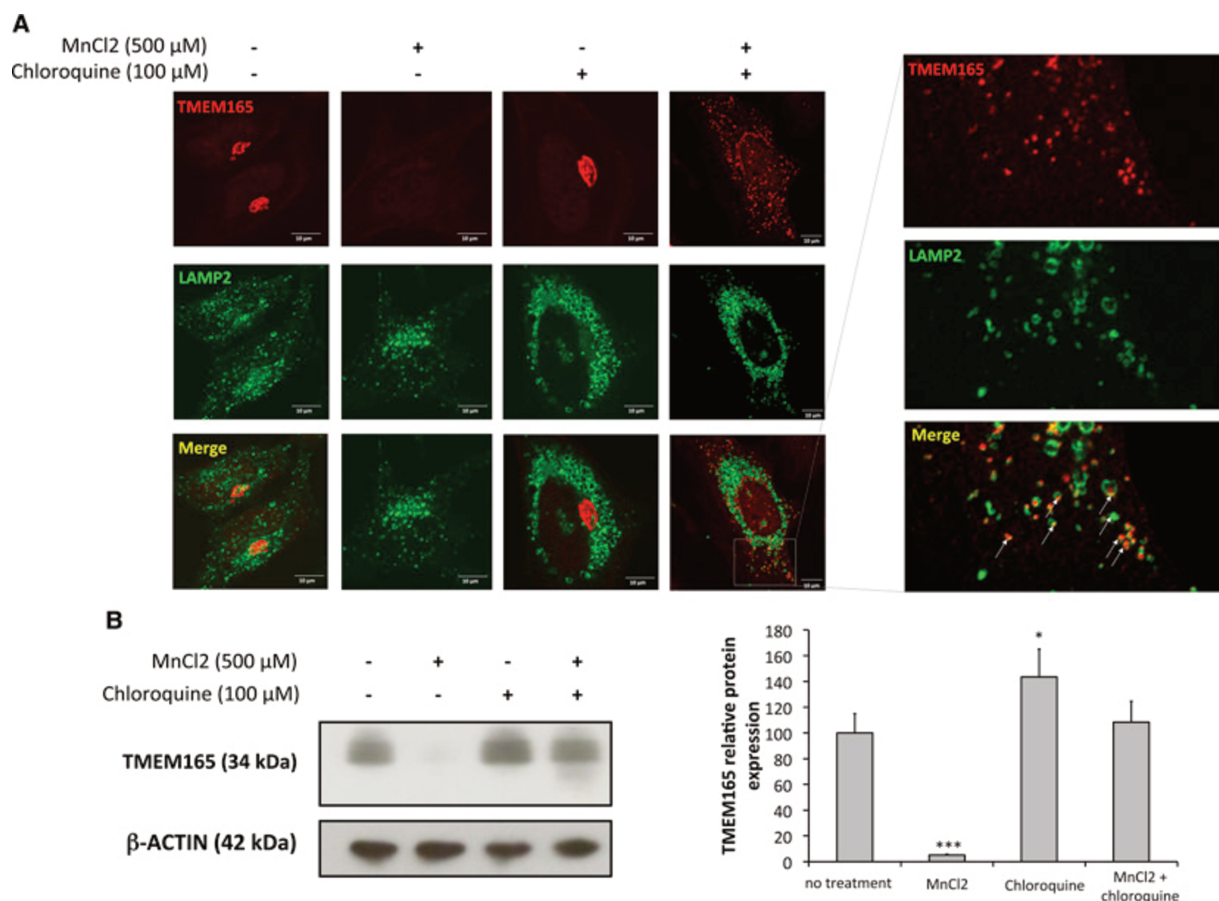


Figure 3. TMEM165 is targeted to lysosomal degradation after Mn²⁺ exposure.

(A) HeLa cells were treated for 8 h with 500 mM MnCl₂ and/or 100 mM chloroquine, and fixed and labeled with antibodies against TMEM165 (upper panels) and LAMP2 (middle panels) before confocal microscopy visualization. (B) Western blot analysis of the same experiment described in (A). Total cell lysates were prepared, and subjected to SDS-PAGE and western blot with the indicated antibodies. Right panel shows the quantification of the TMEM165 protein level after normalization with actin (N = 2; ***P-value < 0.001).

The amino acid E108 of the ELGDK motif is involved in Mn²⁺-induced degradation of TMEM165

To gain more insight into the TMEM165 Mn²⁺-induced degradation mechanism, we wondered whether the reported missense mutations (pE108G and pR126H) found in TMEM165-deficient CDG patients could impact the TMEM165 Mn²⁺ sensitivity. To test the putative role of these mutations in TMEM165 Mn²⁺ responsiveness, immunofluorescence and western blot experiments were performed in the absence and presence of MnCl₂ (Figure 4A,B). The missense mutation c.323 A>G (p.E108G) found in two newly TMEM165 deficient siblings was first tested [17]. As observed for wt-TMEM165, the mutant form is Golgi-localized in fibroblasts for the two siblings. This indicates that the mutation does not disturb the subcellular localization of the mutated form of TMEM165 (Figure 4B). The

impact of Mn²⁺ treatment was then investigated during an 8 h time course by western blot and immunofluorescence experiments (Figure 4A,B). As expected, the wild-type (wt) TMEM165 was very sensitive to Mn²⁺ exposure (Figure 4A). However, the mutated form of TMEM165 (E108G) remained stable (Figure 4A,B). No changes were observed in localization or stability by immunofluorescence. Quantification of the western blot results indicated that wt-TMEM165 loss exceeded 95% at the 6 h time point, while only 20% loss was observed for the mutated form p.E108G. To demonstrate the distinctive feature of this mutation, fibroblasts from another TMEM165-CDG patient, carrying the R126H mutation, were also tested for Mn²⁺ sensitivity by western blot and confocal microscopy (Figure 5). Although the steady-state level of TMEM165, compared with control fibroblasts, is lower in the R126H patients' fibroblasts, our results highlighted that this mutation did not prevent the Mn²⁺ -induced TMEM165 (R126H) degradation. It is also important to note that its localization is not altered, neither at the steady-state level nor after chloroquine and Mn²⁺ exposure (Supplementary Figure S5). After Mn²⁺ and chloroquine exposure, the co-localization between TMEM165 and LAMP2/EEA1 was determined for both control and patient fibroblasts. For control fibroblasts, we observed a co-localization of TMEM165 with LAMP2 ($59 \pm 5\%$) and no significant co-localization of TMEM165 with EEA1 ($6 \pm 1\%$). For patient fibroblasts (R126H), the results were the same. A co-localization of TMEM165 with LAMP2 ($58 \pm 11\%$) but no significant co-localization of TMEM165 with EEA1 ($5 \pm 1\%$) was observed. Interestingly, the western blot results showed that the R126H variant is stabilized upon Mn²⁺ and chloroquine exposure (Supplementary Figure S5C). This clearly demonstrates that this allele is constitutively able to traffic to the lysosomes upon Mn²⁺ exposure. In summary, our results support the evidence that the glutamic acid (E) of the highly conserved ELGDK motif is crucial in mediating the lysosomal degradation of TMEM165 in response to Mn²⁺ . To determine whether the E108G mutation could also affect the function of TMEM165, the glycosylation status of LAMP2 was assessed in TMEM165 KO HEK293 cells generated by CRISPR-Cas9 (Figure 4C and Supplementary Figure S4). Both the expression of the wt-TMEM165 and the E108G mutant complemented the observed glycosylation defect. Compared with the expression of the wt TMEM165, the expression of the E108G mutant in rescuing the LAMP2 glycosylation is less efficient. This result suggests, nevertheless, that the E108G mutant remains functional and

that the activity of TMEM165 then appears independent of the Mn²⁺-induced degradation mechanism.

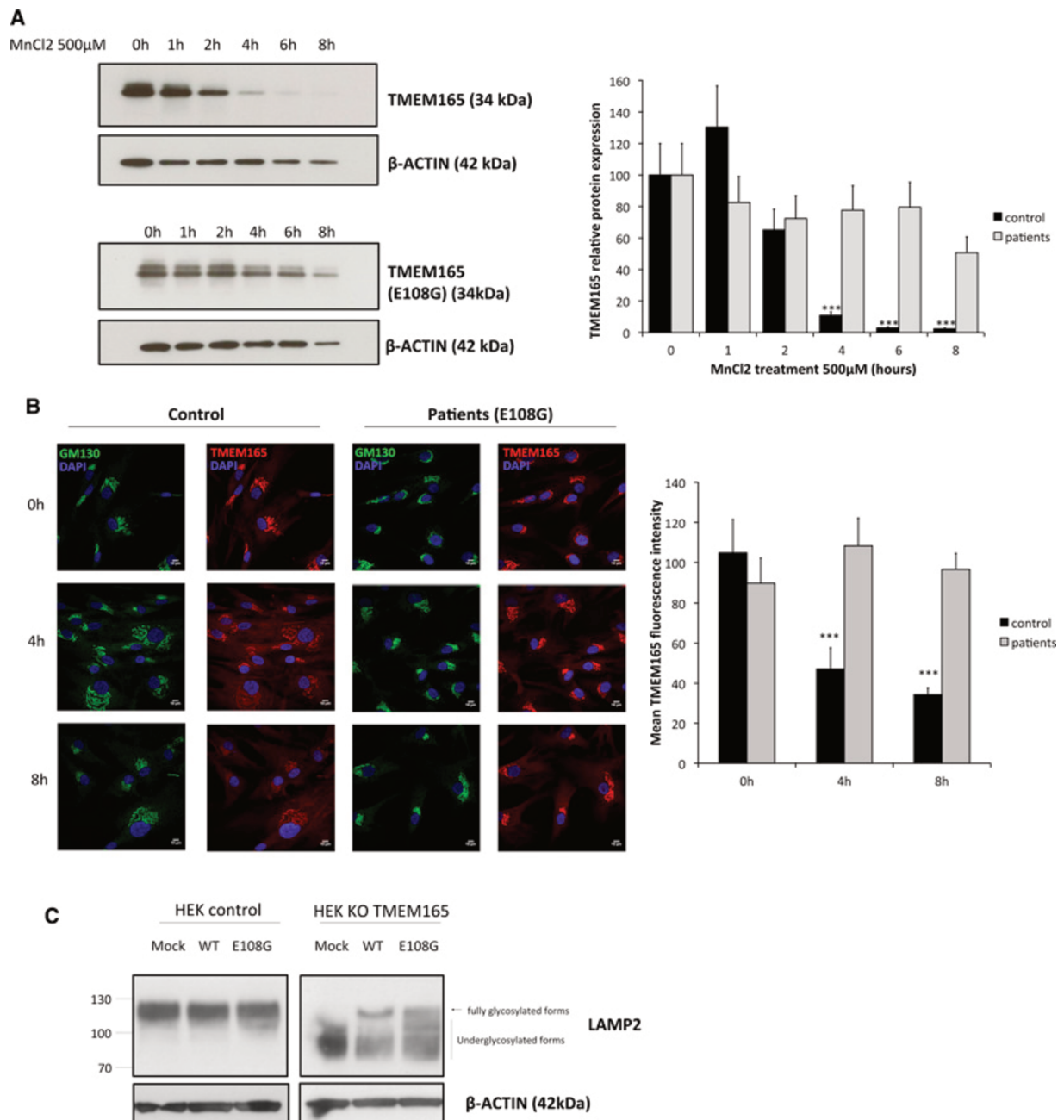


Figure 4. The glutamic acid (E1108) in the ELDGK motif is crucial for Mn²⁺ sensitivity.

(A) Healthy skin fibroblasts (upper left) and patients' skin fibroblasts (lower left) carrying E108G mutation were treated with 500 mM MnCl₂ for 0–8 h. Total cell lysates were prepared, and subjected to SDS–PAGE and western blot with the indicated antibodies. Right panel shows the quantification of TMEM165 protein levels after normalization with actin (N = 2; ***P-value < 0.001). (B) Healthy skin fibroblasts and patients' skin fibroblasts carrying E108G mutation were treated with 500 mM MnCl₂ for 0, 4, and 8 h. Cells were then fixed and labeled with antibodies against TMEM165 and GM130 before confocal microscopy visualization (N = 2; ***P-value < 0.001). Lower panel shows the quantification of the associated TMEM165 fluorescence intensity (N = 2; n = 30; ***P-value < 0.001). (C) HEK293 control cells and HEK293 KO TMEM165 cells were transfected with empty-vector, wt or E108G plasmid for 36 h. Total cell lysates were prepared, and subjected to SDS–PAGE and western blot with the indicated antibodies.

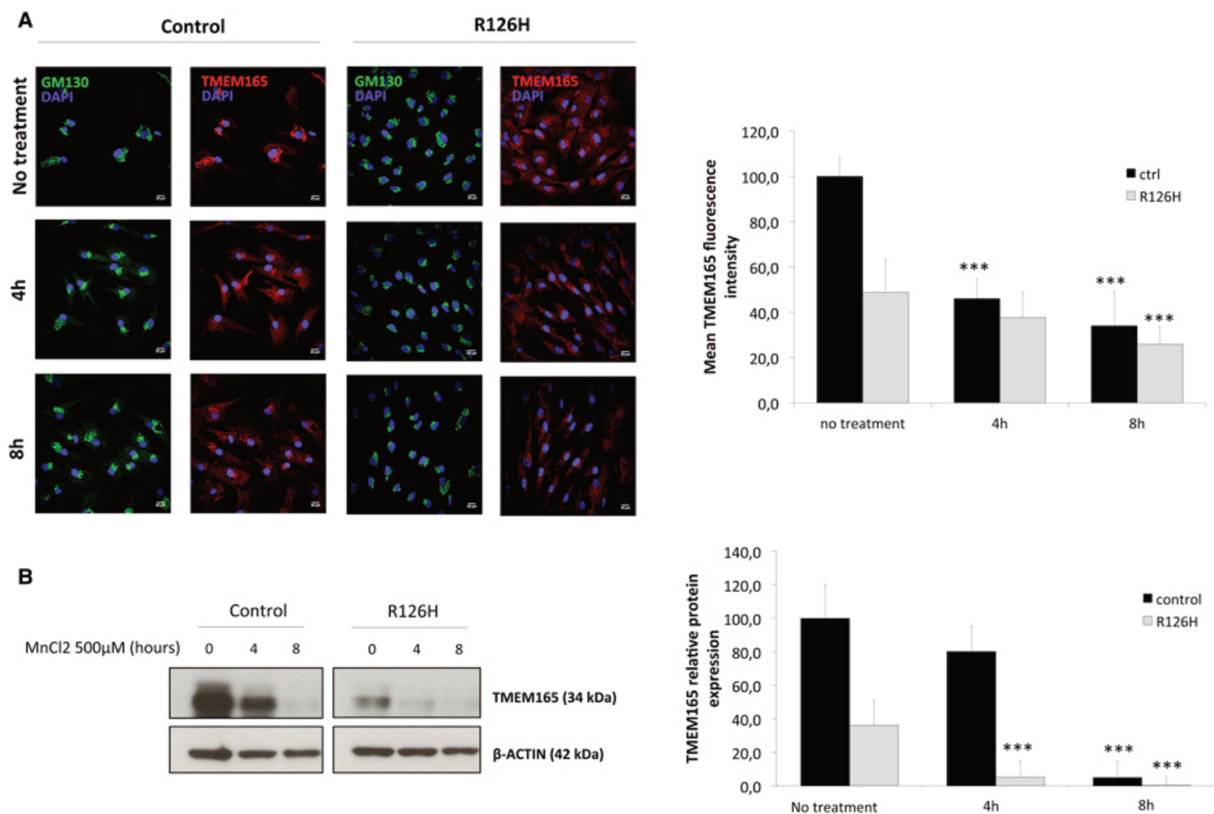


Figure 5. TMEM165 Mn²⁺-induced degradation also occurs in fibroblasts carrying R126H mutation. (A) Control skin fibroblasts and patient skin fibroblasts carrying R126H mutation were treated with 500 mM MnCl₂ for 0–8 h and then fixed and labeled with antibodies against TMEM165 and GM130 before confocal microscopy visualization. Right panel shows the quantification of the associated TMEM165 fluorescence intensity [N = 2; number of cells (n) = 30; ***P-value < 0.001]. (B) Steady-state cellular level of TMEM165. Fibroblasts were treated as described in (A). Total cell lysates were prepared, and subjected to SDS–PAGE and western blot with the indicated antibodies. Right panel shows the quantification of TMEM165 protein levels after normalization with actin (N = 2; ***P-value < 0.001).

Validation of a predicted topology of TMEM165

Human TMEM165 encodes a 7-transmembrane spanning protein of 324 amino acids. To validate a predicted topology of TMEM165 and thus the orientation of the ELGDK motif, we used the two available commercial antibodies against TMEM165, each recognizing two differentially oriented epitopes: the Sigma antibodies recognizing the immunogen sequence (aa176–aa229) and the antibodies provided by Thermo Fischer directed against the immunogen sequence (aa17–aa45; [Figure 6A](#)). The topology was determined by selective membrane permeabilization and immunofluorescence analysis ([Figure 6B](#)). Under conditions that allowed antibody access to all cellular compartments, both epitopes were detectable

and showed co-localization with the Golgi marker GM130 (Figure 6B). Selective permeabilization of the plasma membrane with low concentrations of digitonin allowed visualization of the cytosolic epitope only recognized by the Sigma antibody. On the basis of these results, we can propose a model where the loop encompassing the aa 176–229 is cytosolic and where the ELGDK motif is facing the cytosol (Figure 6A).

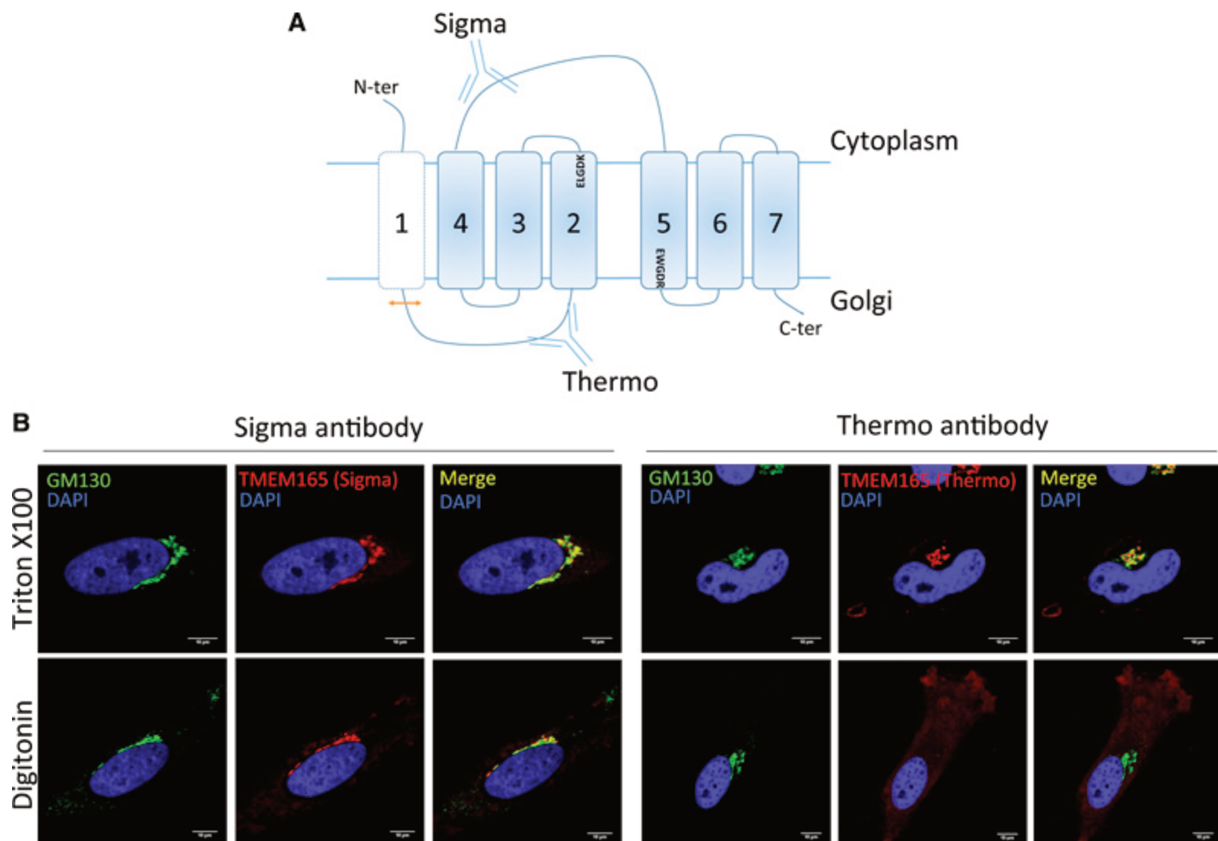


Figure 6. TMEM165 topology.

(A) Representation of TMEM165 predicted topology. The two anti-TMEM165 antibodies (Sigma–Aldrich and Thermo Fisher Scientific) depicted here recognize two different parts of the protein. The Sigma ones recognize the cytoplasmic loop between the fourth and fifth transmembrane domains. The Thermo ones recognize the short luminal loop between the first and the second transmembrane domain. The red double arrows show the predicted location of the signal sequence cleavage. The first TMD is depicted in white and with a dotted line border as it can be absent from the mature protein. (B) Cells were fixed with PAF 4% and treated as described in the materials and methods section. Selective permeabilization was done by using Triton X-100 or digitonin. Cells were labeled with antibodies against TMEM165 and GM130 before confocal microscopy visualization.

SPCA1 knockdown does not prevent TMEM165-induced degradation

Since the ELGDK motif is oriented toward the cytosol, we wished to assess whether TMEM165 responded to changes in cytosolic or Golgi luminal Mn²⁺. To tackle this point, we

tested the contribution of SPCA1 (known to be one of the major Golgi Mn²⁺ importers) in the Mn²⁺-induced degradation of TMEM165. The impacts of knockdown of SPCA1 on the Mn²⁺-induced degradation of TMEM165 were assessed. SiRNA depletion of SPCA1 was very efficient as 85% of the protein was depleted compared with untreated cells. Interestingly, knockdown of SPCA1 did not abolish the Mn²⁺-induced degradation of TMEM165 (Figure 7). The results showed that TMEM165 loss exceeded 80% after 8 h of Mn²⁺ treatment both in siSPCA1 cells and untreated cells. This highly strengthens the fact that the degradation of TMEM165 is not dependent on Golgi luminal Mn²⁺ changes.

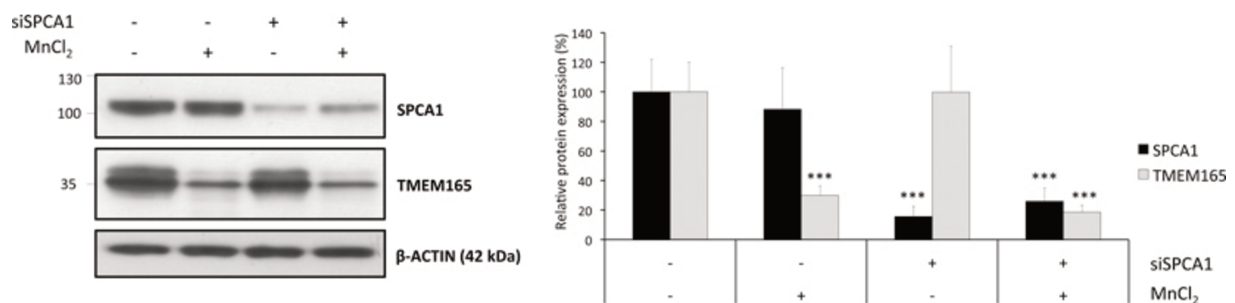


Figure 7. SPCA1 knockdown does not prevent the Mn-induced degradation of TMEM165.

(A) Steady-state cellular level of TMEM165 and SPCA1 in control and siSPCA1 HeLa cells. Control and siSPCA1 HeLa cells were cultured in the absence or presence of MnCl₂ (500 mMn, 8 h); total cell lysates were then prepared, and subjected to SDS-PAGE and western blot with the indicated antibodies. Right panel shows the quantification of TMEM165 and SPCA1 protein levels after normalization with actin (N = 3; ***P-value < 0.001).

Discussion

Our previous work has shown that the observed Golgi glycosylation defect due to a lack of Gdt1p/TMEM165 resulted from a Golgi Mn²⁺ homeostasis defect, then leading to strong Golgi glycosylation abnormalities. Interestingly, we demonstrated that such defects could totally be suppressed by manganese supplementation, strongly suggesting that TMEM165 could somehow be involved in the Golgi transport of Mn²⁺. It has been shown in yeast that Smf1p and Smf2p, members of the Nramp family of metal transporters, are tightly regulated by different intracellular Mn²⁺ concentrations [18–20]. When cells are exposed to toxic Mn²⁺ concentrations, Smf1p and Smf2p are targeted to the vacuole for degradation, thus stopping the Mn²⁺ cellular entry. To test whether TMEM165 falls under the same regulation, TMEM165 stability for Mn²⁺ was tested. Our results showed that TMEM165 was highly sensitive to Mn²⁺ as manganese supplementation targets TMEM165 under the way of lysosomal degradation. Although, intriguingly, the molecular mechanisms by which

TMEM165 is degraded following Mn^{2+} exposure are currently not known, the Mn^{2+} -induced degradation of Gdt1p-Myc in Q1 yeasts demonstrated that this mechanism is conserved during evolution. Another mammalian Golgi protein GPP130 has been reported to be sensitive to Mn^{2+} [16]. While the obtained results are very similar to the one observed for GPP130, several lines of evidences tend to prove that the molecular mechanisms could be different. First, the manganese sensitivity is different as 25 mM manganese is sufficient to engage TMEM165 in the lysosomal degradation pathway, while at this concentration GPP130 is stable. We cannot, however, avoid the fact that this observed difference in manganese sensitivity is coming from the different binding affinities of manganese for these two proteins. Second, the manganese-induced degradation rate of TMEM165 is faster than that of GPP130, as TMEM165 accumulation was never seen in punctate structures under Mn^{2+} supplementation. Because GPP130 and TMEM165 present high sensitivity to manganese, we cannot exclude a functional link between these two Golgi proteins. Interestingly, while the R126H mutation remains Mn^{2+} responsive, the glutamic acid (E1108) in the highly conserved ELGDK motif was shown to be insensitive to Mn^{2+} exposure and then crucial in TMEM165 Mn^{2+} -induced degradation. One can suppose that these two mutations act differently on the Mn^{2+} -induced degradation mechanisms of TMEM165. Our data also show that the E108G TMEM165 mutant form is able to rescue the glycosylation defect, although less efficiently than the wt-TMEM165 form. This suggests that the Mn^{2+} -induced degradation mechanism is independent of the function of TMEM165 in Golgi glycosylation. According to the prediction of TMEM165 membrane topology, this motif is oriented towards the cytosol and located between the second and the third transmembrane domains of TMEM165. Our results show that TMEM165 responds to changes in cytosolic Mn^{2+} and not Golgi luminal changes. Although the R126H mutation reduces basal TMEM165 expression, the protein remains Mn responsive.

The other important question is, why is TMEM165 degraded by high cytosolic Mn^{2+} concentration? While we currently do not have the answer, our data raise several hypotheses. As a slight fraction of TMEM165 can be found at the plasma membrane, the degradation could be a mechanism to prevent Mn^{2+} entry through the plasma membrane. As mammalian cells can, however, transport the metal by other plasma membrane transporters, this hypothesis is not likely. When cells are exposed to high manganese concentrations, the plasma membrane transporters import the dangerous metal in the

cytosol where it accumulates and impairs many fundamental cellular processes. It is critical for the cell to detoxify the cytosol. The detoxification is crucial to avoid the impairment of many fundamental cellular processes. It is known that SPCA1, the Golgi P-type ATPase essential to import cytosolic Ca²⁺ but also Mn²⁺ inside the Golgi lumen, is the major way for eliminating the surplus of cytosolic Mn²⁺ from the cell. As TMEM165 is degraded when the manganese level becomes toxic, we can hypothesize that this mechanism participates in detoxification. This is still unclear how TMEM165 participates in such a process, but one can think that TMEM165, in the presence of high Mn²⁺ concentration in the Golgi, could transport back the Mn²⁺ into the cytosol. In that case, the specific degradation of TMEM165 in response to Mn²⁺ would prevent the Mn²⁺ from the Golgi to be recaptured back into the cytosol, a mechanism that would definitely annihilate the efforts made by SPCA1. Overall, our studies highlight TMEM165 as a novel Golgi Mn²⁺ sensitive protein in mammalian cells. This discovery sheds light on a novel actor involved in the regulation of intracellular Mn²⁺ homeostasis and the pathophysiological mechanisms in TMEM165-CDG patients.

Material and methods

Antibodies and other reagents

Anti-TMEM165 and anti- β Actin antibodies were from Sigma–Aldrich (St Louis, MO, U.S.A.). The other anti-TMEM165 antibody was purchased from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, U.S.A.). Anti-SPCA1 antibody was purchased from Abcam (Cambridge, U.K.). Anti-GM130 antibody was from BD Biosciences (Franklin lakes, NJ, U.S.A.). Anti-GPP130 antibody was purchased from Covance (Princeton, NJ, U.S.A.). Anti-myc (9E10) was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, U.S.A.). Goat anti-rabbit or goat anti-mouse immunoglobulins HRP-conjugated were purchased from Dako (Glostrup, Denmark). Polyclonal goat anti-rabbit or goat anti-mouse conjugated with Alexa Fluor were purchased from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, U.S.A.). Manganese (II) chloride tetrahydrate was from Riedel-de-Haën (Seelze, Germany). All other chemicals were from Sigma–Aldrich unless otherwise specified.

Constructs, vector engineering and mutagenesis Plasmids, pcDNA3.1 derivatives expressing either wt-TMEM165 or p.E108G version of TMEM165 (c.A323G mutation), have been generated by Ezyvec (Lille, France). Generation of TMEM165 knockouts HEK293T cells (ATTC) were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/F12 medium (Thermo

Scientific) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Atlas Biologicals). Cells were maintained at 37° and 5% CO₂ in a 90% humidified incubator. HEK293T TMEM165 stable knockouts were generated using the CRISPR technique [21–24]. gRNA sequences were purchased from Genecopoeia (Catalog No. HCP214780-SG01-3). HEK293T cells were transfected with plasmid containing gRNA and a separate plasmid containing Cas9 and mCherry. HEK293 cells were transfected in a 6-well plate at 70% confluence using Lipofectamine 2000 in Opti-MEM (Thermo Scientific). Cells were incubated with the lipid-DNA complexes for 5 h after which the cells were supplemented with DMEM/F12 with FBS at a final concentration of 5%. The medium was changed to DMEM/F12 with 10% FBS 24 h after transfection. Twelve days after transfection, cells were single-cell sorted and knockout colonies were identified by immunofluorescence and western blot using antibodies to TMEM165 (Sigma). Sequencing of knockouts identified deletions in exon 1.

Cell culture and transfections

All cell lines were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS (Lonza, Basel, Switzerland), at 37°C in a humidity-saturated 5% CO₂ atmosphere. Transfections were performed using Lipofectamine 2000® (Thermo Scientific) according to the manufacturer's guidelines. For drug treatments, incubations were done as described in each figure.

Immunofluorescence staining

Cells were seeded on coverslips for 12–24 h, washed once in Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (DPBS, Lonza) and fixed either with 4% paraformaldehyde (PAF) in PBS (pH 7.3) for 30 min at room temperature or with ice-cold methanol for 10 min at room temperature. Coverslips were then washed three times with PBS. Only if the fixation had been done with PAF, cells were permeabilized with 0.5% Triton X-100 in PBS for 15 min and then washed three times with PBS. Coverslips were then put in saturation for 1 h in blocking buffer [0.2% gelatin, 2% Bovine Serum Albumin (BSA), 2% FBS (Lonza) in PBS], followed by incubation for 1 h with primary antibody diluted at 1:100 in blocking buffer. After washing with PBS, cells were incubated for 1 h with Alexa 488-, Alexa 568-, or Alexa 700-conjugated secondary antibody (Life Technologies) diluted at 1:600 in blocking buffer. After washing three times with PBS, coverslips were mounted on glass slides with Mowiol. Fluorescence was detected through an inverted Zeiss LSM780 confocal microscope. Acquisitions were done using the

ZEN pro 2.1 software (Zeiss, Oberkochen, Germany). For selective membrane permeabilization, we have used digitonin at 5 mg/ml. Stock solution was prepared at 5 mg/ml in absolute ethanol, 0.3 M sucrose 0.1 M KCl, 2.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 10 mM HEPES, pH 6.9. Permeabilization was done at 4°C for 15 min.

Image analyses

Immunofluorescence images were analyzed using TisGolgi, a home-made imageJ (<http://imagej.nih.gov/ij>) plugin developed by TISBio and available upon request. Basically, the program automatically detects and discriminates Golgi and vesicles, based on morphological parameters such as size and sphericity. Then, the program calculates for each image the number of detected objects, their size and mean fluorescence intensity. Co-localization analyses were done using JACoP plugin and performed according to the guidelines suggested by Bolte et al. [25].

Western blotting

Cells were scraped in DPBS and then centrifuged at 4500 rpm for 3 min. Supernatant was discarded and cells were then resuspended in RIPA buffer [Tris/HCl 50 mM (pH 7.9), NaCl 120 mM, NP40 0.5%, EDTA 1 mM, Na₃VO₄ 1 mM, NaF 5 mM] supplemented with a protease cocktail inhibitor (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany). Cell lysis was done by passing the cells several times through a syringe with a 26G needle. Cells were centrifuged for 30 min at 20 000 Å²g. The supernatant containing protein was estimated with the Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). A 20 mg aliquot of total protein lysate was put in NuPAGE LDS sample buffer (Invitrogen) (pH 8.4) supplemented with 4% β-mercaptoethanol (Fluka). Samples were heated for 10 min at 95°C, then separated on 4–12% Bis–Tris gels (Invitrogen) and transferred to nitrocellulose membrane Hybond ECL (GE Healthcare, Little Chalfont, U.K.). The membranes were blocked in blocking buffer (5% milk powder in TBS-T [1X TBS with 0.05% Tween20]) for 1 h at room temperature, then incubated over night with the primary antibodies (used at a dilution of 1:1000, except for anti-myc, used at 1:200) in blocking buffer, and washed three times for 5 min in TBS-T. The membranes were then incubated with the peroxidaseconjugated secondary goat anti-rabbit or goat anti-mouse antibodies (Dako; used at a dilution of 1:10 000) in blocking buffer for 1 h at room temperature and later washed three times for 5 min in TBS-T. Signal was detected with

chemiluminescence reagent (ECL 2 Western Blotting Substrate, Thermo Scientific) on imaging film (GE Healthcare, Little Chalfont, U.K.).

Yeast strains, media and lysis

Yeast strains originating from BY4741 background were used for the experiments (gdt1Δ : Mata his3Δ 1 leu2Δ 0 ura3Δ 0 gdt1Δ ::KanMX4). Yeasts were cultured at 30°C. Cultures in liquid media are done under light shaking. Rich medium, named YEP medium, contains yeast extract (10 g/l, Difco), Bacto-peptone (20 g/l, Difco); YPD medium is a YEP medium supplemented with 2% D -glucose (Sigma– Aldrich). Before any analysis, a preculture in YPD medium is done and a volume equivalent to 10 OD600 nm unit is transferred into a bigger volume of YPD medium. Culture begins at a volume equivalent to 6 OD600 nm unit until 18 OD600 nm. MnCl₂ was added at this step at the indicated concentration and yeasts were harvested at the indicated times. Yeasts were centrifuged for 5 min at 3500g . The supernatant was discarded and the pellet was kept frozen at – 20°C. Yeast lysis was performed as described by Ballou et al. [26]. Western blot experiments were done as described above.

Cell surface biotinylation

Cells were plated to reach 70– 80% confluence on the day of the experiment. Cells were kept on ice all the time. Cells were washed four times with PBS+ /+ (containing Ca and Mg), pH8. An aliquot of 1.5 ml PBS+ /+ (pH 8) with 7.5 ml biotin was added per dish [Biotin: EZ Link Sulfo-NHS-SS-Biotin (Life Technologies, Carlsbad, CA, Q19 U.S.A.), final concentration of 0.5 mg/ml in DMSO]. Cells were then incubated 30 min in a cold room on slow rocking and then washed three times with PBS+ /+ (pH8). Cells were quenched 15 min with 1.5 ml of PBS+ /+ glycine 100 mM, BSA 0.5% in a cold room on slow rocking and then washed three times with PBS+ /+ glycine. Cells were scraped in 200 ml of lysis buffer [50 mM HEPES (pH 7.2), 100 mM NaCl, 1% Triton X-100, protease inhibitors], incubated 20 min on ice and centrifuged for 15 min at 20 000g at 4°C. The supernatant was kept and the protein concentration was measured. For the pull-down, put the maximum amount of protein, ideally 500 mg in 1 ml final (lysis buffer) + 30 ml streptavidin beads. Incubate 4h at 4°C on a

wheel and then centrifuge at 4000g for 1 min at 4°C. Wash three times with 1 ml of lysis buffer (not supplemented with protease inhibitors) and mix well by inverting the tubes 30 times. Centrifuge at 4000g for 1 min at 4°C and remove the supernatant with a flat end tip. Add NuPAGE LDS sample buffer (Invitrogen) pH 8.4 supplemented with 4% β -mercaptoethanol (Fluka). Samples are boiled at 70°C for 10 min (do not boil if one wishes to reveal TMEM165 on western blot afterwards) and then centrifuged at 1000g for 1 min, and the supernatant was collected. Samples were frozen at – 20°C. Samples are ready to load on gel.

Statistical analysis

Comparisons between groups were performed using Student's t-test for two variables with equal or different variances, depending on the result of the F-test.

Abbreviations

BSA, bovine serum albumin; CDG, congenital disorders of glycosylation; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium; DPBS, Dulbecco's Phosphate Buffer Saline; FBS, fetal bovine serum; PAF, paraformaldehyde; SPCA1, secretory pathway Ca-ATPase 1; wt, wild-type.

Author Contribution

ED and SP contributed equally to this work

Funding

This work was supported by the French National Research Agency [SOLV-CDG to F.F.] and the Mizutani Foundation for Glycoscience [to F.F.]. V.L. was supported by the NIH grants [GM083144 and U54 GM105814].

Acknowledgements

We are indebted to Dr Dominique Legrand of the Research Federation FRABio (Univ. Lille, CNRS, FR 3688, FRABio, Biochimie Structurale et Fonctionnelle des Assemblages Biomoléculaires) for providing the scientific and technical environment conducive to achieving this work. We thank the BioImaging Center of Lille, especially Christian Slomianny and Elodie Richard, for the use of the Leica LSM70.

Competing Interests

The Authors declare that there are no competing interests associated with the manuscript

References

- 1 Au, C., Benedetto, A. and Aschner, M. (2008) Manganese transport in eukaryotes: the role of DMT1. *Neurotoxicology* 29, 569–576 doi:10.1016/j.neuro.2008.04.022
- 2 Perl, D.P. and Olanow, C.W. (2007) The neuropathology of manganese-induced Parkinsonism. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 66, 675–682 doi:10.1097/nen.0b013e31812503cf
- 3 Squitti, R., Gorgone, G., Panetta, V., Lucchini, R., Bucossi, S., Albin, E. et al. (2009) Implications of metal exposure and liver function in Parkinsonian patients resident in the vicinities of ferroalloy plants. *J. Neural. Transm.* 116, 1281–1287 doi:10.1007/s00702-009-0283-0
- 4 Park, J.H., Högberg, M., Grüneberg, M., DuChesne, I., Heiden, A.L. von der Reunert, J. et al. (2015) SLC39A8 deficiency: a disorder of manganese transport and glycosylation. *Am. J. Hum. Genet.* 97, 894–903 doi:10.1016/j.ajhg.2015.11.003
- 5 Potelle, S., Morelle, W., Dulary, E., Duvet, S., Vicogne, D., Spriet, C. et al. (2016) Glycosylation abnormalities in Gdt1p/TMEM165 deficient cells result from a defect in Golgi manganese homeostasis. *Hum. Mol. Genet.* 25, 1489–1500 doi:10.1093/hmg/ddw026
- 6 Garrick, M.D., Dolan, K.G., Horbinski, C., Ghio, A.J., Higgins, D., Porubcin, M. et al. (2003) DMT1: a mammalian transporter for multiple metals. *Biometals* 16, 41–54 doi:10.1023/A:1020702213099
- 7 Forbes, J.R. and Gros, P. (2003) Iron, manganese, and cobalt transport by Nramp1 (Slc11a1) and Nramp2 (Slc11a2) expressed at the plasma membrane. *Blood* 102, 1884–1892 doi:10.1182/blood-2003-02-0425
- 8 Chen, P., Bowman, A.B., Mukhopadhyay, S. and Aschner, M. (2015) SLC30A10: a novel manganese transporter. *Worm* 4, e1042648 doi:10.1080/21624054.2015.1042648

- 9 Chen, P., Chakraborty, S., Mukhopadhyay, S., Lee, E., Paoliello, M.M.B., Bowman, A.B. et al. (2015) Manganese homeostasis in the nervous system. *J. Neurochem.* 134, 601–610 doi:10.1111/jnc.13170
- 10 Girijashanker, K., He, L., Soleimani, M., Reed, J.M., Li, H., Liu, Z. et al. (2008) Slc39a14 gene encodes ZIP14, a metal/bicarbonate symporter: similarities to the ZIP8 transporter. *Mol. Pharmacol.* 73, 1413–1423 doi:10.1124/mol.107.043588
- 11 Dode, L., Andersen, J.P., Vanoevelen, J., Raeymaekers, L., Missiaen, L., Vilsen, B. et al. (2006) Dissection of the functional differences between human secretory pathway Ca²⁺/Mn²⁺-ATPase (SPCA) 1 and 2 isoenzymes by steady-state and transient kinetic analyses. *J. Biol. Chem.* 281, 3182–3189 doi:10.1074/jbc.M511547200
- 12 He, W. and Hu, Z. (2012) The role of the Golgi-resident SPCA Ca²⁺/Mn²⁺ pump in ionic homeostasis and neural function. *Neurochem. Res.* 37, 455–468 doi:10.1007/s11064-011-0644-6
- 13 Mukhopadhyay, S. and Linstedt, A.D. (2011) Identification of a gain-of-function mutation in a Golgi p-type ATPase that enhances Mn²⁺ efflux and protects against toxicity. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 108, 858–863 doi:10.1073/pnas.1013642108
- 14 Foulquier, F., Amyere, M., Jaeken, J., Zeevaert, R., Schollen, E., Race, V. et al. (2012) TMEM165 deficiency causes a congenital disorder of glycosylation. *Am. J. Hum. Genet.* 91, 15–26 doi:10.1016/j.ajhg.2012.05.002
- 15 Masuda, M., Braun-sommargren, M., Crooks, D. and Smith, D.R. (2013) Golgi phosphoprotein 4 (GPP130) is a sensitive and selective cellular target of manganese exposure. *Synapse* 67, 205–215 doi:10.1002/syn.21632
- 16 Mukhopadhyay, S., Bachert, C., Smith, D.R. and Linstedt, A.D. (2010) Manganese-induced trafficking and turnover of the cis-Golgi glycoprotein GPP130. *Mol. Biol. Cell* 21, 1282–1292 doi:10.1091/mbc.E09-11-0985
- 17 Schulte Althoff, S., Grüneberg, M., Reunert, J., Park, J.H., Rust, S., Mühlhausen, C. et al. (2015) TMEM165 deficiency: postnatal changes in glycosylation. *JIMD Rep.* 26, 21–29 doi:10.1007/8904_2015_455
- 18 Culotta, V.C., Yang, M. and Hall, M.D. (2005) Manganese transport and trafficking: lessons learned from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* 4, 1159–1165 doi:10.1128/EC.4.7.1159-1165.2005

- 19 García-Rodríguez, N., Manzano-López, J., Muñoz-Bravo, M., Fernández-García, E., Muñiz, M. and Wellinger, R.E. (2015) Manganese redistribution by calcium-stimulated vesicle trafficking bypasses the need for P-type ATPase function. *J. Biol. Chem.* 290, 9335–9347 doi:10.1074/jbc.M114.616334
- 20 Reddi, A.R., Jensen, L.T. and Culotta, V.C. (2009) Manganese homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Chem. Rev.* 109, 4722–4732 doi:10.1021/cr900031u
- 21 Bailey Blackburn, J., Pokrovskaya, I., Fisher, P., Ungar, D. and Lupashin, V.V. (2016) COG complex complexities: detailed characterization of a complete set of HEK293T cells lacking individual COG subunits. *Front. Cell Dev. Biol.* 4, 23 doi:10.3389/fcell.2016.00023
- 22 Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N. et al. (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339, 819–823 doi:10.1126/science.1231143
- 23 Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A. and Charpentier, E. (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816–821 doi:10.1126/science.1225829
- 24 Mali, P., Yang, L., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J.E. et al. (2013) RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339, 823–826 doi:10.1126/science.1232033
- 25 Bolte, S. and Cordelières, F.P. (2006) A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J. Microsc.* 224, 213–232 doi:10.1111/j. 1365-2818.2006.01706.x
- 26 Ballou, C.E. (1990) [36] isolation, characterization, and properties of *Saccharomyces cerevisiae* mnn mutants with nonconditional protein glycosylation defects. *Methods. Enzymol.* 185, 440–470 doi:10.1016/0076-6879(90)85038-P

Annexe 3

Investigating the function of Gdt1p in yeast Golgi glycosylation

Eudoxie Dulary*¹, Shin-Yi Yu*¹, Geoffroy de Bettignies¹, Valérie Decool², Sven Potelle¹, Sandrine Duvet¹, Marie-Ange Krzewinski-Recchi¹, Anne Garat², Gert Matthijs³, Yann Guerardel¹ and François Foulquier¹

¹ Univ. Lille, CNRS, UMR 8576 – UGSF - Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, F-59000 Lille, France ; LIA GLYCOLAB4CDG France/ Belgium (International Associated Laboratory " Laboratory for the Research on Congenital Disorders of Glycosylation – from cellular mechanisms to cure”.

² Univ. Lille, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, EA 4483 – IMPECS – IMPact de l'Environnement Chimique sur la Santé humaine, F-59000 Lille, France

³ Center for Human Genetics, KU Leuven, Leuven, Belgium

Address correspondence should be sent to: François Foulquier (francois.foulquier@univ-lille1.fr)

* These authors have equally contributed

Address: Univ. Lille, CNRS, UMR 8576 – UGSF - Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, F-59000 Lille, France

Tel. + 33 3 20 43 44 30

Fax. +33 3 20 43 65 55

E-mail. Francois.foulquier@univ-lille1.fr

Abstract

The Golgi ion homeostasis is tightly regulated to ensure essential cellular processes such as glycosylation, yet our understanding of this regulation remains incomplete. Gdt1p is a member of the conserved Uncharacterized Protein Family (UPF0016). Our previous work suggested that Gdt1p may function in the Golgi by regulating Golgi Ca²⁺/ Mn²⁺ homeostasis. NMR structural analysis of the polymannan chains showed that the gdt1Δ mutant cultured in presence of high Ca²⁺ concentration, as well as the prm1Δ and gdt1Δ/prm1Δ strains presented strong late Golgi glycosylation defects with a lack of α-1,2 mannoses substitution- and α-1,3 mannoses termination. The addition of Mn²⁺ confirmed the suppression of these defects. Interestingly, our structural data confirmed that the glycosylation defect in prm1Δ could also completely be suppressed by the addition of Ca²⁺. The use of Pmr1p mutants either defective for Ca²⁺/Mn²⁺ transport or both revealed that the suppression of the observed glycosylation defect in prm1Δ strains by the intraluminal Golgi Ca²⁺ requires the activity of Gdt1p. These data support the hypothesis that Gdt1p, in order to sustain the Golgi glycosylation process, import Mn²⁺ inside the Golgi lumen when Prm1p exclusively transports Ca²⁺. Our results also reinforce the functional link between Gdt1p and Pmr1p as we highlighted that Gdt1p was a Mn²⁺ sensitive protein whose abundance was directly dependent on the nature of the ion transported by Pmr1p. Finally, this study demonstrated that the acidic residues of the two conserved motifs E-x-G-D-[KR], likely constituting the cation binding sites of Gdt1p, play a crucial role in Golgi glycosylation and hence in Mn²⁺ transport.

Keywords : Gdt1p, Prm1p, Golgi glycosylation, Mn²⁺ homeostasis

1. Introduction

In 2012, we highlighted TMEM165 as the first member of the Uncharacterized Protein Family 0016 (UPF0016) related to human diseases. Defects in TMEM165 lead to a rare inherited disorders named CDG for Congenital Disorders of Glycosylation in which Golgi glycosylation process is affected. Found in bacteria, archaea, yeast, plants and animals, members of the UPF0016 family share two highly conserved regions as signatures motifs: E-x-G-D-[KR] (Foulquier et al. 2012). Many evidences show that these two motifs form the pore of the protein and then the functionality of the UPF0016 members. Currently, the precise cellular functions of these proteins remain to be fully characterized and are under debate. In yeasts, it was previously reported that Gdt1p was involved in Ca²⁺ transport then playing an important role in Ca²⁺ signaling and Golgi protein glycosylation thereby supporting the hypothesis that Gdt1p would act as Ca²⁺/H⁺ antiporter in the Golgi apparatus (Demaegd et al. 2013; Colinet et al. 2016). The role of TMEM165 as a Golgi Ca²⁺/H⁺ antiporter can however be questioned. We recently highlighted that the observed glycosylation defect due to TMEM165 deficiencies resulted from a defect in Golgi Mn²⁺ homeostasis (Potelle et al. 2016). Moreover, we demonstrated that TMEM165 was a novel Golgi protein sensitive to Mn²⁺ as exposition to high Mn²⁺ concentrations lead to lysosomal degradation of TMEM165 (Potelle et al. 2017). These data reinforced the hypothesis of TMEM165 as being involved in Mn²⁺ transport. This is also currently emphasized by several other studies. In *Arabidopsis thaliana*, the homologous protein photosynthesis affected mutant 71 PHOTOSYNTHESIS AFFECTED MUTANT 71 (PAM71) has been shown to be required for efficient Mn²⁺ uptake at the thylakoid membrane (Schneider et al. 2016). Moreover, the Mnx protein of the cyanobacterial model strain *Synechocystis* sp. PCC 6803, also belonging to the UPF0016 family, was recently demonstrated as a Mn exporter (Brandenburg et al. 2017). Altogether these data cast doubt about the precise function about the transport substrates of the UPF0016 members and the differential substrate specificity. From a general point of view, the mechanisms by which yeast cells regulate Golgi Ca²⁺ and Mn²⁺ homeostasis, both critical for many cellular processes and in particular Golgi glycosylation, are not completely deciphered yet.

In this paper we have investigated more into details the contribution of Gdt1p, Pmr1p and both in Golgi glycosylation processes. We have demonstrated that inactivation of Pmr1 led

to strong Golgi glycosylation defects fully reversed by both the addition of Ca²⁺ and Mn²⁺. Interestingly, in the *gdt1Δ/pmr1Δ* double knock-out, only the addition of Mn²⁺ was capable to suppress the observed Golgi glycosylation defect thus pointing the critical role of Gdt1p in suppressing the Golgi glycosylation defect in *pmr1Δ* strains supplemented with Ca²⁺. We have also shown that the abundance and function of Gdt1p in Golgi glycosylation was dependent on the function of Pmr1p. By using mutants of Pmr1p specifically defective for transport of either Ca²⁺ ions (Pmr1pD53A), Mn²⁺ ions (Pmr1pQ783A) or both (Pmr1pD778A), our results evidenced that in the case where Pmr1p only transport Ca²⁺ from the cytosol to the Golgi lumen, Gdt1p was necessary to import Mn²⁺ inside the Golgi lumen to suppress the observed Golgi glycosylation defect. Finally, this paper demonstrated that the acidic residues of the two conserved motifs E-x-G-D-[KR] of Gdt1p are involved in Golgi glycosylation.

2. Material and methods

Yeast strains and media

Yeast strains used for the experiments are listed below:

Wild-type (WT) Mata *his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0*

pmr1Δ Mata *his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 pmr1Δ::KanMX4*

gdt1Δ Mata *his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 gdt1Δ::KanMX4*

gdt1Δ/pmr1Δ Mata *his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 gdt1Δ::KanMX4 pmr1Δ::KanMX4*

Yeast were cultured at 30°C. Cultures in liquid media are done under a light shaking. Rich media, named YEP media, contains yeast extract (10 g.L⁻¹, Difco), Bacto-peptone (20 g.L⁻¹, Difco). YPD media is a YEP media supplemented with 2% D-glucose (Sigma-Aldrich). YPR is YEP supplemented with 2% raffinose (Euromedex). Selection antibiotics were added at 100 μg.mL⁻¹ for nourseothricine, 200 μg.mL⁻¹ for G418 and 300 μg.mL⁻¹ for hygromycin.

Constructs, vector engineering and mutagenesis

Plasmids, pRS41H derivatives (wt, E53G, D56G, E204G, L205W and D207G mutated version of GDT1) and pRS41N derivatives (wt, D53A, D778A and Q783A mutated version of PMR1) have been generated by Ezyvec (Lille, France).

Invertase glycosylation analysis

Before any analysis, a preculture in YPD media is done and a volume equivalent to 15 OD_{600nm} units is centrifuged for 3 minutes at 3500 rpm. The supernatant is discarded and the pellet is resuspended in a YPR media to induce invertase expression. Calcium, manganese and other ions were added at this step at the indicated concentration. After a 20h culture in YPR, yeasts were centrifuged for 5 minutes at 3500 rpm. Supernatant was

discarded and the pellet was kept frozen at -20°C. Invertase glycosylation analysis was performed as described by Ballou et al (Potelle et al. 2017).

Western Blotting

Yeasts were centrifuged for 5 minutes at 3500 rpm. Supernatant was discarded and cells were then resuspended in TBP buffer supplemented with a protease cocktail inhibitor (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany). Cell lysis was done by vortexing the cells with beads by vortexing 1h at 4°C. Cells were centrifuged for 5 min at 3 500g. The supernatant containing protein was estimated with the micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). 20 µg of total protein lysate were put in NuPAGE LDS sample buffer (Invitrogen) pH 8.4 supplemented with 4% β-mercaptoethanol (Fluka). Samples were heated 10 min at 95°C and then separated on 4%-12% Bis-Tris gels (Invitrogen) and transferred to nitrocellulose membrane Hybond ECL (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). The membranes were blocked in blocking buffer (5% milk powder in TBS-T [1X TBS with 0.05% Tween20]) for 1 h at room temperature, then incubated overnight with the anti-HA (Santa Cruz; used at a dilution of 1:200) in blocking buffer, and washed three times for 5 min in TBS-T. The membranes were then incubated with the peroxidase-conjugated secondary goat anti-rabbit (Dako; used at a dilution of 1:10,000) in blocking buffer for 1 h at room temperature and later washed three times for 5 min in TBS-T. Signal was detected with chemiluminescence reagent (ECL 2 Western Blotting Substrate, Thermo Scientific) on imaging film (GE Healthcare, Little Chalfont, UK).

Whole cell Mn measurement by ICP-MS

Yeasts were grown in YPD medium and a volume equivalent to 15 a volume equivalent to 15 OD600nm units is centrifuged for 3 minutes at 3500 rpm. The supernatant is discarded and the pellet is resuspended in a YPD media containing or not 50 µM MnCl₂. After 20h, a volume equivalent to 25 OD600nm units is centrifuged for 3 minutes at 3500 rpm. Yeasts are washed 2 times with EDTA 1 µM and 3 times with water. Yeasts are resuspended in 500 µL of HNO₃ 30% and heat at 65°C in a light shaking during 20h. 500 µL of water are added to the mixture. 300 µL are analyzed by ICP-MS (Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometer). Mn analysis were done in the Toxicology Laboratory of the Lille University Hospital. Samples were diluted 50 times with 1.5% (v/v) nitric acid (ultrapure quality 69.5%, Carlo Erba Reagents, Val de Reuil, France) solution in ultrapure water (Purelab Option-Q, Veolia Water, Antony, France) containing 0.1% triton®X-100 (Euromedex, Souffelweyersheim, france), 0.2% butan-1-ol (VWR Chemicals, Fontenay-sous-Bois, France), and 0.5µg/L rhodium (Merk, Darmstadt, Germany). Assays were performed on an ICP-MS THERMO ICAP™ Q (Thermo Scientific, Courtaboeuf Cedex, France). The limit of quantification was 0.2µg/L).

NMR analyses

All NMR experiments were acquired on Avance II Bruker spectrometer equipped with BBO 5mm probe resonating at 400 MHz for ^1H , 100.6 MHz for ^{13}C . Mannans were dissolved in 500 μL $2\text{H}_2\text{O}$ (99.96% 2H , Eurisotop®), and then transferred into 5 mm Shigemi tubes (Allision Park, USA). NMR experiments were performed at 293 K for Mannan. The ^1H chemical shifts were expressed in ppm. related to the methyl signal of acetone ($\delta^1\text{H}$ 2.225 and $\delta^{13}\text{C}$ 31.55 ppm) as internal standards. The COSY90, $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC experiments were performed by using Bruker standard sequences and optimized for each experiment.

Monosaccharide analyses

10 μg of inositol (taken as internal standard) and 10 μg of target mannan were mixed. The monosaccharide composition of the exosporium fraction was established by GC and GC/MS as alditol-acetate derivatives. Briefly, samples were hydrolyzed in 4 M trifluoroacetic acid (TFA) for 4 h at 100°C and then reduced with sodium borohydride in 0.05 M NaOH for 4 h. Reduction was stopped by dropwise addition of acetic acid until pH 6 was reached and borate salts were co-distilled by repetitive evaporation in dry methanol. Peracetylation was performed in acetic anhydride at 100°C for 2 h. The derivatized monosaccharides were dissolved in 1 mL of chloroform, and 1 μL of sample was injected into GC-MS (TRACE GC Ultra, Thermo Fisher Scientific). The capillary column is SOLGEL-1MS (Part No. 054795, 30m x 0.25 mm x 0.25 μm). The initial oven temperature was held at 120°C, increased to 230°C at 3°C/min, and then, 270°C for 10 min. The derivatized monosaccharides were well separated into individual peaks, and identified by MS. However, the signal of GlcNAc is very low due to the very low percentage of GlcNAc in mannan. Therefore, selected ion monitor (SIM) was applied to increase sensitivity and quantify the amount of Man and GlcNAc. We took the same amount of authentic standards which are inositol, Man, GlcNAc to estimate the response factor of each monosaccharide in this method. Ions at m/z 168, 187, and 144 are the respective fragment ions for inositol, Man, and GlcNAc. The size of isolation window was set 0.2 Da, and the scan time of selected ion was 0.2 sec. The responsive factor of inositol was set to 1. In our system, Man and GlcNAc was 0.48 and 0.28, respectively. The amount (μg) of mannose in different Mannan samples was calculated by [(Peak area of selected ion at m/z 187 for Man/0.48)/Peak area of selected ion at m/z 168 for inositol *10]. Similar calculation was applied to GlcNAc, which is [(Peak area of selected ion at m/z 144 for GlcNAc/0.28)/Peak area of selected ion at m/z 168 for inositol *10]. We assumed most of mannan is located on N-glycans. Therefore, the size of Man per N-glycan would be [molar of Man/(molar of GlcNAc*2)].

The derivatized monosaccharides were re-dissolved in 1000 μL chloroform. 1 μL of sample was injected into GC-MS. The initial oven temperature was held at 120°C, increased to 230°C at 3°C/min, and then, 270°C for 10 min.

3. Results

3.1. The suppression of the glycosylation defect in *pmr1* Δ strains supplemented with Ca^{2+} is dependent on the activity of Gdt1p

We previously demonstrated that the observed Golgi N-glycosylation defect in *gdt1* Δ strains cultured in presence of high Ca^{2+} concentration could efficiently be suppressed by the addition of Mn^{2+} . This was also observed for *pmr1* Δ and *gdt1* Δ /*pmr1* Δ double knock-out strains (Potelle et al. 2016). Although we demonstrated that high environmental Ca^{2+} concentration in *gdt1* Δ led to strong glycosylation defects, in *pmr1* Δ , we observed the suppression of the glycosylation defect by the addition of Ca^{2+} . Indeed, 10mM Ca^{2+} treatment are sufficient to greatly improve the invertase mobility (Fig. 1A). Since Gdt1p and Pmr1p are two Golgi proteins involved in the regulation of the Golgi Ca^{2+} / Mn^{2+} homeostasis, invertase mobility was analyzed in *gdt1* Δ /*pmr1* Δ double knock-out strains in the absence and in the presence of increasing Ca^{2+} concentrations (from 10mM Ca^{2+} to 300mM) (Fig. 1A). Although the invertase mobility is strongly affected in the *gdt1* Δ /*pmr1* Δ double knock-out strains, the Ca^{2+} treatment does not suppress the observed invertase mobility defect (Fig. 1A). By contrast and as previously observed, the addition of 50 μM Mn^{2+} is sufficient to fully suppress the observed Golgi N-glycosylation defect in the different yeast strains (Supplementary Fig. 1).

These results points to the crucial requirement of Gdt1p activity in the observed suppression of the glycosylation defect in *pmr1* Δ strains supplemented with Ca^{2+} . Altogether these results highly suggest a functional link between Gdt1p and Pmr1p in maintaining Golgi glycosylation homeostasis.

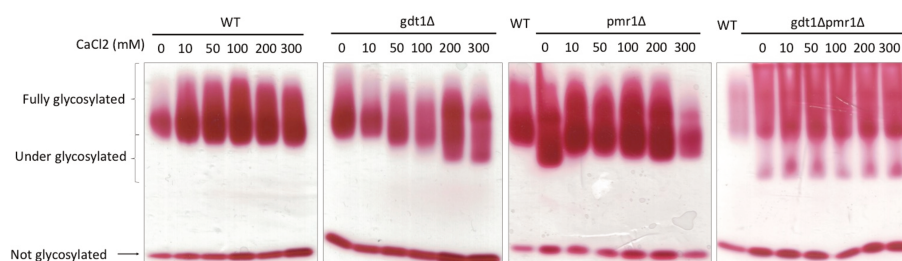


Figure 1: The suppression of the glycosylation defect in *pmr1* Δ strains supplemented with Ca^{2+} is dependent of the activity of Gdt1p. Wild-type (WT), *gdt1* Δ , *pmr1* Δ and *gdt1* Δ /*pmr1* Δ yeasts mutants were grown to an OD600 of 0.8 in a YPD medium. Afterwards, yeasts were transferred in YPR medium with an increase of the indicated CaCl_2 concentrations to induce

Invertase secretion. N-glycosylated invertase secreted was analyzed in a native gel as indicated by Ballou et al.

3.2. Structural analysis of the mannans from wild type and different mutants under different supplement of Ca²⁺/Mn²⁺

In order to further delineate the nature of the observed Golgi N-glycosylation defects, mannans were isolated from yeast strains cultured under different Ca²⁺/ Mn²⁺ conditions, followed by detailed structural analyses. So called mannans from most yeasts share similar overall architectures. They are made of Man₈GlcNAc₂ N-linked glycans extended by an α -linked polymannoside containing around 200 mannose residues. In *S. cerevisiae*, the polymannoside is composed of a long stretch of (α -1,6)-linked D-mannopyranose units substituted in C2 positions by short side chains of (α -1,2)-linked mannose units that may be further capped by terminal Man(α -1,3) residues (Munro 2001). So called acid-labile mannan domain is further attached to the (α -1,2)-oligomannosides through phospho-di-ester bonds. In a first step, we established the structural features of the mannan isolated from WT strain by 1D 1H NMR experiment (Fig. 2A). Due to its polymeric nature, it is not possible to assign all the signals corresponding to individual monosaccharide residues of mannans. However, five broad signals annotated as I, II, III, IV, V could be detected in anomeric region between 5.5-4.8 ppm, which natures were established by observing their spin systems by 1H-1H COSY, TOCSY and 1H-13C HSQC experiments, based on literature (Vinogradov, Petersen, and Bock 1998) (Fig. 2A). They were assigned to five major epitopes (**I**), internal -2)Man(α -1,2) residues; (**II**), terminal Man(α -1,3) residues; (**III**), -2,6)Man(α -1,6) branched residues; (**IV**), terminal Man(α -1,2) and -3)Man(α -1,2) residues; (**V**), unbranched -6)Man(α -1,6) residues. Furthermore, terminal Man(α -1,2) (**IV.a**, H2 at 4.06 ppm) and -3)Man(α -1,2) residues (**IV.b**, H2 at 4.22 ppm) could be differentiated by COSY90 spectrum as shown in Fig. 2B. Relative quantification of NMR signals I to V provides reliable snapshot of the overall mannan structural features. As shown in Fig. 2C, mannan isolated from WT strain is characterized by a high proportion of (α 1-2) substitution on the (α 1-6)-mannoside stretch [2,6)Man / 6)Man = 6,4], leaving few un-substituted -6)Man(α -1,6) residues left.

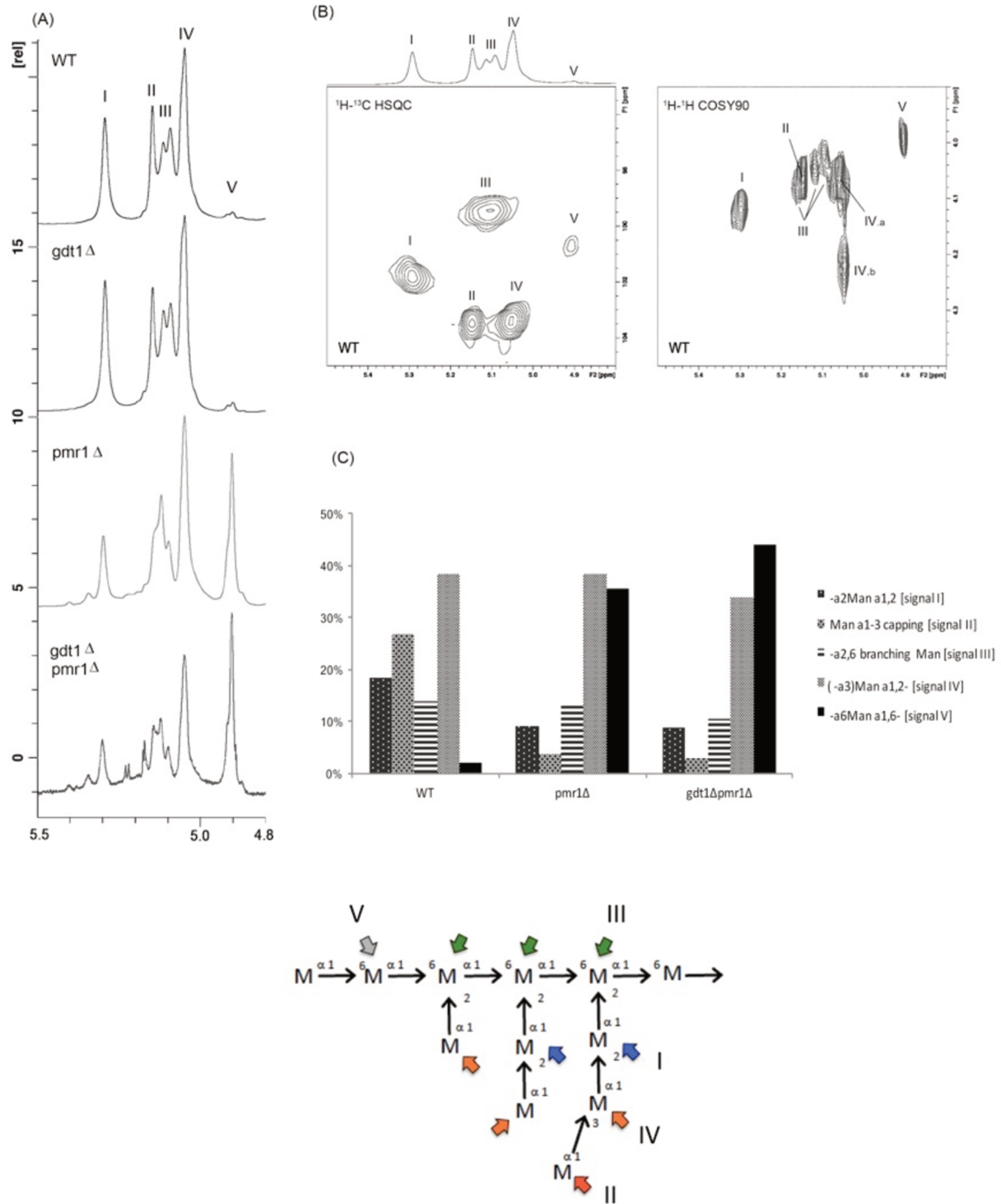


Figure 2: NMR analyses in YPD media

In a second step, we compared the structures of mannans isolated from all four strains grown in normal conditions by homo- and heteronuclear NMR. 1D ^1H -NMR spectra, of mannans isolated from wild type and *gdt1* Δ established that these two were very similar (Fig. 2A). In contrast, distinctive features were observed in the structures of mannans

isolated from $\text{pmr1}\Delta$ and $\text{gdt1}\Delta\text{pmr1}\Delta$ strains compared to WT, as shown by 1D $^1\text{H-NMR}$ spectra (Fig. 2A) and relative quantification of $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ HSQC NMR signals (Fig. 2C). The two most salient features of mannans from $\text{pmr1}\Delta$ and $\text{gdt1}\Delta\text{pmr1}\Delta$ strains were (1) a sharp decrease in the proportion of internal (α -1,2) oligomannoside sidechains and of α 3 capping mannose residues, which correlated with (2) a large increase in the proportion of unbranched (α -1,6) polymannoside backbone. Indeed, compared to WT mannan, the 2,6)Man / 6)Man ratio decreased from 6.4 to 0.37 and 0.23, respectively, which correspond to about 17 and 28 times less (α -1,2) substitution on the (α -1,6) polymannoside backbone. Additionally, COSY90 spectra showed an increased proportion of terminal Man(α -1,2) residues on mannans from $\text{pmr1}\Delta$ and $\text{gdt1}\Delta\text{pmr1}\Delta$ strains, which is correlated with a decreased proportion of terminal Man(α -1,3) (data not shown). Altogether, these experiments show that a lack of pmr1 and both gdt1pmr1 leads to a drastic reduction of the branching pattern of (α -1,6) polymannoside domain of the mannan.

In a third step, we screened by 1D $^1\text{H-NMR}$ experiments the structural variability of mannans isolated from all four strains following supplementation with 0.5M Ca^{2+} , 0.05mM Mn^{2+} and 0.5M Ca^{2+} / 0.05mM Mn^{2+} with a special focus on their branching patterns. The branching defects were expressed as a % of unbranched -6)Man(α -1,6) residues compared with total residues by quantifying signal V on 1D $^1\text{H-NMR}$ spectra (Fig 2A). In accordance with the above results, WT and $\text{gdt1}\Delta$ grown in normal condition contained less than 2% of -6)Man(α -1,6) residues, whereas mannans from $\text{pmr1}\Delta$ and $\text{gdt1}\Delta\text{pmr1}\Delta$ contained 21 and 27% of -6)Man(α -1,6) residues, respectively. This observed branching defect is fully restored in $\text{pmr1}\Delta$ by the addition of any divalent cation, Ca^{2+} or Mn^{2+} . Contrarily, the glycosylation defect of $\text{gdt1}\Delta\text{pmr1}\Delta$ strain which is almost entirely restored in presence of Mn^{2+} and both Ca^{2+} Mn^{2+} (4% and 7%), is not restored in the presence of Ca^{2+} . Then, $\text{gdt1}\Delta$ cultured in presence of 0.5M Ca^{2+} showed an increased proportion of unbranched -6)Man(α -1,6) backbone, as well as a decreased number of α 3 mannose capping (data not shown). However, these defects were also completely restored by the addition of Mn^{2+} .

NMR analysis established that a lack of Pmr1p leads to strong defects in the mannan structure through the decrease of terminal Man(α -1,3) capping, the decrease of side chains

(α -1,2) mannosylation and the increase of the proportion of unbranched 6)Man(α -1,6). These characteristics should result in the change of mannan size. In order to determine the average size of mannan domain of N-glycans, we quantified Man and GlcNAc residues in all samples by GC/MS analysis, and deduced the average number of mannose per N-glycan based on the presence of the chitobiose core. As shown in Fig. 3B, N-glycans isolated from WT and *gdt1* Δ strains grown in normal conditions contained an average of 220-250 Man residues. However, we observed that the size of mannan domain of *gdt1* Δ strain under Ca^{2+} , as well as *pmr1* Δ and *gdt1* Δ *pmr1* Δ strains in normal conditions and under Ca^{2+} are drastically reduced (Fig. 3A) down to about 40 Man residues. Under Mn^{2+} condition, the size of mannans from *pmr1* Δ and *gdt1* Δ *pmr1* Δ was restored to average sizes. Altogether, structural analysis by NMR and GC/MS showed that the glycosylation defects are due to a reduced synthesis of -2)Man(α -1,2) side chains that results in the synthesis of polymannosylated N-glycans of smaller size compared to that of WT strains.

This suggests *pmr1* and *gdt1* involve the defects in MMN2/ MNN5/ MNN1, late Golgi processing steps. Altogether, these results demonstrate (i) the crucial requirement of Gdt1p in maintaining Golgi glycosylation when cells are cultured in presence of Ca^{2+} and (ii) that the suppression of the glycosylation defect by the Ca^{2+} in *pmr1* Δ strains is strictly dependent on the activity of Gdt1p.

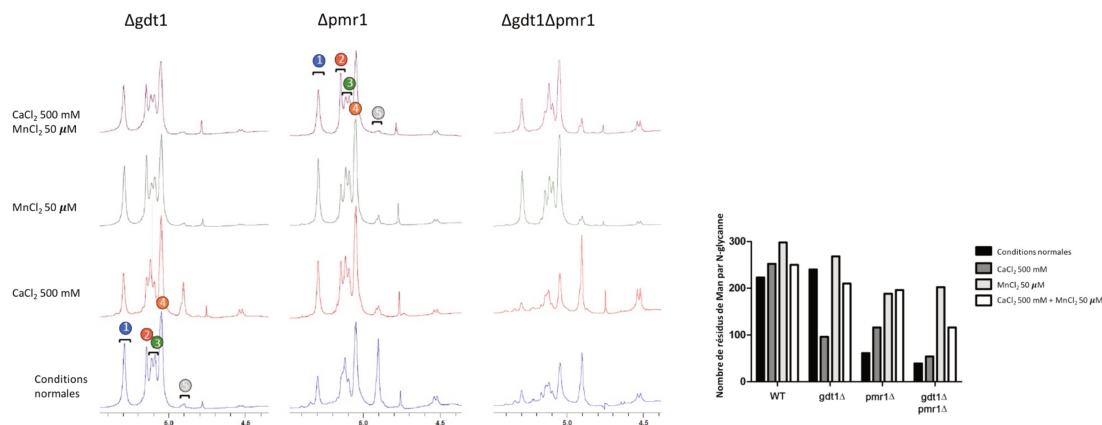


Figure 3

3.3. The abundance and function of Gdt1p in glycosylation is dependent on the Prm1p function

To further investigate the contribution of Ca^{2+} versus Mn^{2+} transport activity of Prm1p to the observed N-glycosylation defect, we first transfected *PMR1*-deficient cells with

three point mutants of Pmr1p that were defective for transport of either Ca²⁺ ions (Pmr1pD53A), Mn²⁺ ions (Pmr1pQ783A) or both (Pmr1pD778A) (Wei et al. 1999; Mandal, Woolf, and Rao 2000). Although both Pmr1pD53A and Q783A can suppress the observed initial glycosylation defect, differences can be observed (Fig. 4A). The suppression is total with the Pmr1pWT and the Pmr1pD53A and only partial with the Pmr1pQ783A (Fig. 4A, left panel). To then assess the potential role of Gdt1p in this glycosylation rescue, *gdt1Δpmr1Δ* strains were transfected with the same Pmr1p mutants. While the expression of the D53A completely suppressed the initial glycosylation defect, the Q783A clearly did not (Fig. 4A, right panel). To confirm these results, the invertase mobility in the *pmr1Δ* and *gdt1Δ/pmr1Δ* double knock-out strains transfected with the Pmr1pQ783A in the presence of increasing Ca²⁺ concentrations was evaluated. In the *pmr1Δ* yeast strains transfected with the *pmr1Q783A*, the invertase mobility is strongly reduced both in absence of Ca²⁺ and under increasing Ca²⁺ concentrations (Fig. 4B, left panel). We demonstrated that this effect was due to the activity of Gdt1p, as the Ca²⁺ treatment in the *gdt1Δ/pmr1Δ* double knock-out strains transfected with the *pmr1Q783A* does not suppress the observed glycosylation defect (Fig 4B, right panel). We then wondered whether the suppression of the glycosylation defect in *pmr1Δ* strains supplemented with Ca²⁺ could result from Gdt1p expression changes. The cellular abundance of Gdt1p was then evaluated by Western blotting using specific antibodies directed against Gdt1p in *pmr1Δ* strains, transfected or not with the different Pmr1p mutants defective for transport of either Ca²⁺ ions (Pmr1pD53A), Mn²⁺ ions (Pmr1pQ783A) or both (Pmr1pD778A). The results showed that the abundance of Gdt1p was directly linked to the transport function of Pmr1p. In *pmr1Δ*, the abundance of Gdt1p was greatly reduced (-80% compared to WT) (Fig. 4C). The expression of Pmr1pWT in *pmr1Δ* strains greatly restored the Gdt1p abundance. Interestingly, while the expression of the Pmr1pD53A also completely rescue the Gdt1p level, the two other Pmr1p mutants (Q783A and D778A) had no effects on Gdt1p abundance (Fig. 4C). This result then proves that the abundance of Gdt1p is dependent of the transport function of Pmr1p. These results are in accordance with those obtained recently (Potelle et al. 2017) where we highlighted that the abundance of Gdt1p was greatly reduced in response to Mn²⁺. To go further, we then evaluated the total cellular Mn²⁺ concentration in the different yeast strains under different conditions by ICP-MS. While under physiological conditions the total cellular Mn²⁺ concentration is similar in the different mutants, a huge increase is observed followed Mn²⁺

supplementation in all investigated mutants compared to WT (Fig 4D). After Mn²⁺ supplementation, a 10-fold increase in Mn concentration is observed in the *gdt1Δ*/*pmr1Δ* double knock-out mutant, a 5 fold increase in the *pmr1Δ* mutant and a 2 fold increase in the *gdt1Δ* mutant. These results support the fact that both Pm1 and Gdt1 are involved in total cellular Mn²⁺ homeostasis.

Our results demonstrate that (i) the Golgi glycosylation defect observed in *pmr1* deficient cells result from a lack of Golgi intraluminal Mn²⁺, (ii) that the suppression of the observed glycosylation defect in *pmr1Δ* strains by the intraluminal Golgi Ca²⁺ requires the activity of Gdt1p.

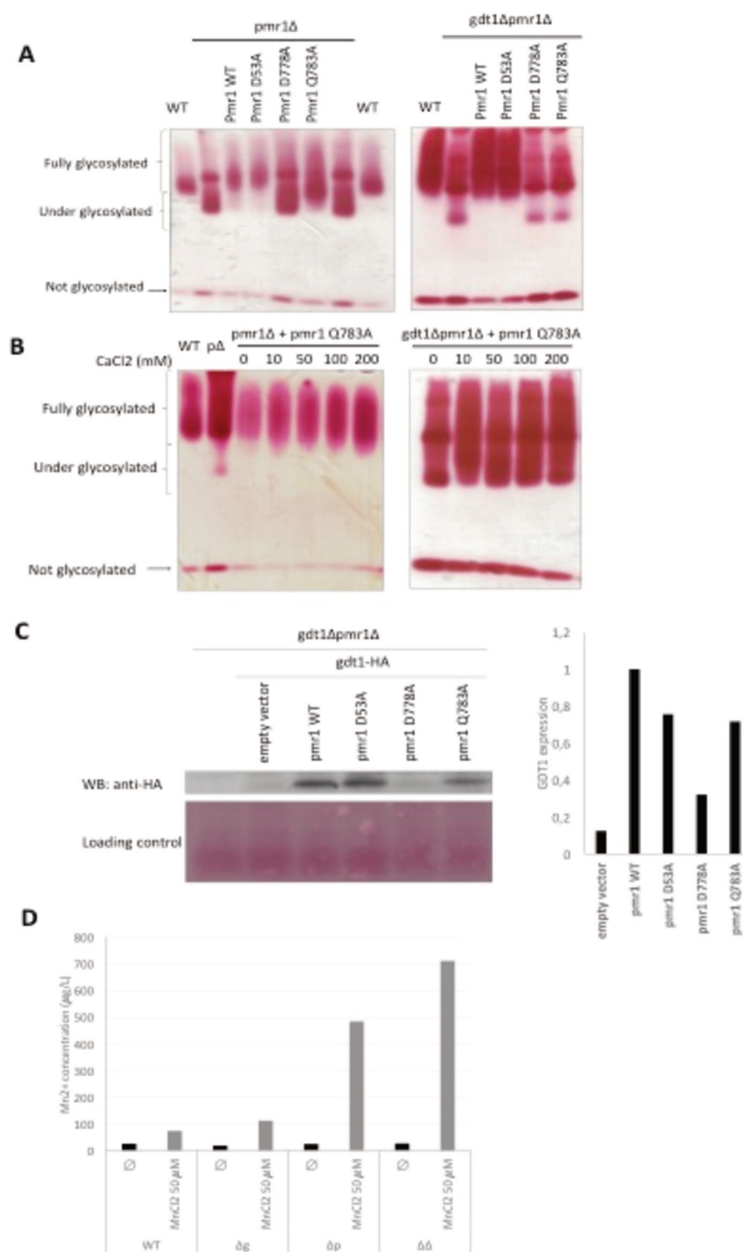


Figure 4: The function and abundance of Gdt1p in glycosylation is dependent on the Pmr1p function

(A) The Glycosylation defect in *pmr1p* mutants depends on its function. *Pmr1Δ* and *gdt1Δpmr1Δ* strains were transformed with *pRS41N-pmr1p* mutants (*pmr1p*-WT, *pmr1p*-D53A, *pmr1p*-D778A and *pmr1p*-Q783A). Yeasts were grown in YPR media and N-glycosylated invertase profile was performed (B) Ca^{2+} uptake by *pmr1p* influences the Mn^{2+} uptake by Gdt1p. Yeasts were grown in YPR media supplemented with an increase of the indicated CaCl_2 concentrations in the medium and invertase profile was analyzed. (C) Abundance of Gdt1p depends on the Pmr1p function. *gdt1Δpmr1Δ* strains were transformed with *pRS41H-Gdt1p*-HA and with *pRS41N-Pmr1p* mutants (*pmr1p*-WT, *pmr1p*-D53A, *pmr1p*-D778A and *pmr1p*-Q783A). Yeasts were grown in a YPD medium and GDT1 expression was performed by western Blot using an anti-HA. (D) Cytosolic manganese detoxification needs Pmr1p. Wild-type (WT), *gdt1Δ*, *pmr1Δ* and *gdt1Δpmr1Δ* yeasts mutants were grown to an OD600 of 0.8 in a YPD medium and transferred to a media containing no Mn^{2+} or 50 μM MnCl_2 . Total Mn^{2+} concentrations were analyzed by ICP-MS.

3.4. Acidic residues of the conserved motifs of Gdt1p are involved in Golgi glycosylation

As previously published (Foulquier et al. 2012; Demaegd et al. 2014; Dulary et al. 2016), members of the UPF0016 family contain two highly conserved consensus motifs E- ϕ -G-D-[KR]-[TS], predicted to be involved in the transport function of UPF0016 members. Recently these motifs have been shown to be part of the regulatory Ca^{2+} binding domains. In order to evaluate the importance of these two motifs in the maintenance of Golgi glycosylation homeostasis, mutated versions of Gdt1p have been generated (E53G, D56G, E204G and D207G) and used to complement the observed glycosylation defect in *gdt1Δ* strains cultured in presence of high Ca^{2+} concentrations. Interestingly none of the mutated Gdt1p complements the observed glycosylation defect demonstrating that these acidic amino acids are essential for the function of Gdt1p in Golgi glycosylation (Fig. 5). We can note that the L205W mutation completely suppresses the glycosylation defect. We then wondered whether the activity of Gdt1p was required in the case where Pmr1p would only transport Mn^{2+} . For that, the same mutated versions were expressed in *gdt1Δ/pmr1Δ* strains transformed with *Pmr1pD53A* and the invertase mobility was followed. As shown in figure 5, the glycosylation defect was completely suppressed for all the mutated versions of Gdt1p then demonstrating that when Pmr1p exclusively transports Mn^{2+} , Gdt1p is dispensable. The same experiment was then performed in *gdt1Δ/pmr1Δ* strains transformed with *Pmr1pQ783A*. Although the expression of Gdt1p wt partially rescues the invertase glycosylation defect, none of the mutated version suppresses the glycosylation defect (Fig.

5). This result clearly demonstrates that the requirement of Gdt1p for Golgi glycosylation then depends on the nature of the ion transported by Pmr1p.

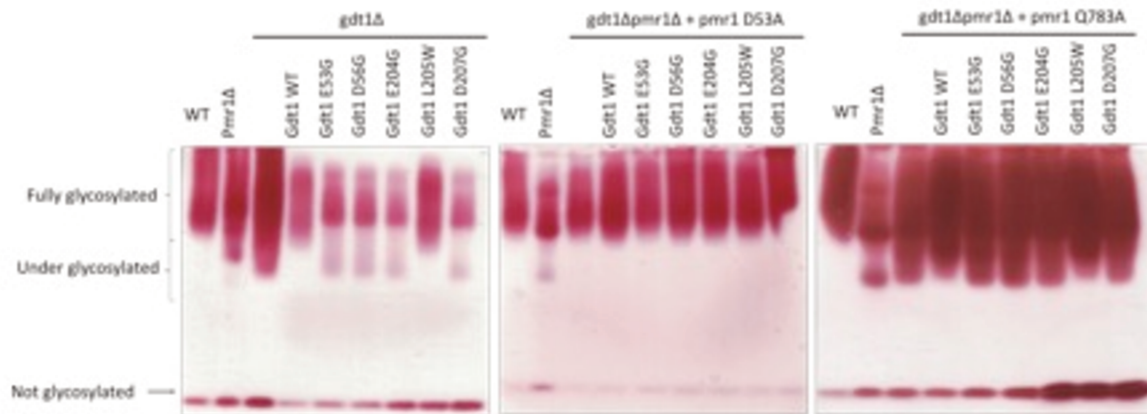


Figure 4: Acidic residues of the conserved motifs of Gdt1p are involved in Golgi glycosylation. *gdt1Δpmr1Δ* strains were transformed with pRS41N-*pmr1pD53A* (left panel) and pRS41N-*pmr1p-Q783A* (middle panel) and with pRS41H-*gdt1p* mutants (Gdt1p-E53G, Gdt1p-D56G, Gdt1p-E204G, Gdt1p-L205W and Gdt1p-D207G). Yeasts were grown in YPR medium. *gdt1Δ* strains were transformed with pRS41H-*gdt1p* mutants (Gdt1p-E53G, Gdt1p-D56G, Gdt1p-E204G, Gdt1p-L205W and Gdt1p-D207G) (right panel) and yeasts were grown in a YPR media supplemented with 200 mM CaCl₂.

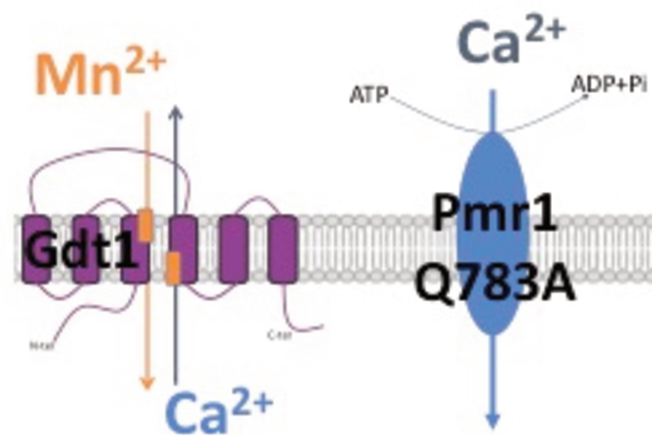


Figure 5: Hypothesis on the role of Gdt1p in ion homeostasis. In this model, Gdt1p would be a Mn²⁺/Ca²⁺ antiporter whose function depends on Pmr1p. When Pmr1p would import Ca²⁺ to the Golgi lumen, Gdt1p would import Mn²⁺ by exporting Ca²⁺.

4. Discussion

The regulation of Ca^{2+} and Mn^{2+} in the Golgi apparatus is crucial for many cellular processes particularly the secretion of proteins and the Golgi glycosylation maintenance. One of the main supplier/ regulator of Ca^{2+} / Mn^{2+} Golgi homeostasis was the Golgi localized P-type ATPase Pmr1p. Our previous work raised the possibility that Gdt1p might also play a crucial role in Golgi ion homeostasis and Golgi glycosylation. Although the precise cellular function of Gdt1p in the Golgi remains unsolved, few results cast doubt about its precise function about the transport substrates. In this work we show that Gdt1p is a functionally important Golgi protein playing a unique role in Golgi glycosylation. Compared to mammalian cells, one of the particularities of yeasts is the further Golgi maturation of the N-linked glycans with the addition of outer chains that may contain up to 50-200 mannose residues (Munro 2001). These hypermannosylated structures consists in a long backbone of α -1,6-linked mannose residues substituted with α -1,2-linked mannose residues themselves branched with terminal α -1,3-linked mannose residues. Many Golgi mannosyltransferase complexes are involved in generating these specific structures. In this paper we assessed and compared by using NMR the structural details of polymannan chains in the different yeast strains (*gdt1 Δ* , *pmr1 Δ* and *gdt1 Δ /pmr1 Δ* strains) under different conditions. The NMR experiments showed strong alteration of the Golgi N-linked glycosylation in the different yeast strains under different conditions. While the backbone of α -1,6-linked mannose residues is not altered, strong defects in α -1,3- and α -1,2- branching are mainly observed in *gdt1 Δ* strains cultured in presence of high Ca^{2+} concentration, *pmr1 Δ* and *gdt1 Δ /pmr1 Δ* strains. We also confirmed that addition of Mn^{2+} was sufficient to completely suppress the observed branching defects. Interestingly, our data clearly demonstrated that the suppression of the Golgi glycosylation defects by the Ca^{2+} in *pmr1 Δ* yeast strains was dependent on the activity of Gdt1p. Based on the structural analysis of the polymannan chains, we deduced that the defects mainly affected medial and late Golgi glycosylation as only the α -1,2 substitution- and the α -1,3 termination are affected. This points to an alteration of Mnn2p/ Mnn5p/ Mnn6p and/or Mnn1p activities. The α -1,6 initiation/ elongation seems not to be altered in our analysis. Taken together, our structural analysis data showed Gdt1p as well as Pmr1p to be critical participants in medial and late Golgi glycosylation functions.

The identity of Gdt1p as a potential Golgi transporter controlling both Golgi Ca²⁺/ Mn²⁺ homeostasis arose from our studies and others (Colinet et al. 2016; Dulary et al. 2016; Potelle et al. 2016). In this work we further evaluated the potential role of Gdt1p in importing Mn²⁺ from the cytosol to the Golgi lumen. As first pointed by us (Foulquier et al. 2012) and others (Demaegd et al. 2014; Schneider et al. 2016; Brandenburg et al. 2017) members of the UPF0016 family contain two highly conserved consensus motifs E-φ-G-D-[KR]-[TS], predicted to be involved in the transport function of UPF0016 members. Our results show that mutations of the acidic amino acids of these two conserved motifs (E53A, D56A, E204A and D207A) completely abolish the suppression of the glycosylation defect. Interestingly, we demonstrated that an active form of Gdt1p was exclusively required in case where Pmr1p mainly transports Ca²⁺. When Pmr1p mainly imports Mn²⁺ inside the Golgi lumen, our results show that Gdt1p is completely dispensable for the Golgi glycosylation. We propose that these amino acids constitute the cation binding sites of Gdt1p (one for Ca²⁺ and one for Mn²⁺). We can assume that mutations in any of these amino acids completely abolish the transport function of Gdt1p by impairing cation affinity or conformation changes of the pocket.

Moreover, the use of different Pmr1p mutants defective for transport of either Ca²⁺ ions (Pmr1pD53A), Mn²⁺ ions (Pmr1pQ783A) or both (Pmr1pD778A) (Wei et al. 1999; Mandal, Woolf, and Rao 2000) showed that the observed Golgi glycosylation defect in the *gdt1Δ/pmr1Δ* strains only resulted from a lack of intraluminal Golgi Mn²⁺ and not Ca²⁺. Our data suggest that the activity of Gdt1p in Golgi glycosylation becomes essential only when Pmr1p transports Ca²⁺. It should also be noted that the suppression of the glycosylation defect is more efficient in *pmr1Δ* strains complemented with Pmr1pQ783A under Ca²⁺ supplementation. Given the fact that the observed Golgi glycosylation defect was due to a lack of intraluminal Golgi Mn²⁺, our results highly suggest that in case where Pmr1p only transports Ca²⁺ from the cytosol to the Golgi lumen, Gdt1p is necessary to import Mn²⁺ inside the Golgi lumen by exchanging Ca²⁺. This model also explain why high environmental Ca²⁺ concentrations in *gdt1Δ* would lead to strong N-glycosylation deficiencies. When cytosolic Ca²⁺ concentration increases, Pmr1p favors the transport of Ca²⁺ in place of Mn²⁺. The Golgi luminal pool of Mn²⁺ is then rapidly depleted if Gdt1p is not there to efficiently import Mn²⁺ inside the Golgi lumen. Given the fact that a lack of Pmr1p leads to strong Golgi glycosylation defects, our results suggest that in physiological conditions, Pmr1p

preferentially import Mn^{2+} instead Ca^{2+} into the Golgi lumen. In such conditions, the role of Gdt1p, at least in Golgi glycosylation, is completely dispensable. Would that suggest that Gdt1p use the Golgi Mn^{2+} gradient generated by Pmr1p to import cytosolic Ca^{2+} inside the Golgi lumen? The question is completely open. As many antiport transporters can work in reverse if the gradient concentration of the driving ion is reversed, we can reasonably postulate that Gdt1p may also work in both directions. As our results show that the requirement of Gdt1p in Golgi glycosylation depends on the nature of the ion transported by Pmr1p, we then propose that Gdt1p would be the leak channel of Pmr1p.

5. Acknowledgements

This work was supported by grants from Agence Nationale de la Recherche (SOLV-CDG project to F.F.), Mizutani Grant (to F.F.) and EURO-CDG-2 that has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under the ERA-NET Cofund action N° 643578. We are also indebted to Dr Dominique Legrand for the Research Federation FRABio (Univ. Lille, CNRS, FR 3688, FRABio, Biochimie Structurale et Fonctionnelle des Assemblages Biomoléculaires) for providing the scientific and technical environment conducive to achieving this work.

6. Conflict of interests

None.

7. References

- [1] F. Foulquier, M. Amyere, J. Jaeken, R. Zeevaert, E. Schollen, V. Race, R. Bammens, W. Morelle, C. Rosnoblet, D. Legrand, D. Demaegd, N. Buist, D. Cheillan, N. Guffon, P. Morsomme, W. Annaert, H.H. Freeze, E. Van Schaftingen, M. Vikkula, G. Matthijs, TMEM165 deficiency causes a congenital disorder of glycosylation, *Am. J. Hum. Genet.* 91 (2012) 15–26. doi:10.1016/j.ajhg.2012.05.002.
- [2] D. Demaegd, F. Foulquier, A.-S. Colinet, L. Gremillon, D. Legrand, P. Mariot, E. Peiter, E. Van Schaftingen, G. Matthijs, P. Morsomme, Newly characterized Golgi-localized family of proteins is involved in calcium and pH homeostasis in yeast and human cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) 6859–6864. doi:10.1073/pnas.1219871110.

- [3] A.-S. Colinet, P. Sengottaiyan, A. Deschamps, M.-L. Colsoul, L. Thines, D. Demaegd, M.-C. Duchêne, F. Foulquier, P. Hols, P. Morsomme, Yeast Gdt1 is a Golgi-localized calcium transporter required for stress-induced calcium signaling and protein glycosylation, *Sci. Rep.* 6 (2016) 24282. doi:10.1038/srep24282.
- [4] S. Potelle, W. Morelle, E. Dulary, S. Duvet, D. Vicogne, C. Spriet, M.-A. Krzewinski-Recchi, P. Morsomme, J. Jaeken, G. Matthijs, G. De Bettignies, F. Foulquier, Glycosylation abnormalities in Gdt1p/TMEM165 deficient cells result from a defect in Golgi manganese homeostasis, *Hum. Mol. Genet.* 25 (2016) 1489–1500. doi:10.1093/hmg/ddw026.
- [5] S. Potelle, E. Dulary, L. Climer, S. Duvet, W. Morelle, D. Vicogne, E. Lebredonchelle, M. Houdou, C. Spriet, M.-A. Krzewinski-Recchi, R. Peanne, A. Klein, G. DE Bettignies, P. Morsomme, G. Matthijs, T. Marquardt, V. Lupashin, F. Foulquier, Manganese-induced turnover of TMEM165, *Biochem. J.* (2017). doi:10.1042/BCJ20160910.
- [6] A. Schneider, I. Steinberger, A. Herdean, C. Gandini, M. Eisenhut, S. Kurz, A. Morper, N. Hoecker, T. Rühle, M. Labs, U.I. Flügge, S. Geimer, S.B. Schmidt, S. Husted, A.P.M. Weber, C. Spetea, D. Leister, The Evolutionarily Conserved Protein PHOTOSYNTHESIS AFFECTED MUTANT71 is Required for Efficient Manganese Uptake at the Thylakoid Membrane in Arabidopsis, *Plant Cell.* (2016) tpc.00812.2015. doi:10.1105/tpc.15.00812.
- [7] F. Brandenburg, H. Schoffman, S. Kurz, U. Krämer, N. Keren, A.P.M. Weber, M. Eisenhut, The Synechocystis Manganese Exporter Mnx Is Essential for Manganese Homeostasis in Cyanobacteria, *Plant Physiol.* 173 (2017) 1798–1810. doi:10.1104/pp.16.01895.
- [8] S. Munro, What can yeast tell us about *N*-linked glycosylation in the Golgi apparatus?, *FEBS Lett.* 498 (2001) 223–227. doi:10.1016/S0014-5793(01)02488-7.
- [9] E. Vinogradov, B. Petersen, K. Bock, Structural analysis of the intact polysaccharide mannan from *Saccharomyces cerevisiae* yeast using ¹H and ¹³C NMR spectroscopy at 750 MHz, *Carbohydr. Res.* 307 (1998) 177–183.
- [10] Y. Wei, V. Marchi, R. Wang, R. Rao, An N-terminal EF hand-like motif modulates ion transport by Pmr1, the yeast Golgi Ca(2+)/Mn(2+)-ATPase, *Biochemistry (Mosc.)*. 38 (1999) 14534–14541.
- [11] D. Mandal, T.B. Woolf, R. Rao, Manganese selectivity of pmr1, the yeast secretory pathway ion pump, is defined by residue gln783 in transmembrane segment 6. Residue Asp778 is essential for cation transport, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 23933–23938. doi:10.1074/jbc.M002619200.
- [12] D. Demaegd, A.-S. Colinet, A. Deschamps, P. Morsomme, Molecular evolution of a novel family of putative calcium transporters, *PloS One.* 9 (2014) e100851. doi:10.1371/journal.pone.0100851.
- [13] E. Dulary, S. Potelle, D. Legrand, F. Foulquier, TMEM165 deficiencies in Congenital Disorders of Glycosylation type II (CDG-II): Clues and evidences for roles of the protein in Golgi functions and ion homeostasis, *Tissue Cell.* (2016). doi:10.1016/j.tice.2016.06.006.

