



Université de Lille Sciences et Technologies

Ecole Doctorale Biologie-Santé (ED 446)

Thèse de doctorat d'Université

Présentée par

Moyira Osny AQUINO GIL

En vue de l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Lille, Sciences et Technologies
Spécialité Biochimie et Biologie Moléculaire

**Caractérisation de la *O*-GlcNAcylation et des OGTs chez
l'apicomplexe *Toxoplasma gondii* et les modèles végétaux
Arabidopsis thaliana et *Chlamydomonas reinhardtii*.**

Soutenue publiquement le 21 novembre 2018 devant la commission d'examen:

Rapporteurs :	Pr. Muriel Bardor Dr. Tarik Issad	Université de Rouen Normandie Institute Cochin de Paris
Examineurs :	Pr. Ikram El Yazidi Belkoura Pr. Ralph Schwarz Dr. Fabrice Wattebled Pr. Edgar Zenteno	Université de Lille Université de Marburg Université de Lille Universite Autonome de Mexique
Directeur de Thèse:	Pr. Tony Lefebvre	Université de Lille
Co-directeur de Thèse:	Dr. Yobana Pérez Cervera	Université Autonome d'Oaxaca

«Il faut rêver très haut, pour ne pas réaliser trop bas»

Alfred Capus.

A mes parents, Víctor et Luz.

Remerciements

Je remercie l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, dirigée par le Pr. Christophe D'Hulst, pour m'avoir ouvert les portes de ce grand laboratoire qui m'a permis de grandir tant sur le plan personnel que professionnel.

Je remercie tous les membres de mon comité de thèse, parmi lesquels mes deux rapporteurs, le Pr. Muriel Bardor et le Pr. Tarik Issad, pour leur lecture de mon manuscrit et le suivi régulier des progrès de mon sujet, notamment par leur présence au comité de suivi individuel.

Je remercie le Pr. Ralph Schwarz pour tous ses conseils et enseignements concernant la parasitologie, vous avez été une partie essentielle de ce travail, toujours au courant de nos expériences et d'une aide précieuse dans leur interprétation. Je me souviendrai toujours de nos échanges de connaissances autour d'une bonne tasse de café lors de vos visites au laboratoire et l'unité.

Merci également au professeur Fabrice Wattebled, qui grâce à sa grande expérience en glycobiologie végétale a permis l'étude de la deuxième partie de mes travaux. Merci pour votre aide.

Merci au Dr Edgar Zenteno d'avoir fait partie de ce long voyage qui, je l'espère, nous réunira à nouveau au Mexique ou ailleurs, merci pour toutes vos contributions.

Merci à la meilleure équipe de recherche, mes collègues du C9, avec qui j'ai eu l'immense chance de partager plus de trois années de joie, des sourires, du café et encore plus des sourires et plus de café. Annick, Anne-Sophie et Ikram, ma plus grande admiration va à vous trois, mes meilleurs exemples en tant que femmes de science et femmes de famille, je serai toujours reconnaissante pour chacun des mots avec lesquels elles m'ont soutenu et m'ont donné la force de continuer ce chemin. Un immense merci à Marlene, d'être toujours à l'écoute et d'avoir toujours su me reconforter quand c'était nécessaire, à tes côtés, j'ai toujours senti que ma maman était avec moi, merci pour toutes tes attentions et pour avoir partagé avec moi de merveilleux moments, avec ta famille et tes proches. Je

te remercie de tout mon cœur. Merci aussi à Céline, puisque t'as été une partie essentielle des travaux de clonages et de partage des jeudi bière sans bière.

À tous mes collègues au bureau et de payasse au labo depuis mon arrivée : à Agata, qui m'a ouvert les portes de sa maison et qui m'a donné tous ses attentions depuis mon arrivée, merci Agata car mes week-ends ont été plus agréables avec une famille aussi exemplaire que la tienne ; merci à mon cher Mattis, puisqu'avec toi les manips en protéomique et à la chambre froide ont été plus sympa, en mélangeant français, espagnol et allemand, tu es officiellement mon frère préféré ; à ma chère Steffi, merci pour chacun de tes conseils et pour ta patience lorsque j'en ai eu le plus besoin, je n'oublierai jamais les journées de travail et les petits moments de détente à la fin de la journée, en essayant toujours de partager les bonnes choses du labo et un peu plus que ça, merci d'être toujours près de moi ; à Ninon, le meilleur exemple de tranquillité et de perfection, merci de partager avec moi ces bons moments au bureau, toujours en train de rire (quoique moins toi que moi) de mes mauvaises blagues, merci de partager également tes meilleurs moments en tant que maman avec Bryan, avec toi cinq minutes sont suffisantes pour me regonfler ; et que te dire Maite, qui a été depuis mon arrivé au labo ma voisine de bureau, mon français et mon ch'ti ont beaucoup été améliorés grâce à tes corrections, les meilleurs moments café/thé/bière ont été en ta compagnie, merci Maite, parce que tu as été tellement habituée à mon humeur que ça ne m'étonnerais pas que tu adopte mon accent avec plein de coultoure ! Mes meilleurs vœux à toi, Sadia, tu as pris la meilleure des décisions en venant ici car tu ne trouveras jamais une équipe aussi magnifique que le nôtre, merci pour les moments partagés et pour nos longues discussions qui se sont souvent terminées par des séances de rigolade, pour ta persévérance et ton travail, qui t'amèneront où tu veux. Stephan?, merci pour les cours de français et un peu d'espagnol, tu es tombé au bon moment, puisque les conversations de filles ont eu une touche masculine, et grâce à ça, nous avons rigolés beaucoup plus, merci pour les moments de détente par ces conversations parfois hors de contexte ou initialement mal comprises (à cause de ma prononciation) toujours accompagnées de sourires, de café et de tentatives

échouées pour vider ma bouteille de tequila. James, Theo, Jeane, Louis, merci pour tous ces bons moments partagés.

Merci Pr Lefebvre, merci Tony pour toute ta patience et pour toujours avoir partager toutes tes connaissances, toujours disponible et à l'écoute de tes étudiants et de tous les personnes qui ont besoin de tes conseils, qu'ils soient scientifiques ou personnels, merci de m'avoir permis de partager avec toi ces trois ans et demi (et un peu plus, en incluant les visites au Mexique), ce temps passé me donnent la meilleure des récompenses, ton exemple restera toujours comme une de mes meilleures motivations de vie, merci de toujours me transmettre un peu de ton énergie, avec laquelle j'ai pu continuer sur cette route, qui n'a jamais été aussi facile mais bien allégée par conseils, avec toi j'ai découvert que les larmes sont interrompues avec une bonne tasse du café et une phrase qui m'as beaucoup marqué « s'il n y a pas de solution a une problème, ça veut dire que qu'il n'y avait pas du problème ». Ma gratitude et mon admiration pour le meilleur chef de laboratoire, et en corrigeant la phrase qui dit que derrière un grand homme, il y a une grande femme, je dirais que, à côté toi, il y a une grande femme, merci Vanessa.

Merci Dr. Yobana Pérez pour avoir été une partie essentielle d'inspiration à continuer dans la recherche, votre motivation, votre exemple et vos envies de démontrer que tout est possible si on le veut m'ont vraiment aidé.

Merci à l'équipe de Glycobiologie végétale, je serai toujours très reconnaissante pour l'accueil que vous m'avez donné et pour votre aide précieuse, merci beaucoup David, Adeline et Maud, Sylvain et ma chère Camille, à votre côté les formations doctorales ont été plus agréables et plus amusantes.

À Frédéric, un grand merci pour ta patience depuis que j'ai commencé à travailler sur le dosage de l'UDP-GlcNAc, je sais toujours que le câlin le plus sincère vient de toi, merci de m'encourager et de corriger mon accent franco-mexicain.

À Nao, ma japonaise préférée, avec qui j'ai toujours eu un moment pour parler et partager les bons et les mauvais passages de ma vie, merci pour tes conseils en spectrométrie de

masse et d'avoir toujours été à mes côtés, avec toi, je sais que même au loin, nous allons continuer à partager tous les petits instants. Bernadette, Elizabeth, merci de toujours sourire avec moi et de me donner autant d'énergie positive. Merci à toutes les personnes de cette unité de recherche.

Merci toujours à ma famille, à mes parents d'avoir toujours été avec moi bien qu'une grande distance physique nous sépare, je vous emmène toujours avec moi en pensée, vous êtes pour moi le meilleur et le plus grand exemple d'amour, cette thèse récompense en partie les efforts que vous avez consacrés à notre famille, que vous avez forgée et de lequel je suis si fière. A mes sœurs et mes neveux, cet effort est aussi pour vous.

Germain, une partie de ce chemin a été partagé avec toi, merci pour toute ta patience et toujours à continuer avec moi en partageant les bons et les mauvais moments. J'aimerai bien continuer cette balade de vie comme les balades aux montagnes, pas toujours facile, mais toujours ensemble, je t'embrasse très fort.

Enfin, merci à toutes les personnes avec qui j'ai partagé de petits ou grands moments au sein de l'Unité et à Lille. GRACIAS...

Sommaire

Avant-propos

Résumé

Abstract

Abréviations

Liste des figures

1. Généralités	1
1.1 La <i>O</i> - β -N-Acétyleglucosaminylation	1
1.1.1 La <i>O</i> -GlcNAcylation, une modification post-traductionnelle dynamique	1
1.1.2 Les fonctions biologiques de la <i>O</i> -GlcNAcylation.....	3
1.1.3 Les enzymes régulatrices de la <i>O</i> -GlcNAcylation	5
1.1.3.1 L'OGT.....	5
1.1.3.1.1 Les isoformes de l'OGT	8
1.1.3.1.2 L'OGT au travers de divers organismes biologiques.....	9
1.1.3.1.3 Les inhibiteurs de l'OGT.....	12
1.1.3.1.4 La protéolyse de HCF-1, nouvelle activité de l'OGT	14
1.1.3.1.5 La EOGT.....	14
1.1.3.2 La <i>O</i> - β -N-Acétyleglucosaminidase	15
1.1.3.2.1 Les isoformes de l'OGA.....	15
1.1.3.2.2 Quelques caractéristiques de l'OGA.....	16
1.1.3.2.3 Les inhibiteurs de l'OGA	17
1.1.4 Le substrat de l'OGT, l'UDP-GlcNAc, et la voie de biosynthèse des hexosamines .	18
1.1.5 Les différentes approches d'étude des protéines <i>O</i> -GlcNAcylées.....	20
1.1.5.1 Les anticorps et les lectines	21
1.1.5.1.1 Les anticorps.....	21
1.1.5.1.2 Les lectines.....	22
1.1.5.2 Utilisation de sucres radiomarqués et de la chimie-click.....	23
1.1.5.3 Prédiction des sites de <i>O</i> -GlcNAcylation par des outils bio-informatiques et détermination par spectrométrie de masse	24
1.1.5.3.1 Les outils bio-informatiques	24
1.1.5.3.2 La spectrométrie de masse.....	24
1.2 L'apicomplexe <i>Toxoplasma gondii</i>	26

1.2.1	Historique et classification.....	26
1.2.2	Organisation subcellulaire de <i>T. gondii</i>	26
1.2.3	Biologie de <i>T. gondii</i> et toxoplasmose	28
1.2.3.1	Cycle de vie de <i>T. gondii</i>	28
1.2.3.2	Epidémiologie de la toxoplasmose	29
1.2.4	Les modifications post-traductionnelles chez <i>T. gondii</i>	30
1.2.4.1	La N-glycosylation	31
1.2.4.2	La O-Fucosylation.....	31
1.2.4.3	La O-GlcNAcylation	32
1.2.4.4	La Phosphorylation	32
1.2.4.5	L'Acétylation	33
1.2.4.6	La Méthylation	34
1.2.4.7	L'Ubiquitination	34
1.2.4.8	La SUMOylation	34
1.3	L'apicomplexe <i>Plasmodium falciparum</i>	36
1.3.1	Historique et classification.....	36
1.3.2	Organisation subcellulaire de <i>P. falciparum</i>	36
1.3.3	Biologie de <i>P. falciparum</i> et paludisme	36
1.3.3.1	Cycle de vie de <i>P. falciparum</i>	36
1.3.3.2	Epidémiologie du paludisme.....	38
1.3.4	Les modifications post-traductionnelles chez <i>P. falciparum</i>	39
1.4	Les modèles végétaux <i>Arabidopsis thaliana</i> et <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	41
1.4.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	41
1.4.1.1	Généralités.....	41
1.4.1.1.1	Histoire et distribution géographique	41
1.4.1.1.2	Etapas de croissance.....	42
1.4.1.1.3	Le génome décrypté d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	43
1.4.2	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	44
1.4.2.1	Généralités.....	44
1.4.2.2	Biologie et cycle de vie.....	45
1.4.3	Les modifications post traductionnelles chez les plantes.....	46
1.4.3.1	La N-Glycosylation.....	46
1.4.3.2	La O-Glycosylation	49

1.4.3.3 La Phosphorylation	50
1.4.3.4 L'ubiquitination	50
1.4.3.5 La SUMOylation	51
1.4.3.6 Le glycosylphosphatidylinositol (GPI)	52
1.4.4 Quelques données de glycosylation chez <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	53
1.4.4.1 La O-Glycosylation	53
1.4.4.2 La N-glycosylation	53
1.4.5 Rôles de la O-GlcNAcylation, de SPINDLY et de SECRET AGENT chez les végétaux	54
1.4.5.1 Les enzymes SPINDLY (SPY) et SECRET AGENT (SEC)	54
1.4.5.2 Rôles de SPY et de SEC chez les plantes	56
1.4.5.2.1 En qualité de régulateurs négatifs de la voie de signalisation de la gibbérelline (GA)	56
1.4.5.2.2 En qualité de régulateur positif de la signalisation des cytokinines	57
1.4.5.2.3 Au cours du rythme circadien	58
1.4.5.2.4 En interaction avec les organismes hôtes	58
1.4.5.2.5 Par la régulation de l'activité des histones lysine méthyltransférases	59
1.4.5.2.6 SPY perd son statut d'OGT	59
2. Résultats des travaux personnels	61
2.1 La O-GlcNAcylation chez <i>Plasmodium falciparum</i>	61
2.2 Sujet de recherche 1 : Caractérisation moléculaire de la O-GlcNAcylation et de l'OGT chez l'apicomplexe <i>Toxoplasma gondii</i>	62
2.2.1 Contexte de l'étude	62
2.2.2 Objectifs du projet	63
2.2.3 Résultats	64
2.2.4 Discussion	69
2.3 Sujet de recherche 2: Mise en évidence de la O-GlcNAcylation et de l'OGT chez les modèles végétaux <i>Arabidopsis thaliana</i> et <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	73
2.3.1 Contexte de l'étude	73
2.3.2 Objectifs du projet	73
2.3.3 Résultats	74
2.3.3.1 Caractérisation de la O-GlcNAcylation chez <i>A. thaliana</i> par différentes approches protéomiques	74
2.3.3.2 Suivi de croissance des plantes sauvages et mutantes <i>sec</i> et <i>spy</i> d' <i>A. thaliana</i> cultivées en serre et en phytotron	76

2.3.3.3 Analyse en condition forcée d'activation d'HBP par culture d' <i>A. thaliana</i> en milieu gélosé	78
2.3.3.4 Production des protéines recombinantes SPY et SEC en cellules en culture	81
2.3.3.5 Résultats préliminaires concernant la caractérisation de la <i>O</i> -GlcNAcylation chez <i>C. reihnardtii</i>	82
2.3.4 Matériels et méthodes.....	84
2.3.4.1 Conditions de culture d' <i>Arabidopsis thaliana</i> en serre	84
2.3.4.2 Conditions de culture d' <i>Arabidopsis thaliana</i> en milieu gélosé	84
2.3.4.3 Extraction des protéines, SDS-PAGE et Western Blot.....	85
2.3.4.4 Marquage des protéines <i>O</i> -GlcNAcylées par réaction de chimie-click.....	85
2.3.4.5 Enrichissement des extraits végétaux sur sWGA-immobilisée sur billes d'agarose.....	86
2.3.4.6 Cinétique de croissance d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	86
2.3.5 Discussion.....	86
3. Conclusion générale.....	91
4. Références.....	95
Annexes.....	125
Annexe 1.....	126
Annexe 2.....	133
Annexe 3.....	145
Annexe 4.....	157

Avant-propos

Cette thèse de doctorat a été effectuée dans le cadre d'une cotutelle entre l'Université de Lille, Faculté des Sciences et Technologies, au sein de l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UGSF) à Villeneuve D'Ascq, France, encadrée par le Pr. Tony Lefebvre, et l'Institut Technologique de Oaxaca et l'Université Autonome de Oaxaca (UABJO), au sein du Centre de Recherche, Faculté de Médecine, à Oaxaca, Mexique, encadrée par le Dr. Yobana Perez Cervera.

Cette thèse a été financée par le Conseil National des Sciences et Technologies du Mexique (CONACyT) et a fait l'objet de plusieurs publications, présentations orales et par affiche, ainsi que d'une collaboration avec l'Université Philipps à Marburg.

I. Publications

Aquino Gil M, Pierce A, Perez-Cervera Y, Zenteno E and Lefebvre T. OGT: a short overview of an enzyme standing out from usual glycosyltransferases. *Biochemical Society Transactions* (2017) 45. 365-370. (Annexe 1)

Kupferschmid M., **Aquino-Gil M.**, Shams-Eldin H., Schmidt J., Yamakawa N., Krzewinski F., Schwarz R.T., Lefebvre T. Identification of O-GlcNAcylated proteins in *Plasmodium falciparum*. *Malaria Journal* (2017) 16:485. (Annexe 2)

Aquino-Gil M.O., Kupferschmid M., Shams-Eldin H., Schmidt J., Yamakawa N., Mortuaire M., Krzewinski F., Rolando C., Bray F., Pérez Campos E., Dubremetz J.F., Perez-Cervera Y., Schwarz R.T., Lefebvre T. Apart from rhoptries, identification of *Toxoplasma gondii's* O-GlcNAcylated proteins reinforces the universality of the O-GlcNAcome, *Frontiers in Endocrinology* (2018) 9. 450. (Annexe 3)

Congrès et communications

Communications orales

Aquino-Gil Moyira. zooGT sans véGT : « L'OGT sous toutes les coutures » Séminaire de l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle de Lille, Villeneuve d'Ascq, 29 Avril 2016.

Aquino-Gil Moyira, Kupferschmid Mattis, Schwarz Ralph, Krzewinski Frederic, Schmidt Jörg, Shams-Eldin Hossam, Yamakawa Nao, Perez-Cervera Yobana and Lefebvre Tony. Characterization of *O*-GlcNAcylation in the apicomplexans *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*. Protein *O*-GlcNAcylation in Health and Disease, London, United Kingdom, 08 Juillet 2016.

Kupferschmid Mattis, **Aquino-Gil Moyira** Schmidt Jörg, Shams-Eldin Hosam, Yamakawa Nao, Krzewinski Frédéric, Perez-Cervera Yobana, Schwarz Ralph T. and Lefebvre Tony. Identification of *O*-GlcNAcylated proteins in the apicomplexans *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii*. Joint Glycobiology Meeting 2016, Nijmegen, Netherland, 16-18 Septembre 2016.

Moyira Osny Aquino-Gil, Mattis Kupferschmid, Hosam Shams-Eldin, Jörg Schmidt, Nao Yamakawa, Frédéric Krzewinski, Stéphan Hardivillé, Edgar Zenteno, Christian Rolando, Fabrice Bray, Eduardo Pérez Campos, Jean-François Dubremetz, Yobana Perez-Cervera, Ralph T. Schwarz, Tony Lefebvre. "The identification of *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum* *O*-GlcNAcylated proteins reinforces the universality of the *O*-GlcNAcome". 5th International Conference on Parasitology and Microbiology". Paris, France, 12 et 13 Juillet 2018.

Communications affichées

Aquino-Gil Moyira, Vercoutter-Edouart Anne-Sophie, Baldini Steffi, Zenteno Edgar, Schwarz Ralph, Perez-Cervera Yobana, Lefebvre Tony. Molecular characterization of *O*-GlcNAcylation and OGT in the apicomplexan *Toxoplasma gondii*. Joint Glycobiology Meeting 2015, Lille, France, 25-27 Octobre 2015.

Aquino-Gil Moyira, Kupferschmid Mattis, Schmidt Jörg, Shams-Eldin Hosam, Yamakawa Nao, Krzewinski Frédéric, Perez-Cervera Yobana, Schwarz Ralph T. and Lefebvre Tony. Identification of O-GlcNAcylated proteins in the apicomplexans *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii*. Joint Glycobiology Meeting 2016, Nijmegen, Netherland, 16-18 Septembre 2016.

Aquino-Gil Moyira, Kupferschmid Mattis, Courseaux Adeline, Yamakawa Nao, Krzewinski Frederic, Hardivillé Stephan, Zachara Natasha, Dauvillée David, Wattebled Fabrice, Schwarz Ralph, Perez-Cervera Yobana and Lefebvre Tony. Characterization of the O-GlcNAcome in unusual models: the apicomplexans *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*, the *Brassicaceae Arabidopsis thaliana* and the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. Journée André Verbert (JAV), Villeneuve d'Ascq, 14 septembre 2017.

Aquino-Gil Moyira, Kupferschmid Mattis, Courseaux Adeline, Yamakawa Nao, Krzewinski Frederic, Hardivillé Stephan, Zachara Natasha, Dauvillée David, Wattebled Fabrice, Schwarz Ralph, Perez-Cervera Yobana and Lefebvre Tony. Characterization of the O-GlcNAcome in unusual models: the apicomplexans *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*, the *Brassicaceae Arabidopsis thaliana* and the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. 4ème Congrès Latino-Américain de Glycobiologie 2017, Mexico, Mexique, 04-07 octobre 2017.

II. Collaboration

Dans le cadre de mon sujet de thèse nous avons poursuivi une collaboration ouverte de longue date avec le Pr. Ralph Schwarz de l'Université Philipps à Marburg (Allemagne). Cette collaboration a été renforcée par l'accueil d'un étudiant en thèse de médecine, Mattis Kupferschmid, dans notre équipe. Ce dernier a développé avec mon concours tout une série d'analyses chez *Plasmodium falciparum*. Un article sur ce projet a été publié dans la revue *Malaria Journal*.

Résumé

La *O*-GlcNAcylation est une modification post-traductionnelle dynamique, dépendante de la disponibilité en nutriments. Elle consiste en l'addition de N-acétylglucosamine (GlcNAc) sur des résidus de sérine et de thréonine de protéines cytoplasmiques, nucléaires et mitochondriales. Les processus de *O*-GlcNAcylation sont catalysés par deux enzymes, la β -N-acétyl-D-glucosaminyltransférase, ou *O*-GlcNAc transférase (OGT), qui ajoute le sucre provenant du donneur de haute énergie UDP-GlcNAc, et de la β -N-acétyl-D-glucosaminidase, ou *O*-GlcNAcase (OGA), qui l'hydrolyse. Chez les mammifères, trois isoformes de l'OGT ont été décrites : une forme nucléocytoplasmique (ncOGT), une forme courte (sOGT) et une forme mitochondriale (mOGT). Notre équipe a rapporté l'existence de la *O*-GlcNAcylation chez *Toxoplasma gondii*, un parasite apicomplexe responsable d'un taux d'infection élevé chez les patients immunodéprimés, ainsi que l'activité d'une OGT mais dont on connaît relativement peu de choses. D'autre part, il avait été observé que les plantes exprimaient deux OGT distinctes, SPINDLY (SPY) et SECRET AGENT (SEC), capables d'interférer avec divers processus fondamentaux chez les végétaux, notamment le développement, le rythme circadien, le transport intracellulaire et la réponse aux hormones. Récemment, il est apparu que SPY était une *O*-Fucosyltransférase, perdant ainsi son statut d'OGT. *In fine*, peu de choses avaient été décrites concernant la *O*-GlcNAcylation et l'OGT chez ces organismes: le but de ma thèse a ainsi consisté à approfondir nos connaissances en ce domaine en nous focalisant sur les parasites, *T. gondii* et *P. falciparum*, la plante supérieure *A. thaliana* et l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*. En utilisant différentes approches biochimiques et protéomiques nous avons identifié tout un panel de protéines *O*-GlcNAcylées chez *T. gondii* et *P. falciparum*, ébauchant pour la toute première fois le *O*-GlcNAcome de ces parasites. La majorité des protéines identifiées comme *O*-GlcNAcylées chez ces apicomplexes avaient été décrites au préalable chez des eucaryotes supérieurs ; elles participent à l'organisation de la charpente cellulaire, à la réponse au stress, à la synthèse des protéines et au métabolisme. De manière plus originale, nos analyses ont révélé que

les protéines rhoptries, protéines nécessaires à l'invasion, sont glycosylées. Ensemble, ces données montrent qu'en dehors des protéines strictement spécifiques aux organismes, les protéines *O*-GlcNAcylées sont assez similaires chez les organismes vivants, révélant une certaine universalité du *O*-GlcNAcome. En ce qui concerne les modèles végétaux, nous avons identifié une OGT potentielle chez *C. reinhardtii* mais avons été surpris de constater que les niveaux de *O*-GlcNAcylation chez cet organisme ainsi que chez la plante *A. thaliana* étaient très faibles. Les phénotypes des mutants OGT de *C. reinhardtii* et *A. thaliana* ont été analysés et il en est ressorti assez peu de différence en comparaison aux souches sauvages. Nous avons ensuite tenté de forcer la voie de biosynthèse des hexosamines fournissant l'UDP-GlcNAc en cultivant *A. thaliana* dans des milieux de culture enrichis en glucosamine et en glutamine. Malgré cela il est apparu que les niveaux de *O*-GlcNAcylation restaient très faibles. Enfin, l'expression de SPY et SEC dans des cellules de mammifères en culture semble confirmer le fait que la première ne soit pas une OGT, et renforce l'idée que la seconde soit également dépourvue d'activité GlcNAc transférase. Ces derniers résultats remettent en question l'existence d'une *O*-GlcNAcylation chez les organismes végétaux et questionnent sur l'apparition et la diversification des OGTs au cours de l'évolution des espèces.

Abstract

O-GlcNAcylation is a dynamic post-translational modification, dependent upon nutrients availability. *O*-GlcNAcylation consists in the addition of a N-acetylglucosamine (GlcNAc) group on serine and threonine residues of proteins confined within the cytoplasm, the nucleus and the mitochondrion. *O*-GlcNAcylation processes are managed by two enzymes, the *O*- β -N-acetyl-D-glucosaminyltransferase, or *O*-GlcNAc transferase (OGT) that adds the sugar providing from the high-energy donor UDP-GlcNAc, and the β -N-acetyl-D-glucosaminidase, or *O*-GlcNAcase (OGA) that hydrolyzes it. In mammals, three isoforms of OGT have been described: a nucleocytoplasmic form (ncOGT), a short form (sOGT) and a mitochondrial form (mOGT). Our team reported the occurrence of *O*-GlcNAcylation in *Toxoplasma gondii*, an apicomplexan parasite responsible for elevated complications in immunocompromised patients, and the catalytic activity of OGT about which few things are known. In the other hand, plants express two distinct OGT, SPINDLY (SPY) and SECRET AGENT (SEC), capable to interfere with a variety of fundamental processes in vegetables, including development, circadian rhythm, intracellular transport and response to hormones. Recently, it was revealed that SPY is in fact an *O*-Fucosyltransférase, losing its OGT status. *In fine*, relatively few things have been described regarding *O*-GlcNAcylation and OGT in these organisms: therefore, the aim of my thesis was to go further into our knowledges in this field by focusing on the parasites *T. gondii* and *P. falciparum*, the higher plant model *Arabidopsis thaliana* and the unicellular algae *Chlamydomonas reinhardtii*. By using a panel of biochemical and proteomics approaches we identified a set of *O*-GlcNAcylated proteins in *T. gondii* and *P. falciparum*, outlining for the very first time the *O*-GlcNAcome of these parasites. The major part of these apicomplexan parasites' *O*-GlcNAcylated proteins were previously described in higher eukaryotes; they participate in the organization of cell shape, the response to stress, protein synthesis and metabolism. More original was the identification of rhoptries, proteins necessary for cell invasion. Together these data show that in margin to proteins strictly specific to organisms, *O*-GlcNAcylated proteins are rather similar amongst living beings, unveiling the universality

of the *O*-GlcNAcome. Concerning the plant models, we identified a putative OGT in *C. reinhardtii* but we were surprised to note that *O*-GlcNAcylation levels in this organism as for the plant *A. thaliana* were very low. The phenotypes of the *C. reinhardtii* and *A. thaliana* OGT mutants were analyzed but few differences were observed when compared to wild types. Then we tried to force the hexosamine biosynthetic pathway providing UDP-GlcNAc by culturing *A. thaliana* in glucosamine and glutamine enriched-media. Nevertheless, *O*-GlcNAcylation levels remained very low. Lastly, expression of SPY and SEC in mammal cultured cells seems to confirm that the former is not an OGT, and reinforces that the latter is also devoid of GlcNAc transferase activity. These last results question again the occurrence of *O*-GlcNAcylation in plants and about the apparition and the diversification of OGTs along species evolution.

Abréviations

Ac-CoA: acétylcoenzyme A	COS7: african green monkey fibroblast cells
ADN: acide désoxyribonucléique	CREB: cAMP response element binding protein
ADN-T: ADN de transfert	CTD: carboxy-terminal domain
AdoMet: S-adenosyl-méthionine	E3: Ubiquitine Ligase
AG: agamous	ECD: electron capture dissociation
AGI: Arabidopsis genome initiative	EGF: epidermal growth factor
AGM1: GlcNAc phosphomutase 1	EOGT: EGF domain specific OGT
AKT: protéine kinase B	ES: embryonic stem cells
AMP: adénosine monophosphate	FL: flowering locus
APTG1: abnormal pollen tube guidance1	FLS2: flagellin sensitive 2
ARN: acide ribonucléique	GA: gibbérelline
ATX1: Arabidopsis homolog of thritorax 1	GalNAz: N-azido-galactosamine
BEMAD: β -élimination suivie d'une addition de Michael de dithiothréitol	GalT: galactosyltransférase
BRI1: brassinosteroid insensitive 1	GFAT: glutamine:fructose-6-phosphate amidotransférase
BZR1: brassinazole resistant 1	GI: gigantea
CAZy: carbohydrate-active enzymes database	GlcN6P: glucosamine-6-phosphate
CDI: catalytic domain I	GlcNAc: N-Acétylglucosamine
CDII: catalytic domain II	GlcNAc6P: N-acétylglucosamine-6-phosphate
cgl: complex glycan less	GmaR: MogR antirepressor
CID: collision induced dissociation	GNPNAT1: glucosamine-6-phosphate N-acétyltransférase
CK: cytokinin	GnT1: N-acétylglucosaminyltransférase 1
CO: constans	
Col-0: columbia	

GPI: glycosylphosphatidylinositol	MAPK: mitogen-activated protein kinase
GR: récepteur des glucocorticoïdes	MCI: complexe membranaire interne
GT41: glycosyltransférase famille 41	MEF: mouse embryonic fibroblast
HAT: histone acétyltransferase	Mgea5: meningioma expressed antigen 5
HBP: hexosamine biosynthetic pathway	MHC: major histocompatibility complex
HCF-1: host cell factor-1	mOGT: mitochondrial OGT
HK: hexokinase	MTS: mitochondrial target sequence
HPLC: High Performance Liquid Chromatography	ncOGT: nucleocytoplasmic OGT
hOGT: human OGT	NF-κB: nuclear factor kappa B
HTLV-1: virus lymphotrope humain de type 1	OGA: <i>O</i> -β-N-acétylglucosaminidase
IgG: immunoglobuline de type G	OGT: <i>O</i> -β-N-acétyl-D-glucosaminyltransférase
IgM: immunoglobuline de type M	P78: sous-unités de 78 kDa
IntD: intervening domain	p110: sous-unités de 110 kDa
IRG: immunity-related GTPase	PcG: polycomb group gene
IRS: insulin receptor substrate	PDK1: phosphoinositide-dependent protein kinase 1
JAZ1: jasmonate-zim-domain protein 1	PEG: polyéthylène glycol
KAT: lysines acétyltransférase	PGI: phosphoglucose isomérase
KDAC: lysines désacétylase	PI3K: phosphoinositide 3-kinase
KOR1: korrigan 1	PIF: phytochrome interacting factor
KPHV: Kaposi sarcoma-associated herpes virus	PIP3: phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate
LC-MS/MS: liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry	Pol II: Polymerase II
IOGA: long OGA	PPi: pyrophosphate inorganique
LRR-RLK: leucine-rich repeat receptor-like kinase	PPO: PIP-binding activity of OGT
LTR: long terminal repeat sequence	PRMT: protéine arginine-méthyltransférase
	PVL: Psathyrella velutina lectin

RE: *reticulum* endoplasmique

RGA: repressor of gibberellin

ROP: rhoptrie

SDS-PAGE: sodium dodecyl-sulfate
polyacrylamide gel electrophoresis

SEC: secret agent

sOGA: short OGA

sOGT: short OGT

SPS: sucrose phosphate synthase

SPY: spindly

STZ: streptozotocine

SUMO: small ubiquitin-like modifier

sWGA: succinyl wheat germ agglutinin

Sxc: super sex combs

TAIR: the Arabidopsis information
resource

TPR: tétratricopeptide

UAP: UDP-N-acétylglucosamine
pyrophosphorylase

UDP: uridine diphosphate

UDP-GlcNAc: uridine-diphospho-N-
Acétylglucosamine

WB: western blot

WGA: wheat germ agglutinin

WHO: world health organisation

WS: Wassilewskija

Liste des figures

Figure 1. Le cycle de la *O*-GlcNAcylation.

Figure 2. Distribution de la *O*-GlcNAcylation et des OGTs chez différents organismes biologiques.

Figure 3. Alignement des séquences d'OGTs de différentes espèces.

Figure 4. Modèle de l'OGT humaine de pleine longueur et isoformes de l'OGT chez l'Homme

Figure 5. Structures chimiques de quelques inhibiteurs d'OGT.

Figure 6. Représentation tridimensionnelle de l'OGA, formes longue et courte de l'OGA.

Figure 7. Structures chimiques des inhibiteurs de l'OGA.

Figure 8. Voie de biosynthèse des hexosamines.

Figure 9. Structure de *Toxoplasma gondii* au stade tachyzoïte.

Figure 10. Cycle de vie de *Toxoplasma gondii*.

Figure 11. Cycle de vie de *Plasmodium falciparum*.

Figure 12. Représentation d'*Arabidopsis thaliana* et de sa distribution géographique.

Figure 13. Cycle de vie d'*Arabidopsis thaliana*.

Figure 14. *Chlamydomonas reinhardtii* observé au microscope.

Figure 15. Cycle de vie de *Chlamydomonas reinhardtii*.

Figure 16. Alignement des séquences protéiques AtSPY, AtSEC et CrSPY.

Figure 17. Caractérisation des protéines *O*-GlcNAcylées chez *T. gondii* par diverses approches.

Figure 18. Classification des protéines *O*-GlcNAcylées identifiées chez *T. gondii* selon leur fonction.

Figure 19. Localisation subcellulaire des principales protéines *O*-GlcNAcylées identifiées chez *T. gondii*.

Figure 20. Mise en évidence de la *O*-GlcNAcylation de certaines isoformes des protéines rhoptries exprimées chez *T. gondii* par enrichissement sur lectine de sWGA immobilisée sur billes et par chimie-click.

Figure 21. Les protéines rhoptries sont impliquées dans le processus d'invasion de la cellule hôte par *T. gondii*.

Figure 22. Analyse d'extraits totaux d'*A. thaliana* wt et mutant *sec* par Western blot.

Figure 23. A. Analyse des profils protéiques obtenus chez *A. thaliana* après réaction de chimie-click et analyse sur sWGA immobilisée.

Figure 24. Cinétique de croissance des différentes souches d'*A. thaliana* en serre.

Figure 25. Cinétique de croissance des différentes souches d'*A. thaliana* en phytotron.

Figure 26. Effet de la glucosamine sur la croissance des différentes souches d'*A. thaliana* cultivées en milieu gélosé.

Figure 27. Effet du Thiamet-G (Th-G) sur la croissance des différentes souches d'*A. thaliana* cultivées en milieu gélosé.

Figure 28. Effet du NaCl sur la croissance des différentes souches d'*A. thaliana* cultivées en milieu gélosé.

Figure 29. Analyse par Western blot anti-*O*-GlcNAc d'échantillons de la souche sauvage *Col-0* d'*A. thaliana* cultivée en milieu gélosé enrichi en glutamine ou en glucosamine.

Figure 30. Expression des protéines recombinantes hOGT, SEC et SPY en HEK 293.

Figure 31. Analyse d'extraits totaux de *C. reinhardtii* wt et mutant *spy-like* par Western blot.

Figure 32. Analyse des profils protéiques obtenus chez *C. reinhardtii* après réaction de chimie-click.

Figure 33. Test de nage sur gélose de *Chlamydomonas reinhardtii*, mutant *spy-like* et fond génétique sauvage (wt).

1. Généralités

1.1 La O-β-N-Acétylelucosaminylation

Les protéines sont d'importants effecteurs de l'ensemble des fonctions physiologiques cellulaires, leur rôle aussi bien dans l'environnement extracellulaire qu'intracellulaire est fondamental. La fonction même de ces protéines est finement régulée à plusieurs niveaux comprenant leur synthèse, leur dégradation, leur localisation intracellulaire, leurs interactions et leurs modifications co- et post-traductionnelles. Dans la longue liste de modifications post-traductionnelles on retrouve les glycosylations parmi lesquelles figure la O-GlcNAcylation.

1.1.1 La O-GlcNAcylation, une modification post-traductionnelle dynamique

C'est en étudiant la distribution des résidus de N-Acétylelucosamine à la surface des lymphocytes en 1984, que Gerald Warren Hart et Carmen Torres de l'Université Johns Hopkins à Baltimore ont mis en évidence pour la toute première fois une nouvelle forme de glycosylation, la O-β-N-Acétylelucosaminylation ou plus communément appelée O-GlcNAcylation (Torres & Hart 1984).

A la différence des glycosylations complexes, cette modification consiste en le transfert de N-Acétylelucosamine sur des résidus de sérine ou de thréonine des protéines cytoplasmiques, nucléaires et mitochondriales (Lefebvre & Issad 2015). La O-GlcNAcylation est dynamique et peut entrer en compétition avec la phosphorylation sur les mêmes résidus ou sur des résidus adjacents de l'axe polypeptidique (Wang *et al.*, 2008) (Figure 1). Néanmoins, comme nous le verrons plus loin, alors que la phosphorylation est régulée par une myriade de kinases et de phosphatases, la O-GlcNAcylation n'est contrôlée que par un couple unique d'enzymes (Fig. 1).

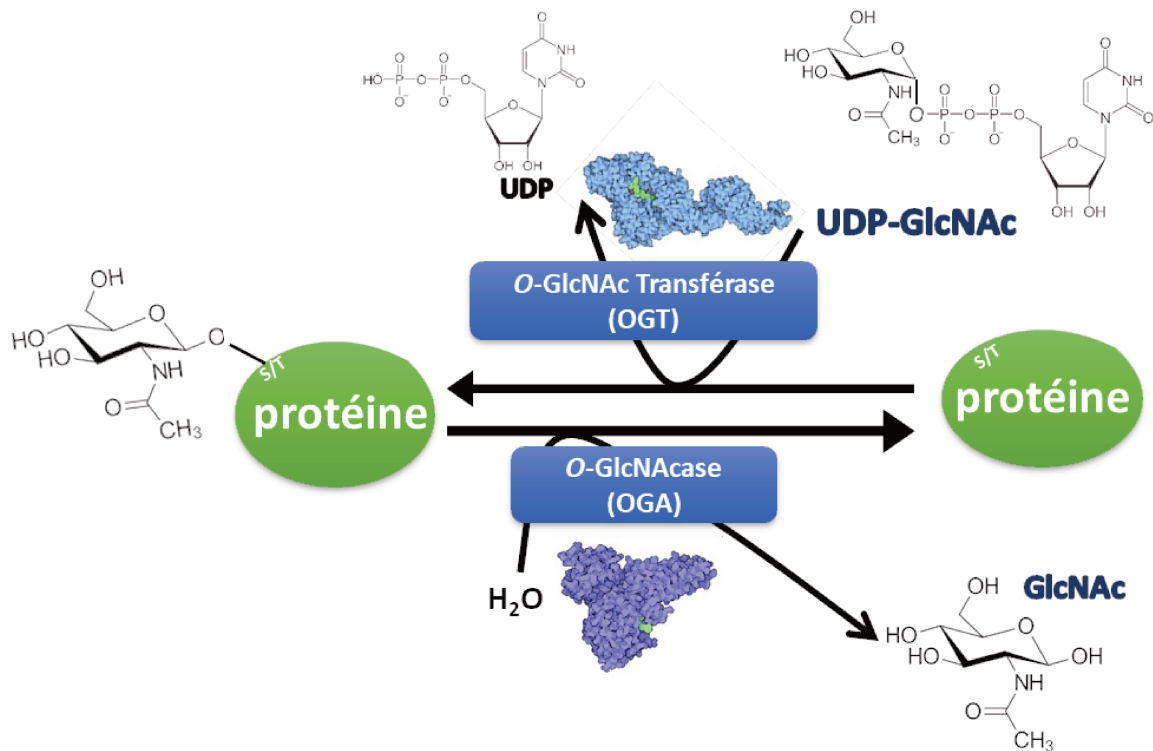


Figure 1. Le cycle de la O-GlcNAcylation. L'OGT, glycosyltransférase nucléocytoplasmique et mitochondriale, catalyse le transfert d'un résidu GlcNAc à partir du donneur UDP-GlcNAc sur des résidus spécifiques de sérine ou de thréonine de protéines cibles. Ce processus est dynamique : une glycosylhydrolase appelée O-GlcNAcase (OGA) clive le résidu de GlcNAc, le résidu d'acide aminé hydroxylé est déglycosylé.

Depuis sa découverte, la O-GlcNAcylation a émergé comme une modification post-traductionnelle très répandue au sein de différents organismes biologiques: on la retrouve en effet chez l'homme et plus largement les mammifères et animaux (Hanover 2001), les insectes (Gambetta *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2015), les nématodes (Hanover *et al.*, 2005; Schmidt *et al.*, Baumeister, 2007; Guo *et al.*, 2014), les apicomplexes (Banerjee *et al.*, 2009; Perez-Cervera *et al.*, 2011; Kupferschmid *et al.*, 2017), les bactéries (Shen *et al.*, 2006; Ostrowski *et al.*, 2015), les virus (Kim *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2005; Fernandez-Fernandez *et al.*, 2002; Pérez *et al.*, 2006) et les plantes (Hartweck *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2005; Hartweck *et al.*, 2006; Olszewski *et al.*, 2010; Zentella *et al.*, 2016) (Fig. 2).

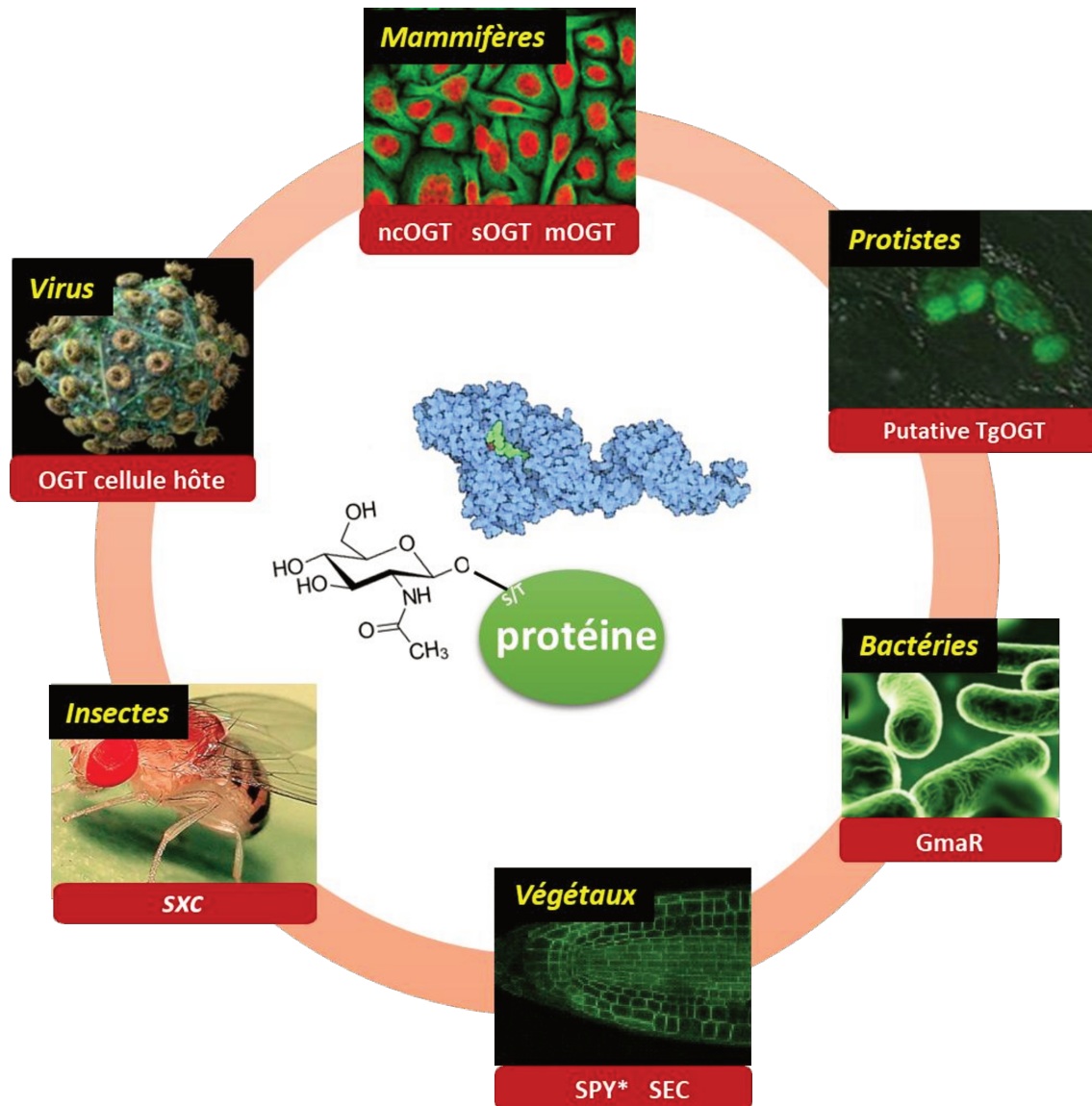


Figure 2. Distribution de la O-GlcNAcylation et des OGTs chez différents organismes biologiques. Le nom de l'OGT de chaque organisme est indiqué dans le cadre rouge. OGT, O-GlcNAc transférase ; ncOGT, nucleocytoplasmic OGT ; sOGT, short OGT ; mOGT, mitochondrial OGT ; TgOGT, *Toxoplasma gondii* OGT ; sxc, super sex combs ; GmaR, MogR antirepressor.

1.1.2 Les fonctions biologiques de la O-GlcNAcylation

La O-GlcNAcylation joue un rôle fondamental dans de nombreux processus cellulaires, comme l'atteste l'interférence sur l'expression de l'OGT qui diminue la prolifération, l'adhésion, et la migration de cellules tant normales que cancéreuses issues de colon humain (Steenackers *et al.*, 2016). L'OGT est aussi nécessaire pour la reprise du cycle

cellulaire et sa progression (Tan *et al.*, 2017), elle intervient également dans la signalisation cellulaire (Cork *et al.*, 2018). Ainsi, l'inhibition pharmacologique de l'OGT bloque la synthèse de la Cycline D1 par un processus pour le moment mal compris, et retarde l'activation des voies des PI3K/Akt et MAPK (Olivier-van Stichelen *et al.*, 2012).

La O-GlcNAcylation régule l'expression génique (Brimble *et al.*, 2010). En ce sens, bon nombre de facteurs de transcription sont O-GlcNAcylés, cette modification se répercutant directement sur l'activation et la répression transcriptionnelle (Lewis, 2013). NF- κ B (nuclear factor kappa B) en est un exemple précis: la O-GlcNAcylation favorise sa translocation nucléaire, sa liaison à l'ADN ainsi que son activité transcriptionnelle (Kim *et al.* 2015). En revanche, le récepteur des glucocorticoïdes (GR) peut se lier directement à NF- κ B, recruter l'OGT qui réprime l'activité de NF- κ B (Li *et al.*, 2012). L'ARN polymérase II (Pol II) est elle-même modifiée par O-GlcNAcylation (Lewis, Burlingame and Myers, 2016). La O-GlcNAcylation de Pol II sur son domaine carboxy-terminal (CTD) est important pour l'assemblage de complexes de pré-initiation aux sites de transcription, tandis que la dé-O-GlcNAcylation du CTD de Pol II promeut sa phosphorylation au cours de l'initiation et de l'élongation transcriptionnelle (Lewis *et al.*, 2016).

La O-GlcNAcylation est impliquée dans la régulation de la signalisation de l'insuline. La liaison de l'insuline sur son récepteur induit une autophosphorylation et une phosphorylation subséquente de résidus tyrosine de l'IRS (insulin receptor substrate). IRS phosphorylé active la phosphoinositide 3-kinase (PI3K), qui catalyse la production de phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PIP3). En réponse à une stimulation prolongée de l'insuline, l'OGT se déplace du noyau vers le cytoplasme et se localise sur la membrane plasmique en se liant à PIP3, ce qui conduit à la régulation de la voie de l'insuline (Yang *et al.*, 2008). En effet, l'OGT modifierait certains composants de la voie de l'insuline tels que IRS1, PI3K, PDK1 et AKT, bloquant leur phosphorylation et/ou leurs interactions, les inactiverait, et faciliterait ainsi la terminaison de la transduction du signal de l'insuline. Mon équipe a montré qu'en réponse à l'insuline, l'OGT était plus précisément adressée aux microdomaines lipidiques (Perez-Cervera *et al.*, 2013).

Au-delà de la réponse à l'insuline, tout laisse à penser que d'autres hormones régulatrices du métabolisme (glucagon ou ghréline par exemple) modulent également la signalisation par O-GlcNAcylation dans divers types de cellules et tissus (Yang & Qian 2017).

1.1.3 Les enzymes régulatrices de la O-GlcNAcylation

A différence de la phosphorylation, la O-GlcNAcylation est contrôlée par un couple unique d'enzymes, la O- β -N-Acétylglucosaminyltransférase, O-GlcNAc transférase (OGT), qui ajoute le résidu de N-acétylglucosamine à partir du substrat uridine-diphospho-N-Acétylglucosamine ou UDP-GlcNAc, produit final de la voie de biosynthèse des hexosamines (HBP), et la O- β -N-Acétylglucosaminidase, O-GlcNAcase (OGA), qui hydrolyse les résidus de GlcNAc des protéines cibles (Zachara *et al.*, 2017).

1.1.3.1 L'OGT

L'OGT a été purifiée pour la toute première fois à partir d'extraits de protéines cytosoliques de foie de rat en tant qu'hétérotrimère composé de deux sous-unités de 110 kDa (p110) et d'une sous-unité de 78 kDa (p78) (Haltiwanger *et al.*, 1992). Par la suite, le clonage et la caractérisation du gène codant la sous-unité p110 ont été effectués (Kreppel *et al.*, 1997); il est alors apparu que l'OGT était hautement conservée au cours de l'évolution (Figure 3).



Figure 3. Alignement de séquences d'OGTs de différentes espèces. Les OGT exprimées chez différentes espèces telles que *Sus scrofa*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Toxoplasma gondii* et *Cryptosporidium parvum* présentent des analogies de séquences relativement conservées en comparaison à l'OGT de pleine longueur exprimée chez *Homo sapiens*. Cependant, SEC et SPY exprimées chez *Arabidopsis thaliana* présentent une analogie plus faible.

L'OGT est une glycosyltransférase qui fait partie de la famille GT41, en accord avec la classification de la base de données CAZy (Carbohydrate-Active EnZymes database) (EC 2.4.1.255) (Wrabl & Grishin 2001). L'OGT est une enzyme de type Leloir (Caputto *et al.*, 1950) qui caractérise les enzymes utilisant les nucléotides comme substrat: c'est le cas des glycosyltransférases nécessitant des nucléotides sucres pour les processus de glycosylation.

L'OGT adopte un repliement de type GT-B (Clarke *et al.*, 2008), une structure caractérisée par deux motifs de type Rossmann (alternance $\beta/\alpha/\beta$) dans laquelle la région de liaison de l'UDP-GlcNAc se localise entre les deux motifs. Par ailleurs, l'OGT partage une homologie avec la famille glycogène phosphorylase/glycosyltransférase (Wrabl & Grishin 2001). Il a également été démontré que l'OGT est codée par un gène unique localisé sur le chromosome X au locus Xq13.1, à proximité du site d'inactivation du chromosome X (Shafi *et al.*, 2000; Hanover *et al.*, 2003; Merchant *et al.*, 2010; Olivier-van Stichelen, Abramowitz and Hanover, 2014).

Comme nous allons le voir ci-dessous, l'OGT se subdivise en deux régions: une région N-terminale formée à partir d'une série de répétitions tétratricopeptidiques (TPRs), et une région C-terminale portant le domaine catalytique de la glycosyltransférase (Fig. 4).

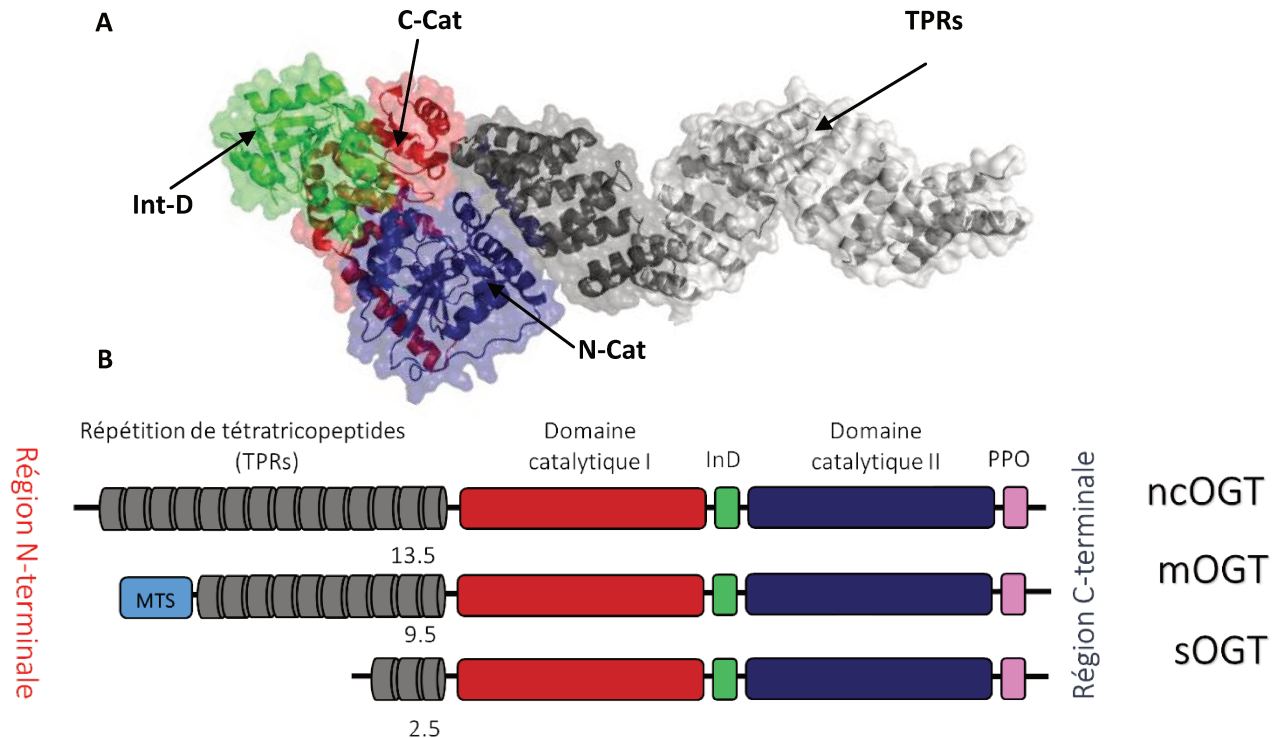


Figure 4. A. Modèle de l'OGT humaine de pleine longueur. Les domaines catalytiques sont représentés en rouge et bleu, les domaines TPRs en gris et le domaine supplémentaire Int-D de fonction inconnue est en vert (Janetzko & Walker 2014). **B. Isoformes de l'OGT chez l'Homme.** ncOGT, nucleocytoplasmic OGT ; sOGT, short OGT ; mOGT, mitochondrial OGT possédant respectivement 13.5, 9.5 et 2.5 domaines TPR (tétratricopeptides, vert), deux domaines catalytiques I (rouge) et II (bleu), un domaine d'intervention IntD de fonction inconnue (violet) et un domaine PPO (PIP-binding activity of OGT, rose) permettant la liaison de l'OGT aux phosphoinositides.

1.1.3.1.1 Les isoformes de l'OGT

Trois isoformes ont été décrites pour l'OGT: une forme nucléocytoplasmique de 110 kDa (ncOGT), une forme courte de 75 kDa (sOGT) et une forme mitochondriale de 103 kDa (Hanover *et al.*, 2003; Levine & Walker 2016) (Fig. 4).

La région N-terminale contient des répétitions de 34 acides aminés, les TPRs, ce nombre caractérisant les différents isoformes de l'OGT: 13.5 pour la ncOGT, 9.5 pour la mOGT et 2.5 TPRs pour la forme courte, sOGT. Les TPRs sont disposés sous la forme d'une superhélice adjacente au site actif. Ils interviennent dans les interactions protéiques et sont nécessaires pour la reconnaissance de certains substrats (Pathak *et al.*, 2015).

La région C-terminale des trois isoformes de l'OGT porte l'activité glycosyltransférase (Janetzko & Walker 2014; Vocadlo, 2012). Cette région C-terminale contient les deux domaines catalytiques: le domaine catalytique I (CDI ou N-cat) et le domaine catalytique II (CDII ou C-cat). Ces deux domaines sont séparés par le domaine d'intervention Int-D dont la fonction reste à démontrer (Roos & Hanover 2000; Wrabl & Grishin 2001) (Fig. 4). Le processus catalytique de l'OGT suit un mécanisme de type bi-bi ordonné.

Bien que l'OGT se localise principalement au cytosol et au noyau, en réponse à l'insuline, cette enzyme est adressée à la membrane plasmique où elle interagit avec le PIP3 via le domaine PPO (Yang *et al.*, 2008) (Fig. 4). Comme précédemment mentionné, en réponse à la stimulation hormonale, l'OGT réside au sein des microdomaines lipidiques (Perez-Cervera *et al.*, 2013). Il est proposé que l'interaction entre l'OGT et les microdomaines lipidiques soit sous le contrôle de la voie de signalisation PI3K/KT et qu'en retour cette même interaction régule la voie mitogénique.

L'OGT mitochondriale, mOGT, possède une séquence MTS (Mitochondrial target sequence) de localisation mitochondriale. La mOGT n'est exprimée que chez certaines primates et, contre toute attente, ne semble pas nécessaire à la O-GlcNAcylation des protéines mitochondriales (Trapannone *et al.*, 2016).

Une forme courte, la sOGT, est également exprimée dans le cytosol et le noyau (Lazarus *et al.*, 2009).

1.1.3.1.2 L'OGT au travers de divers organismes biologiques

L'OGT est une enzyme quasi universelle puisqu'on la retrouve aussi bien chez les animaux et les plantes que les protistes et certaines bactéries (Aquino-Gil *et al.*, 2017) (Fig. 2). Néanmoins il semblerait que son caractère fondamental ne soit pas inscrit au même niveau dans toutes les espèces: chez l'animal elle est nécessaire très tôt au cours de l'embryogenèse et est indispensable à la viabilité des cellules ES (Shafi *et al.*, 2000) tout comme chez la plante *Arabidopsis thaliana* où le double mutant *sec/spy* (deux formes préalablement décrites d'OGT, SPY pour SPINDLY et SEC pour SECRET AGENT, SPY ayant depuis été redéfinie comme une O-Fucosyltransférase comme nous le verrons un peu plus

loin), montre un phénotype létal à l'état embryonnaire alors que le mutant simple *sec* ne semble pas avoir de phénotype particulier (Hartweck *et al.*, 2002). La perte de son activité n'a pas d'effet délétère chez *Caenorhabditis elegans* (mutant *ogt-1 null*), le nématode montrant un phénotype normal et restant fertile (Wang *et al.*, 2012).

Fait remarquable et pour le moins surprenant avec le recul pris sur l'ensemble de ces observations, en 1984, c'est-à-dire la même année que la découverte de la *O*-GlcNAcylation (Torres and Hart, 1984), Ingham décrivait le gène homéotique *sxc* (*super sex combs*) essentiel à l'embryogenèse et au développement cellulaire chez *Drosophila melanogaster* (Ingham, 1984). *sxc* fait partie du groupe de gènes répresseurs Polycomb (PcG) et code une OGT (Gambetta *et al.*, 2009). Dans ce groupe on retrouve la protéine *Polyhomeotic polycomb* comme *O*-GlcNAcylée. Ainsi, il a été montré que l'OGT est impliquée dans la répression transcriptionnelle via PcG chez *Drosophila melanogaster*.

Listeria monocytogenes est la première bactérie pour laquelle une protéine *O*-GlcNAcylée a été identifiée (Schirm *et al.*, 2004). Il s'agit de flagelline globulaire, un des principaux éléments du flagelle, indispensable pour la colonisation et la virulence bactérienne. Un peu plus tard, une glycosyltransférase capable de *O*-GlcNAcyler la flagelline a été identifiée (Shen *et al.*, 2006). Cette enzyme nommée GmaR est en complexe avec le répresseur MogR et est impliquée dans l'anti-répression de la transcription de gènes de la motilité flagellaire. GmaR est par conséquent un élément bifonctionnel permettant l'expression de ses gènes cibles et leur *O*-GlcNAcylation subséquente (Shen *et al.*, 2006).

Une seconde OGT procaryote a été identifiée chez l'eubactérie thermophile *Thermobaculum terrenum* ; il s'agit de TtOGT (Ostrowski *et al.*, 2015). En revanche, et contrairement à GmaR, aucune activité enzymatique glycosyltransférase *in vitro* n'a été prouvée pour TtOGT alors qu'une activité bactériostatique a été observée après utilisation de l'Ac₄-5SGlcNAc (Gloster *et al.*, 2011), inhibiteur de l'OGT (pas chez *Bacillus subtilis* de manière surprenante). Une activité OGA chez cette même bactérie est néanmoins mesurable (Ostrowski *et al.*, 2015). Ainsi, et malgré l'absence d'activité OGT notable chez *T. terrenum*, il semblerait que le cycle de la *O*-GlcNAcylation existe chez les bactéries, *T.*

terrenum pouvant servir de modèle minimal ou réductionniste pour l'étude de cette modification.

La caractérisation moléculaire des OGTs chez les protistes a été abordée par Banerjee et collaborateurs en prédisant les gènes putatifs *ogt* chez *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, *Toxoplasma gondii* et *Dictyostelium discoideum* (Banerjee *et al.*, 2009). Ces gènes portent tous des domaines TPRs et un domaine catalytique proche de SPY. Un peu plus tard, mon équipe d'accueil a démontré la présence de la O-GlcNAcylation chez *Toxoplasma gondii* et *Plasmodium falciparum* (Perez-Cervera *et al.*, 2011). Ces observations sont en partie en accord avec celles de Banerjee et collaborateurs (Banerjee *et al.*, 2009), bien que l'expression de l'OGT chez *Plasmodium falciparum* n'ait pas été élucidée. De plus, l'OGT de *T. gondii* reste une énigme puisque la séquence SPY partageant le plus d'homologie avec la glycosyltransférase de l'apicomplexe a été reconsidérée: SPY code une O-Fucosyltransférase et non pas une OGT (Zentella *et al.*, 2017). La séquence codant l'OGT chez *T. gondii* reste par conséquent à définir.

Chez les virus il existe tout un ensemble de protéines O-GlcNAcylées comme démontré pour la première fois pour la fibre d'adénovirus de sérotype-2 (Caillet-Boudin *et al.*, 1989). Parmi les 85 protéines codées par le virus de l'herpès associé au sarcome de Kaposi (KSHV), 18 ont été démontrées comme O-GlcNAcylées (Jochmann *et al.*, 2013). Récemment, une étude a porté sur l'oncoprotéine virale Tax jouant un rôle clé dans la réplication du rétrovirus lymphotrope humain de type 1 (HTLV-1) (Groussaud *et al.*, 2017). Tax promeut le recrutement de CREB (cAMP Response Element Binding Protein) au niveau d'éléments de réponse à l'AMP cyclique favorisant sa propre expression. Dans des cellules transformées par HTLV-1, une plus forte expression de l'OGA est observée, tant au niveau des transcrits que des protéines, avec une activité moindre de l'enzyme et sans noter de différence pour l'OGT. D'un point de vue moléculaire, les auteurs ont démontré que Tax, l'OGA et l'OGT étaient des partenaires d'interaction bloquant l'activité catalytique de l'OGT interagissant avec l'OGA. L'inhibition de l'OGA favorise la O-GlcNAcylation de CREB ainsi que son recrutement au LTR (Long Terminal Repeat sequence), tout comme l'OGA et

l'OGT. Cette étude met en lumière un nouveau dialogue moléculaire entre le complexe d'assemblage de la protéine Tax et les processus de *O*-GlcNAcylation.

Bien évidemment les virus n'exprimant pas leur propre OGT, les protéines virales sont modifiées par une glycosyltransférase de la cellule hôte. Ceci a pu être démontré par exemple pour la protéine de capsid du *Plum pox* virus portant des résidus de *O*-GlcNAc dans le domaine N-terminal (Fernandez-Fernandez et al. 2002): c'est SEC, l'OGT végétale, qui est responsable de cette modification (Chen et al. 2005).

1.1.3.1.3 Les inhibiteurs de l'OGT

Comme pour toutes les enzymes, et plus largement les protéines à activité biologique, l'utilisation d'inhibiteurs puissants et spécifiques de l'OGT sont d'un intérêt précieux pour mieux comprendre le rôle de la *O*-GlcNAcylation dans les différents systèmes biologiques (Gross et al., 2005; Gloster & Vocadlo, 2010).

Plusieurs inhibiteurs ont ainsi été décrits pour l'OGT. Tout d'abord, l'agent diabétogène alloxane, premier inhibiteur décrit, est un analogue de l'uracile (Konrad et al., 2002) (Fig.5). L'alloxane a été utilisé tout d'abord dans les cellules bêta pancréatiques qui se caractérisent par une expression importante d'OGT. Il est suggéré que l'alloxane entre en compétition directe avec l'UDP-GlcNAc au niveau du domaine de liaison de l'OGT. En revanche, sa faible spécificité et sa haute cytotoxicité n'ont permis qu'une utilisation ultérieure limitée (Dehennaut et al., 2007).

Afin de combler ce manque, l'équipe de Suzanne Walker de l'Université de Harvard, a développé un système d'identification de molécules potentiellement inhibitrices de l'OGT basé sur le déplacement d'analogues structuraux fluorescents (polarisation de fluorescence) (Gross et al., 2005). L'application de cette technique à une OGT produite chez *E. coli* a permis d'identifier une centaine de structures à activité inhibitrice parmi une chimiothèque de plus de 64.000 composés. Des études plus précises ont permis d'en retenir 19, l'un d'entre eux, un dérivé de la benzoxazolinone, ayant été utilisé avec succès en ovocyte de xénope (Dehennaut et al., 2007).

Plus tard, un analogue synthétique de la N-acétylglucosamine, le 5SGlcNAc et son dérivé perméable aux cellules l'Ac₄-5SGlcNAc ont montré une certaine efficacité du fait de la diminution importante des niveaux de O-GlcNAc des cellules traitées (Gloster *et al.*, 2011) (Fig. 5). Des expériences *in vitro* ont révélé que ces composants généraient l'UDP-5SGlcNAc au travers de la voie de sauvetage de l'UDP-GlcNAc (Gloster *et al.*, 2011). L'UDP-5SGlcNAc est, d'un facteur quatorze, plus mauvais substrat pour l'OGT que l'UDP-GlcNAc. De manière tout à fait intéressante, des analyses sur des dérivés pMP (para-méthoxyphényl) ont indiqué que le 5SGlcNAc transféré à la protéine cible serait hydrolysé plus rapidement qu'un résidu GlcNAc classique.

OSMI-1 ((α R)- α -[[[1,2-Dihydro-2-oxo-6-quinoliny]sulfonyl]amino]-N-(2-furanylméthyl)-2-méthoxy-N-(2-thiénylméthyl)-benzène-acétamide) a été décrit comme une petite molécule perméable aux cellules et inhibiteur de l'OGT (Ortiz-Meoz *et al.*, 2015) (Fig. 5). D'après les auteurs, OSMI-1 n'affecte pas les glycosylations complexes contrairement à l'Ac₄-5SGlcNAc qui, entre les mains des auteurs, semblait affecter les O-Glycanes de type mucine et autres glycanes de la surface cellulaire.

Dans le même but, les inhibiteurs d'OGT bi-substrats de type *goblins* miment le peptide accepteur (VTPVSTA) couplé à l'UDP pour lequel la partie GlcNAc-pyranoside a été éliminée (Borodkin *et al.*, 2014) (Fig. 5). Malheureusement, le manque de perméabilité aux cellules des *goblins*-1 et -2 limite leur utilisation dans les différents modèles biologiques.

Plus récemment, un dérivé d'amentoflavone, le L01, tout d'abord décrit comme le principal composé anti-inflammatoire (Selvam & Jachak 2004) extrait de la graine de *Semecarpus anacardium*, anacardier donnant la noix de cajou, a été reconnu comme le premier inhibiteur naturel d'OGT à partir d'un criblage virtuel sur 61.000 molécules (Y. Liu *et al.*, 2017) (Fig. 5). Son efficacité inhibitrice a ensuite été évaluée sur cellules COS7 et HeLa, et sur des embryons de poisson zèbre ce qui a permis de montrer sa faible toxicité, faisant du L01 une molécule tout à fait prometteuse en termes d'étude des processus de O-GlcNAcylation.

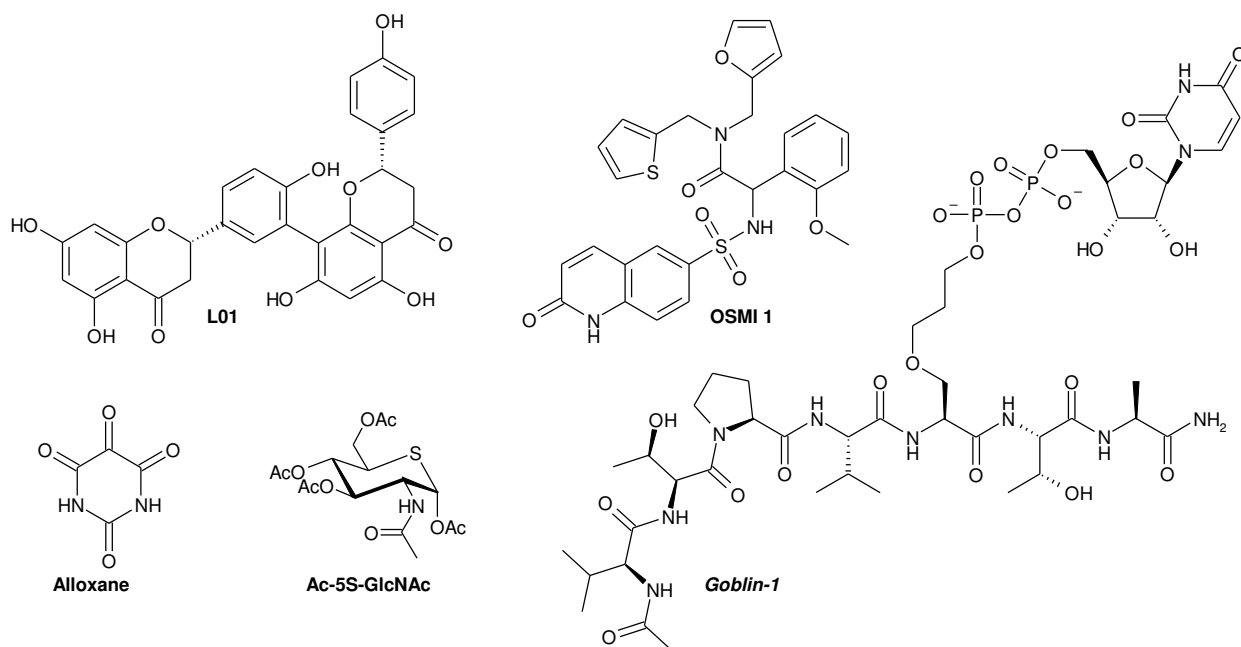


Figure 5. Structures chimiques de quelques inhibiteurs d'OGT.

1.1.3.1.4 La protéolyse de HCF-1, nouvelle activité de l'OGT

En 2011, Capotosti et collaborateurs ont démontré qu'en plus de porter une activité de transfert de résidus de GlcNAc sur les protéines cibles, l'OGT était également dotée de propriétés de clivage protéolytique envers le régulateur de cycle cellulaire HCF-1 (Host cell factor-1) (Capotosti *et al.*, 2011). Le clivage de HCF-1 en deux fragments N- et C-terminaux et sa GlcNAcylation concomitante sont nécessaires à l'entrée et à la sortie de phase G1, ainsi qu'à la progression en phase M (Kötzler & Withers 2016). HCF-1 contient des séquences de 20-26 acides aminés localisés dans la partie centrale et nécessaires pour le clivage protéolytique et la glycosylation par l'OGT (Janetzko & Walker 2014; Kapuria *et al.*, 2016). L'OGT transfère un résidu de GlcNAc sur un glutamate pour former un premier intermédiaire GlcNAc-Glu à l'aide d'une liaison glycosyl-ester, le résidu GlcNAc est ensuite libéré, un pyroglutamate est généré (intermédiaire 2), et le clivage de HCF-1 s'effectue (Janetzko *et al.*, 2016).

1.1.3.1.5 La EOGT

L'existence d'une O-GlcNAcylation extracellulaire a été caractérisée il y a quelques années (Sakaidani *et al.* 2011). Cette nouvelle forme de glycosylation est gouvernée par l'EOGT

(EGF-domain specific OGT) laquelle réside dans le *reticulum* endoplasmique. La première évidence de l'EOGT a été rapportée chez *Drosophila melanogaster* (Sakaidani *et al.*, 2011) et depuis d'autres études ont démontré sa présence chez le porc *Sus scrofa* (Nagnan-Le Meillour *et al.*, 2014). L'EOGT ne possède pas d'homologie particulière avec l'OGT nucléocytoplasmique ou mitochondriale, mais cependant partage 19,4% d'identité avec la β 2-xylosyltransferase exprimée par *Arabidopsis thaliana* (Müller *et al.*, 2013).

Un récapitulatif des connaissances actuelles sur la distribution et les fonctions portées par l'OGT a fait l'objet d'une mini-revue jointe en annexe 1.

Moyira Aquino-Gil, Annick Pierce, Yobana Perez-Cervera, Edgar Zenteno and Tony Lefebvre (2017) OGT: a short overview of an enzyme standing out from usual glycosyltransferases. *Biochemical Society Transactions* 45:365–370.

1.1.3.2 La O- β -N-Acétetylglucosaminidase

La β -N-acétetylglucosaminidase ou O-GlcNAcase (OGA) (Dong & Hart 1994) nucléocytoplasmique est une hexosaminidase capable de s'homodimériser appartenant à la famille GH84 selon la classification CAZY (EC 3.2.1.169). Le gène de l'OGA a d'abord été identifié comme codant une hyaluronidase putative humaine (*meningioma expressed antigen 5*, Mgea5) (Heckel *et al.*, 1998) avant d'être reconnu comme codant l'OGA (Comtesse *et al.*, 2001; Nagel and Ball, 2014).

1.1.3.2.1 Les isoformes de l'OGA

Chez l'homme l'OGA est décrite sous deux isoformes : une forme longue, lOGA (long OGA), et une forme courte, sOGA (short OGA) (Fig. 6). La lOGA de 130 kDa est localisée au cytosol et au noyau. Elle possède deux domaines: un domaine N-terminal membre de la famille des glycoside hydrolases GH84, et un domaine C-terminal similaire aux N-acétyltransférases de la famille GCN5 (GNAT) avec une activité potentielle histone acétyltransférase (Toleman *et al.*, 2004). La sOGA de 75 kDa ne possède pas le domaine C-terminal (Comtesse *et al.*, 2001) (Fig. 6).

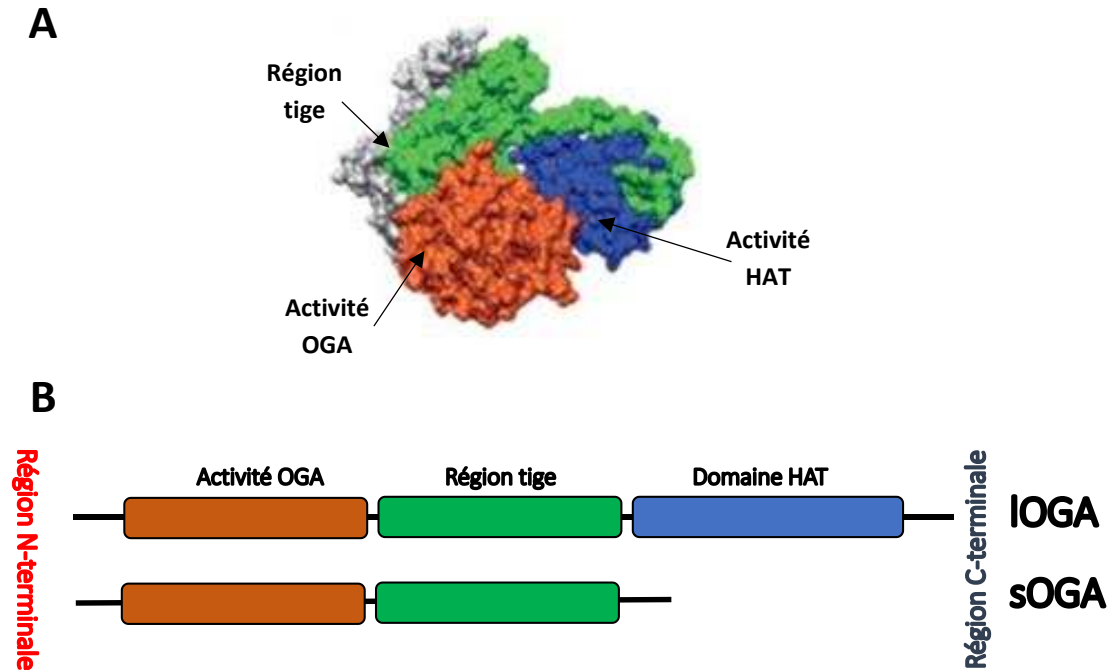


Figure 6. A. Représentation tridimensionnelle de l'OGA (d'après Vocadlo, 2012). **B. Formes longue, IOGA, et courte, sOGA, de l'OGA.** Les activités OGA (O-GlcNAcase) et HAT (histone acétyltransférase) sont représentés respectivement à gauche et à droite de la figure, de part et d'autre de la région tige.

1.1.3.2.2 Quelques caractéristiques de l'OGA

L'OGA peut être clivée par la caspase-3 au niveau de l'acide aspartique 413 *in vitro* et au cours de l'apoptose *in vivo* comme l'ont souligné les profils globaux de O-GlcNAcylation modifiés au cours du processus apoptotique (Wells *et al.*, 2002; Butkinaree *et al.*, 2008). Outre la protéolyse, l'OGA est très probablement régulée par des modifications post-traductionnelles puisqu'il a été démontré par spectrométrie de masse que l'enzyme était phosphorylée sur la Sérine 364 (Beausoleil *et al.*, 2004) dans les cellules HeLa et O-GlcNAcylée sur la Sérine 405 dans le cerveau (Khidekel *et al.*, 2007).

L'activité O-GlcNAcase pourrait également être régulée par la formation d'un complexe transitoire avec l'OGT, le O-GlcNAczyme (Whisenhunt *et al.*, 2006).

1.1.3.2.3 Les inhibiteurs de l'OGA

Afin de mieux comprendre le rôle de l'OGA et, comme pour l'OGT, les processus biologiques régis par celle-ci, plusieurs inhibiteurs ciblant l'enzyme ont été développés (Fig. 7).

Le tout premier inhibiteur décrit pour l'OGA est un analogue de la GlcNAc, la streptozotocine (STZ), une nitrosourée (Roos *et al.*, 1998). La STZ a été tout d'abord reconnue pour ses propriétés antimicrobiennes (Lewis & Barbiers, 1959) et était également utilisée comme inducteur de diabète (diabétogène) chez les modèles murins: la STZ détruit sélectivement les cellules β productrices d'insuline au niveau du pancréas (Junod *et al.*, 1967; Liu *et al.*, 2000).

Le PUGNAc (*O*-(2-acétamido-2-désoxy-D-glucopyranosylidène)-amino-*N*-phényl carbamate) est un inhibiteur des hexosaminidases A et B lysosomales (Beer *et al.*, 1990), mais également un inhibiteur puissant de l'OGA (Haltiwanger *et al.*, 1998). Cependant, le manque de spécificité du PUGNAc comme le démontre l'étude de Mehdy et collaborateurs, dans laquelle il est montré que l'inhibiteur génère des oligosaccharides libres en bloquant les hexosaminidases lysosomales (Mehdy *et al.*, 2012), ont incité la recherche d'inhibiteurs d'OGA plus sélectifs.

La publication de deux structures cristallines d'homologues bactériens de l'OGA humaine a permis d'élucider le mécanisme moléculaire de l'enzyme par le biais d'une réaction nécessitant un intermédiaire de type oxazoline (Dennis *et al.*, 2006). Ainsi deux petites molécules, la NAG-thiazoline (1,2-didésoxy-2'-méthyl- α -D-glucopyranoso-[2,1-*d*]-D2'-thiazoline) et le NButGT (1,2-didésoxy-2'-propyl- α -D-glucopyranoso-[2, 1-*d*]- Δ 2'-thiazoline), se sont avérés être des inhibiteurs micromolaires de l'OGA *in vitro* (Macauley *et al.*, 2005).

Après plusieurs études concernant les NAG-thiazolines, la découverte de l'inhibiteur Thiamet-G ((3aR,5R,6S,7R,7aR)-2-(éthylamino)-3a,6,7,7a-tétrahydro-5-(hydroxyméthyl)-5H-Pyrano[3,2-*d*]thiazole-6,7-diol, (TMG)) a permis l'obtention d'une molécule possédant une excellente sélectivité (de 37.000 fois) vis-à-vis de l'OGA sur les HexA/B, avec

l'avantage d'une bonne capacité à traverser la membrane plasmique et la barrière hématoencéphalique (Yuzwa *et al.*, 2008).

De manière indépendante, les GlcNAcstatines, montrant une similitude structurale avec des glucoimidazoles, ont été synthétisées et reconnues comme une famille d'inhibiteurs de l'OGA très sensibles, de l'ordre du picomolaire, et sélectifs (environ 100.000 fois comparées aux HexA/HexB) *in vitro* (Dorfmueller *et al.*, 2006). Les GlcNAcstatines sont perméables aux cellules mais leur plus grand inconvénient provient de leur faible solubilité dans l'eau et d'une synthèse compliquée (Borodkin and van Aalten, 2010).

Finalement, une série d'inhibiteurs de l'OGA dérivés du 2'-aminothiazoline a été synthétisée (Cekic *et al.*, 2016). Cette nouvelle génération d'inhibiteurs fixe l'OGA avec un K_i sub-nanomolaire et une sélectivité de 1.800.000 fois vis-à-vis des hexosaminidases lysosomales.

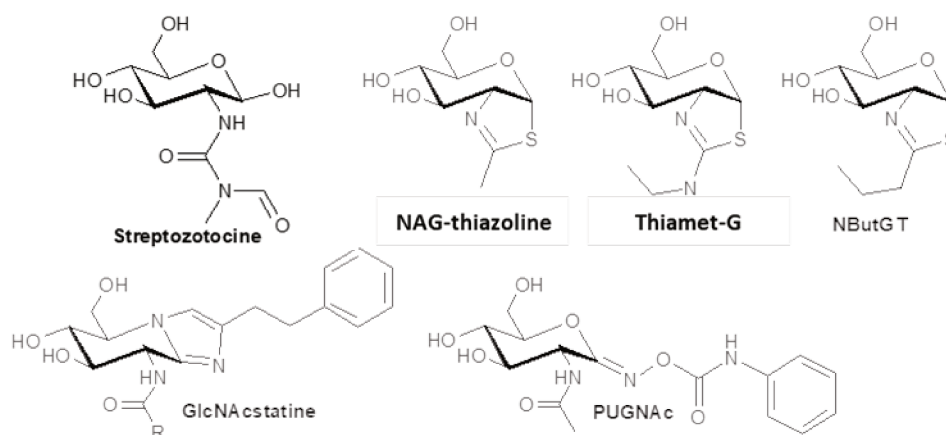


Figure 7. Structures chimiques des inhibiteurs de l'OGA.

1.1.4 Le substrat de l'OGT, l'UDP-GlcNAc, et la voie de biosynthèse des hexosamines

Le substrat donneur des processus de *O*-GlcNAcylation et de nombre autres glycosylations plus complexes (*O*-Glycosylation, *N*-Glycosylation, glypiation, protéoglycanes...) est l'UDP-GlcNAc, produit final de la voie de biosynthèse des hexosamines (HBP) (Bond and Hanover, 2015; Aquino-Gil *et al.*, 2017; Chiaradonna *et al.*, 2018) (Fig. 8).

Après absorption du glucose par les cellules de l'organisme, une partie estimée entre 2 et 5% est canalisée vers cette voie (Aquino-Gil *et al.*, 2017) (Fig. 8). L'hexokinase (HK) phosphoryle le glucose pour produire du glucose-6-phosphate, qui est ensuite converti en fructose-6-phosphate par la phosphoglucose isomérase (PGI). Ces deux réactions sont communes à la glycolyse et à la voie des hexosamines. Cette dernière continue à partir du fructose-6-phosphate et de la glutamine qui sont convertis en glucosamine-6-phosphate (GlcN6P) et en glutamate par l'enzyme limitante de la voie, la glutamine:fructose-6-phosphate amidotransférase (GFAT). La glucosamine-6-phosphate N-acétyltransférase (GNPNAT1) convertit la GlcN6P en N-acétylglucosamine-6-phosphate (GlcNAc6P) grâce à l'acétylcoenzyme A (Ac-CoA). Le GlcNAc6P est converti en GlcNAc1P par la GlcNAc phosphomutase (AGM1) et enfin, l'UDP-N-acétylglucosamine pyrophosphorylase (UAP) active le GlcNAc1P en UDP-N-acétylglucosamine (UDP-GlcNAc) en utilisant l'UTP. Du pyrophosphate (PPi) est généré au cours de cette réaction. La synthèse de l'UDP-GlcNAc nécessite l'intervention de tout un ensemble de nutriments (acides aminés, acides gras, glucides...) faisant de ce nucléotide sucre un véritable senseur nutritionnel (Fig. 8). Une voie de sauvetage (salvage pathway) vient se greffer à HBP en recyclant le GlcNAc cellulaire et en le réinjectant au niveau du GlcNAc6P (Fig. 8).

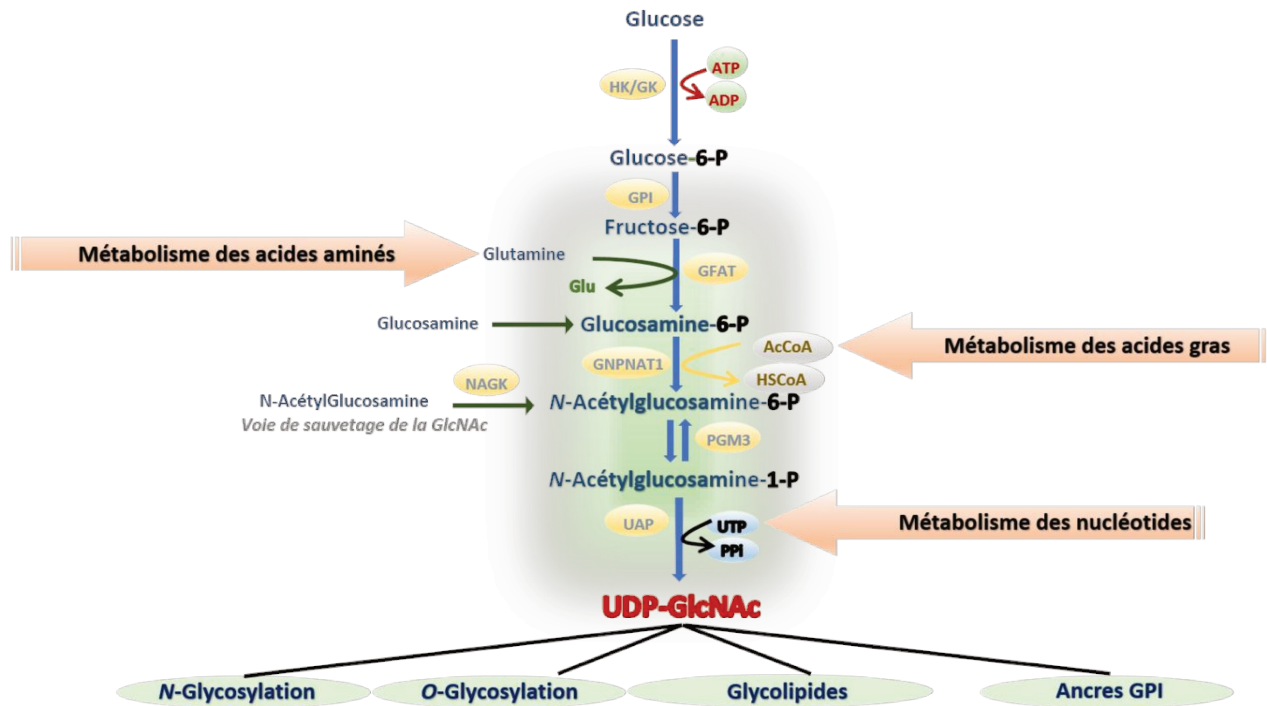


Figure 8. Voie de biosynthèse des hexosamines. Le substrat de l'OGT, l'UDP-GlcNAc, est produit par la voie de biosynthèse des hexosamines (HBP, hexosamine biosynthetic pathway) ou de la voie de sauvetage de la GlcNAc. L'UDP-GlcNAc est au carrefour de différentes voies métaboliques faisant de ce nucléotide-sucré un senseur nutritionnel également important pour les autres types de glycosylations.

1.1.5 Les différentes approches d'étude des protéines O-GlcNAcylées

Plusieurs milliers de protéines ont été identifiées à ce jour comme étant O-GlcNAcylées, ainsi que, pour certaines d'entre-elles, les sites précis de glycosylation (Vercoutter-Edouart *et al.*, 2015).

La O-GlcNAcylation a été mise en évidence à la surface des lymphocytes (Torres and Hart, 1984) grâce à l'utilisation combinée de la galactosyltransférase (GalT) bovine (EC 2.4.1.38) non perméante aux cellules et d'un marquage à l'UDP-[³H]Galactose. Un peu plus tard, la même approche met en évidence cette modification au niveau de fractions microsomales et nucléaires préparées à partir de foie de rat (Holt and Hart, 1986). Malheureusement, la substœchiométrie et la labilité de la O-GlcNAcylation ont rendu son étude particulièrement difficile et par conséquent incité au développement de nouvelles

méthodes et d'une large variété d'outils visant à sa détection et à son analyse. Ces techniques concernent d'une part les lectines, les anticorps de plus en plus spécifiques, les enrichissements de protéines basés sur la stratégie de chimie-click et, d'autre part, l'identification des sites de glycosylation par spectrométrie des masses ainsi que des outils bio-informatiques permettant de prédire ces sites. Cet ensemble a contribué à ouvrir de nouvelles opportunités et perspectives dans le champ d'investigation de la O-GlcNAcylation (Vercoutter-Edouart *et al.*, 2015).

1.1.5.1 Les anticorps et les lectines

1.1.5.1.1 Les anticorps

En 1987, un groupe de huit protéines de l'enveloppe nucléaire dans une gamme de masses moléculaires variant de 45 à 210 kDa et porteuses de résidus O-GlcNAc, nouvelle glycosylation pour l'époque, étaient identifiés par des anticorps monoclonaux (Snow *et al.*, 1987). Or, en parallèle, un second groupe de chercheurs a démontré que ces mêmes anticorps reconnaissaient la partie O-GlcNAcylée de ce groupe de protéines (Holt *et al.* 1987). L'un de ces anticorps a été nommé RL2 et constitue encore à ce jour un des outils les plus performants dans les études focalisant la O-GlcNAcylation.

Plus tard, un anticorps monoclonal murin IgM, appelé CTD110.6, reconnaissant spécifiquement les résidus O-GlcNAc du CTD de pol II est développé (Comer *et al.* 2001). L'anticorps ne montre aucune réactivité croisée apparente avec les déterminants peptidiques et ne réagit pas non plus avec d'autres types d'antigènes glucidiques. Comme pour le RL2, le CTD110 est un des outils les plus utilisés pour l'étude des protéines modifiées par O-GlcNAcylation par immunoblotting, immunofluorescence indirecte et pour l'enrichissement des protéines par immunoprécipitation. Cependant, la spécificité de l'anticorps CTD110.6 a été remise en question. En effet, le CTD110.6 reconnaît entre autres NOTCH1 possédant des répétitions EGF cibles de la EOGT, ainsi que des résidus GlcNAc terminaux portés par des N-glycanes de la surface cellulaire (Tashima and Stanley, 2014). Ce manque de spécificité du CTD110.6 avait été soulevé au préalable par des analyses par protéomique montrant que la déprivation en glucose induit la formation de

motifs GlcNAc- β 1,4-GlcNAc à partir de *N*-glycoprotéines (Isono, 2011). Il avait été supposé avant cette étude que la déprivation en glucose favorisait de manière surprenante la *O*-GlcNAcylation (Taylor *et al.*, 2008, 2009). La démonstration d'Isono est venue apportée la réponse à ce paradoxe (Isono, 2011).

Plus récemment, en utilisant en combinaison la technologie des hybridomes et un système immunogène à trois composants (peptide dérivé de la caséine kinase-2 sur lequel est greffé un résidu de GlcNAc, épitope du MHC de classe 2 du *T-cell helper* et ligand du TLR, *Toll-like receptor*) de sorte à générer une réponse immune forte à IgG, trois nouveaux anticorps monoclonaux 18B10.C7, 9D1.E4, 1F5.D6 ont été générés (Teo *et al.*, 2010). Malgré tout, et bien qu'ils aient permis l'identification de 200 nouvelles protéines *O*-GlcNAcylées, ces anticorps monoclonaux sont très peu utilisés.

Nous pouvons également citer les anticorps monoclonaux HGACs 39, 49, et 85 dirigés contre des structures glycaniques de groupe A exprimées par le Streptocoque (Turner *et al.*, 1990). Il s'est avéré que ces mêmes anticorps reconnaissent fortement la *O*-GlcNAcylation de la périphérie nucléaire, du nucléoplasme et du cytoplasme de cellules de rat dans une moindre mesure. Ces anticorps semblent être tombés dans l'oubli puisqu'à notre connaissance aucune étude récente ne semble y avoir fait appel.

1.1.5.1.2 Les lectines

Les lectines (protéines ou glycoprotéines possédant une activité de reconnaissance des glycanes de manière intrinsèque et plus ou moins sélective) sont souvent d'une précieuse aide pour la détection de protéines glycosylées, plus particulièrement *O*-GlcNAcylées en ce qui nous concerne, et leur enrichissement. En ce sens, la lectine de l'Agglutinine de germe de blé, *Triticum vulgaris*, ou WGA (pour *Wheat Germ Agglutinin*) a été très largement utilisée (Hanover *et al.*, 1987) malgré sa double spécificité puisqu'elle lie également certains acides sialiques en plus des résidus β -GlcNAc en position terminale non réductrice des glycanes complexes. Pour cette raison, on lui préfère sa forme succinylée qui évite la reconnaissance des acides sialiques par répulsion électrostatique (Monsigny *et al.*, 1979). Une autre lectine extraite du champignon *Agrocybe aegerita*,

AAL2, a été décrite en 2013 pour se lier aux GlcNAc terminales non réductrices (Ren *et al.*, 2013). Enfin la lectine fongique recombinante rPVL (*Psathyrella velutina lectin*, PVL) a l'avantage de présenter une haute affinité pour les motifs *O*-GlcNAc et moindre pour les résidus Neu5Ac (Machon *et al.*, 2017).

1.1.5.2 Utilisation de sucres radiomarqués et de la chimie-click

La première approche utilisée pour détecter la *O*-GlcNAcylation était basée sur le marquage radioactif des résidus GlcNAc en utilisant l'UDP-³H]galactose et la GalT bovine, suivie d'une β -élimination et d'une analyse des produits obtenus par filtration sur gel, électrophorèse sur papier à haute tension ou HPLC (High Performance Liquid Chromatography) (Torres & Hart 1984). Cette technique a évolué grâce à l'avènement de la chimie-click pour laquelle un dérivé de galactose modifié et activé (UDP-GalNAz ou UDP-cétogalactose) est greffé sur des résidus de GlcNAc par une GalT modifiée, la GalT1 Y289L (Ramakrishnan & Qasba 2002). Le transfert de GalNAz ou cétogalactose est suivi par l'addition chimique sélective et spécifique de biotine-alcyne ou aminoxy-biotine, respectivement. Ces sondes facilitent la purification et la détection des protéines ou peptides marqués par l'avidine/streptavidine (chromatographie d'affinité) ainsi que l'identification des protéines *O*-GlcNAcylées et des sites de *O*-GlcNAcylation (Vercoutter-Edouart *et al.*, 2015). La chimie-click peut être aussi suivie par un « marquage de masse » pour caractériser des sous populations de protéines. Cette approche repose sur la fixation d'un polymère polyéthylène glycol (PEG) de masse moléculaire définie (par exemple 2 ou 5 kDa) sélectivement sur le résidu *O*-GlcNAc et la résolution des populations marquées par SDS-PAGE. Cette technique s'applique notamment à des protéines endogènes, faiblement exprimées, et évite toute étape de purification en vue d'une analyse compliquée de la glycosylation (Clark *et al.*, 2013; Leturcq *et al.*, 2018).

1.1.5.3 Prédiction des sites de *O*-GlcNAcylation par des outils bio-informatiques et détermination par spectrométrie de masse

L'identification précise des sites de *O*-GlcNAcylation est cruciale pour en révéler les rôles fonctionnels spécifiques dans les divers processus biologiques. A cause de la labilité, du dynamisme et de la stœchiométrie de la modification, l'identification précise des sites *O*-GlcNAcylation par des approches protéomiques systématiques reste un enjeu.

1.1.5.3.1 Les outils bio-informatiques

En raison de l'intérêt croissant et de la nécessité de déterminer les sites de *O*-GlcNAcylation mais également de s'affranchir des barrières expérimentales, la prédiction informatique des sites de *O*-GlcNAcylation est devenue un outil à la fois important et confortable, bien qu'elle doive être utilisée avec beaucoup de précautions, ce type d'approche étant basé sur des algorithmes plus ou moins puissants et rigoureux.

Ainsi plusieurs outils de ce type ont-ils été développés : YinOYang (Gupta & Brunak 2001), *O*-GlcNAcScan (Wang *et al.*, 2011), *O*-GlcNAcPRED-I et II (Jia *et al.*, 2013; Cagzhi *et al.*, 2018), PGlcS (Zhao *et al.*, 2015), chacun d'eux prétendant être le plus performant pour l'identification computationnelle des sites de *O*-GlcNAcylation.

1.1.5.3.2 La spectrométrie de masse

Le principal obstacle dans l'étude des rôles joués par la *O*-GlcNAcylation est le manque d'approches expérimentales simples, souples et sensibles en vue de la détermination des sites de *O*-GlcNAcylation (cartographie de sites ou « site-mapping »). En effet, la majorité des techniques actuelles utilisées sont lourdes et pèchent par leur manque de sensibilité. La cartographie de sites de modification est particulièrement difficile pour les raisons invoquées ci-dessus: faible stœchiométrie de la *O*-GlcNAcylation vis-à-vis des protéines sur lesquelles elle réside, et labilité chimique et enzymatique de la liaison glycosidique entre le résidu GlcNAc et les résidus Ser/Thr (Kim, 2011). Une des toutes premières

techniques utilisées pour cartographier les sites de *O*-GlcNAcylation consistait en la purification de la protéine d'intérêt suivi d'un marquage enzymatique avec du galactose radiomarké tel que décrit plus haut. Les protéines radiomarkées étaient ensuite soumises à une protéolyse, les peptides issus de cette digestion étaient séparés par HPLC puis séquencés par la méthode d'Edman (Chou *et al.*, 1995; Cheng *et al.*, 2000).

Les techniques de cartographie les plus utilisées sont basées sur la spectrométrie de masse en tandem couplée à la chromatographie liquide (LC-MS/MS) (Vercoutter-Edouart *et al.*, 2015) (Wu *et al.*, 2014). Dans ce contexte, des méthodes de fragmentation comme la dissociation induite par collision (CID, collision induced dissociation) sont limitées en raison de la labilité de la liaison osidique. Pour cette raison le développement de la dissociation par transfert d'électrons (ETD, electron transfer dissociation) et de la dissociation par capture d'électrons (ECD, electron capture dissociation) facilitent la fragmentation des glycopeptides exclusivement le long de l'axe peptidique mais tout en préservant la liaison osidique intacte (Zachara *et al.*, 2011).

La β -élimination suivie de l'addition de Michael avec du dithiothréitol (BEMAD, beta-elimination followed by Michael addition with dithiothreitol) a été développée directement ou après marquage chimio-enzymatique avec des analogues de sucres. Cette technique consiste en une β -élimination en condition douce des résidus *O*-liés à l'axe polypeptidique de la protéine ou du peptide suivie par une addition de dithiothréitol. Les peptides ainsi marqués sont enrichis par chromatographie sur billes de thiol-sépharose, élués puis séquencés (Vercoutter-Edouart *et al.*, 2015). Malheureusement, toute autre modification *O*-liée telle que la phosphorylation est également réactive au BEMAD, nécessitant des traitements préalables à la phosphatase alcaline.

1.2 L'apicomplexe *Toxoplasma gondii*

1.2.1 Historique et classification

En 1908, Charles Jules Henry Nicolle et Luis Herbert Manceaux en Tunisie (Nicolle & Manceaux, 1908) et Alfonso Splendore au Brésil (Splendore, 1908) identifient un parasite nommé *Toxoplasma* (du grec *toxon* = arc et *plasma* = forme), chez *Ctenodactylus gundi*, un rongeur d'Afrique du nord, pour les premiers, et chez le lapin pour Splendore (Morrisette & Ajioka, 2009)(Weiss & Dubey, 2009). Plus tard, en 1949, d'autres formes de *Toxoplasma* sont identifiées dans des tissus humains par Frenkel et Friedlander (Frenkel, 1949). Ce n'est que dans les années 1960 que ce parasite est considéré comme une coccidiose toxoplasmique chez le chat (Frenkel *et al.*, 1970).

Toxoplasma gondii est donc un parasite intracellulaire obligatoire. Il fait partie du phylum *Apicomplexa* regroupant des pathogènes eucaryotes unicellulaires liés aux dinoflagellés et aux ciliés. *T. gondii* possède une haute habilité à se répliquer au sein des différents hôtes indispensables à son développement et à sa pathogénicité. (Francia & Striepen, 2014).

1.2.2 Organisation subcellulaire de *T. gondii*

T. gondii est un organisme unicellulaire haploïde. La cellule est polarisée, de forme arquée, de 8 µm de longueur pour 3 µm de largeur (Fig. 8). Ce parasite possède toutes les structures subcellulaires universelles retrouvées chez les eucaryotes - noyau, *reticulum* endoplasmique, appareil de Golgi, ribosomes et mitochondrie - ainsi que des organites spécialisés spécifiques aux apicomplexes. L'ensemble est enveloppé dans une structure complexe membranaire appelée pellicule (Ferguson & Dubremetz, 2013). Les organites spécialisés comprennent les micronèmes situées à l'extrémité apicale. Ils jouent un rôle de première importance dans plusieurs étapes du cycle de vie du parasite, notamment la motilité, l'invasion et la sortie des cellules hôtes, et la survie intracellulaire (Soldati *et al.*, 2001; Q. Liu *et al.*, 2017). Les rhoptries, autres organites spécialisés, et au nombre de 6 à 12 par cellule, sont situées dans la partie antérieure du parasite et sont associées à une vésicule. Comme les micronèmes, elles sont impliquées dans la motilité parasitaire et joue

un rôle clé dans le phénomène d'invasion des cellules hôtes (Dubremetz, 2007; Boothroyd & Dubremetz, 2008). Les granules denses sont un troisième type d'organite spécifique aux apicomplexes (Boothroyd & Dubremetz, 2008). Ce sont des vésicules sécrétoires impliquées dans les modifications structurales de la vacuole parasitophore. *T. gondii* possède un cytosquelette composé de deux anneaux localisés sous la membrane plasmique à l'extrémité apicale, conoïde constitué de fibres microtubulaires enroulées sous la forme d'une spirale (Hu et al. 2002). Il possède également un apicoplaste, caractéristique principale des apicomplexes à l'exception de *Cryptosporidium parvum* (McFadden & Yeh, 2017) (Figure 9). L'apicoplaste est un organite plastidique non photosynthétique qui participe à la synthèse des acides gras, des isoprénoïdes et du groupement hémique.

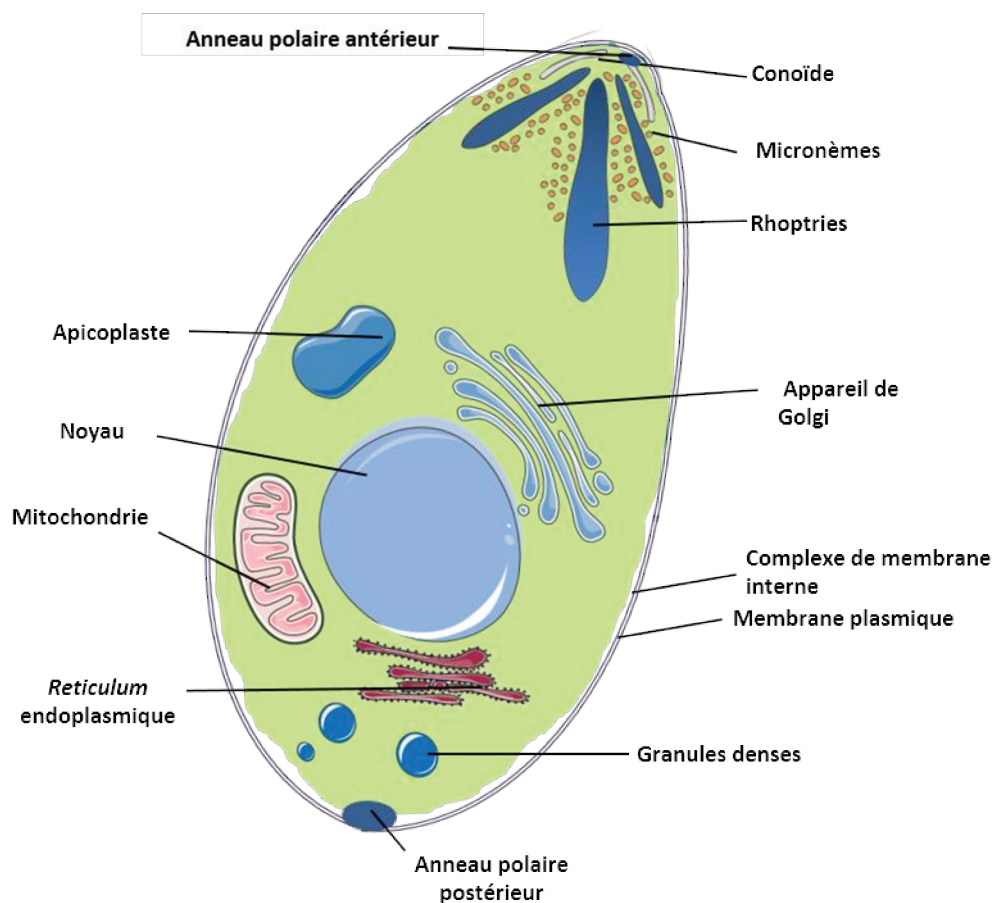


Figure 9. Structure de *Toxoplasma gondii* au stade tachyzoïte.

1.2.3 Biologie de *T. gondii* et toxoplasmose

1.2.3.1 Cycle de vie de *T. gondii*

T. gondii présente un cycle de vie hétéroxène avec des hôtes intermédiaires comprenant à la fois des rongeurs et des humains, ainsi qu'un hôte définitif, le chat (Fig. 10). Pour survivre, *T. gondii* a mis en place tout un ensemble de programmes de développement complexes en réponse à des signaux multiples incluant tout une panoplie de stress. Aussi, le parasite doit gérer tout un ensemble de conditions et de contextes environnementaux différents lui permettant de transiter d'un hôte à l'autre et d'échapper aux défenses de ces organismes l'hébergeant.

Pour se reproduire, *T. gondii* a développé un cycle évolutif complet comprenant une phase sexuée dont les membres de la famille des *felidae*, incluant les chats domestiques, sont les principaux hôtes (hôtes définitifs). Le cycle cellulaire de *T. gondii* se déroule exclusivement dans les intestins après ingestion d'oocystes matures ou kystes déposés dans les excréments de chats. Il s'agit ici de ce que l'on peut appeler un réservoir tellurique (sol). Dans cet environnement, les parasites se développent en quelques jours (1 à 5 jours). Les hôtes intermédiaires, généralement des animaux homéothermes tels que les oiseaux, les rongeurs et les humains, sont alors infectés directement par le biais du sol en ingérant des oocystes sporulés ou indirectement par la consommation d'hôtes intermédiaires (viande de porc, mouton ou volaille, crue ou trop peu cuite). Les oocystes se différencient rapidement en tachyzoïtes pouvant migrer vers les tissus neuronaux et musculaires. Les tachyzoïtes se convertissent alors en bradyzoïtes. *T. gondii* peut alors se diviser de manière asexuée (Fig. 10). Le majeur problème lié à *T. gondii* réside dans le fait que chez la femme enceinte les parasites sont transmis au fœtus par le placenta, il s'agit de formes tachyzoïtes (Dubey, 2009; Blader *et al.*, 2015) .

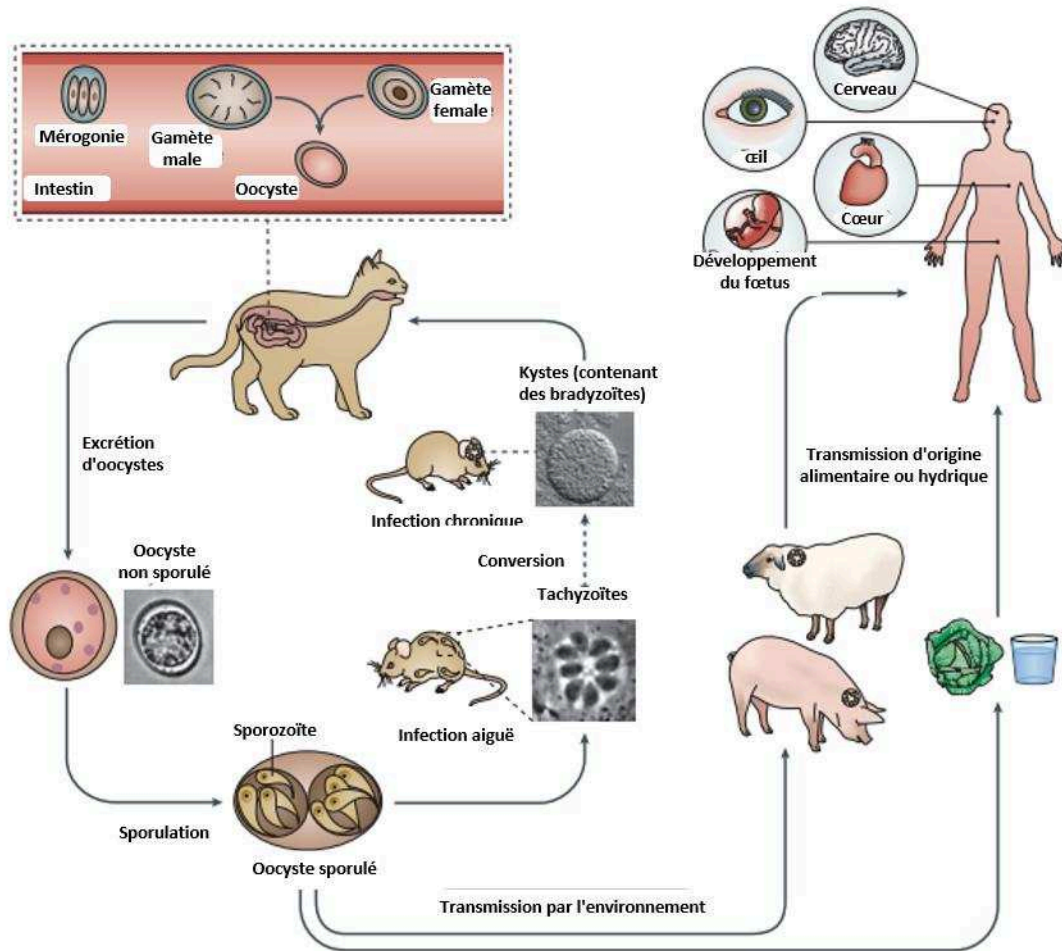


Figure 10. Cycle de vie de *Toxoplasma gondii*. *T. gondii* passe par différents stades en fonction de l'hôte intermédiaire ou définitif l'hébergeant. Il doit faire face à toute sorte de stress notamment il doit échapper au système de défense de ses divers hôtes. D'après (Hunter & Sibley, 2012).

1.2.3.2 Epidémiologie de la toxoplasmose

La toxoplasmose est généralement une maladie asymptomatique, les kystes pouvant rester tout au long de la vie au sein des muscles squelettiques, du cœur, du cerveau et des yeux. Dans la plupart des cas l'infection n'a pas de graves conséquences chez les patients immunocompétents. De même, chez la femme enceinte, l'infection par *T. gondii* ne représente pas systématiquement un risque pour le fœtus. En effet plus tôt survient l'infection au cours de la grossesse, plus le risque de passage du parasite au travers du placenta est faible. Par contre si le fœtus est infecté tôt pendant cette grossesse, plus les

conséquences peuvent être délétères. Les manifestations de la toxoplasmose congénitale peuvent inclure l'hydrocéphalie, la microcéphalie, les calcifications intracrâniens, la rétinochoroïdite, le strabisme, la cécité, l'épilepsie, le retard psychomoteur et mental, des pétéchies par thrombocytopénie et l'anémie (Chaudhry et al., 2014).

Chez les individus immunodéprimés, la réactivation de l'infection peut provoquer une encéphalite, inflammation aigüe du cerveau ; c'est pour cette raison que la toxoplasmose cérébrale est une des plus grandes causes de morbidité et de mortalité chez les patients atteints du VIH/SIDA (Anuradha, 2016).

Six millions de personnes seraient touchées par la toxoplasmose dans le Monde. Ce chiffre varie en fonction des conditions climatiques, du régime alimentaire, de l'hygiène, et de la susceptibilité aux organismes infectieux (Dard *et al.*, 2016). En Europe, cette maladie affecte plus de 2 millions de personnes chaque année. D'après le centre national de référence de la toxoplasmose en France, les taux de séroprévalence chez l'adulte sont compris entre 20 et 55%, et la principale cause de la pathologie correspond à la toxoplasmose congénitale (61.8% de cas) (Peyron *et al.*, 2017).

1.2.4 Les modifications post-traductionnelles chez *T. gondii*

T. gondii a dû développer au cours de son évolution des mécanismes de réponse visant à le protéger des différentes formes de stress, lui permettre d'échapper au système de défense des organismes hôtes et de manière plus intrinsèque, de l'autoriser à passer d'un stade à l'autre au cours de son cycle de vie (Yakubu *et al.*, 2018). Pour ce faire des systèmes hautement sophistiqués et plastiques sont nécessaires tels que les modifications post-traductionnelles.

Chez *T. gondii*, plusieurs modifications post-traductionnelles ont été décrites. Ces modifications ont permis de mieux comprendre la biologie du parasite, notamment les processus d'invasion des cellules hôtes, la signalisation intracellulaire, le trafic, la régulation du cycle cellulaire et de l'expression génique. Voici quelques exemples d'études ayant ciblé le rôle de ces modifications dans certains processus biologiques.

1.2.4.1 La *N*-glycosylation

La *N*-glycosylation est une modification co-translationnelle complexe qui se déroule en grande partie au sein du *reticulum* endoplasmique. Elle consiste en le transfert *en bloc* d'un précurseur oligosaccharidique sur certains résidus d'asparagine de protéines confinées dans les compartiments intracellulaires ou suivant la voie d'exocytose (Aebi, 2013). La *N*-glycosylation a été étudiée dans un premier temps par Fauquenoy et collaborateurs dans le but de comprendre le rôle de cette modification dans le processus d'invasion des cellules hôtes (Fauquenoy *et al.*, 2008). Ces auteurs ont démontré que plusieurs protéines clés impliquées dans le processus d'invasion étaient *N*-glycosylées, l'inhibition de cette forme de glycosylation par la tunicamycine réduisant considérablement la motilité et la croissance du parasite, ainsi que l'invasion. Ces résultats sont en partie supportés par une seconde étude qui démontre l'importance de la *N*-glycosylation pour le processus d'invasion et la croissance parasitaire (Luk *et al.*, 2008).

Le même année, Garénaux et collaborateurs ont analysé les *N*-glycanes d'extraits de tachyzoïtes cultivés dans différentes cellules hôtes (Garénaux *et al.* 2008). Les auteurs ont démontré que *T. gondii* est capable de synthétiser ses propres *N*-glycanes tronqués mais également de transférer ceux de la cellule hôte sur ses propres protéines, élucidant de manière originale, la double origine de la *N*-glycosylation chez cet apicomplexe.

Ces auteurs rapportent notamment que la nature des glycanes chez *T. gondii* sont structuralement différents de ceux de la cellule hôte.

1.2.4.2 La *O*-Fucosylation

La *O*-fucosylation est une forme inhabituelle de glycosylation qui modifie les groupements hydroxyles des résidus sérine ou thréonine au niveau d'un site consensus strict ((CXXGG(S/T)C, où S/T est le résidu modifié) au sein des domaines de type EGF de plusieurs protéines sériques chez les mammifères (Moloney *et al.* 1997).

L'utilisation de la lectine *Aleuria aurantia* (AAL) a permis la découverte de protéines *O*-fucosylées associées à la membrane nucléaire chez *T. gondii*, à proximité des pores nucléaires, chez des tachyzoïtes, bradyzoïtes et sporozoïtes (Bandini *et al.*, 2016).

1.2.4.3 La O-GlcNAcylation

Au cours des années 90, l'existence de la O-GlcNAcylation a pu être démontrée au sein de nombreux organismes biologiques incluant les apicomplexes (voir première partie). En ce sens, Dieckman-Schuppert et ses collaborateurs ont documenté, pour la première fois, la O-GlcNAcylation chez les apicomplexes en 1993 (Dieckmann-Schuppert *et al.*, 1993). En 2009, Banerjee et collaborateurs ont déterminé par des méthodes phylogénétiques la présence potentielles des OGTs chez les protistes (Banerjee *et al.*, 2009). De manière intéressante les extraits cytosoliques de *Giardia* et *Cryptosporidium*, ce dernier partageant une très forte homologie avec *T. gondii*, ont montré une véritable activité OGT.

En 2011, l'utilisation d'anticorps spécifiques dirigées contre la O-GlcNAcylation a pour la toute première fois mis en évidence cette modification dans des extraits totaux de *T. gondii* (Perez-Cervera *et al.*, 2011). Toute une pléthore de protéines O-GlcNAcylées a pu être caractérisée. Plus précisément, mon équipe a démontré la O-GlcNAcylation de la protéine HSP70 (70 kDa-Heat shock protein), protéine reconnue pour présenter cette glycosylation (Guinez *et al.*, 2006). De plus, une activité catalytique OGT a été mesurée par méthode radioactive. Une séquence putative d'OGT a été identifiée par analyse bio-informatique de l'OGT chez *T. gondii*. Cette OGT putative est proche de SPY exprimée chez *Arabidopsis thaliana*. Néanmoins, depuis peu, SPY n'est plus reconnue comme une véritable OGT mais comme une O-Fucosyltransférase (Zentella *et al.*, 2017): l'existence et l'identité de l'OGT chez *T. gondii* demeure de ce fait une énigme.

1.2.4.4 La Phosphorylation

La phosphorylation joue un rôle fondamental au cours du métabolisme et de la transduction du signal. Cette modification est réalisée par des protéines kinases qui transfèrent un groupement phosphoryle à partir de l'ATP sur des résidus hydroxyles d'une sérine, thréonine ou tyrosine, la phosphorylation sur les résidus de sérine et de thréonine étant plus fréquente que sur les résidus de tyrosine. Cependant, d'autres résidus d'acides aminés, tels que l'histidine, les acides glutamique et aspartique, notamment chez les

procaryotes, peuvent également être phosphorylés. Les réactions de phosphorylation sont « réversées » par des protéines phosphatases (hydrolyse du résidu phosphate).

Chez les apicomplexes, comme chez tout eucaryote, la phosphorylation des protéines est essentielle à la survie cellulaire. En ce sens il a été montré chez *T. gondii* que le blocage de la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction protéique eucaryote 2 α (eIF2 α) réduit la virulence des tachyzoïtes (Joyce *et al.*, 2010).

Un système de défense, lié à l'infection par *T. gondi* et associé au système immunitaire, fait intervenir une famille de protéines connue sous le nom d'IRG (immunity-related GTPase). Les IRG s'accumulent dans les cellules infectées à la surface des vacuoles contenant le parasite et le détruisent. Il a été montré dans un système murin que *T. gondii* s'oppose à ce système en sécrétant une enzyme appelée ROP (rhoptries) 18 kinase. ROP18 kinase phosphoryle certains acides aminés clés des protéines IRG, notamment Irga6, les inactivant: le parasite échappe ainsi à la destruction (Steinfeldt *et al.*, 2010).

1.2.4.5 L'Acétylation

L'acétylation consiste en l'addition d'un groupement acétyle à partir de l'acétyl-CoA sur l'acide aminé en position N-terminale d'une protéine ou sur la fonction amine- ϵ de résidus lysine au sein même de la chaîne polypeptidique. Cette modification catalysée par des acétyltransférases est très conservée chez la plupart des eucaryotes et est distribuée dans tout un ensemble de compartiments (Carabetta & Cristea, 2017).

Une étude portant sur *T. gondii* a identifié plus de 400 protéines acétylées chez la forme proliférative du parasite, le tachyzoïte, parmi lesquelles les histones et l'alpha-tubuline, révélant que cette modification est probablement apparue très tôt au cours de l'évolution (Jeffers & Sullivan, 2012). Une autre étude protéomique a porté sur l'acétylome de cellules astrocytaires infectées par *T. gondii* (Bouchut *et al.*, 2015). L'expression de nombreux gènes de la cellule hôte sont modifiés parmi lesquels des gènes codants des lysines acétyltransférases (KAT) et des lysines désacétylases (KDAC) démontrant que l'acétylome est modifié au cours de l'infection par le parasite.

1.2.4.6 La Méthylation

La méthylation repose sur le transfert d'un groupement méthyle à partir du donneur S- adénosyl-méthionine (AdoMet) sur les groupements carboxyle des acides aminés cystéine, leucine, glutamate, aspartate, et l'azote des acides aminés glutamine, histidine, lysine, arginine en position alpha-amino-terminale (Fisk & Read, 2011). Chez les parasites, la méthylation de l'arginine se retrouve sur les protéines cytoplasmiques et nucléaires. Elle joue des fonctions importantes dans de nombreux processus cellulaires, comprenant la régulation épigénétique et transcriptionnelle, l'épissage de l'ARN et la réponse aux dommages à l'ADN. La famille de protéines arginine-méthyltransférases (PRMT) joue un rôle important au cours de la division cellulaire, la croissance parasitaire. L'absence de cette modification promeut des changements morphologiques ainsi qu'un ralentissement de croissance de *T. gondii* (Bissati *et al.*, 2016; Yakubu *et al.*, 2017).

1.2.4.7 L'Ubiquitination

L'ubiquitination consiste en la formation d'une liaison entre l'extrémité C-terminale de l'ubiquitine, polypeptide de 76 acides aminés, et le groupement amine-ε d'un résidu lysine substrat. L'ubiquitination nécessite l'action séquentielle de trois enzymes: une enzyme activatrice de l'ubiquitine, E1, une enzyme de support structurel ou de conjugaison, E2, couplée à une protéine ubiquitine ligase, E3, modifiant la protéine cible (Pickart, 2001). Des analyses protéomiques réalisées sur *T. gondii* ont permis l'identification d'un grand nombre de protéines ubiquitinées, majoritairement du cytosquelette, localisées dans le complexe membranaire interne (MCI), caractéristique des parasites apicomplexes (Silmon de Monerri *et al.*, 2015). Plus de 35% des protéines ont un profil d'ubiquitination régulé par le cycle cellulaire sans pour autant, et de manière surprenante, modifier les facteurs classiques de régulation du cycle cellulaire.

1.2.4.8 La SUMOylation

A l'instar de l'ubiquitine, SUMO (Small Ubiquitin-like MOdifier) est une petite protéine de 11 kDa modifiant réversiblement certaines lysines accessibles des protéines cibles (Czuba

et al., 2018). Il a été décrit que certains pathogènes incluant les bactéries et les virus utilisent cette modification des protéines hôtes pour faciliter leur mode d'infection.

Une approche globale basée sur la protéomique a permis l'identification de nombreuses protéines cibles TgSUMO cellulaires à la surface du tachyzoïte en réponse à l'entrée en contact avec la cellule hôte précédant l'invasion (Braun *et al.*, 2009). Dans des conditions de culture favorisant la différenciation en bradyzoïte, des formes conjuguées à SUMO ont été retrouvées au niveau de la vacuole parasitophore. Une autre étude a également montré le rôle majeur de la SUMOylation dans le processus d'invasion (Maruthi *et al.*, 2017). Ces données suggèrent que le système complexe de conjugaison par SUMOylation interfère avec les processus biologiques vitaux du parasite.

1.3 L'apicomplexe *Plasmodium falciparum*

1.3.1 Historique et classification

Plasmodium a été découvert en 1880 en Algérie par Charles Louis Alphonse Laveran, chirurgien de l'armée française. Il a été le premier à démontrer la présence de ce parasite dans le sang de patients atteints de paludisme (Cox, 2010). Laveran a publié le résultat de ses observations sous le titre : "Un nouveau parasite trouvé dans le sang de plusieurs malades atteints de fièvre palustre" dans le Bulletin de la Société médicale des hôpitaux de Paris (Petithory, 1995). Le paludisme est ainsi causé par un parasite du genre *Plasmodium* qui compte environ 150 espèces. Les primates sont infectés par une trentaine d'espèces de parasites responsables du paludisme: il s'agit de parasites adaptés à l'hôte humain qui se transmettent principalement par un vecteur insecte, l'anophèle. Ces principaux parasites sont *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* et *Plasmodium knowlesi* (Janet, 2012; Sermwittayawong et al., 2012).

1.3.2 Organisation subcellulaire de *P. falciparum*

P. falciparum possède à son extrémité apicale des organites de sécrétion similaires à ceux présents chez *T. gondii*. Ces organites sont les rhoptries, les micronèmes et les granules denses, jouant un rôle important dans le processus de motilité indispensable à l'invasion, mais également à la biogenèse de la membrane parasitophore et au remodelage des protéines chez la cellule hôte. Par ailleurs, comme d'autres apicomplexes, *Plasmodium* possède également un apicoplaste.

1.3.3 Biologie de *P. falciparum* et paludisme

1.3.3.1 Cycle de vie de *P. falciparum*

Au cours de son cycle de vie, *Plasmodium falciparum* présente trois stades de maturation: les anneaux (rings), les trophozoïtes et les schizontes (Photini & Lee Sim, 2015).

Son cycle de vie se divise en deux parties: la multiplication asexuelle chez l'homme comme organisme hôte, et la reproduction sexuelle au sein d'un diptère de la famille des *Culicidae* et de la sous-famille des *Anophelinae* (Fig. 11). *P. falciparum* est en effet transmis, par le moustique anophèle femelle qui injecte des sporozoïtes qui, après avoir atteint la circulation sanguine, sont transportés passivement vers le foie. Après pénétration dans le système vasculaire hépatique, les sporozoïtes glissent le long des sinusoides et transmigrent à travers les cellules de Kupffer ou les cellules endothéliales pour atteindre les hépatocytes. Les sporozoïtes au sein des hépatocytes résident dans une vacuole parasitophore où ils subiront une réplication asexuée sans provoquer de symptômes cliniques chez l'hôte (schizontes), c'est le cycle exo-érythrocytaire schizogonique.

L'achèvement du stade hépatique est marqué par la libération de milliers de mérozoïtes sous la forme de mérosomes dans la circulation périphérique. Ils sont transportés vers les petits capillaires pulmonaires où ils se rompent et libèrent les mérozoïtes capables d'envahir les globules rouges, marquant le début des stades érythrocytaires de l'infection (cycle endo-érythrocytaire schizogonique). La pré-perméabilité, période jusqu'à l'apparition des parasites dans le sang, varie de 3 à 30 jours en fonction de l'espèce parasitaire et de plusieurs autres facteurs tels que le statut immunitaire de l'hôte, l'exposition antérieure des hôtes aux parasites, et le nombre de sporozoïtes inoculés. Après l'invasion des globules rouges, les parasites se développent en trophozoïtes et finalement en schizontes qui se rompent et libèrent jusqu'à 36 mérozoïtes dans la circulation sanguine (Figure 11).

La réplication asexuée se déroule sous la forme de cycles multiples de schizogonie et augmente de manière exponentielle la charge parasitaire. La réplication asexuée se traduit également par la génération de stades sexuels, qui peuvent être transmis à un moustique pendant un repas de sang.

À la suite de la transmission au vecteur, les gamétocytes mâles et femelles se développent en gamètes mâles et femelles. Ils sont libérés et fusionnent à l'intérieur de l'intestin pour donner des zygotes ou ookinètes mobiles ; ces zygotes quittent la lumière de l'intestin moyen et s'installent sous la lamine basale. Ils se développent alors en oocystes dans

lesquels des centaines de sporozoïtes sont produits. Finalement, les oocystes éclatent et les sporozoïtes libérés sont transportés à travers l'hémolymphe, atteignant et envahissant éventuellement les glandes salivaires du moustique, d'où ils peuvent à nouveau être injectés dans un nouvel hôte lors d'une piqûre (De Niz *et al.*, 2017).

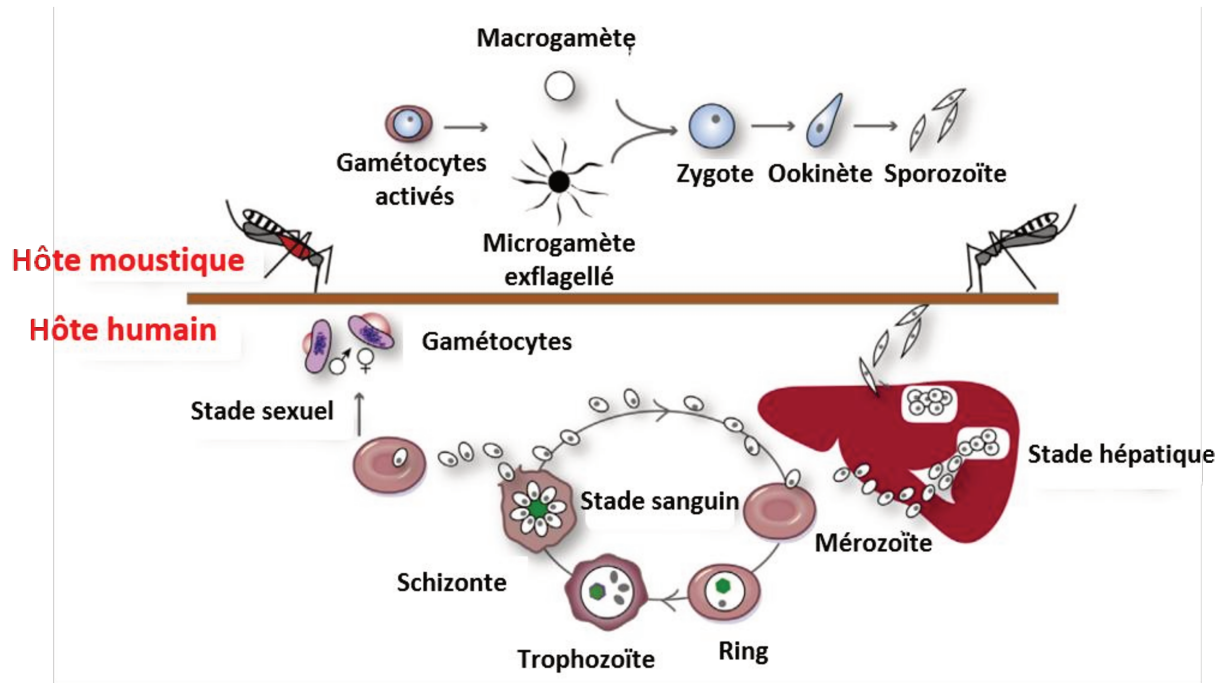


Figure 11. Cycle de vie de *Plasmodium falciparum*. D'après (Schmidt *et al.*, 2015).

1.3.3.2 Epidémiologie du paludisme

En 2016, l'Organisation mondiale de la santé estimait à environ 216 millions le nombre de cas de paludisme dans le monde. L'immense majorité des personnes infectées résident en Afrique (90%). Les autres porteurs du parasite se situent en Asie du Sud-Est (7%) et dans la région de la Méditerranée orientale (2%) (WHO, 2017).

Il est estimé qu'entre 2010 et 2016, le taux d'incidence du paludisme est passé de 76 à 63 cas pour 1.000 habitants. Néanmoins et malgré cette réduction, entre 2014 et 2016, le nombre de cas a considérablement augmenté dans la Région des Amériques, et légèrement dans les régions de l'Asie du Sud-Est, du Pacifique occidental et de l'Afrique. En 2016, on estimait à 445.000 le nombre de décès dus au paludisme dans le monde, contre 446.000 en 2015 (WHO, 2017).

P. falciparum est la cause principale des décès attribués au paludisme notamment chez les jeunes enfants. Ces enfants présentent généralement les symptômes suivants: fièvre, anémie sévère, obstruction microvasculaire avec ischémie tissulaire, détresse respiratoire, acidose, hypoglycémie, taux élevé d'aminotransférases, et parasitémie élevée (Schumacher & Spinelli, 2012).

Les caractéristiques de la transmission du paludisme varient d'une région à l'autre, même au sein du même pays. Elles dépendent de l'espèce du parasite, ses propriétés et ses vecteurs (hôtes définitifs, moustiques), des conditions écologiques et des facteurs socio-économiques impliqués dans la transmission du parasite et autres parasitoses, tels que la pauvreté et les conditions de services de soins de santé et de prévention (WHO, 2017).

L'émergence d'une résistance aux antipaludiques, incluant les artémisinines, traitement de première ligne actuel (Dondorp *et al.*, 2010) et d'une résistance des anophèles aux insecticides (Djouaka *et al.*, 2016) menace les progrès actuels pour diminuer la propagation du paludisme.

Pour cette raison, la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques dans l'optique de diminuer ou d'éradiquer la maladie est devenue essentielle pour la recherche scientifique. Comme pour *T. gondii*, les modifications post-traductionnelles pourraient apporter des pistes intéressantes.

1.3.4 Les modifications post-traductionnelles chez *P. falciparum*

En effet, les modifications post-traductionnelles, comme la phosphorylation et l'acétylation, sont un exemple de la mise en évidence de cibles médicamenteuses potentielles chez *P. falciparum* (Doerig *et al.*, 2015). Plusieurs modifications post-traductionnelles ont été décrites chez le parasite comme la *N*-Glycosylation et la *O*-Glycosylation (de Macedo *et al.*, 2010), la phosphorylation (Doug Chung *et al.*, 2009), la SUMOylation (Issar *et al.*, 2008), l'acétylation (Jeffers & Sullivan, 2012; Miao *et al.*, 2013), la méthylation (Kaur *et al.*, 2016; Mohammad *et al.*, 2017), la *O*-Fucosylation (Lopaticki *et*

al., 2017; Sanz et al. 2016), la lipidation (Gilson *et al.*, 2006) et la *O*-GlcNAcylation (Perez-Cervera *et al.*, 2011; Kupferschmid *et al.*, 2017).

La *O*-GlcNAcylation a été signalée pour la première fois chez *P. falciparum* par Dieckmann-Schuppert et collaborateurs en 1993 (Dieckmann-Schuppert *et al.*, 1993) en utilisant une approche similaire à celle utilisée par Torres et Hart (Torres & Hart, 1984). Comme nous l'avons mentionné pour *T. gondii*, mon équipe a également caractérisé tout un ensemble de protéines *O*-GlcNAcylées chez *P. falciparum* par Western blot (Perez-Cervera et al., 2011).

Dans le cadre de ma formation doctorale, j'ai travaillé avec le Pr. Ralph Schwarz et Mattis Kupferschmid de l'Université Philipps à Marburg (Allemagne) dans l'objectif de pousser un peu plus loin ce qui avait pu être fait en matière de *O*-GlcNAcylation chez *P. falciparum* en entreprenant l'identification d'une partie du *O*-GlcNAcome de l'apicomplexe. Ainsi, nous avons mis en évidence la *O*-GlcNAcylation de treize protéines intervenant dans la glycolyse, le repliement des protéines et l'architecture cellulaire. Les niveaux d'UDP-GlcNAc montrent que *P. falciparum* possède son propre stock de substrat pour entreprendre ses réactions de *O*-GlcNAcylation (Kupferschmid *et al.*, 2017).

Cette collaboration a fait objet d'une publication en deuxième auteur (article 2 en annexe 2) :

Identification of *O*-GlcNAcylated proteins in *Plasmodium falciparum*.

Mattis Kupferschmid, **Moyira Osny Aquino-Gil**, Hosam Shams-Eldin, Jörg Schmidt, Nao Yamakawa, Frédéric Krzewinski, Ralph T. Schwarz and Tony Lefebvre. Malaria Journal, 2017. DOI 10.1186/s12936-017-2131-2.

1.4 Les modèles végétaux *Arabidopsis thaliana* et *Chlamydomonas reinhardtii*

Arabidopsis thaliana (également connu sous le nom d'arabette des Dames ou arabette de Thalius) est une petite plante dicotylédone de la famille des Brassicacées (*Brassicaceae*, autrefois appelées Crucifères). Parmi les Brassicacées on retrouve également les radis, les choux et la moutarde.

A. thaliana est très utilisée comme modèle végétal pour étudier différents processus biologiques spécifiques aux plantes supérieures. Ce modèle possède un cycle de vie court et, d'un point de vue génétique, son génome est assez facile à travailler. De même, *Chlamydomonas reinhardtii* est une algue verte unicellulaire, chlorophyte, également très appréciée comme modèle biologique. Ces deux modèles possèdent, en accord avec des alignements de séquences de divers organismes, deux formes d'OGT chez *Arabidopsis* comme nous l'avons mentionné plus haut (SPY et SEC), et de manière intéressante une OGT-like qui semble être plus proche de SPY que de SEC chez *C. reinhardtii* comme nous le verrons un peu plus tard.

1.4.1 *Arabidopsis thaliana*

1.4.1.1 Généralités

1.4.1.1.1 Histoire et distribution géographique

A. thaliana est originaire d'Asie centrale et s'est propagée au fil du temps au travers de l'Eurasie. Elle est présente principalement dans l'hémisphère Nord, dans les régions tempérées, depuis les montagnes d'Afrique du Nord jusqu'au cercle polaire, et également en Amérique du Nord. Cette plante a été par la suite introduite en Afrique du Sud puis en Australie (Weigel & Mott, 2009) (Fig. 12).

Arabidopsis thaliana apparaît pour la première fois dans la littérature botanique en 1873 introduite par Alexander Braun décrivant une plante mutante dans un champ à proximité de Berlin (Braun, 1873; Meyerowitz, 2001). Il semblerait que cette mutation affectait le

gène AGAMOUS (AG) codant un régulateur de floraison ABC (cloné depuis lors en 1990). Bien que les botanistes recherchent un modèle d'étude biologique et génétique à l'instar de la drosophile, l'utilisation d'*A. thaliana* en tant que tel a quelque peu tardé. Il faudra attendre 1943 pour que Friedrich Laibach rapporte les avantages de temps de génération, de fécondité, de croissance et de mutagenèse chez cette plante (Laibach, 1943). Une toute première collection de mutants d'*A. thaliana* obtenue par utilisation des rayons X est générée par l'étudiante en thèse de Laibach, Erna Reinholz, en 1945. L'historique d'*A. thaliana* a été retracé par Meyerowitz (Meyerowitz, 2001).

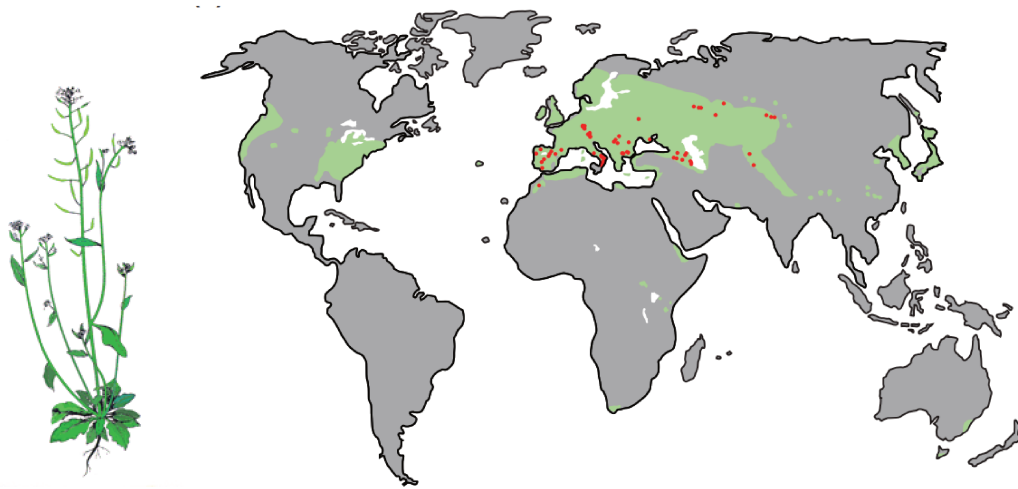


Figure 12. Représentation d'*Arabidopsis thaliana*, à gauche, et de sa distribution géographique à droite, en vert. Les zones rouges correspondent aux plants d'*A. thaliana* utilisés pour le 1001 Genomes project lancé en 2008 sur 1001 souches. Cette figure est extraite de TAIR database et de (Weigel & Mott, 2009)).

1.4.1.1.2 Etapes de croissance

Dans des conditions d'environnement considérées comme optimales, c'est-à-dire température constante de l'ordre de 20°C, luminosité journalière de seize heures, *A. thaliana* accomplit un cycle de vie complet de 60 jours (Fig. 13). La première étape d'une durée de 5 jours environ consiste en la germination des graines par l'émergence de la radicule (forme embryonnaire de la racine), de l'hypocotyle (partie de la racine comprise entre le collet et les cotylédons) et du cotylédon. Vient ensuite l'étape de croissance de 14 jours environ qui voit le déploiement des feuilles sous la forme d'une rosette basale. Par la suite, l'étape principale de croissance comprend une augmentation de la taille de la

rosette de 20 à 70% de la taille initiale (11 jours environ); cette étape se traduit par l'émergence de la florescence (apparition de l'épi) d'environ 5 jours. La production complète de fleurs *hermaphrodites*, dure environ 20 jours: à ce stade, la plante mesure entre 10 et 12 centimètres de haut, pour atteindre un maximum de 30 cm. Enfin, la maturation des siliques d'un millimètre de large et de quelques centimètres de long en forme de cylindre effilé permet après rupture de libérer les graines (vers le jour 48 environ). A ce stade, le processus de senescence démarre. La figure 13 correspond aux étapes principales de la croissance d'*A. thaliana* (Boyes, 2001).

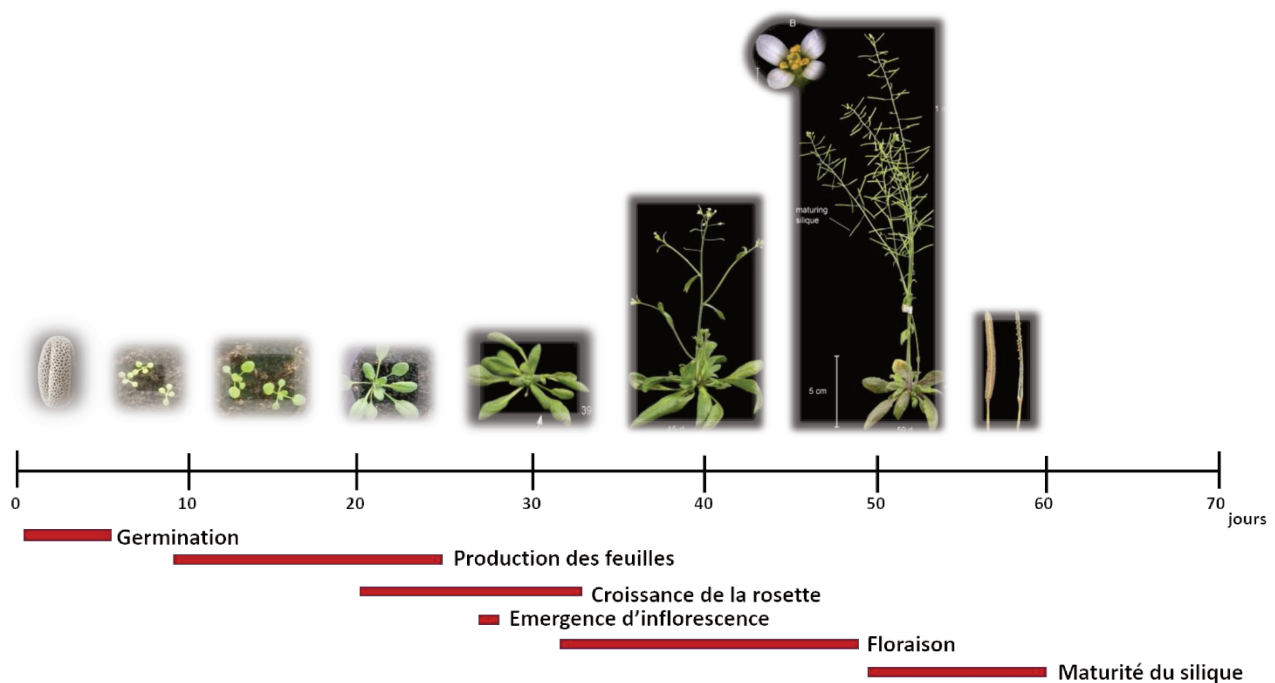


Figure 13. Cycle de vie d'*Arabidopsis thaliana* (modifié d'après Boyes, 2001). Cette figure représente les principales étapes de la croissance d'*Arabidopsis thaliana*.

1.4.1.1.3 Le génome décrypté d'*Arabidopsis thaliana*

Comme mentionné un peu plus haut, Friedrich Laibach a été le premier à proposer *A. thaliana* comme modèle génétique végétal dans les années 1940s. Il faudra attendre 2000 pour que son génome soit totalement séquencé grâce aux efforts concertés d'une communauté scientifique, le consortium international « *The Arabidopsis genome initiative, AGI* ». Ce projet avait pour but, comme toute initiative de séquençage de génome, de mieux comprendre les processus biologiques de la plante et d'identifier les

gènes impliqués ainsi que leur régulation dans le développement, le métabolisme, la défense, la morphogénèse ou les mécanismes de réparation de l'ADN entre autres. Le génome d'*A. thaliana* d'une longueur de 125 Mb est réparti sur 5 chromosomes avec près de 27.500 protéines codées. Ce projet a permis l'annotation du génome d'*A. thaliana*, de définir les catégories fonctionnelles des gènes, les dynamiques et architectures chromosomiques, la distribution des éléments transposables, les transferts de gènes latéraux à partir des organites, et de comparer la séquence et la structure du génome à ceux d'autres espèces végétales. Suite à l'AGI, en 2008 le *1001 Genomes Project for Arabidopsis thaliana* a été amorcé (Weigel et al Mott, 2009). Ce second consortium avait pour objectif de séquencer les génomes de 1001 souches d'*A. thaliana* originaires de diverses conditions écologiques et de relier les génotypes aux phénotypes. Les graines du *1001 Genomes* sont désormais disponibles pour toute personne désirant les utiliser.

1.4.2 *Chlamydomonas reinhardtii*

1.4.2.1 Généralités

L'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas*, est une microalgue (Fig. 14) offrant un cycle de vie simple, une ségrégation et une collecte aisée des mutants, et un éventail large et croissant d'outils et de techniques pour les études de génétique moléculaire. Parmi les principaux domaines de recherche utilisant ce modèle figurent l'étude de la structure et de la fonction flagellaires, la génétique des corps basaux (centrioles), la biogenèse des chloroplastes, la photosynthèse, la perception de la lumière, la reconnaissance cellulaire et le contrôle du cycle cellulaire (Manuell & Mayfield, 2006).

L'espèce *Chlamydomonas reinhardtii* appartient à la classe des chlorophycées (algues vertes), de l'ordre des *Chlamydomonadales* (ou *Volvocales*) et à la famille des *Chlamydomonadaceae*. *C. reinhardtii* aurait divergé des plantes terrestres il y a un milliard d'années.

Comme pour *A. thaliana*, le génome de *C. reinhardtii* a été séquencé: il porte sur environ 120 M paires de bases. L'ensemble des gènes sont répartis sur un total de 17

chromosomes. Ces ressources sont également disponibles pour l'ensemble de la communauté scientifique et comprennent les souches de type sauvage et mutantes, les constructions plasmidiques, et une base de données en ligne (Blabym *et al.*, 2015).

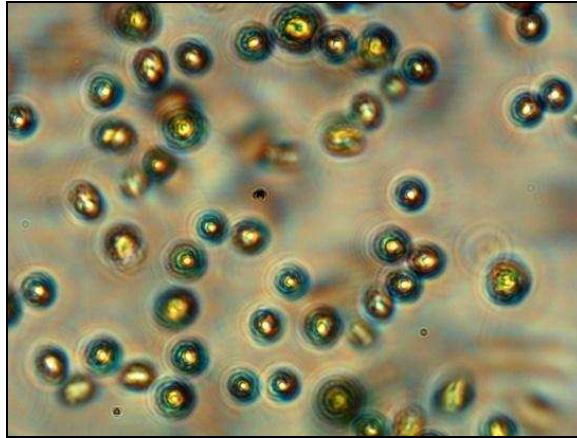


Figure 14. *Chlamydomonas reinhardtii* observé au microscope (Objectif 40x).

1.4.2.2 Biologie et cycle de vie

Chlamydomonas fait partie d'un genre de flagellés unicellulaires mobiles comportant deux flagelles égaux. Il possède, à proximité du flagelle, deux petites vacuoles contractiles qui ont une fonction excrétoire. Une tache rouge pigmentée appelée stigma sensible aux photons, permet à la cellule de s'orienter par rapport à la lumière (nécessaire à la photosynthèse de la microalgue). Il existe une grande variation dans la reproduction des différentes espèces du genre *Chlamydomonas* (Pröschold *et al.*, 2005).

Comme nous avons pu le voir pour les apicomplexes, il existe deux types de cycle de vie pour *C. reinhardtii*: l'un sexué et l'autre asexué (Fig. 15). En général, la reproduction asexuée se fait par fission (division en fragments de fission nucléaire), le protoplasma est divisé en 4 à 8 zoospores semblables à celles des parents. Dans le cycle sexuel, la privation d'azote conduit les cellules à former des isogamètes, qui se fondent par paires en zygote. Le zygote sans flagelle est délimité par une paroi épaisse qui résiste à des conditions difficiles. Lorsque les conditions deviennent plus favorables, le zygote *via* la méiose, forme 4 zoospores haploïdes. En culture, ces algues peuvent se développer dans un simple milieu contenant des sels inorganiques en utilisant la lumière seule pour fabriquer

l'énergie dont elles ont besoin. *Chlamydomonas* peut donc se développer sous une forme autotrophe mais, néanmoins, peut pratiquer l'hétérotrophie, c'est-à-dire qu'il doit pour se nourrir utiliser des nutriments organiques présents dans le milieu (Cross & Umen, 2015).

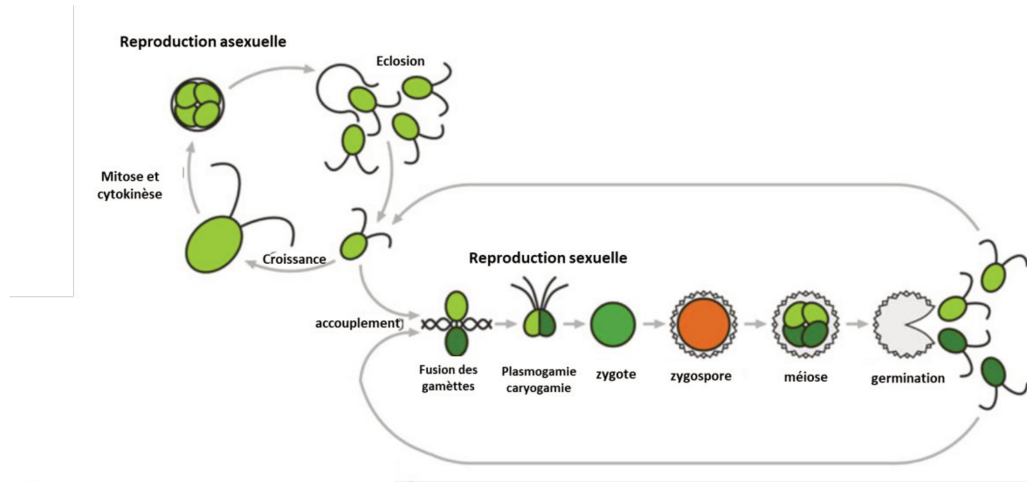


Figure 15: Cycle de vie de *Chlamydomonas reinhardtii* (D'après Hallmann, 2011)

1.4.3 Les modifications post traductionnelles chez les plantes

Après l'étape de traduction, à l'instar des protéines eucaryotes animales, les protéines végétales peuvent subir nombre de modifications post-traductionnelles. Comme pour leurs homologues chez les animaux, ces modifications affectent presque tous les aspects de l'activité protéique, y compris la fonction, la localisation, la stabilité et les interactions dynamiques avec d'autres molécules (Strasser, 2016).

1.4.3.1 La N-Glycosylation

Chez les plantes, la N-glycosylation joue un rôle important dans de nombreux processus biologiques, comme le repliement des protéines, les processus de contrôle qualité dans le *reticulum* endoplasmique, la stabilité des protéines et les interactions protéine-protéine. A la différence des mammifères, les plantes produisent des oligosaccharides de complexité et de taille réduites, des structures comportant notamment du β 1,2-Xylose, α 1,3-Fuc et de

type Lewis^a qui sont par ailleurs conservées chez les plantes supérieures (Lannoo & Van Damme, 2010).

L'étude des *N*-glycosylprotéines chez les plantes montre que la grande majorité des protéines sécrétées sont glycosylées. Aussi, de nombreux aspects de la croissance, du développement, du métabolisme et des réponses biotiques des plantes sont affectés par la *N*-glycosylation, y compris les effets directs sur les fonctions enzymatiques (Song *et al.*, 2011).

En ce sens, la fonction de plusieurs kinases de type RLK (receptor-like kinases) sont sensibles aux perturbations des voies de contrôle qualité de la *N*-glycosylation. Un des exemples rapportés est celui du récepteur *Arabidopsis* EF-Tu (EFR). Cet EFR est un récepteur de reconnaissance de formes impliqué dans la perception de fragments du facteur d'élongation bactérien Tu (EF-Tu), du récepteur Flagellin Sensitive-2 (FLS2) et du récepteur Brassinosteroid Insensitive-1 (BRI1) (Jin *et al.*, 2007; Häweker *et al.*, 2010).

Le riz, *Oryza sativa*, constitue un modèle très intéressant pour l'étude de la *N*-glycosylation chez la plante. Par exemple, des changements drastiques dans la structure des *N*-glycanes sont observés avant et après germination du riz (Horiuchi *et al.*, 2015). Des structures oligomannosidiques et paucimannosidiques ont été décrites pour le riz non germé. Par contre après germination des structures complexes ont pu être rapportées avec notamment l'apparition de Lewis a. Ces observations indiquent que la modification des structures glycaniques soit nécessaire au processus de développement chez la plante. Pour approfondir cette étude, la même équipe a joué sur les conditions environnementales, notamment la luminosité, pour identifier de possibles changements de structures des *N*-glycanes (Horiuchi *et al.*, 2016). Tout d'abord, il n'y a pas de différence fondamentale entre la structure des *N*-glycanes de la tige et des racines d'*Oryza sativa*. Néanmoins, en présence de lumière, les structures paucimannosidiques diminuent dans la partie racinaire. De manière surprenante, lorsque la plante se développe à l'obscurité, bien que des changements phénotypiques soient rapportés, les structures glycaniques semblent inchangées. Très probablement les plantes supérieures sont capables de

s'adapter aux conditions de stress (luminosité/obscurité) sans nécessité de changements de glycosylation complexe (Horiuchi et al., 2016).

Chez *Arabidopsis*, la première cible fonctionnelle de la *N*-glycosylation à avoir été identifiée est Korrigan-1 (KOR1), une glycoprotéine transmembranaire de type II douée d'une activité β -1,4-endoglucanase (Rips *et al.*, 2014). KOR1 est localisée à la membrane plasmique, le réseau trans-Golgi (TGN) et le tonoplaste. KOR1 interagit avec les complexes de cellulose synthase, il est par conséquent requis pour la biosynthèse de la cellulose (Rips *et al.*, 2014).

Le rôle de la *N*-glycosylation dans le développement et la croissance végétale est étudié depuis plus d'une vingtaine d'années. En effet, en 1993 von Schaewen et ses collaborateurs ont isolé un mutant déficient pour la N-acétylglucosaminyltransférase 1 (GnT1), appelé *complex glycan less (cgl)* chez *A. thaliana*, nécessaire pour la synthèse des *N*-glycanes complexes (von Schaewen *et al.*, 1993). Malgré cela, les auteurs n'ont pas observé de modification apparente ou de trouble dans le développement des plantes mutantes suggérant que les glycanes complexes ne sont pas essentiels aux processus vitaux chez les végétaux (von Schaewen *et al.*, 1993). Cette observation a été renforcée par le fait qu'un triple mutant pour les α 1,3-fucosyltransférases et la β 1,2-Xylosyltransférase (FucTA/FucTB/XylT) chez le même modèle ne révélait aucun phénotype morphologique évident dans des conditions de croissance standard (Strasser *et al.*, 2004).

Plus tard, et de manière contradictoire, le mutant *cgl1* a montré une sensibilité particulière au stress salin, provoquant une inhibition de la croissance, une morphologie aberrante de l'extrémité des racines et une accumulation de callose en comparaison à la souche sauvage (Kang *et al.*, 2008). Les auteurs suggèrent de cette étude que la *N*-glycosylation joue un rôle au-delà du repliement des protéines dans le *reticulum* endoplasmique puisqu'il semble indispensable à la formation d'une paroi cellulaire résistante au stress salin.

Le système de repliement et de contrôle qualité des glycoprotéines synthétisées dans le *reticulum* endoplasmique fondé sur une série de cycles glyco-déglyco chez les eucaryotes

supérieurs a été clairement décrit (Cacan *et al.*, 1998). Chez les levures, ce rôle est tenu par la *O*-mannosylation, absente chez les végétaux. Or, il semblerait que ce système existe chez les plantes et qu'il soit joué par un mécanisme inconnu dans lequel un transporteur de nucléotides sucres (UDP-GlcNAc et UDP-GalNAc) récemment identifié chez *A. thaliana*, ROCK1, tient un rôle de premier plan (Niemann *et al.*, 2015). Il existerait de ce fait un système chez les plantes capable de jouer ce rôle de contrôle qualité mais probablement fondé sur un type de glycosylation indéterminé.

1.4.3.2 La *O*-Glycosylation

On ne retrouve pas chez les plantes de *O*-Glycosylation de type mucine comme chez les animaux, les enzymes initiant et procédant à l'élongation des chaînes glycaniques n'ayant pas été retrouvées dans le génome végétal. Les plantes produisent un type de *O*-Glycosylation très simple voire minimaliste, puisque seul un galactose est transféré sur des résidus de sérine des protéines cibles. Néanmoins, grâce à aux biotechnologies, il est possible de modifier le patron d'expression d'enzymes de glycosylation chez les plantes et de leur faire produire tout un ensemble de glycosylations normalement absentes des végétaux. Par exemple, la production d'une GalNAcT2 recombinante humaine chez *Nicotiana benthamiana* se localise au niveau de l'appareil de Golgi et démontre une activité *in vitro* (Daskalova *et al.*, 2010). Ainsi la plante est-elle capable de former des liaisons Sérine-GalNAc et d'initier de la *O*-Glycosylation par GalNAc. Malgré tout, pour que les plantes puissent générer des protéines recombinantes parfaitement « processées » au niveau *O*-Glycosylation, il existe des limitations quant à la disponibilité en UDP-GalNAc et à la translocation de ce substrat à l'appareil de Golgi. L'expression ectopique d'une UDP-GlcNAc 4-épimérase et d'un transporteur de nucléotide sucre UDP-HexNAc est capable de corriger cette insuffisance. Cette approche est particulièrement intéressante dans l'optique de produire des molécules humanisées à visée thérapeutique.

On retrouve également chez les plantes des chaînes d'arabinose ainsi que des arabinogalactanes complexes d'un point de vue structural sur des résidus hydroxyproline de protéines de la paroi cellulaire (Tryfona *et al.*, 2012). En ce sens, des approches bio-

informatiques ont révélé la nature de 166 glycoprotéines riches en hydroxyproline, dont 85 portent potentiellement des chaînes d'arabinogalactane (Showalter *et al.*, 2010).

1.4.3.3 La Phosphorylation

De nombreuses kinases et phosphatases ont été identifiées à partir du génome d'*A. thaliana*, suggérant l'importance de la phosphorylation chez les plantes (Kerk, 2002).

La phosphorylation chez les végétaux est reliée à la réponse de la plante à différents facteurs internes ou externes notamment la lumière. C'est ce qu'on retrouve notamment au cours de la photosynthèse. Le dioxyde de carbone (CO₂) est fixé dans les chloroplastes (phase chimique ou sombre), en utilisant des réactions de la voie de Calvin-Benson. Les intermédiaires métaboliques de cette voie aboutissent à la formation d'hexoses-6-phosphate puis de saccharose. L'enzyme sucrose phosphate synthase (SPS) est un point de contrôle important dans cette voie. L'activité de cette enzyme est modulée par phosphorylation en réponse aux signaux lumineux (Huber, 2007).

On retrouve également chez les plantes une signalisation par phosphorylation de tyrosines. Ainsi les hormones de type brassinostéroïdes activent des récepteurs LRR-RLK (Leucine-rich repeat receptor-like kinases) pour promouvoir la croissance et le développement végétal. Il s'agit donc d'un phénomène de transduction du signal comme celui retrouvé dans les cellules animales (Jin *et al.*, 2007; Oh *et al.*, 2009).

Enfin, au cours d'un stress thermique, la transduction du signal et la modulation des cascades MAPK chez les plantes jouent un rôle important dans la réponse cellulaire par le jeu des phosphorylations-déphosphorylations. C'est notamment ce qui a pu être démontré chez le riz en cas de sécheresse ou de stress à basse température (Wen, 2002).

1.4.3.4 L'ubiquitination

Il semblerait qu'environ 7% du génome d'*Arabidopsis* code des protéines impliquées dans les mécanismes d'ubiquitination, la majorité codant des ubiquitine ligases E3 ou des facteurs facilitant l'interaction avec le substrat. Cette observation suggère le rôle pivot de

l'ubiquitination dans tout un ensemble de processus vitaux chez la plante, à savoir la croissance, le développement et la morphogenèse, la signalisation liée aux différentes hormones, les réponses biotiques et le métabolisme (Vierstra, 2009; Pratelli *et al.*, 2012). Concernant le métabolisme, l'aldéhyde oxydase 3, impliquée dans la synthèse de l'acide abscissique, est polyubiquitinée par l'ubiquitine ligase E3 SAUL1 (senescence-associated E3 Ubiquitin Ligase 1) ce qui entraîne sa dégradation par le protéasome et prévient la sénescence prématurée (Raab *et al.*, 2009). Autre exemple, l'ubiquitine ligase ATL31 est impliquée dans la croissance végétale et ce de manière carbone et azote (C/N) dépendante. ATL31 cible les protéines 14-3-3 en les ubiquitinant, ce qui résulte en leur adressage au protéasome en vue de leur dégradation. Des analyses par mutagenèse dirigée et par double hybride levure ont montré que ATL31 interagissait de manière phospho-dépendante avec les protéines 14-3-3 (Yasuda *et al.*, 2014). Les mutants de phosphorylation d'ATL31 ne peuvent plus fixer 14-3-3, ayant pour effet de stopper la croissance végétale dans des conditions C/N perturbées.

1.4.3.5 La SUMOylation

La SUMOylation est reconnue pour affecter plusieurs processus importants chez les plantes notamment la réponse au stress environnemental, la réaction de défense envers les pathogènes, mais également pour interférer avec la floraison, la croissance et le développement cellulaire, et l'assimilation de l'azote (Park *et al.*, 2011). Les plantes sont un modèle intéressant pour l'étude de la SUMOylation car elles permettent de combler certains manques ou de dépasser certaines limites rencontrés avec des modèles plus conventionnels (Park *et al.*, 2011).

Chez les plantes, la première protéine SUMOylée a été isolée chez la tomate en tant que partenaire d'interaction de la xylanase (EIX), une enzyme impliquée dans la signalisation par l'éthylène chez le champignon phyto-pathogène *Trichoderma viride* (Hanania *et al.*, 1999). Des analyses par protéomique et par double hybride en levure ont permis d'identifier plus de 200 cibles SUMOylées chez *Arabidopsis* (Elrouby & Coupland, 2010). Des interactions croisées antagonistes et coopératives entre la SUMOylation,

l'ubiquitination et la phosphorylation ont été relevées (Park & Yun, 2013), laissant supposer un dialogue très complexe entre les modifications post-traductionnelles chez les plantes tout comme chez les animaux.

1.4.3.6 Le glycosylphosphatidylinositol (GPI)

La fixation d'un glycosylphosphatidylinositol (GPI ou ancre GPI) à l'extrémité C-terminale des protéines est une modification fréquente des protéines se réalisant dans le RE, y compris chez les plantes. Ce processus est complexe et nécessite tout un ensemble d'étapes mettant en jeu une machinerie protéique relativement conservée (Kinoshita, 2014). A l'instar de la *N*-Glycosylation, l'ancre GPI est transférée en bloc sur la protéine par le complexe GPI-transamidase. Une étude ayant combinée analyse du protéome et recherche bioinformatique dans le génome d'*A. thaliana* a permis d'identifier 248 protéines potentielles ancrées GPI (Borner *et al.*, 2003).

Des orthologues végétaux putatifs des différentes protéines impliquées dans la biosynthèse du GPI ont été retrouvées chez *A. thaliana* et le riz (Eisenhaber *et al.*, 2003). Malheureusement pour la majeure partie, ils n'ont pu être caractérisés d'un point de vue fonctionnel. Néanmoins, les mutants hétérozygotes dépourvus de GPI-GlcNAc transférase chez *A. thaliana* (SETH1 et SETH2, homologues respectifs de PIG-C et PIG-A chez les mammifères) présente des défauts de fertilité (Lalanne *et al.*, 2004).

De même, des plantes exprimant des mutants de l' α 1,4-mannosyltransférase, appelée PEANUT1 (homologue de PIG-M mammifère) et impliquée dans la synthèse du GPI, présentent des réductions de protéines ancrées GPI et s'avèrent être létales (Gillmor *et al.*, 2005). Dans une étude récente, il a été montré qu'une mutation de l' α 1,2-mannosyltransférase (homologue de PIG-B chez les mammifères), préalablement identifiée comme APTG1 pour *abnormal pollen tube guidance1*, présente des phénotypes similaires avec une fertilité mâle anormale et une létalité embryonnaire (Dai *et al.*, 2014). Ensemble, ces études mettent en évidence le caractère essentiel des ancres GPI dans le développement et la reproduction des plantes.

1.4.4 Quelques données de glycosylation chez *Chlamydomonas reinhardtii*

1.4.4.1 La O-Glycosylation

Chez *Chlamydomonas reinhardtii*, la O-Glycosylation est connue de longue date. Le mutant *gag-1* par exemple forme des agrégats cellulaires causés par des défauts de mitose, probablement en lien avec des défauts de glycosylation de protéines de la paroi cellulaire, possiblement les extensines (Vallon and Wollman, 1995). Cette même mutation rend l'algue stérile, renforçant le caractère crucial de la O-Glycosylation chez les plantes. L'analyse des O-Glycanes de la paroi externe de *C. reinhardtii* a révélé des structures linéaires contenant de l'arabinose et plus surprenant du galactofuranose, le tout fixé sur de l'hydroxyproline (Bollig *et al.*, 2007).

1.4.4.2 La N-glycosylation

La N-Glycosylation chez *C. reinhardtii* reste à l'heure actuelle un champ de recherche très intéressant en termes de prospection en ce sens qu'assez peu de choses ont été décrites sur le sujet, en tout cas nettement moins que chez les modèles de laboratoire plus usités. Néanmoins, Mathieu-Rivet et ses collaborateurs de l'Université de Rouen ont étudié dans le détail, grâce à un ensemble d'approches expérimentales très pointues alliant génomique, glycomique et glycoprotéomique, le processus de N-Glycosylation chez cette microalgue (Mathieu-Rivet *et al.*, 2013). Majoritairement, les structures obtenues étaient du type oligomannosidique avec quelques espèces minoritaires portant de la xylose et du 6-O-méthylmannose. Cette étude exhaustive a permis à cette équipe française de mettre en évidence un système de glycosylation complexe transitant par le *reticulum* endoplasmique et l'appareil de Golgi mais dans un processus indépendant de la GlcNAc transférase I (GnT-I) aboutissant à la formation de N-glycanes différents de ce qui est généralement retrouvées chez les plantes terrestres.

Ces différentes données sur la structure des *N*-glycanes chez les microalgues sont d'un intérêt pharmaceutique et thérapeutique de premier plan. En effet, la capacité à modifier le profil de *N*-glycosylation chez ces organismes dans le but de produire de nouvelles biomolécules à activité thérapeutique sont une opportunité très séduisante d'amélioration de compatibilité chez l'Homme. Ce type d'approche a été documentée par l'équipe du Pr. Muriel Bardor en 2014 (Mathieu-Rivet *et al.*, 2014).

1.4.5 Rôles de la *O*-GlcNAcylation, de SPINDLY et de SECRET AGENT chez les végétaux

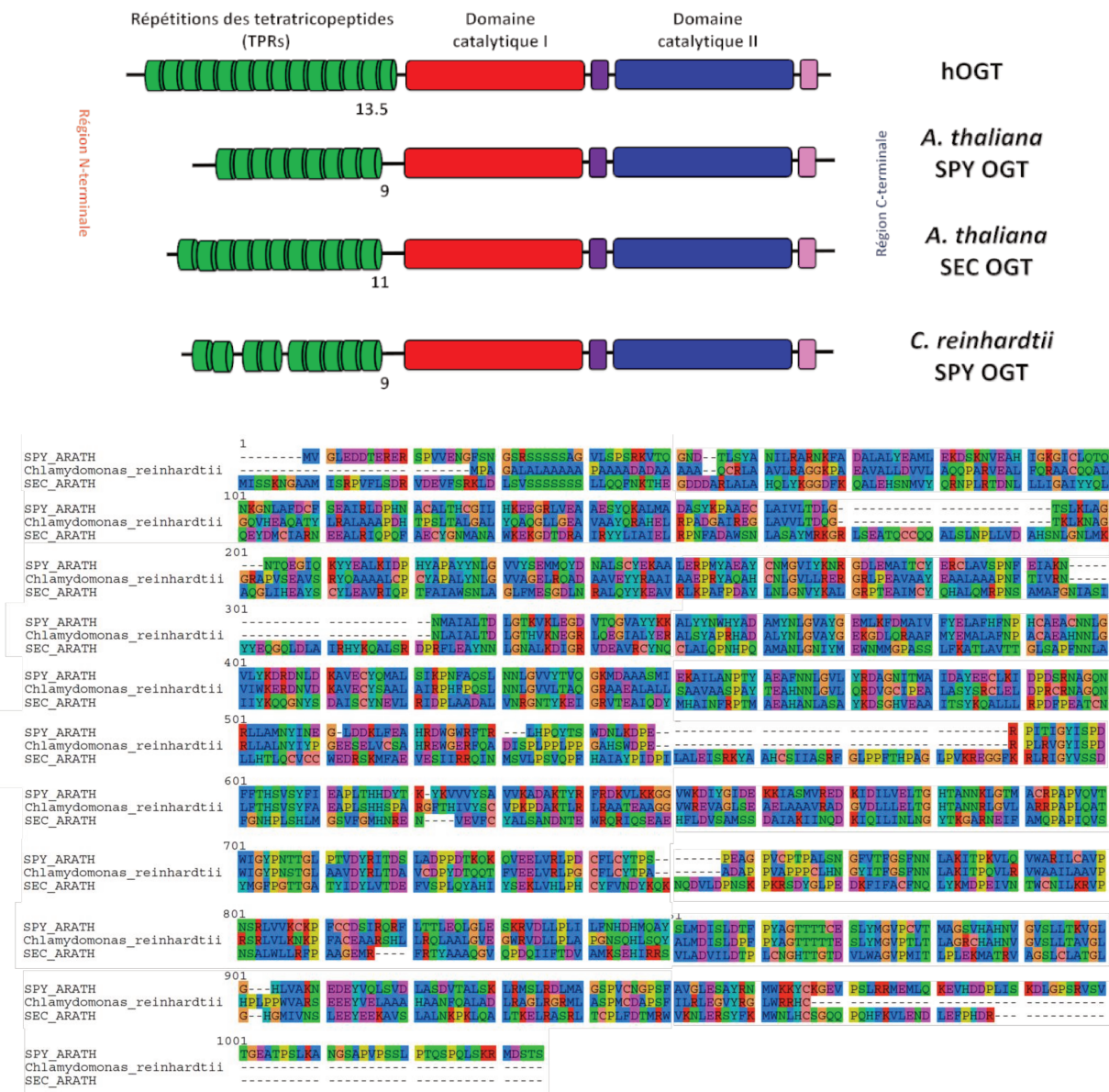
Depuis sa découverte, la *O*-GlcNAcylation en qualité de modification post-traductionnelle, a été étudiée chez plusieurs modèles biologiques. Au cours de l'évolution des espèces, le rôle des glycosyltransférases chez les procaryotes et les eucaryotes a très probablement été modifié en fonction des types trophiques, des besoins et des modes métaboliques de chaque organisme. Ainsi chez les végétaux, ce type d'étude a-t-il conduit à intégrer le rôle des glycosyltransférases dans des processus biologiques bien spécifiques comme la photosynthèse ou la voie des phytohormones gibbérellines. En 2010, Olszewski et collaborateurs ont entrepris une analyse phylogénétique des différentes OGTs (Olszewski *et al.* 2010b). Ainsi, SEC et SPY sont exprimées chez les plantes tandis que SEC est retrouvée chez les mousses et les plantes vasculaires. Les algues vertes et d'autres espèces parmi les apicomplexes et les protozoaires expriment une enzyme *SPY-like*. Ces OGTs ainsi que la *O*-GlcNAcylation semblent fondamentales pour divers processus chez les plantes, notamment la réponse aux phytohormones et signaux environnementaux, le rythme circadien, le développement, le transport intercellulaire ou l'infection virale (Olszewski *et al.* 2010b).

1.4.5.1 Les enzymes SPINDLY (SPY) et SECRET AGENT (SEC)

De manière générale, SPY et SEC sont décrites comme des glycosyltransférases putatives de la famille GT41 (EC : 2.4.1.255) selon la classification CAZy.

Chez *A. thaliana*, SPY est constituée 914 acides aminés; on trouve pour SPY 11 domaines TPRs, les domaines catalytiques I et II (CDI/II) et un domaine PPO (Fig. 16). De même, SEC contient 977 acides aminés, 14 domaines TPRs, CDI et CDII et un domaine PPO.

Chlamydomonas reinhardtii exprime une glycosyltransférase SPY-like composée de 9 TPR, des domaines catalytiques CDI et CDII (Olszewski *et al.*, 2010b). Ces glycosyltransférases possèdent une certaine homologie de séquence avec l'OGT humaine : 28% pour SPY, 44% pour SEC et 29% pour l'OGT putative exprimée par *C. reinhardtii* (Fig. 16).



1.4.5.2 Rôles de SPY et de SEC chez les plantes

1.4.5.2.1 En qualité de régulateurs négatifs de la voie de signalisation de la gibbérelline (GA)

SPY a été reconnu il y a plusieurs années comme un régulateur négatif de la voie de signalisation de la gibbérelline (GA). La GA est une phytohormone tétracyclique diterpénoïde qui contrôle la croissance, le développement, la germination et la floraison chez les plantes. Trois mutants indépendants et récessifs de SPY, *spy-1*, *spy-2* et *spy-3*, ont été identifiés après confirmation de leur résistance au paclobutrazol, inhibiteur de biosynthèse de la GA. Il a pu être démontré que les mutants récessifs de *spy* étaient capables de supprimer toutes les caractéristiques phénotypiques causées par le mutant *ga1-2* présentant une déficience dans la voie de la GA (Jacobsen & Olszewski 1993).

Un peu plus tard, cet effet a été également étudié sur un mutant semi-dominant de la GA noté *gai*. Le mutant *spy-5*, quatrième allèle récessif, situé au locus SPINDLY chez *A. thaliana* montre une partielle suppression du phénotype *gai* (Wilson & Somerville 1995).

Des analyses un peu plus fonctionnelles ont permis de montrer, grâce à l'utilisation de mutants *spy*, que les TPRs 6, 8 et 9 ainsi que le domaine catalytique C-terminal sont nécessaires à la signalisation de la GA (Silverstone *et al.*, 2007). D'un point de vue mécanistique, SPY semble supprimer la réponse à la GA par une potentialisation de l'activité de RGA (Repressor of *ga1-3*) (Maymon *et al.*, 2009). RGA fait partie de la famille des facteurs de transcription DELLA agissant comme répresseurs. Cette famille possède plusieurs membres: GAI (GA Insensitive) qui en collaboration avec RGA bloque l'élongation de la tige et l'induction florale; RGL1 (RGA-like 1); RGL2 qui inhibe la germination des graines et RGL3. Tous les membres de la famille DELLA répriment la signalisation de la GA chez *A. thaliana*. En revanche, GA dérègle leur activité en favorisant la protéolyse des protéines DELLA au travers d'un mécanisme dépendant de SCF^{SLY1}, une ubiquitine ligase E3. Il est suggéré que SPY est un répresseur de la signalisation GA en modifiant les protéines RGA ou autres protéines DELLA (Steiner *et al.*, 2016).

Plus récemment, une étude a montré que les protéines DELLA sont *O*-GlcNAcylées par SEC (Zentella *et al.*, 2016). La glycosylation de RGA inhibe son interaction avec BZR1, PIF3, PIF4 et JAZ1 qui interviennent dans la signalisation lumineuse, jasmonate et brassinostéroïde (Zentella *et al.*, 2016).

1.4.5.2.2 En qualité de régulateur positif de la signalisation des cytokinines

En 2005, une interaction entre la signalisation de la GA et la signalisation des cytokinines (CKs) a été décrite (Greenboim-Wainberg *et al.*, 2005). Les CKs sont des phytohormones qui favorisent et maintiennent la division des cellules végétales en culture et sont également impliqués au cours des divers processus de différenciation, notamment la formation de pousses, la photomorphogenèse et la sénescence (Riou-Khamlichi *et al.*, 1999). La perte de fonction de SPY promeut la résistance à la cytokinine et la gibbérelline inhibe la réponse aux cytokinines: SPY agirait à la fois comme répresseur des réponses GA et comme régulateur positif de la signalisation des cytokinines (Greenboim-Wainberg *et al.*, 2005).

L'interaction des facteurs de transcription de classe 1 TCP (Teosinte Branched-1/Cycloidea/Proliferating cell factor), facteurs régulant la prolifération cellulaire, et de SPY facilite la réponse aux cytokinines des fleurs et des feuilles, en induisant un changement de formes des feuilles et le développement du trichome chez *A. thaliana* (Steiner *et al.*, 2012). Ceci a pu être démontré par l'interaction physique et génétique entre SPY, TCP14 et son homologue TCP15: SPY semble être nécessaire pour l'activité de TCP14. De plus, TCP14 et TCP15 interagissent avec SPY pour promouvoir la réponse aux cytokinines. En revanche, l'interaction entre les deux facteurs de transcription et SEC n'a été seulement démontrée que par l'expression de la glycosyltransférase chez *E. coli*. En effet, chez les plantes, les mutants *sec* ne présentent pas de phénotypes suffisants pour étudier la signalisation des cytokinines ou l'activité de TCP14 et TCP15 (Steiner *et al.*, 2012). Plus tard, l'importance de l'activité de SPY dans l'accumulation de TCP14 a été démontrée (Steiner *et al.*, 2016). Dans cette étude, une mutation dans le domaine catalytique putatif

de SPY a favorisé la protéolyse de TCP14 par le protéasome 26S tout en supprimant la signalisation des cytokinines.

1.4.5.2.3 Au cours du rythme circadien

Afin d'étudier le rôle des domaines TPRs de SPY localisés dans le domaine N-terminal (région d'interaction protéine-protéine), le criblage double hybride en levure a été réalisé pour identifier les protéines qui interagissent avec SPY. Parmi celles-ci, la protéine Gigantea (GI) a été retrouvée (Tseng *et al.*, 2004). Cette protéine nucléaire est impliquée dans différents processus: induction de la floraison liée aux journées longues, inhibition de l'allongement de l'hypocotyle par la lumière rouge, et rythme circadien. La fonction de GI et SPY a été testée en examinant la période de floraison en utilisant les gènes d'expression Constans (CO) et du Flowering Locus T (FLT), et la réponse à la lumière rouge des doubles mutants *spy-4/gi-2*. Les auteurs ont également examiné le mouvement des cotylédons de plusieurs mutants *spy* et du double mutant *spy-4/gi-2* ils ont démontré que SPY et GI travaillent de concert (Tseng *et al.*, 2004).

1.4.5.2.4 En interaction avec les organismes hôtes

Pour rappel, les virus ne sont pas capables d'exprimer leur propre OGT. A ce sujet, des études génétiques menées chez les plantes ont suggéré que SEC était capable de modifier la protéine de capsid du *Plum pox virus* (PPV-CP) et que cette modification jouait un rôle dans le processus d'infection (Chen *et al.*, 2005). PPV-CP est capable d'infecter les mutants OGT d'*Arabidopsis sec-1*, *sec-2* et *spy-3*, mais au début de l'infection, les taux de propagation et d'accumulation de virus sont réduits chez les mutants *sec-1* et *sec-2* par rapport à *spy-3* et les plantes de type sauvage (Chen *et al.*, 2005).

Bien que ces résultats suggèrent que SEC modifie PPV-CP et que la modification joue un rôle dans l'infection, les résultats n'excluent pas la possibilité que la mutation de SEC agisse indirectement pour bloquer la modification de PPV-CP. Dans cette étude, l'hypothèse selon laquelle SEC modifie directement PPV-CP est soutenue par l'observation que SEC produite chez *E. coli* modifie PPV-CP. Enfin, une approche par mutagenèse

dirigée, a permis de démontrer que SEC modifie quatre acides aminés différents proche de l'extrémité N-terminale de la protéine (Kim *et al.*, 2011).

1.4.5.2.5 Par la régulation de l'activité des histones lysine méthyltransférases

Bien que le rôle de la *O*-GlcNAcylation en termes d'épigénétique ait été décrit chez les animaux (Lewis & Hanover, 2014; Hanover *et al.*, 2012), cette hypothèse n'a pas été explorée chez les plantes. Très récemment, une équipe a mis en évidence la participation de SEC comme régulateur positif de l'activité des histones méthyltransférases (HKMT) chez *A. thaliana* (Xing *et al.*, 2018). La perte d'expression de cette enzyme provoque un phénotype de floraison précoce; SEC semble activer l'histone Arabidopsis homolog of Trithorax-1 (ATX1) (Xing *et al.*, 2018).

Dans cette étude, les auteurs ont étudié l'effet de la perte de fonction OGT SEC sur la régulation du temps de floraison en utilisant un mutant *null*, *sec-5*, chez Arabidopsis. Ce mutant présente un phénotype de floraison précoce avec une expression régulée à la baisse du FLC codant un régulateur négatif clé de la floraison (Xing *et al.*, 2018). Des études biochimiques et génétiques ont indiqué que l'histone méthyltransférase ATX1 est activée de manière dépendante à la *O*-GlcNAcylation: cette modification est donc fondamentale dans la régulation de l'activité de HKMT chez les plantes (Xing *et al.*, 2018).

1.4.5.2.6 SPY perd son statut d'OGT

Bien que plusieurs publications aient montré l'importance de la putative OGT SPY, en 2017, Zentella et collaborateurs ont démontré que bien que SPY régule de manière négative la signalisation GA, tandis que SEC la régule positivement, il est apparu que SPY ne portait pas d'activité GlcNAc transférases (Zentella *et al.*, 2017).

En revanche, les auteurs ont découvert que SPY portait une toute autre activité glycosyltransférase de type *O*-Fucosyltransférase (Zentella *et al.*, 2017). Ceci a pu être prouvé après analyse par spectrométrie de masse des produits issus de la catalyse enzymatique, et détermination de l'activité catalytique de SPY *in vitro*. Cette *O*-

Fucosylation semble stimuler l'activité de la protéine DELLA, en s'opposant au rôle par SEC
(fonction inhibitrice)(Zentella *et al.*, 2017).

2. Résultats des travaux personnels

2.1 La O-GlcNAcylation chez *Plasmodium falciparum*

Pendant ma thèse, j'ai eu la chance de participer à un projet portant sur *Plasmodium falciparum* en collaboration avec le Pr. Ralph Schwarz et Mattis Kupferschmid de l'Université Philipps à Marburg (Allemagne). Ces travaux ont été valorisés par une publication dans *Malaria Journal* que j'ai signé en second auteur (Kupferschmid et al. 2017) (article 2 en annexe 2).

Plasmodium falciparum est l'agent responsable du paludisme également appelé malaria. Bien que le taux de décès relatif à cette pathologie ait diminué de 50% au cours des 15 dernières années, 400.000 personnes, pour la plupart des enfants, succombent encore chaque année du paludisme. Malheureusement si de nouvelles solutions thérapeutiques ne sont pas trouvées d'ici peu il se pourrait que le paludisme reparte à la hausse ces prochaines années. Cet échec quasi programmé fait suite à une série de résistances contre la chloroquine, le DDT et les artémisinines. Comme nous l'avons vu dans la partie généralités de ce manuscrit, nous en reparlerons d'ailleurs pour *Toxoplasma gondii*, les modifications post-traductionnelles des protistes pourraient offrir de nouvelles pistes de recherche très intéressantes en termes de lutte contre les maladies parasitaires.

Au cours de notre étude avec l'équipe de Marburg nous avons focalisé l'analyse de la O-GlcNAcylation chez *P. falciparum*. Cette modification avait été rapportée pour la toute première fois chez *P. falciparum* par l'équipe du Pr. Ralph Schwarz il y a 25 ans (Dieckman-Schuppert *et al.*, 1993) et plus récemment par mon équipe qui s'était intéressée à ce parasite en caractérisant son O-GlcNAcome (Perez-Cervera *et al.*, 2011).

Grâce à des techniques de chimie-click et d'enrichissement sur lectine nous avons réussi à identifier sans ambiguïté treize protéines O-GlcNAcylées chez *P. falciparum* parmi lesquelles l'actine; l'hexokinase, la fructose-bisphosphate aldose, la phosphoglycérate kinase, et l'énolase acteurs de la glycolyse; la myosine-A; la caséine kinase 1 et Hsp70.

Nous avons pu prouver que *P. falciparum* disposait de son propre stock d'UDP-GlcNAc indispensable aux processus de glycosylation et en particulier de *O*-GlcNAcylation. Enfin, les profils de *O*-GlcNAcylation entre le stade trophozoïte et ring diffèrent quelque peu: le cycle de vie de *P. falciparum* régule probablement l'expression et/ou l'activité d'une OGT endogène ou de l'hôte, ou la disponibilité en UDP-GlcNAc en fonction du stade.

Notre recherche d'OGT chez *P. falciparum* est restée infructueuse en ce sens qu'aucun équivalent en termes de séquence génique n'a été retrouvé dans la base de données *PlasmoDB*. Ceci suggère soit que la séquence d'OGT chez le parasite est structuralement très différente de ce qui est connu actuellement sur les OGTs de mammifères, ou que l'apicomplexe utilise pour ses réactions de *O*-GlcNAcylation, l'OGT de la cellule hôte, ce qui nous semble assez improbable du fait de la compartimentalisation des deux milieux intracellulaires.

2.2 Sujet de recherche 1 : Caractérisation moléculaire de la *O*-GlcNAcylation et de l'OGT chez l'apicomplexe *Toxoplasma gondii*

2.2.1 Contexte de l'étude

Comme nous l'avons souligné auparavant, une large part de la population est infectée par *Toxoplasma*, touchant principalement les femmes enceintes et les personnes immunodéprimées. Malgré d'énormes efforts pour comprendre la biologie de ce parasite, il n'existe aucun traitement ou vaccin efficace à 100%.

Puisque la *O*-GlcNAcylation est impliquée dans toute une pléthore de processus biologiques fondamentaux, et qu'elle touche une large variété d'organismes, des bactéries aux mammifères en incluant les apicomplexes comme l'avait montré précédemment mon équipe (Perez-Cervera *et al.*, 2011), nous nous sommes intéressés au *O*-GlcNAc de *T. gondii*. En effet, les premiers résultats rapportés par cette publication nous ont amenés à poser plusieurs questions quant à l'identité de ces protéines potentiellement *O*-

GlcNAcylées : ces protéines interviennent-elles dans le cycle de vie de l'apicomplexe et dans sa pathogénicité. Lorsque j'ai démarré ce projet, une telle identification des protéines *O*-GlcNAcylées chez ce parasite n'avait pas été entreprise, et de manière plus large aucun *O*-GlcNAcome de protiste n'avait été décrit.

Ainsi, par le biais de différentes approches alliant outils biochimiques et protéomiques nous avons pu identifier toute une série de protéines cibles de l'OGT et échauffer tout un ensemble d'hypothèses concernant leurs fonctions potentielles dans les mécanismes de développement parasitaire ou d'infection de cellule hôte, offrant de nouvelles cibles thérapeutiques intéressantes contre la toxoplasmose.

2.2.2 Objectifs du projet

Plusieurs *O*-GlcNAcomes ont été décrits pour divers modèles cellulaires ou organismes biologiques (Cieniewski-Bernard *et al.*, 2004; Dehennaut *et al.*, 2008; Gurcel *et al.*, 2008; Ma & Hart, 2014; Vercoutter-Edouart *et al.*, 2015; Kupferschmid *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2017; Woo *et al.*, 2018). Pour cela les auteurs de ces différentes études ont utilisé toute une panoplie d'outils et d'approches différentes plus ou moins simples à mettre en œuvre et plus ou moins spécifiques de la *O*-GlcNAcylation. En l'effet, l'existence de nombre de glycosylations différentes, y compris chez *T. gondii* telle que nous l'avons décrite dans la section généralités, incite à la prudence quant à la caractérisation moléculaire et à l'identification de protéines *O*-GlcNAcylées.

Les principaux objectifs de ce travail ont été les suivants :

- Caractériser un peu plus le *O*-GlcNAcome de *T. gondii* avec différents outils et aller un peu plus loin que l'étude préalablement menée par l'équipe (Perez-Cervera *et al.*, 2011).
- Identifier les protéines *O*-GlcNAcylées chez *T. gondii* par deux approches protéomiques distinctes.
- Comprendre le rôle que pourrait jouer cette modification dans la biologie du parasite et le processus d'infection.

2.2.3 Résultats

Pour mieux caractériser le *O*-GlcNAcome de *T. gondii* nous avons utilisé plusieurs approches de biochimie routinières dans l'équipe telles que la détection par anticorps anti-*O*-GlcNAc (RL2) en immunoblotting (Fig. 17A) et immunofluorescence (Fig. 17B), l'enrichissement sur la lectine sWGA immobilisée sur billes (Fig. 17C) et par chimie-click (Fig. 17D). Ces outils permettent de visualiser les protéines *O*-GlcNAcylées chez les parasites et chez les cellules hôtes (HFF, human foreskin fibroblast, et cellules VERO issues de rein de singe vert d'Afrique) dans lesquelles *T. gondii* a été produit. Cette série d'expériences montre que les profils *O*-GlcNAcylés sont à la fois différents entre *T. gondii* et les cellules de mammifères servant à les reproduire et, en partie, assez proches suggérant que la *O*-GlcNAcylation affecte des familles de protéines identiques entre protistes et cellules animales d'organismes supérieurs. L'absence de contamination cellule hôte-parasite est avérée par le Western blot anti-tubuline indiquant une différence de masse de la protéine microtubulaire entre les organismes (Fig. 17A) et les profils protéiques globaux tel celui présenté figure 17 (Fig. 17C). Aussi, la spécificité de l'anticorps RL2 a été assurée par co-incubation avec de la GlcNAc libre à 0,5 M tant en Western blot (Fig. 17A) qu'en immunofluorescence (Fig. 17B).

L'utilisation de la lectine sWGA couplée aux billes d'agarose nous a permis d'enrichir des protéines glycosylées à partir d'extraits totaux de *T. gondii* ainsi que de la cellule hôte VERO (Fig. 17C). La sWGA est une lectine modifiée par un groupement succinyle qui l'empêche de se lier aux acides sialiques (la WGA « classique » montrant une double spécificité GlcNAc/NeuAc) et de ne détecter que les protéines potentiellement *O*-GlcNAcylées.

En chimie-click, la détection de protéines *O*-GlcNAcylées-clickées est réalisée par l'avidine HRP, l'absence d'UDP-GalNAz permettant de différencier les protéines naturellement biotinylées (sans UDP-GalNAz) de celles spécifiquement marquées sur des résidus de GlcNAc au cours de l'expérience (avec UDP-GalNAz) (Fig. 17D).

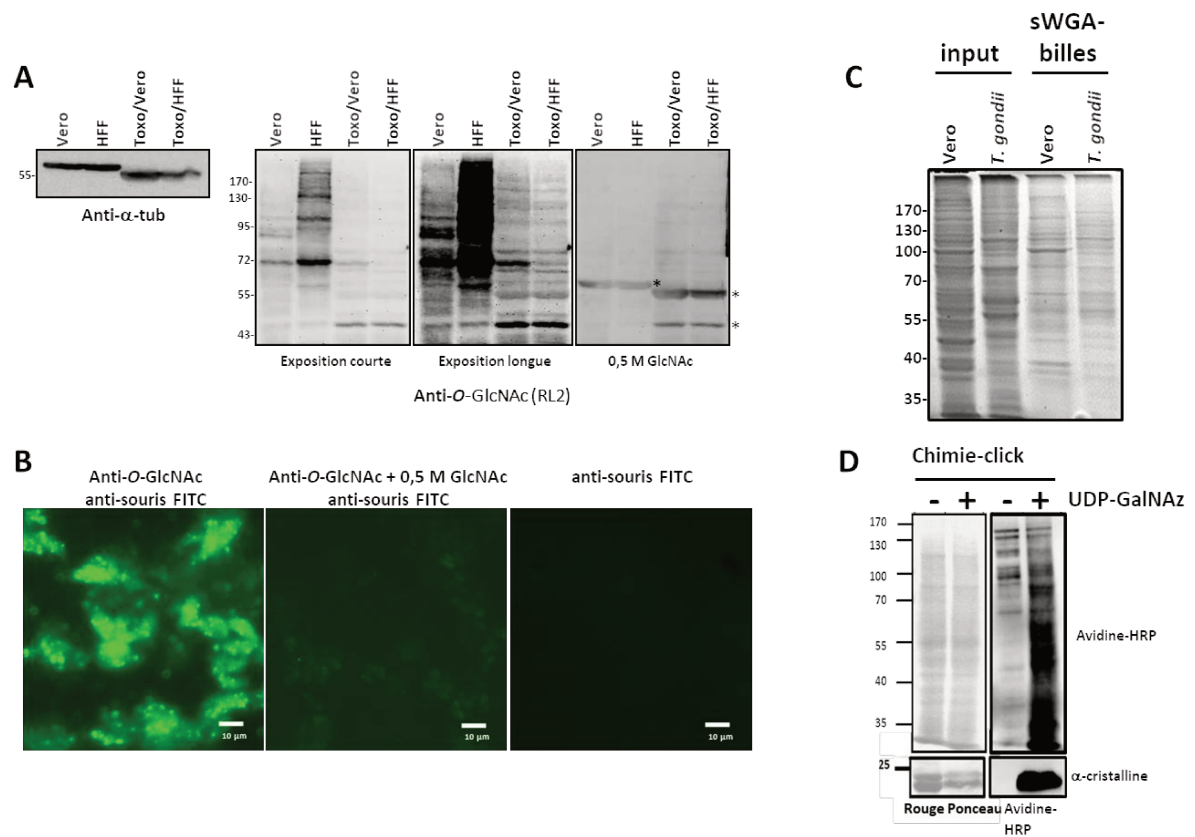


Figure 17. Caractérisation des protéines O-GlcNAcylées chez *T. gondii* par diverses approches : **A.** par Western blot à l'aide de l'anticorps anti-O-GlcNAc (RL2), **B.** par immunofluorescence avec le même anticorps (l'ajout de 0,5 M de GlcNAc en A et en B permet d'attester la spécificité de l'anticorps), **C.** par enrichissement sur sWGA insolubilisée, et **D.** par chimie-click. L' α -crystalline est utilisée en contrôle positif de chimie-click. Le contrôle négatif correspond à la réaction effectuée en omettant l'UDP-GalNAz.

Dans l'optique d'identifier quelles protéines sont potentiellement O-GlcNAcylées chez le parasite, nous avons opté pour deux méthodes différentes afin d'enrichir les glycoprotéines: par immunoprécipitation avec l'anticorps anti-O-GlcNAc RL2 et par enrichissement des protéines sur sWGA immobilisée sur billes. Les protéines ainsi enrichies ont été résolues par SDS-PAGE et les gels colorés au bleu de Coomassie ou au nitrate d'argent. Les protéines d'intérêt ont été protéolysées et traitées en vue de leur analyse par spectrométrie de masse (le protocole précis est détaillé dans l'article joint à ce manuscrit, article 3 en annexe). Les données issues de la spectrométrie de masse ont été analysées en utilisant le moteur de recherche Mascot et la base de données SwissProt.

Plusieurs centaines de protéines ont été identifiées avec un ratio 65.5/34.5 enrichissement par sWGA/immunoprécipitation préparative sur RL2, une cinquantaine de protéines ayant été identifiées par les deux approches. La liste de ces identifications est présentée dans le tableau en annexe 4.

Les protéines identifiées dans notre étude portent des fonctions très diverses au sein des organismes animaux en général et sont impliquées dans la biogenèse de ribosome, la biologie des ARNs, le transport intracellulaire, la transduction du signal, le métabolisme des lipides, la glycolyse, le cycle des acides tricarboxyliques (cycle de Krebs), l'organisation du cytosquelette, ainsi que d'autres fonctions cellulaires (Fig. 18).

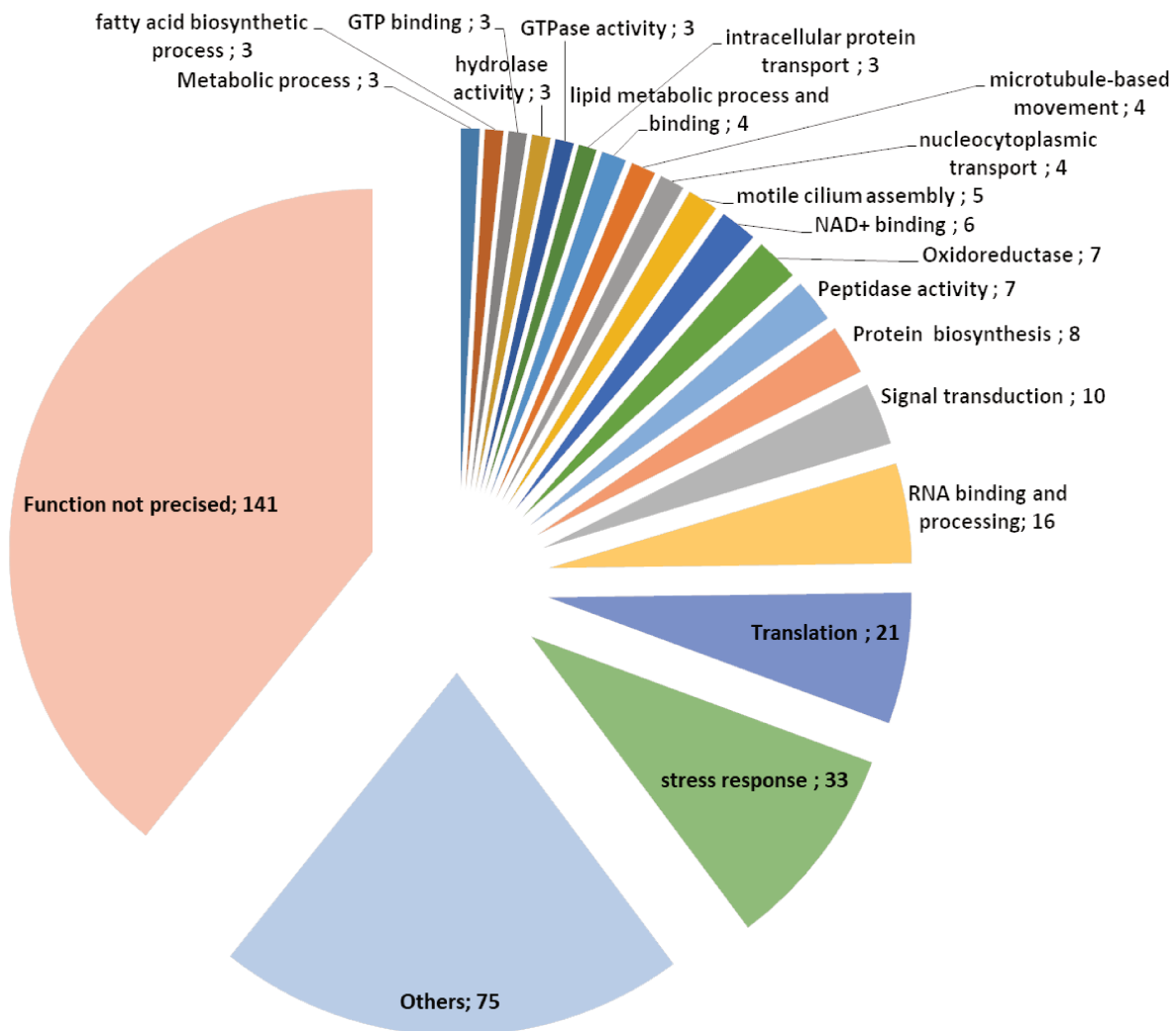


Figure 18. Classification des protéines O-GlcNAcylées identifiées chez *T. gondii* selon leur fonction.

De manière plus intéressante, nous avons retrouvé dans nos analyses protéomiques des protéines spécifiques des apicomplexes et impliquées dans le processus d'invasion de la cellule hôte : cela concerne les protéines des micronèmes, des granules denses et plus particulièrement les rhoptries (Fig. 19).

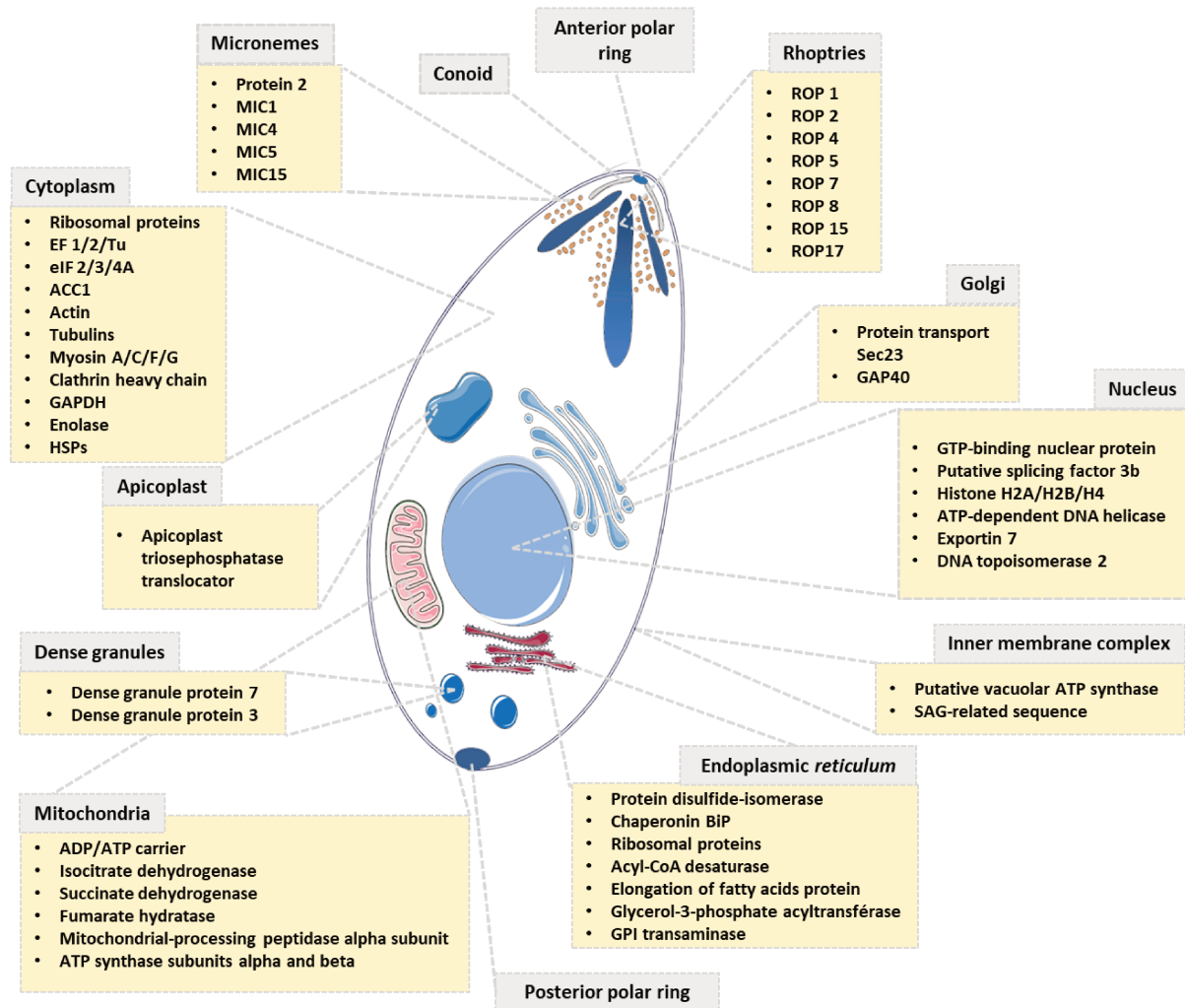


Figure 19. Localisation subcellulaire des principales protéines O-GlcNAcylées identifiées chez *T. gondii*.

L'identification de certaines protéines rhoptries comme étant O-GlcNAcylées a été validée par enrichissement sur sWGA immobilisée sur billes (Fig. 20A) et par chimie-click (Fig. 20B). L'ensemble de ces résultats indique que le O-GlcNAcome de *T. gondii* est assez proche de celui de tout autre organisme, en témoignent les protéines O-GlcNAcylées

identifiées intervenant dans la structure du ribosome, la synthèse protéique, le métabolisme lipidique, la glycolyse ou le cycle de Krebs. Néanmoins, d'autres acteurs spécifiques de l'apicomplexe sont aussi glycosylés, les démarquant des protéines arborant des résidus de *O*-GlcNAc préalablement rapportées dans la littérature. Cette étude révèle que le *O*-GlcNAcome bien que partiellement universel détient des protéines spécifiques à chaque espèce.

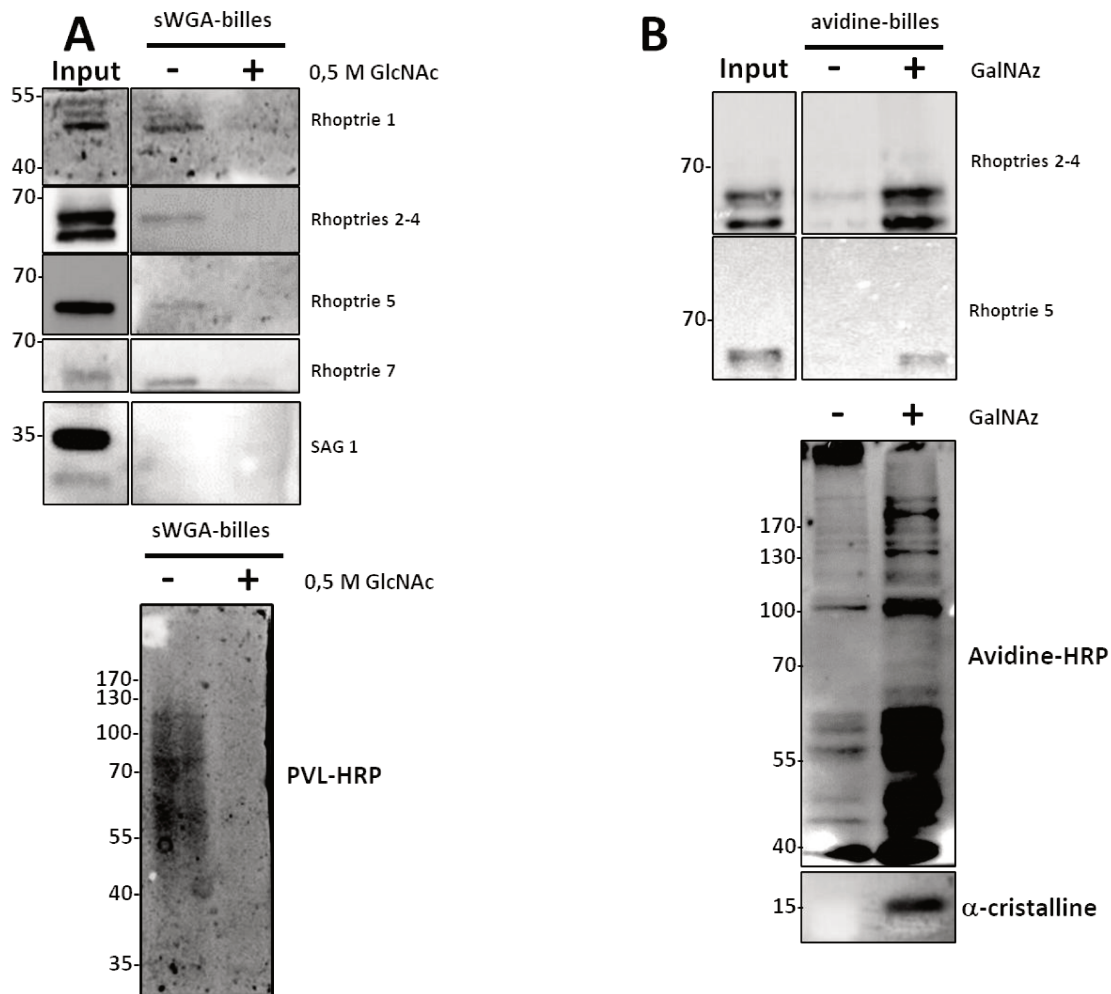


Figure 20. Mise en évidence de la *O*-GlcNAcylation de certaines isoformes des protéines rhoptries exprimées chez *T. gondii* par enrichissement sur lectine de sWGA immobilisée sur billes (A), et par chimie-click (B). La spécificité sur sWGA a été testée par co-incubation des billes avec 0.5 M de GlcNAc. La protéine SAG 1 portant des glycanes avec des résidus de mannose en position terminale non-réductrice a servi de contrôle négatif. La lectine recombinante PVL (*Psathyrella velutina lectin*) couplée à la peroxydase est spécifique des résidus de *O*-GlcNAc (Machon *et al.*, 2017). L' α -cristalline est utilisée en contrôle positif de chimie-click. Le contrôle négatif correspond à la réaction effectuée en omettant l'UDP-GalNAz.

Ce travail a fait l'objet de la publication d'une publication (présentée en annexe 3):

Apart from rhoptries, identification of *Toxoplasma gondii*'s O-GlcNAcylated proteins reinforces the universality of the O-GlcNAcome.

Moyira Osny Aquino-Gil, Mattis Kupferschmid, Hosam Shams-Eldin, Jörg Schmidt, Nao Yamakawa, Marlène Mortuaire, Frédéric Krzewinski, Stéphan Hardivillé, Edgar Zenteno, Christian Rolando, Fabrice Bray, Eduardo Pérez Campos, Jean-François Dubremetz, Yobana Perez-Cervera, Ralph T. Schwarz, Tony Lefebvre.

2.2.4 Discussion

La O-GlcNAcylation n'a cessé d'éveiller la curiosité depuis sa toute première description dans la première moitié des années 1980. Beaucoup d'équipes scientifiques se sont intéressées à sa distribution et ses fonctions mais essentiellement sur des lignées cellulaires en culture et des modèles animaux. Malgré cela, l'expression et l'activité de l'OGT ont été observées dans quasiment tout le monde du vivant à l'exception de la levure, et bien que nous émettons des doutes quant à sa fonction en qualité de N-acétylglucosaminyltransférase chez les plantes (comme nous le verrons dans le chapitre suivant).

Aussi, peu de choses ont porté sur des organismes appartenant aux protistes. Au cours de ma thèse je me suis plus particulièrement intéressée à deux d'entre eux : *Plasmodium falciparum*, comme mentionné en début de chapitre (Kupferschmid *et al.*, 2017), et *Toxoplasma gondii*, agents responsables du paludisme et de la toxoplasmose respectivement. C'est *T. gondii* qui a occupé une plus grande partie de mon temps de recherche (Aquino-Gil *et al.*, 2018).

Il est important de garder à l'esprit que la toxoplasmose reste une des maladies les plus contagieuses en France avec un taux de séroprévalence chez la femme enceinte de près de 54% avec toutes les conséquences dramatiques que cela impose sur le fœtus. Ajoutons que la population mondiale serait infectée pour un tiers par *T. gondii* ; cela touche en particulier les personnes immunodéprimées, la toxoplasmose cérébrale étant responsable

d'une forte morbidité et mortalité chez les patients souffrant du sida. La toxoplasmose reste donc un véritable problème de santé publique majeur. Il y a urgence à identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et à trouver de nouveaux traitements de sorte en enrayer les désastres sanitaires dont elle est responsable notamment dans les régions où l'accès au dépistage et à l'absence de soins se fait le plus ressentir.

L'ensemble de nos analyses protéomiques ont mis en évidence la *O*-GlcNAcylation de nombreuses protéines impliquées dans une large gamme de fonctions biologiques chez *T. gondii* (protéines de choc thermique, enzymes glycolytiques, protéines ribosomales, acteurs de la synthèse protéique et du métabolisme des lipides). Ainsi, la plupart des protéines *O*-GlcNAcylées identifiées dans notre étude avaient été rapportées dans d'autres modèles renforçant l'importance et la conservation du *O*-GlcNAcome chez diverses espèces, et donc en quelque sorte son universalité.

Néanmoins, en marge de ces protéines que nous pourrions considérer comme conventionnelles, nos analyses protéomiques ont révélé des protéines beaucoup plus spécifiques des apicomplexes, en particulier de *T. gondii*. Celles nous apparaissant les plus intéressantes sont impliquées dans le processus d'infection: protéines rhoptries, protéines des micronèmes et protéines des granules denses, toutes faisant partie d'organites de sécrétion et caractéristiques de la motilité des apicomplexes (Fig. 21). Les protéines rhoptries, ou rhoptries plus simplement, interviennent au cours de l'invasion de la cellule hôte. Elles trafiquent par le *reticulum* endoplasmique puis l'appareil de Golgi avant d'être adressées dans des organites sécrétoires; pour cette raison nous proposons l'hypothèse selon laquelle ces protéines seraient modifiées par la EOGT, contrôlant une seconde forme de *O*-GlcNAcylation et affectant les protéines de la voie de sécrétion, plutôt que l'OGT conventionnelle, nucléocytoplasmique (Fig. 21). Deux autres études menées par des équipes différentes avaient identifié les rhoptries en qualité de glycoprotéines, l'une par chromatographie d'affinité sur lectine, l'autre par incorporation de dérivés sucrés métabolisables par le parasite (Nazarova *et al.*, 2016). Bien que la fonction spécifique de la glycosylation des rhoptries, et autres protéines confinées dans les organites de sécrétion tels que micronèmes et granules denses et cruciales pour les processus d'infection, n'ait

pas été exploitée, il serait intéressant de déterminer si une interférence avec leur statut *O*-GlcNAcylé réduit la motilité et l'invasion de *T. gondii*.

Aussi, puisque cette modification est intimement reliée au statut nutritionnel il serait intéressant de considérer le rôle de l'environnement métabolique, de l'accès aux nutriments du parasite dans ses capacités à infecter la cellule hôte. La *O*-GlcNAcylation interférant avec les niveaux d'expression de nombreuses protéines en particulier au niveau de la résistance à la dégradation (Ruan et al. 2013; Stéphanie Olivier-Van Stichelen et al. 2014; Baldini et al. 2016), tester cette hypothèse sur la stabilité des rhoptries et autres micronèmes serait tout à fait à propos. L'utilisation d'inhibiteurs du cycle de la *O*-GlcNAcylation comme l'Ac₄-5SGlcNAc ou le Thiamet G permettrait de déterminer ou, tout au moins, d'approcher le rôle joué par la glycosylation au cours du processus d'infection de *T. gondii*.

Si la EOGT pourrait être responsable de la glycosylation des rhoptries (et potentiellement d'autres protéines de la voie de sécrétion impliquées dans le processus d'infection par *T. gondii*) et, bien que rien ne prouve que ce soit elle, si tant est qu'elle existe chez l'apicomplexe, qui soit responsable de cette modification, nous ne connaissons presque rien non plus sur l'OGT nucléocytoplasmique. En 2011, mon équipe avait pointé une OGT putative, tgOGT, très proche de SPY exprimée chez les plantes (Perez-Cervera *et al.*, 2011). En effet, mes collègues avaient montré que la séquence *TGGT1_112580* chez *T. gondii* montrait 40% d'identité avec SPY de pleine longueur et 50% en limitant l'identité à la région C-terminale portant les domaines catalytiques CDI et CDII. Or puisque SPY a été retirée de la liste des OGTs (Zentella *et al.*, 2017), l'occurrence d'une OGT chez ce parasite reste sujette à question même si une activité *O*-GlcNAc transférase a pu être mesurée (Perez-Cervera *et al.*, 2011). Ce point fait partie des interrogations en suspens sur ce projet.

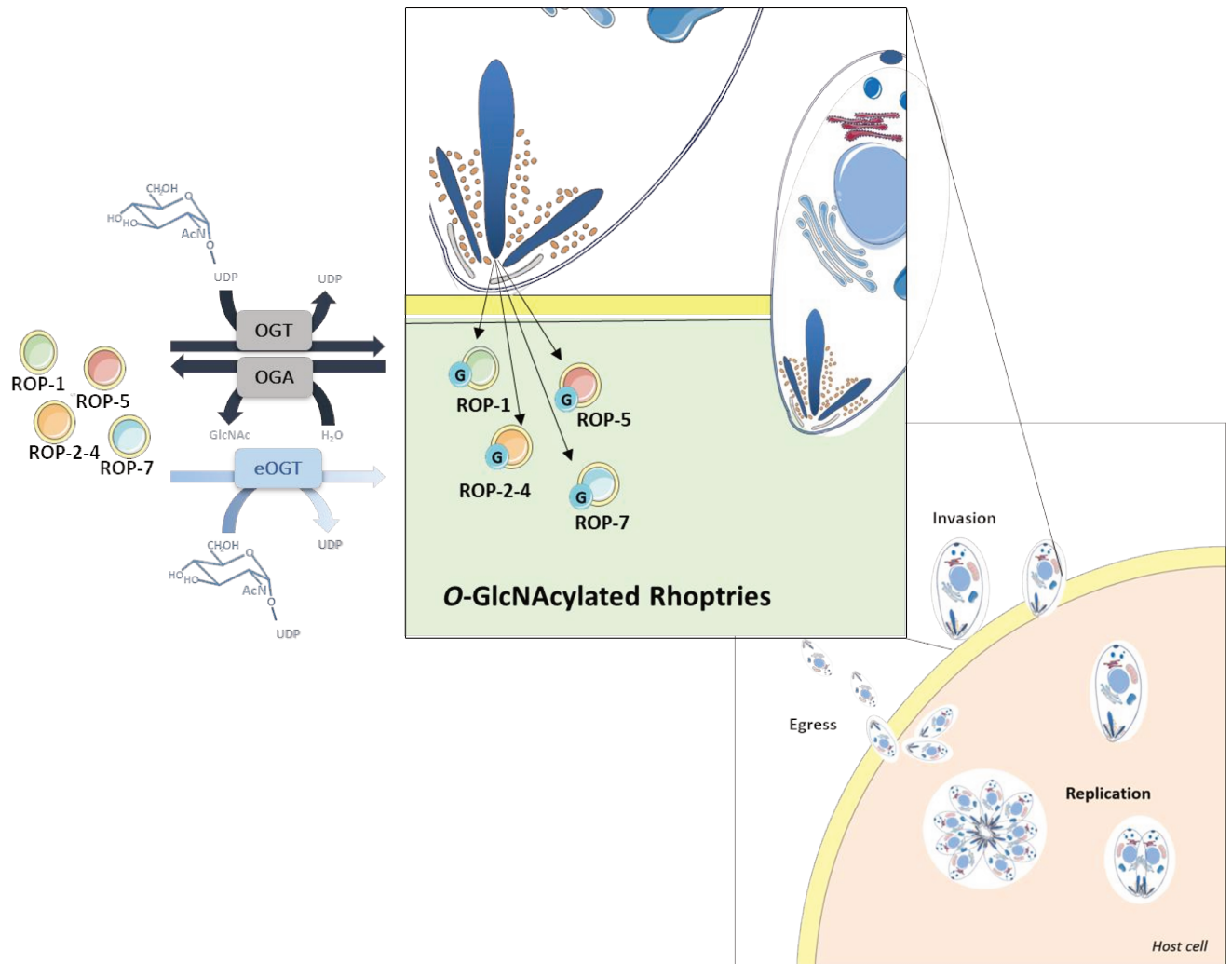


Figure 21. Les protéines rhoptries sont impliquées dans le processus d'invasion de la cellule hôte par *T. gondii*. Au cours de ma thèse j'ai pu montrer par approche protéomique, par chimie-click et enrichissement sur lectine que certaines isoformes des rhoptries étaient glycosylées. L'identité de la glycosyltransférase impliquée dans cette modification, OGT nucléocytoplasmique ou eOGT, reste à définir. De plus, la fonction de cette glycosylation dans la motilité parasitaire et l'infection est inconnue.

2.3 Sujet de recherche 2: Mise en évidence de la O-GlcNAcylation et de l'OGT chez les modèles végétaux *Arabidopsis thaliana* et *Chlamydomonas reinhardtii*

2.3.1 Contexte de l'étude

Comme nous l'avons décrit dans la section généralités, *Arabidopsis thaliana* est une petite plante de la famille des *Brassicaceae* très utilisée comme modèle végétal; il sert en effet à étudier tout un ensemble de processus biologiques liés aux plantes supérieures. Ce modèle est pratique car il possède un cycle de vie court et, d'un point de vue génétique, son génome est assez facile à travailler. De même, *Chlamydomonas reinhardtii* est une algue verte unicellulaire également très utilisée en qualité de modèle biologique.

Jusqu'à récemment, il semblait que ces deux modèles exprimaient, en accord avec des alignements de séquences de divers organismes, deux formes d'OGT chez *A. thaliana* (SPY et SEC), et de manière intéressante une OGT-like qui semblait être plus proche de SPY que de SEC chez *C. reinhardtii*. Néanmoins, SPY ne ferait plus faire partie des OGTs puisqu'une équipe Américaine a démontré en 2017 qu'il s'agissait d'une O-Fucosyltransférase (Zentella *et al.*, 2017). Bien que l'expression de SPY et SEC ait été largement décrite chez les végétaux, et que son implication dans différents processus biologiques chez *A. thaliana* soit bien documentée, nous nous sommes intéressés au O-GlcNAcome végétal et à l'impact d'une déficience de l'expression de ces enzymes au cours du processus de développement chez les plantes.

2.3.2 Objectifs du projet

Bien que plusieurs études semblent pointer l'existence de la O-GlcNAcylation chez des modèles végétaux depuis plusieurs années, aucune d'entre elles n'a jamais clairement montré de profil de O-GlcNAcylation avec quelque outil que ce soit, même si récemment une analyse protéomique prétend identifier toute une série de protéines O-GlcNAcylées chez *A. thaliana* (Xu *et al.*, 2017). Ce manque de preuve nous a intrigués. Nous avons alors

entrepris par le biais d'approches biochimique, protéomique et génétique, la détection et l'étude de protéines potentiellement *O*-GlcNAcylées au cours de son cycle de vie.

Les objectifs de ce projet ont été les suivants :

- Détecter les protéines *O*-GlcNAcylées par des approches biochimiques dans des souches sauvages et mutantes OGT d'*Arabidopsis thaliana* et *Chlamydomonas reinhardtii*.
- Identifier les changements phénotypiques au cours de la croissance d'*Arabidopsis thaliana*.
- Forcer la voie de biosynthèse des hexosamines par culture d'*A. thaliana* en milieu gélosé.
- Mesurer l'activité catalytique des OGTs, SPY et SEC, en exprimant des formes enzymatiques recombinantes dans un modèle cellulaire animal.

2.3.3 Résultats

2.3.3.1 Caractérisation de la *O*-GlcNAcylation chez *A. thaliana* par différentes approches protéomiques

Les gènes codants SPY et SEC chez *A. thaliana* se localisent sur le chromosome III au locus AT3g11540 et AT3g04240 respectivement. Les mutants ont été obtenus par insertion aléatoire d'un fragment d'ADN-T exogène dans le génome de différents écotypes d'*Arabidopsis* tels que Columbia (Col-0) pour *spy*, *sec* et *cgl* ou Wassilewskija (WS) pour *sec* (TAIR database). Les graines reçues ont été analysées pour s'assurer du caractère homozygote du mutant. Cette étape préalable est nécessaire afin de pouvoir procéder au phénotypage de la lignée d'intérêt.

Des extraits totaux d'*A. thaliana* ont été analysés par SDS-PAGE suivi d'un transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose (Western blot). Des extraits totaux de cellules humaines ont été utilisés comme contrôle positif. Les échantillons ont ensuite été incubés avec deux anticorps spécifiques de la *O*-GlcNAcylation (RL2 et CTD 110.6) (Fig. 22). Comme

l'indique la figure 22, un profil très faible a été obtenu tant pour la souche sauvage que pour le mutant *sec*.

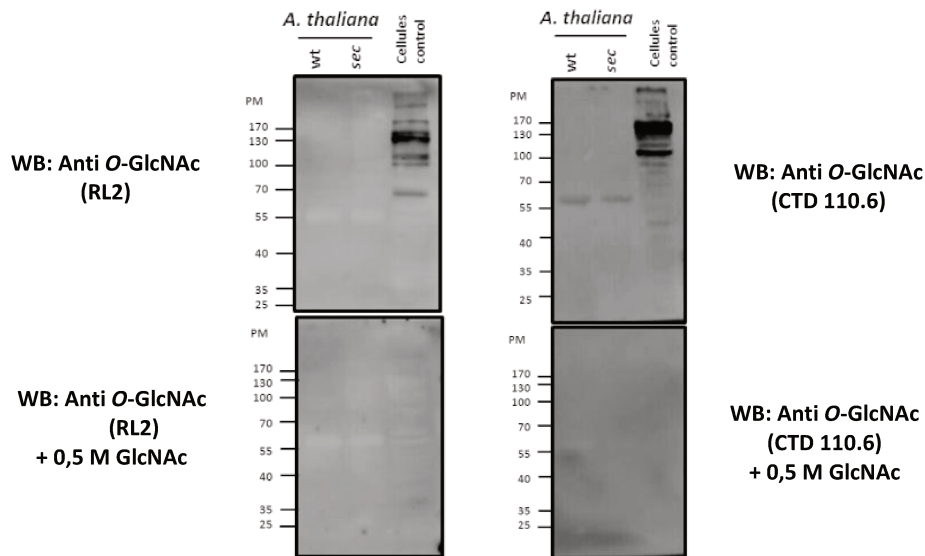


Figure 22. Analyse d'extraits totaux d'*A. thaliana* wt et mutant *sec* par Western blot (CTD110.6 et RL2). La spécificité des anticorps a été évaluée par co-incubation de 0.5 M de GlcNAc libre avec les anticorps.

Bien que l'anticorps CTD110.6 semble détecter quelques bandes dans nos échantillons végétaux, ce type de profil nous est apparu suspect du fait d'une part de l'absence totale de signal avec l'anticorps RL2 et d'autre part du fait que la bande au-dessus du témoin de masse moléculaire 55 kDa détectée par le CTD110.6 soit toujours visible avec l'échantillon correspondant au mutant *sec*. Aussi, le CTD110.6 est-il réputé pour son manque de spécificité (Isono, 2011; Tashima & Stanley, 2014).

D'autres approches ont été menées tels que le marquage des protéines *O*-GlcNAcylées par réaction de chimie-click (Fig. 23A) ou enrichissement des extraits totaux végétaux sur swGA immobilisée sur billes d'agarose (Fig. 23B). La figure 22A est un exemple de Western blot obtenu après réaction de chimie-click suivie d'une incubation directe sur la membrane de nitrocellulose avec la PNGase, enzyme clivant les *N*-Glycanes. Ce type d'expérience renforce l'idée que peu de protéines sont *O*-GlcNAcylées chez les plantes, d'une part parce que le profil obtenu indique qu'une partie du signal coexiste chez les plantes traitées par chimie-click avec et sans UDP-GalNAz (protéines naturellement biotinylées) et que le reste du signal est abrogé par le traitement par la PNGase (Fig. 23).

Une expérience type d'enrichissement sur sWGA immobilisée sur billes d'agarose est présentée en figure 23B. Si on ne peut totalement écarter le caractère non spécifique des protéines retenues sur la lectine, le traitement par la PNGase annule leur interaction sur cette lectine renforçant notre hypothèse.

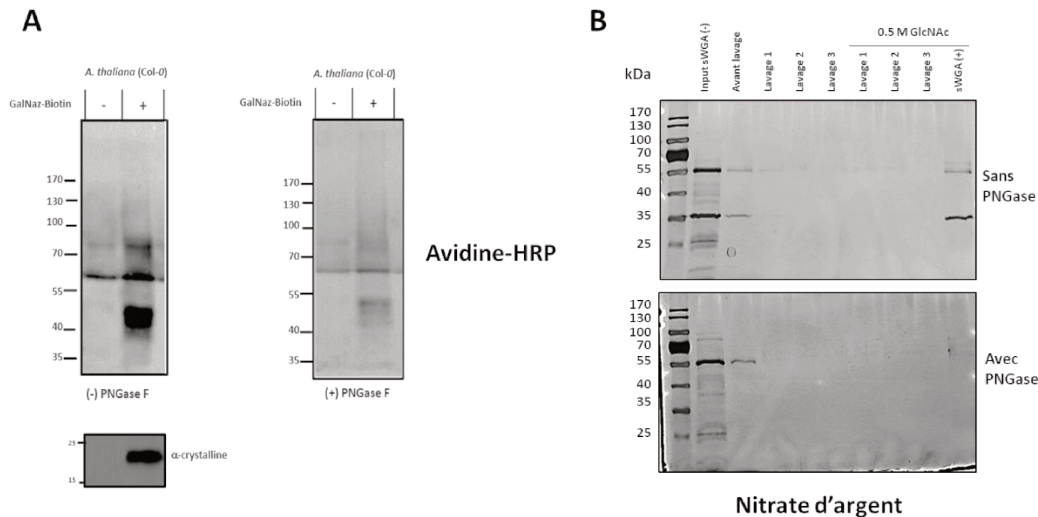


Figure 23. A. Analyse des profils protéiques obtenus chez *A. thaliana* après réaction de chimie-click, avec et sans GalNaz. Après transfert sur membrane de nitrocellulose et blocage des sites non spécifiques, les échantillons ont été traités par la PNGase. Les membranes ont été incubées avec l'avidine-peroxydase puis développées par réaction de chimiluminescence. **B. Analyse sur sWGA immobilisée.** Les échantillons protéiques ont été traités ou non par la PNGase puis enrichis sur sWGA immobilisée sur billes d'agarose. L'ensemble des fractions (lavages avec et sans GlcNAc) ont été résolues par SDS-PAGE, puis les gels colorés au nitrate d'argent.

2.3.3.2 Suivi de croissance des plantes sauvages et mutantes *sec* et *spy* d'*A. thaliana* cultivées en serre et en phytotron

Afin d'étudier l'implication des glycosyltransférases SPY et SEC, et par conséquent de la O-GlcNAcylation, dans le processus de croissance d'*A. thaliana*, des graines d'écotypes Col-0 et WS, et des mutants *spy* et *sec* auxquels nous avons ajouté un mutant *cgl-1* (mutant au niveau de GNT1, GlcNAc transférase 1) accumulant les formes oligomannosidiques de N-glycanes, ont été cultivées en serre (Fig. 24) ou en conditions contrôlées en phytotron (cycle 16 h jour et 8 h nuit) (Fig. 25). Le suivi de croissance des différentes souches a été réalisé afin d'observer des différences phénotypiques à l'échelle de la plante entière. Dans

les deux environnements, serre et phytotron, nous n'avons pas observé de différence flagrante au niveau de l'aspect des plantes hormis pour le mutant *sec* versus souche sauvage WS cultivé en phytotron (Fig. 25). Concernant les courbes de croissance, il est difficile d'apprécier des différences entre les différents mutants, y compris pour *cgl-1* (Fig. 24). Par contre des différences plus significatives sont observées pour les trois mutants, *sec*, *spy* et *cgl-1*, cultivés en phytotron avec un retard de croissance pour chaque mutant (Fig. 25). Néanmoins d'un point de vue morphologique aucune différence apparente n'est réellement visible entre les différentes souches.

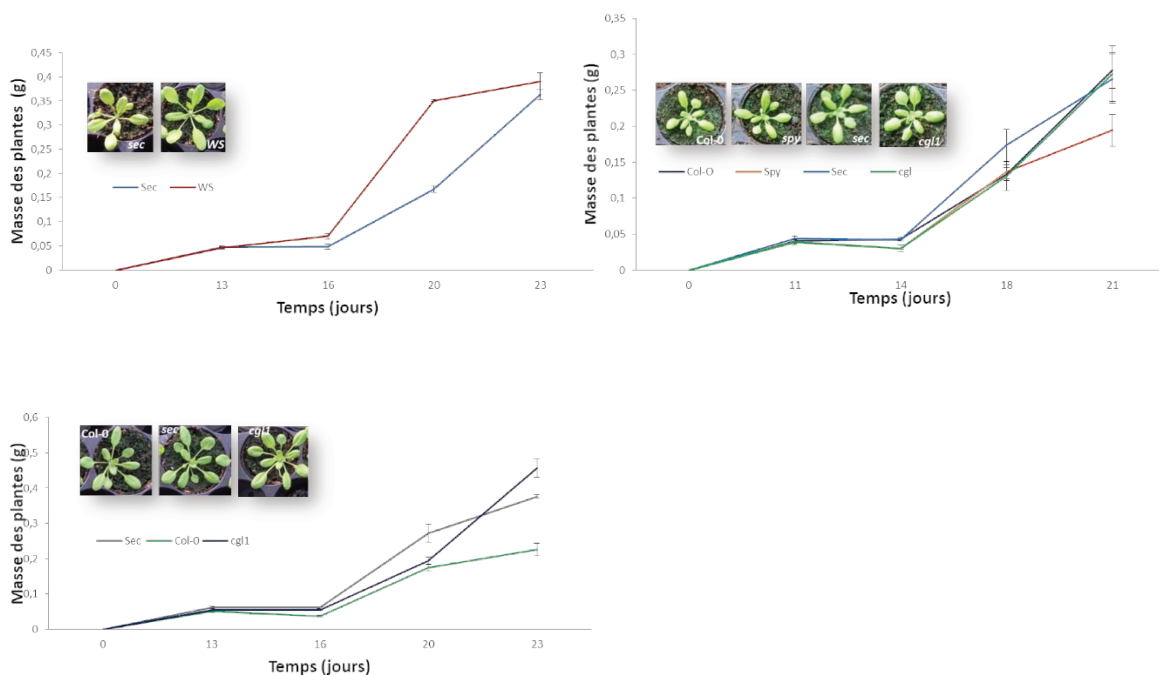


Figure 24. Cinétique de croissance des différentes souches d'*A. thaliana* (mutants et wt) en serre (n=3).

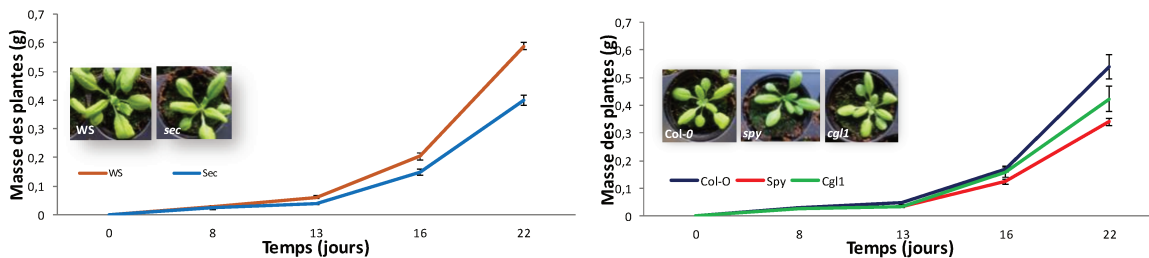


Figure 25. Cinétique de croissance des différentes souches d'*A. thaliana* (mutants et wt) en phytotron (n=3).

2.3.3.3 Analyse en condition forcée d'activation d'HBP par culture d'*A. thaliana* en milieu gélosé

Puisque nos analyses du *O*-GlcNAcome d'*A. thaliana* indiquent que les niveaux de *O*-GlcNAcylation chez ces modèles est très faible, voire inexistant, nous avons entrepris des cultures d'*A. thaliana* en milieu gélosé dans les lesquels nous avons fait varier les concentrations en glutamine et en glucosamine, deux substrats de la voie des hexosamines (Fig. 8). L'objectif était de savoir si ces deux substrats sont capables en forçant cette voie d'augmenter les niveaux de *O*-GlcNAcylation.

Pour ce faire, des graines d'*A. thaliana* (*wt Col-O* et mutants *spy* et *sec*) ont été déposées en milieu gélosé avec différentes concentrations de Glutamine (substrat de la GFAT) ou de Glucosamine (« hijacking » de la voie, Fig. 8). Nous ne montrerons ici que les images des plants cultivés en milieu gélosé enrichi en glucosamine (Fig. 26). Comme nous pouvons l'observer en figure 26, il n'y a pas de différence apparente pour la souche sauvage et le mutant *sec*, par contre le mutant *spy* semble moins bien résister aux plus fortes concentrations en glucosamine. Au cours de la même série d'expériences nous avons ajouté une troisième condition de traitement, à savoir des concentrations croissantes en Thiamet-G (inhibiteur d'OGA) (Fig. 27) ainsi qu'un traitement par stress salin (concentrations croissantes en NaCl) (Fig. 28) afin de déterminer si, comme cela avait été démontré pour la *N*-glycosylation, ce type de stress impacte sur le niveau de *O*-GlcNAcylation. S'il ne semble pas y avoir d'effet notable du Thiamet-G sur la croissance des plants d'*A. thaliana*, hormis pour le mutant *spy* à la concentration la plus élevée (Fig. 27), le NaCl apparaît plus toxique, et ce de manière dose-dépendante, pour la souche sauvage *Col-O* et les trois mutants *sec*, *spy* et *cgl-1*, ce dernier montrant plus de sensibilité au stress salin (Fig. 28).

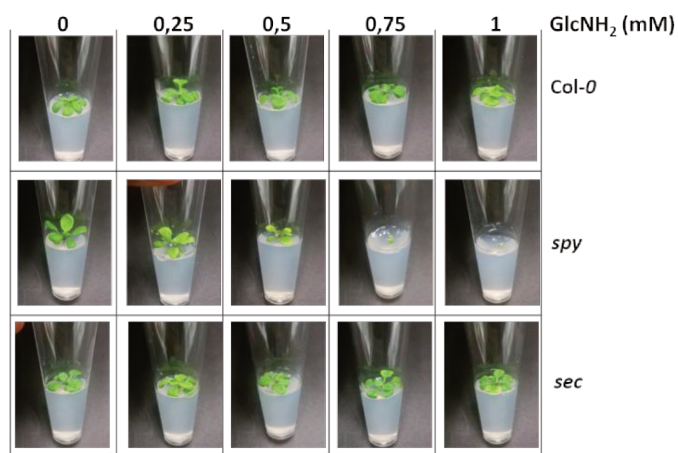


Figure 26. Effet de la glucosamine sur la croissance des différentes souches d'*A. thaliana* cultivées en milieu gélosé.

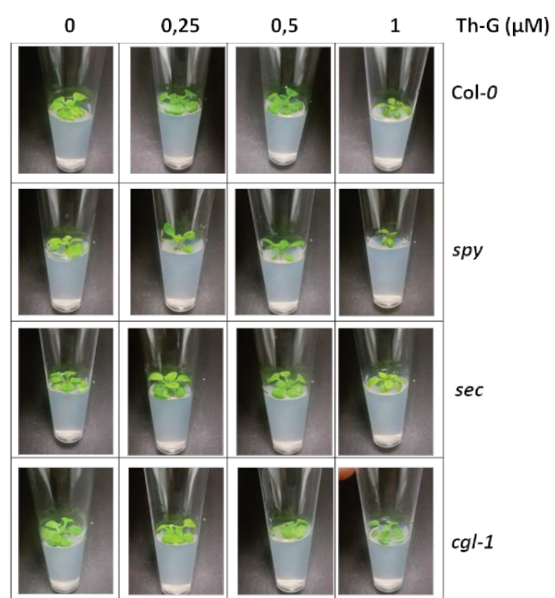


Figure 27. Effet du Thiamet-G (Th-G) sur la croissance des différentes souches d'*A. thaliana* cultivées en milieu gélosé.

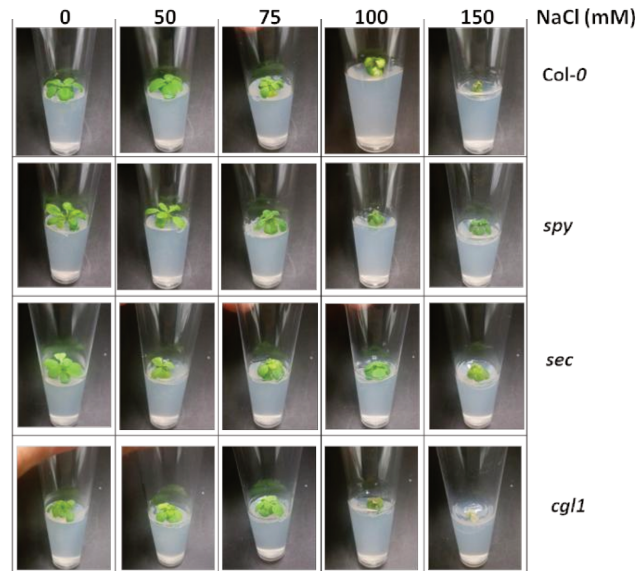


Figure 28. Effet du NaCl sur la croissance des différentes souches d'*A. thaliana* cultivées en milieu gélosé.

L'ensemble des échantillons de ces différentes expériences ont été analysés par Western blot avec un anticorps anti-*O*-GlcNAc. Un exemple de ces blots est montré en figure 29: nous n'observons pas d'élévation particulière de la *O*-GlcNAcylation quelque-soit le traitement considéré (glutamine et glucosamine en Fig. 29). La même chose a été observée pour les traitements en Thiamet-G et en NaCl.

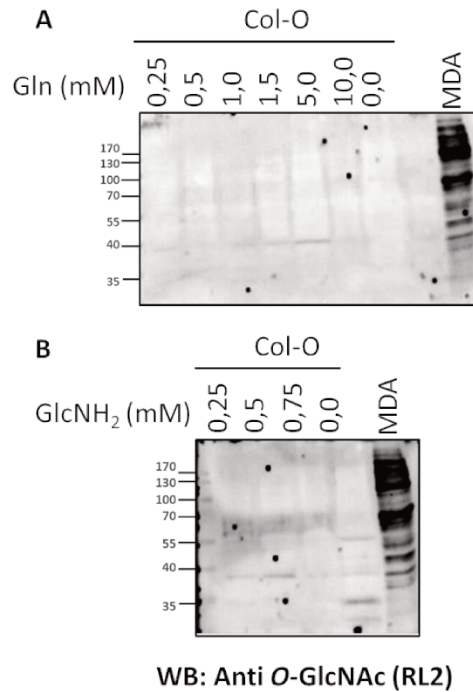


Figure 29. Analyse par Western blot anti-*O*-GlcNAc d'échantillons de la souche sauvage *Col-0* d'*A. thaliana* cultivée en milieu gélosé enrichi en glutamine (A) ou en glucosamine (B).

2.3.3.4 Production des protéines recombinantes SPY et SEC en cellules en culture

Puisque nous ne sommes pas parvenus à mettre en évidence de profils de *O*-GlcNAcylation chez *A. thaliana* même en forçant la voie des hexosamines, nous avons voulu comparer l'activité de SEC et de SPY (bien qu'ayant perdu son statut d'OGT) avec une OGT humaine dans un contexte biologique commun, les cellules HEK 293. Pour cela, les deux enzymes SEC et SPY, ont été clonées en vecteur d'expression eucaryote animal en aval d'une étiquette Flag (Flag-pcDNA3.1). Ces constructions ont été transfectées (transfection transitoire) dans les cellules HEK 293. L'OGT humaine (hOGT) a été utilisée comme contrôle positif, le vecteur vide comme contrôle négatif. Après transfection pendant 24 h, les extraits totaux cellulaires ont été analysés par SDS-PAGE suivi d'un Western blot (Fig. 30). L'efficacité de transfection a été validée par la détection de l'étiquette Flag. Les profils de *O*-GlcNAcylation montrent une élévation de la modification

dans la condition transfectée hOGT, aucune différence significative n'est par contre observée ni pour SEC, ni pour SPY, tendant à confirmer que la seconde n'est effectivement pas une OGT. Cette expérience renforce l'hypothèse selon laquelle SPY ne possède pas d'activité N-acétylglucosaminyltransférase, et suggère que SEC non plus.

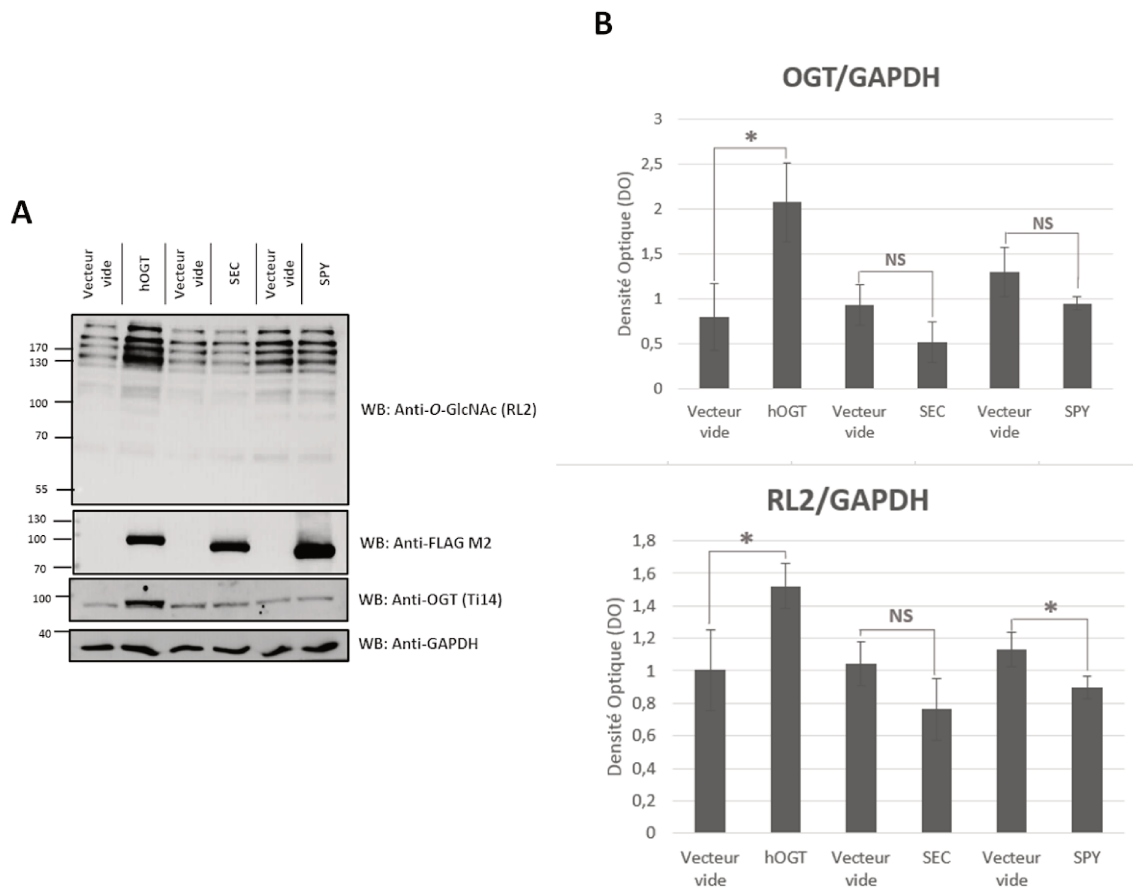


Figure 30. Expression des protéines recombinantes hOGT, SEC et SPY en HEK 293. A. SEC et SPY « flaggées » ont été exprimées en cellules HEK 293. Le vecteur vide a été utilisé en contrôle négatif, et l'OGT humaine « flaggée » en contrôle positif. Les niveaux de O-GlcNAcylation ont été détectés par incubation avec des anticorps anti-O-GlcNAc (RL2). Les anticorps anti-OGT (Ti 14), anti-FLAG (M2) et anti-GAPDH (contrôle de charge) permettent de valider l'expérience d'un point de vue technique. B. Les données de trois expériences indépendantes ont été compilées sous la forme d'histogrammes.

2.3.3.5 Résultats préliminaires concernant la caractérisation de la O-GlcNAcylation chez *C. reinhardtii*

Le mutant *spy* de *C. reinhardtii* a été obtenu après mutagenèse par l'insertion d'un ADN exogène (souche CC4533). Cette souche et son équivalent sauvage ont été entretenus sur

milieu HSA (High Salt Acetate) à 22°C en lumière continue. Les cellules ont ensuite été adaptées au milieu liquide en tampon Tris-Acétate-phosphate sous agitation constante (120 rpm) pendant 5 jours.

De la même manière que décrit ci-dessus pour *A. thaliana*, les mêmes approches biochimiques et protéomiques ont été utilisées dans l'optique de mettre en évidence la O-GlcNAcylation chez cette algue verte : anticorps anti-O-GlcNAc (RL2 et CTD110.6) utilisés pour les analyses par Western blot (Fig. 31), et chimie-click (Fig. 32).

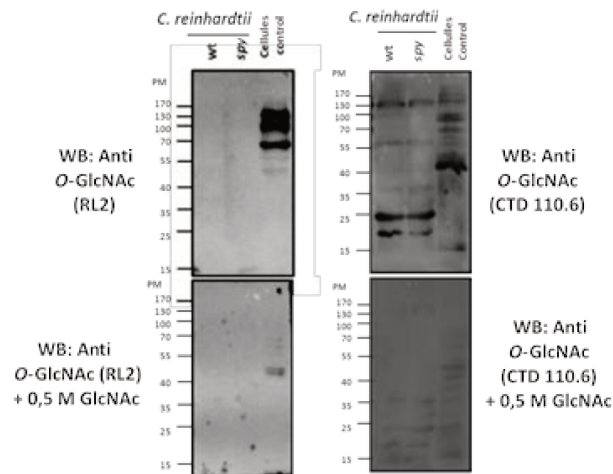


Figure 31. Analyse d'extraits totaux de *C. reinhardtii* wt et mutant *spy-like* par Western blot (CTD110.6 et RL2). La spécificité des anticorps a été évaluée par co-incubation de 0.5 M de GlcNAc libre avec les anticorps.

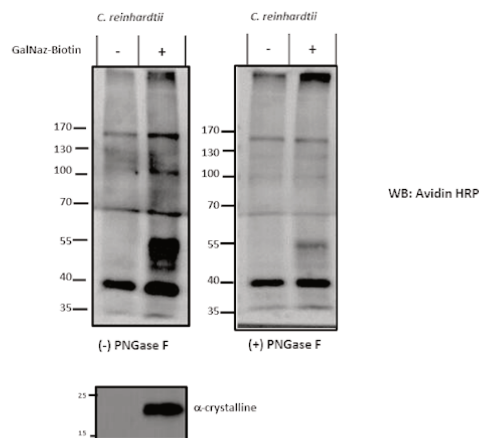


Figure 32. Analyse des profils protéiques obtenus chez *C. reinhardtii* par chimie-click. Après la réaction de chimie-click, les protéines ont été transférées sur membrane de nitrocellulose et blocage des sites non spécifiques, les échantillons ont été traités par la PNGase. Les membranes ont été incubées avec l'avidine-peroxydase puis développées par réaction de chimiluminescence.

D'une manière assez similaire à ce que nous avons pu observer pour *A. thaliana*, nous constatons que l'anticorps RL2 (Fig. 31) ne détecte aucune protéine chez l'algue en comparaison du témoin cellule de mammifère en culture. Le CTD110.6 met en évidence quelques bandes qui, de manière surprenante, ne sont pas abrogées pour le mutant *spy-like*. Ici encore nous tenons à mettre en garde sur la spécificité de cet anticorps.

La réaction par chimie-click indique un marquage dans la condition où l'UDP-GalNAz a été ajouté, beaucoup moins lorsqu'il est omis, démontrant la spécificité de réaction (Fig. 32). Néanmoins, la digestion par la PNGase abolit une majorité du signal (la réaction enzymatique ne semble pas avoir été totale) indiquant que très probablement la réaction de chimie-click a mis en évidence des résidus de GlcNAc en position terminale non-réductrice de *N*-glycanes. Même si les résultats sur *C. reinhardtii* semblent moins nets que pour *A. thaliana*, ces quelques expériences semblent également mettre en doute l'existence de la *O*-GlcNAcylation chez cet organisme.

2.3.4 Matériels et méthodes

2.3.4.1 Conditions de culture d'*Arabidopsis thaliana* en serre

Les graines d'*A. thaliana*, écotypes Columbia (Col-0) et Wassilewskija (WS) ainsi que les mutants *spy*, *sec* et *cgl-1* ont été stratifiées pendant 72 h dans une solution de phytigel à 0,1% (m/v) à 4°C et à l'obscurité. Les graines ainsi traitées ont été ensemencées dans des plateaux de culture contenant du terreau à une température constante de 22°C et soumises à des cycles lumière/obscurité de 16h/8h. Les échantillons ont été collectés après 22 jours et conservés à -80°C avant analyse.

2.3.4.2 Conditions de culture d'*Arabidopsis thaliana* en milieu gélosé

Les graines d'*A. thaliana* ont été aseptisées et ensemencées sur milieu gélosé à 9% (m/v) contenant un milieu de base (Murashige and Skoog medium). Les graines ont été stratifiées pendant 72 heures à 4°C et à l'obscurité puis incubées en phytotron à une

température constante de 22°C et soumises à des cycles lumière 16 heures et à 20°C en obscurité pour 8h.

2.3.4.3 Extraction des protéines, SDS-PAGE et Western Blot

Les échantillons de plantes récoltées ont été homogénéisés dans un tampon de lyse contenant 10 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% (v/v) Triton X-100, 0.5% (m/v) sodium désoxycholate, 0.1% (m/v) SDS, pH 7,4, puis centrifugés à 20,000 g pendant 10 min à 4°C. Après dosage des protéines, les échantillons ont été analysés par SDS-PAGE suivi d'un transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose (Western blot). Les membranes ont ensuite été saturées avec une solution de lait écrémé à 5% (m/v) dans TBS-Tween (15 mM Tris/HCl, 140 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween, pH 8.0), puis incubées avec des anticorps primaires toute la nuit à 4°C dilués dans le TBS-Tween. Après plusieurs lavages au TBS-Tween, les membranes ont été incubées avec des anticorps secondaires couplés à la peroxydase anti-souris ou anti-lapin dilués au 1/10.000 dans le TBS-Tween couplés à la peroxydase pour 1 h à température ambiante. Après plusieurs lavages au TBS-Tween, la détection a été effectuée par réaction chimioluminescente en incubation avec une solution d'ECL.

2.3.4.4 Marquage des protéines O-GlcNAcylées par réaction de chimie-click

Des extraits totaux de protéines végétales (environ 200 µg) ont été soumis à une précipitation chloroforme/méthanol. Le marquage enzymatique a été réalisé en accord avec les instructions du kit *Click-IT™ O-GlcNAc Enzymatic Labeling System* (C33368) (Invitrogen). L'alpha-cristalline a été utilisée en contrôle positif. Le contrôle négatif quant à lui a consisté à omettre l'UDP-GalNAz dans une des conditions de marquage. Les échantillons ont ensuite été marqués à la biotine-alkyne en suivant les instructions du kit *Click-IT™ Protein analysis detection - Biotine alkyne* (C33372). Les protéines marquées (40 µg par condition) ont été résolues par SDS-PAGE puis transférées

sur membrane de nitrocellulose. La détection des protéines clickées a été réalisée grâce à une incubation par l'avidine couplée à la peroxydase.

2.3.4.5 Enrichissement des extraits végétaux sur sWGA-immobilisée sur billes d'agarose

Après extraction, 500 µg de protéines ont été incubées en présence de sWGA immobilisée sur billes d'agarose toute la nuit dans un tampon contenant 10 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 0.4% (m/v) sodium désoxycholate, 0.3% (m/v) SDS et 0.2% (v/v) Nonidet P-40. Les billes ont été ensuite lavées à quatre reprises dans le même tampon avec ou sans GlcNAc à 0.5 M. Les échantillons ont été repris dans de du tampon de Laemmli et la totalité a été analysée par SDS-PAGE.

2.3.4.6 Cinétique de croissance d'*Arabidopsis thaliana*

Après semi des différents fonds génétiques *Col-0* et *WS*, et des différents mutants d'*A. thaliana*, les parties aériennes des plantes ont été prélevées (trois plants par condition et par prélèvement) aux périodes de temps indiquées. La masse totale a été mesurée et analysée par représentation graphique.

2.3.5 Discussion

A l'instar des animaux et des procaryotes, les végétaux possèdent leur propre panoplie de modifications post traductionnelles. Chez les plantes, ces modifications sont impliquées dans le développement, la croissance, la signalisation, la défense contre les pathogènes et la réponse aux différents stress et stimuli.

Lorsque j'ai démarré ce projet tout portait à penser que les plantes étaient également capables de réaliser des processus de O-GlcNAcylation, plusieurs articles ayant été publiés sur le sujet et plus spécifiquement sur les deux OGTs potentielles SPY et SEC (Hartweck *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2005; Hartweck *et al.*, 2006; Olszewski *et al.*, 2010; Zentella *et al.*, 2016). Il avait été rapporté dans la littérature que les plantes mutantes pour ces deux enzymes présentaient des modifications phénotypiques, les deux OGTs étant nécessaires

pour la gamétogenèse et l'embryogenèse (Hartweck *et al.*, 2002). Malgré cela, il est surprenant qu'aucune de ces études n'ait jamais montré clairement de profil de *O*-GlcNAcylation pour une cellule ou un organisme végétal. Néanmoins, récemment une équipe de Stanford, publiait l'identification de 262 protéines prétendues *O*-GlcNAcylées chez *A. thaliana* (Xu *et al.*, 2017). Les auteurs ont utilisé à ce propos la *lectin weak affinity chromatography* (LWAC) pour purifier ces protéines. Or cette technique s'avère très peu spécifique des protéines *O*-GlcNAcylées. De plus, et contre toute attente, il y a un an, SPY était reconnue en qualité de *O*-Fucosyltransférase réduisant considérablement ses prétentions à conserver son statut d'OGT (Zentella *et al.*, 2017).

Dans le but de répondre à cette interrogation, en utilisant différents outils dédiés à la mise en évidence de cette glycosylation, nous avons tout d'abord analysé des extraits totaux d'*A. thaliana* et tenté de caractériser pour la toute première fois un *O*-GlcNAcome végétal. Bien que nous soyons passés par des approches utilisant des anticorps dirigés contre la *O*-GlcNAcylation, la chimie-click ou la sWGA, nous ne sommes pas parvenus à mettre clairement en évidence de profil *O*-GlcNAc. Nous sommes arrivés quasiment au même constat avec l'algue unicellulaire *C. reinhardtii*. Un test de nage - GmaR, l'équivalent OGT chez les bactéries gouvernant le mouvement du flagelle - a été effectué avec la souche sauvage et la souche mutante pour l'OGT putative mais aucune différence significative n'a été observée (Fig. 33).

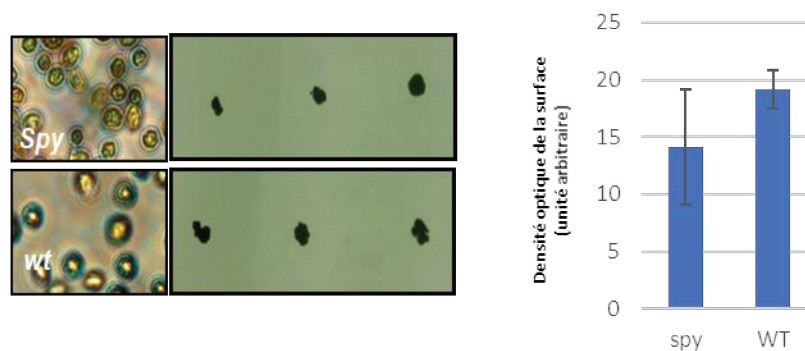


Figure 33. Test de nage sur gélose de *Chlamydomonas reinhardtii*, mutant *spy-like* et fond génétique sauvage (wt). L'expression graphique de l'expérience de nage à gauche est présentée à droite sous la forme d'un histogramme.

Si on peut remettre en cause l'efficacité des anticorps à croiser avec des protéines végétales, les expériences de chimie-click écartent tout doute à ce propos. Néanmoins et afin d'être parfaitement au clair sur ce problème nous allons réaliser des analyses par la méthode des itols-acétate (Lefebvre *et al.*, 2001). Cette approche, très différente de celles utilisées dans nos études, fait appel à une bêta-élimination en conditions réductrices, à une peracétylation des produits et à leur analyse par chromatographie en phase gazeuse. Cette technique devrait définitivement infirmer l'occurrence de la *O*-GlcNAcylation chez les végétaux.

A la période où nous tentions de mettre en évidence la *O*-GlcNAcylation chez *A. thaliana* et *C. reinhardtii*, nous avons amorcé, avec le concours du Dr. Fabrice Wattebled de l'équipe « glycobiochimie végétale », des expériences de croissance sur des souches sauvages et mutantes SPY ou SEC d'*A. thaliana*. Cette plante offre en effet l'avantage, en plus d'avoir un génome séquencé et annoté, de posséder toute une batterie de mutants obtenus par insertion aléatoire d'ADN-T et disponibles à coût intéressant. Cependant, aucun changement morphologique significatif n'a pu être observé quelque soient les conditions de culture, en serre ou en conditions contrôlées en phytotron, à l'exception du mutant *sec* cultivé en phytotron. Concernant les cinétiques de croissance nous n'avons pas été capables de montrer de changement clairement reproductible pour les mutants cultivés en serre ; néanmoins des différences significatives ont été observées pour la culture en phytotron, les mutants *sec* et *spy* exhibant un retard de croissance en comparaison à leur fond génétique sauvage respectif (un mutant *cgl-1* déficient en GNT1 a été utilisé en contrôle). Ces expériences semblent donc indiquer, sans considérer les cultures en serre plus difficiles à contrôler et soumis à nombre d'aléas extérieurs, que SPY et SEC impactent bien la croissance végétale sans pour autant en expliquer clairement les raisons.

Afin de pouvoir influencer sur les conditions de culture nous avons opté pour des conditions de culture en milieu gélosé. Des analyses visant à forcer la voie de biosynthèse des hexosamines par culture en milieu enrichi en glucosamine (court-circuitant l'étape limitante d'HBP catalysée par la GFAT) ou en glutamine (un des deux substrats de la GFAT)

(Steenackers *et al.*, 2016) n'ont pas permis d'observer de différence morphologique flagrante sur nos différentes souches d'*A. thaliana*; seule une toxicité de la glucosamine est à relever pour le mutant *spy* aux plus fortes concentrations. Cet effet délétère de la glucosamine est connu pour les cellules de mammifères en culture, l'excès de glucosamine déplaçant l'ATP cellulaire du fait d'une phosphorylation active de l'hexosamine en glucosamine-6-phosphate. L'analyse des plantes cultivées dans ces conditions par Western blot n'a pas montré d'augmentation de la *O*-GlcNAcylation. Le peu d'efficacité de transport de ces nutriments par les racines d'*A. thaliana* et par conséquent la faible activation de la voie des hexosamines peut expliquer en partie ce manque d'effet. Les dosages d'UDP-GlcNAc sur les plantes cultivées en glucosamine ou en glutamine n'ont pas apporté de réponse concrète bien que le nucléotide sucre soit détectable chez la plante. D'autres cultures en gélose ont été réalisées avec des concentrations croissantes en Thiamet-G, inhibiteur d'OGA. Aucun effet n'a pu être non plus observé sachant qu'à ce moment aucune étude ne prouve l'existence d'une *O*-GlcNAcase nucléocytoplasmique chez les plantes.

Enfin un stress salin a été infligé aux plantes en culture en milieu gélosé. La *O*-GlcNAcylation répond de manière dynamique à tout un ensemble de stress, qu'il soit osmotique, thermique, oxydatif ou toxique induit par les métaux lourds (Zachara *et al.*, 2004; Guinez *et al.*, 2007). Nous avons observé cet effet toxique pour les différentes souches avec un effet plus prononcé sur le mutant *cgl-1*. Malgré tout, l'analyse par Western blot des extraits de plantes n'a pas permis de révéler, ici non plus, de hausse de *O*-GlcNAcylation (résultats non montrés). L'ensemble de ces expériences réalisées en milieu gélosé n'a donc pas permis de détecter de *O*-GlcNAcylation.

La question que nous nous sommes posés tout naturellement a été de savoir, même si pour SPY la démonstration semblait avoir été faite (Zentella *et al.*, 2017), si les enzymes possèdent une réelle activité de *O*-GlcNAc transférase. Nous avons, pour ce faire, réalisé le clonage de SPY et de SEC en vecteur eucaryote mammifère, et puisqu'aucun anticorps dirigé contre ces enzymes ne soit réellement disponible nous avons étiqueté les enzymes avec un « tag » de type « Flag ». En premier lieu notre choix de modèle d'expression s'est

porté sur des fibroblastes de souris (MEF, mouse embryonic fibroblast) inductibles au tamoxifène afin d'abroger l'expression de l'OGT (don du Dr. Natasha Zachara, JHMI de Baltimore). Cependant et malgré de multiples tentatives, nous ne sommes jamais parvenus à transfecter de manière transitoire aucune de nos constructions. Ce problème semble être rémanent avec ce type cellulaire, c'est ce que nous avons pu apprendre de nos échanges avec l'équipe nous l'ayant procuré. Notre second choix s'est donc orienté sur un système utilisé en routine par l'équipe, la ligne cellulaire HEK 293 (human embryonic kidney). En comparaison à la forme humaine de l'OGT (hOGT), nos différentes expériences d'expression des formes « flaggées » de SPY et de SEC n'ont révélé aucune variation de *O*-GlcNAcylation globale, renforçant notre sentiment que ni SPY ni SEC ne présentent d'activité *O*-GlcNAc transférase. Malgré tout, il nous faut rester prudent vis-à-vis de ces observations. Il est possible que ni SPY ni SEC ne soient repliées dans la cellule HEK 293 de la manière où elles le seraient en cellule végétale. Néanmoins les deux enzymes sont produites et détectables et aucune toxicité n'a été relevée. Autre question, SPY et SEC disposent-elles dans ce contexte animal de tout le nécessaire pour travailler avec l'UDP-GlcNAc; en particulier des partenaires protéiques pivots pour leur activité chez les plantes pourraient être absents en cellules HEK 293. Enfin, le code génétique entre une cellule végétale et une cellule animale souffre quelques différences, les protéines traduites chez les cellules HEK 293 peuvent arborer des différences en comparaison de leur version végétale. Un test d'activité *in vitro* pourrait être réalisé afin de s'assurer de cette absence de fonction de transfert de motifs N-acétylglucosamine.

En conclusion, l'ensemble de ces observations tendent à indiquer que la *O*-GlcNAcylation chez les plantes soit inexistante ou tout au moins très faible. Ceci remet en cause l'évolution de certaines glycosyltransférases chez les végétaux et interpelle sur un potentiel changement d'activité d'un organisme à un autre. Quelques expériences complémentaires nous apparaissent indispensables pour aller plus loin dans la démonstration.

3. Conclusion générale

La *O*-GlcNAcylation est une modification post-traductionnelle très simple en termes de structure mais relativement complexe à étudier du fait de son implication dans une multitude de processus biologiques différents, de sa labilité chimique et enzymatique et de sa faible stœchiométrie, cette dernière la démarquant de la phosphorylation avec laquelle elle partage pourtant bien des caractéristiques.

Cette glycosylation a été étudiée dans de nombreux types cellulaires depuis sa découverte. La littérature rapporte sa présence chez les mammifères, les insectes, les nématodes, certaines bactéries et même nombre de virus. Moins de choses semblent avoir été décrites néanmoins sur la *O*-GlcNAcylation des protéines parasitaires et végétales, et son existence au sein même des levures est totalement incertain.

Je me suis donc attelée au cours de ma thèse à entreprendre l'analyse de la *O*-GlcNAcylation chez les protistes, *Toxoplasma gondii* plus particulièrement, et *Plasmodium falciparum* dans le cadre d'une collaboration, et chez les modèles végétaux *Arabidopsis thaliana* et *Chlamydomonas reinhardtii*.

Je me suis rapidement heurtée à un problème majeur : le manque de recul et d'outils pour ces modèles au contraire de ce qui avait été développé pour les modèles que je qualifierais de plus routiniers dans le domaine. A cela s'est ajouté le fait que les parasites expriment des quantités de *O*-GlcNAcylation très faibles en comparaison aux lignées cellulaires en culture ou aux animaux couramment utilisés en laboratoire; les plantes quant à elles ont des niveaux de *O*-GlcNAcylation à la limite de la détection voire proche du bruit de fond comme l'ont montré certaines de nos expériences de caractérisation de cette modification.

Les analyses protéomiques effectuées chez *P. falciparum* sont les toutes premières révélant une partie de son *O*-GlcNAcome. Les mêmes analyses réalisées chez *T. gondii* ont appuyé en partie ce qui avait été publié au préalable mais en utilisant une approche

méthodologique différente; ces études ont également révélé des choses tout à fait nouvelles.

Ces analyses ont montré que les protéines *O*-GlcNAcylées chez les organismes vivants faisaient partie de familles protéiques relativement identiques (protéines de la charpente cellulaire, enzymes métaboliques, protéines de stress, protéines de la machinerie de synthèse protéique...). L'identification chez *T. gondii* d'acteurs de la motilité et de l'invasion est beaucoup plus originale. En effet la *O*-GlcNAcylation des protéines rhoptries ou de protéines appartenant aux micronèmes suggère l'existence de nouvelles isoformes dont la fonction de la modification reste à élucider: est-elle impliquée dans le phénomène d'infection, dans l'interaction avec différents partenaires, interfère-t-elle avec la destinée de la protéine ? Aussi, le fait que les niveaux de *O*-GlcNAcylation soient fortement dépendants des conditions nutritionnelles et métaboliques suppose que la disponibilité en nutriments soit un facteur qu'il faut prendre en compte dans la susceptibilité au parasite: une cellule en bonne santé d'un point de vue métabolique est-elle plus ou moins susceptible à l'infection par l'apicomplexe qu'une cellule sevrée ou en état de déprivation nutritionnelle? Ce point nous apparaît tout à fait intéressant et pourrait faire partie d'une batterie d'expériences dans lesquelles des infections par *T. gondii* seraient soumises à des conditions de variations de la voie des hexosamines (inhibiteurs de GFAT, activateurs tels que la glucosamine ou la glutamine) et des inhibitions de l'OGT ou l'OGA. Concernant les enzymes du cycle de la *O*-GlcNAcylation on ne connaît finalement que très peu de choses. Si des travaux menés par mon équipe il y a quelques années avaient permis d'identifier une *OGT-like*, et bien qu'une protéine exprimée par *T. gondii* réagissait avec certains anticorps anti-OGT, hormis une activité *O*-GlcNAc transférase endogène au parasite, peu de choses sont réellement connues en la matière. Aussi l'OGT putative identifiée *in silico* montre plutôt des similitudes avec SPY exprimée chez *A. thaliana* qu'avec SEC. Or SPY est désormais reconnue comme une *O*-Fucosyltransférase plutôt qu'en tant qu'OGT. L'OGT de *T. gondii* reste de ce fait une énigme. Néanmoins l'existence d'une telle enzyme chez *T. gondii* mais également chez *P. falciparum* ne semble pas pouvoir souffrir le doute; il nous semble assez peu probable que des protéines d'un apicomplexe puissent être *O*-

GlcNAcylées par une OGT de la cellule hôte, des barrières physiques séparant les deux contextes intracellulaires : difficile à imaginer ne serait-ce que sur le plan thermodynamique. Il faudra encore beaucoup de travail expérimental et bioinformatique pour espérer pouvoir répondre à cette question.

A propos de l'OGA, rien n'a été fait pour prouver ou infirmer son existence et son activité chez de tels organismes, tout est à faire en ce domaine.

Concernant nos travaux sur les plantes, les premiers résultats nous ont réellement surpris. Cette thématique avait été amorcée suite à l'évaluation de l'équipe fin 2013 par l'AERES. La question posée était la suivante : quel organisme minimal est capable de réactions de *O*-GlcNAcylation ? L'équipe avait déjà entrepris des études sur les apicomplexes mais un autre modèle semblait nécessaire : il fallait qu'il soit différent de *T. gondii* et de *P. falciparum*. De par la proximité avec l'équipe « Glycobiologie végétale », *C. reinhardtii* nous est apparu comme faisant l'affaire pour se lancer dans ce genre d'investigations. Rapidement un doute est venu concernant les capacités de l'algue unicellulaire à réaliser des réactions de *O*-GlcNAcylation: l'organisme était-il trop minimal ou primitif, ou cette lacune était-elle propre aux végétaux. Nous sommes arrivés à peu de choses près à la même conclusion avec le végétal supérieur *A. thaliana*. Ce qui nous a heurtés à ce moment de ma thèse était le nombre de publications dédiées à l'étude de SPY et de SEC mais sans pour autant présenter de réel profil de *O*-GlcNAcylation. Les seules preuves d'une telle activité OGT émanaient de systèmes de surexpression généralement en système ectopique et quelque peu sortant de la réalité biologique. Cette absence de preuve, entre nos mains, de la *O*-GlcNAcylation chez les plantes ne doit pas être totalement considérée comme une preuve de l'absence d'une telle modification. Il est possible que le niveau de *O*-GlcNAcylation soit très bas, inférieur même à ce qu'exhibent les apicomplexes, pour ne pas être détecté avec nos outils ou se noyant dans le bruit de fond. Quelques expériences complémentaires nous semblent indispensables à ce stade pour paraître plus affirmatif. Néanmoins, si SPY avait perdu sa place parmi les OGTs au cours de ma thèse, il semblerait que SEC puisse subir le même sort. Ce risque pour la seconde glycosyltransférase ne résidait pas dans le fait qu'elle soit exclue de ce club très

privé des OGTs puisqu'une activité de SEC sur DELLA a été prouvée, bien que sur un système d'expression en cellules de tabac, mais plutôt parce que le contexte cellulaire végétal n'est pas favorable à ce genre de réaction enzymatique. Malgré cela, SEC exprimée en cellule de mammifère n'a pas permis de détecter d'activité enzymatique.

Ces résultats interrogent sur le caractère universel et donc crucial de la *O*-GlcNAcylation dans le monde du vivant et sur l'évolution des OGTs. Ces glycosyltransférases ont-elles acquiert la capacité à *O*-GlcNAcyler au cours de l'évolution et de la divergence des espèces ou, à l'inverse, l'ont-elles perdu chez ces organismes.

Les travaux de cette thèse ayant porté sur des organismes modèles peu utilisés dans le domaine de la *O*-GlcNAcylation auront je l'espère une certaine portée sur le plan scientifique international. Peut-être ces études en susciteront-elles d'autres ou même ouvriront-elles de nouvelles voies d'investigation de la *O*-GlcNAcylation en s'élargissant sur d'autres parasites ou agents infectieux tels que *Leishmania*, *Trypanosoma cruzi* ou *brucei*, *Cryptosporidium* ou *Schistosoma*, ou autres algues et plantes supérieures parmi lesquelles *Ostreococcus tauri* ou *Linum*.

4. Références

1. Aebi, M., 2013. N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1833(11), pp.2430–2437.
2. Anuradha, B., 2016. Toxoplasmosis in HIV infection: An overview. *Tropical Parasitology*, 6(2), pp.129–135.
3. Baldini S.F., Wavelet C., Hainault I., Guinez C., Lefebvre T., 2016. The Nutrient-Dependent O-GlcNAc Modification Controls the Expression of Liver Fatty Acid Synthase. *Journal of Molecular Biology*, 428(16), pp.3295–3304.
4. Bandini G., Haserick J.R., Motari E., Ouologuem D.T., Lourido S., Roos D.S., Costello C.E., Robbins P.W., Samuelson J., 2016. O -fucosylated glycoproteins form assemblies in close proximity to the nuclear pore complexes of *Toxoplasma gondii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(41), pp.11567–11572.
5. Banerjee S., Robbins P.W. and Samuelson J., 2009. Molecular characterization of nucleocytosolic O-GlcNAc transferases of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum*. *Glycobiology*, 19(4), pp.331–336.
6. Beausoleil S., Jedrychowski M., Schwartz D., Elias J. E., Villen J., Li J., Cohn M. A., Cantley L. C., Gygi S. P., 2004. Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(33), pp.12130–12135.
7. Beer D., Maloisel J.-L., Rast D.M., Vasella A., 1990. Synthesis of 2-acetamido-2-deoxy-D-gluconhydroximolactone- and chitobionhydroximolactone-derived N-phenylcarbamates, potential inhibitors of N-acetylglucosaminidase? *Helvetica Chimica Acta*, 73, pp.1918–1922.
8. Bissati K., Suvorova E., Xiao H., Lucas O., Upadhya R., Ma Y., Angeletti R.H., White M., Weiss L., Kim K., 2016. *Toxoplasma gondii* Arginine Methyltransferase 1 (PRMT1) Is Necessary for Centrosome Dynamics during Tachyzoite Cell Division. *American Society for Microbiology*, 7(1), pp.337–353.

9. Blaby I.K., Blaby-Haas C.E., Tourasse N., Hom E.F., Lopez D., Aksoy M., Grossman A., Umen J., Dutcher S., Porter M., King S., Witman G.B., Stanke M., Harris E.H., Goodstein D., Grimwood J., Schmutz J., Vallon O., Merchant S.S., Prochnik S., 2015. The *Chlamydomonas* genome project: a decade on. *Trends Plant Sci*, 19(10), pp.672–680.
10. Bollig, K. , Lamshöft M., Schweimer K., Marner F. J., Budzikiewicz H., Waffenschmidt S., 2007. Structural analysis of linear hydroxyproline-bound O-glycans of *Chlamydomonas reinhardtii*-conservation of the inner core in *Chlamydomonas* and land plants', *Carbohydrate Research*, 342(17), pp. 2557–2566.
11. Bond, M.R. and Hanover, J.A., 2015. A little sugar goes a long way : The cell biology of O-GlcNAc. *The Journal of cell biology*, 208(7), pp.869–880.
12. Boothroyd, J.C. and Dubremetz, J.F., 2008. Kiss and spit: The dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. *Nature Reviews Microbiology*, 6(1), pp.79–88.
13. Borner G.H.H., Lilley K.S., Stevens T.J. and Dupree P., 2003. Identification of Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Proteins in Arabidopsis. A Proteomic and Genomic Analysis. *Plant Physiology*, 132(2), pp.568–577.
14. Borodkin V.S., Schimpl M., Gundogdu M., Rafie K., Dorfmueller H.C., Robinson A., Van Aalten, D.M.F., 2014. Bisubstrate UDP-peptide conjugates as human O-GlcNAc transferase inhibitors. *The Biochemical journal*, 457(3), pp.497–502.
15. Borodkin, V.S. and Van Aalten, D.M.F., 2010. An efficient and versatile synthesis of GlcNAcstatins - Potent and selective O-GlcNAcase inhibitors built on the tetrahydroimidazo[1,2-a]pyridine scaffold. *Tetrahedron*, 66(39), pp.7838–7849.
16. Bouchut A., Chawla A. R., Jeffers V., Hudmon A., Sullivan W.J., 2015. Proteome-wide lysine acetylation in cortical astrocytes and alterations that occur during infection with brain parasite *Toxoplasma gondii*. *PLoS ONE*, 10(3), pp.1–18.
17. Boyes D.C., 2001. Growth Stage-Based Phenotypic Analysis of Arabidopsis: A Model for High Throughput Functional Genomics in Plants. *The Plant Cell Online*, 13(7), pp.1499–1510.

18. Braun L., Cannella D., Pinheiro A. M., Kieffer S., Belrhali H., Garin J., Hakimi M.-A., 2009. The small ubiquitin-like modifier (SUMO)-conjugating system of *Toxoplasma gondii*. *International journal for parasitology*, 39(1), pp.81–90.
19. Braun A., 1873. Ueber ein gefülltes und durchwachsenes exemplar of *Arabidopsis thaliana*. *Sitzungs Gessel Naturforsch*, 75.
20. Brimble S., Wollaston-Hayden E.E., Teo C.F., Morris A.C., Wells L., 2010. The Role of the O-GlcNAc Modification in Regulating Eukaryotic Gene Expression. *Current signal transduction therapy*, 5(1), pp.12–24.
21. Butkinaree C., Cheung W.D., Park S., Park K., Barber M., Hart G.W., 2008. Characterization of β -N-acetylglucosaminidase cleavage by caspase-3 during apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 283(35), pp.23557–23566.
22. Cacan R., Duvet S., Kmićik D., Labiau O., Mir A. M., Verbert A., 1998. “Glyco-deglyco” processes during the synthesis of N-glycoproteins. *Biochimie*, 80(1), pp.59–68.
23. Cagzhi J., Zuo Y. and Zuo Q., 2018. O-GlcNAcPRED-II: an integrated classification algorithm for identifying O-GlcNAcylation sites based on fuzzy undersampling and a K-means PCA oversampling technique. *Bioinformatics*, 34(12), pp.2029–2036.
24. Caillet-Boudin M.L., Strecker G. and Michalski J.C., 1989. O-linked GlcNAc in serotype-2 adenovirus fibre. *European journal of biochemistry / FEBS*, 184(1), pp.205–11.
25. Capotosti F., Guernier S., Lammers F., Waridel P., Cai Y., Jin J., Conaway J.W., Conaway R. C., Herr W., 2011. O-GlcNAc transferase catalyzes site-specific proteolysis of HCF-1. *Cell*, 144(3), pp.376–388.
26. Caputto R., Leloir L.F., Cardini C.E., Paladini A.C., 1950. Insolation of the coenzyme of the galactose phosphate-glucose phosphate transformation. *Journal of Biological Chemistry*, 184, pp.333–350.
27. Carabetta V.J. and Cristea M., 2017. Regulation , Function , and Detection of Protein Acetylation in Bacteria. *Journal of Bacteriology*, 199(16), pp.1–15.

28. Cekic N., Heinonen J.E., Stubbs K.A., Roth C., He Y., Bennet A.J., McEachern E.J., Davies G.J., Vocadlo D.J., 2016. Analysis of transition state mimicry by tight binding aminothiazoline inhibitors provides insight into catalysis by human: O-GlcNAcase. *Chemical Science*, 7(6), pp.3742–3750.
29. Chaudhry S. A., Gar N., Koren G., 2014. Toxoplasmosis and pregnancy. *Can Fam Physician*, 60, pp 334-336.
30. Chen D., Juárez S., Hartweck L., Alamillo J.M., Simón-Mateo C., Pérez J.J., Fernández-Fernández M.R., Olszewski N.E., García J.A., 2005. Identification of secret agent as the O-GlcNAc transferase that participates in Plum pox virus infection. *Journal of virology*, 79(15), pp.9381–9387.
31. Cheng X. Cole R. N., Zaia J., Hart G. W., 2000. Alternative O-glycosylation/O-phosphorylation of the murine estrogen receptor β . *Biochemistry*, 39(38), pp.11609–11620.
32. Chiaradonna F., Ricciardiello F. and Palorini R., 2018. The Nutrient-Sensing Hexosamine Biosynthetic Pathway as the Hub of Cancer Metabolic Rewiring. *Journal of cell biology*, 7(53), pp 1-29.
33. Chou T.Y., Hart G.W. and Dang C. V., 1995. c-Myc is glycosylated at threonine 58, a known phosphorylation site and a mutational hot spot in lymphomas. *Journal of Biological Chemistry*, 270(32), pp.18961–18965.
34. Cieniewski-Bernard C., Bastide B., Lefebvre T., Lemoine J., Mounier Y., Michalski J.C., 2004. Identification of O-linked N-acetylglucosamine proteins in rat skeletal muscle using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Molecular and cellular proteomics : MCP*, 3(6), pp.577–85.
35. Clark P.M., Rexach J.E. and Hsieh-Wilson L.C., 2013. Visualization of O-GlcNAc glycosylation stoichiometry and dynamics using resolvable poly(ethylene glycol) mass tags. *Current protocols in chemical biology*, 5(4), pp.281–302.
36. Clarke A.J., Hurtado-Guerrero R., Pathak S., Schüttelkopf A.W., Borodkin V., Shepherd S.M., Ibrahim A.F., van Aalten D.M., 2008. Structural insights into

- mechanism and specificity of O-GlcNAc transferase. *The EMBO journal*, 27(20), pp.2780–2788.
37. Comer F. I., Vosseller K., Wells L., Accavitti M. A., Hart G. W., 2001. Characterization of a mouse monoclonal antibody specific for O-linked N-acetylglucosamine. *Analytical Biochemistry*, 293(2), pp.169–177.
 38. Comtesse N., Maldener E. and Meese E., 2001. Identification of a nuclear variant of MGEA5, a cytoplasmic hyaluronidase and a β -A-acetylglucosaminidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 283(3), pp.634–640.
 39. Cork G.K., Thompson J. and Slawson C., 2018. Real Talk: The Inter-play Between the mTOR, AMPK, and Hexosamine Biosynthetic Pathways in Cell Signaling. *Frontiers in Endocrinology*, 9(September), pp.1–9.
 40. Cox F.E., 2010. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasites and vectors*, 3(1), p.1-9.
 41. Cross F.R. and Umen J.G., 2015. The Chlamydomonas cell cycle. *Plant Journal*, 82(3), pp.370–392.
 42. Czuba L.C., Hillgren K.M. and Swaan P.W., 2018. Post-translational modifications of transporters. *Pharmacology and Therapeutics*.
 43. Dai X. R., Gao X.-Q., Chen G. H., Tang L.L., Wang H., Zhang X.S., 2014. ABNORMAL POLLEN TUBE GUIDANCE1, an Endoplasmic Reticulum-Localized Mannosyltransferase Homolog of GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL10 in Yeast and PHOSPHATIDYLINOSITOL GLYCAN ANCHOR BIOSYNTHESIS B in Human, Is Required for Arabidopsis Pollen Tube Micropylar Gu. *Plant Physiology*, 165(4), pp.1544–1556.
 44. Daskalova S.M., Radder J. E., Cichacz Z.A., Olsen S. H., Tsaprailis G., Mason H., Lopez L. C., 2010. Engineering of N. benthamiana L. plants for production of N-acetylgalactosamine-glycosylated proteins - towards development of a plant-based platform for production of protein therapeutics with mucin type O-glycosylation. *BMC Biotechnology*, 10, pp.1–18.

45. Dehennaut V., Slomianny M.C., Page A., Vercoutter-Edouart A.S., Jessus C., Michalski J.C., Vilain J.P., Bodart J.F., Lefebvre T., 2008. Identification of Structural and Functional O -Linked N -Acetylglucosamine-bearing Proteins in *Xenopus laevis* Oocyte. *Molecular and Cellular Proteomics*, 7(11), pp.2229–2245.
46. Dehennaut V., Lefebvre T., Sellier C., Leroy Y., Gross B., Walker S., Cacan R., Michalski J.C., Vilain J.P., Bodart J.F., 2007. O-linked N-acetylglucosaminyltransferase inhibition prevents G 2/M transition in *Xenopus laevis* oocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 282(17), pp.12527–12536.
47. Dennis R.J., Taylor E.J., Macauley M.S., Stubbs K.A., Turkenburg J.P., Hart S.J., Black G.N., Vocadlo D.J., Davies G.J., 2006. Structure and mechanism of a bacterial β -glucosaminidase having O-GlcNAcase activity. *Nature Structural and Molecular Biology*, 13(4), pp.365–371.
48. Dieckmann-Schuppert A., Bause E. and Schwarz R.T., 1993. Studies on O-glycans of Plasmodium-falciparum-infected human erythrocytes Evidence for O-GlcNAc and O-GlcNAc-transferase in malaria parasites. *European Journal of Biochemistry*, 216(3), pp.779–788.
49. Djouaka R., Riveron J.M., Yessoufou A., Tchigossou G., Akoton R., Irving H., Djegbe I., Moutairou K., Adeoti R., Tamò M., Manyong V., Wondji C., 2016. Multiple insecticide resistance in an infected population of the malaria vector *Anopheles funestus* in Benin. *Parasites and Vectors*, 9(453), pp.1–12.
50. Doerig C., Rayner J.C., Scherf A., Tobin A.B., 2015. Post-translational protein modifications in malaria parasites. *Nature Reviews Microbiology*, 13(3), pp.160–172.
51. Dondorp A.M., Yeung S., White L., Nguon C., Day N.P., Socheat D., von Seidlein L., 2010. Artemisinin resistance: current status and scenarios for containment. *Nature Reviews Microbiology*, 8(7), pp.272–280.
52. Dong, D.L. and Hart, G.W., 1994. Purification and characterization of an O-GlcNAc selective N-acetyl-beta-D-glucosaminidase from rat spleen cytosol. *The Journal of biological chemistry*, 269(30), pp.19321–19330.

53. Dorfmueller H. C., Borodkin V. S., Schimpl M., Shepherd S.M., Shpiro N. A., Van Aalten Daan M F., 2006. GlcNAcstatin: A picomolar, selective O-GlcNAcase inhibitor that modulates intracellular O-GlcNAcylation levels. *Journal of the American Chemical Society*, 128(51), pp.16484–16485.
54. Chung D.W., Ponts N., Cervantes S., Le Roch K.G., 2009. Post-translational modifications in Plasmodium: More than you think! *Molecular and Biochemical Parasitology*, 168(2), pp.123–134.
55. Dubey J.P., 2009. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, 39(8), pp.877–882.
56. Dubremetz, J.F., 2007. Rhoptries are major players in *Toxoplasma gondii* invasion and host cell interaction. *Cellular Microbiology*, 9(4), pp.841–848.
57. Eisenhaber B., Wildpaner M., Schultz C. J., Borner G. H. H., Dupree P. and Eisenhaber F., 2003. Glycosylphosphatidylinositol Lipid Anchoring of Plant Proteins. Sensitive Prediction from Sequence- and Genome-Wide Studies for Arabidopsis and Rice. *Plant Physiology*, 133(4), pp.1691–1701.
58. Elrouby N., Coupland G., 2010. Proteome-wide screens for small ubiquitin-like modifier (SUMO) substrates identify Arabidopsis proteins implicated in diverse biological processes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 107(40), pp.17415-17420
59. Fauquenoy S., Morelle W., Hovasse A., Bednarczyk A., Slomianny C., Schaeffer C., Van Dorsselaer A. Tomavo S., 2008. Proteomics and glycomics analyses of N-glycosylated structures involved in *Toxoplasma gondii*--host cell interactions. *Molecular and cellular proteomics : MCP*, 7(5), pp.891–910.
60. Ferguson D.J.P. and Dubremetz J.F. 2013. *The Ultrastructure of Toxoplasma gondii* Second Edi., Elsevier, pp. 19-59.
61. Fernandez-Fernandez R.M., Camafeita E., Bonay P., Meacute E., Albar J.P., Garcia J.A. 2002. The capsid protein of a plant single-stranded RNA virus is modified by O-linked N-acetylglucosamine. *Journal of Biological Chemistry*, 277(1), pp.135–140.

62. Fisk J.C. and Read L.K. 2011. Protein arginine methylation in parasitic protozoa. *Eukaryotic Cell*, 10(8), pp.1013–1022.
63. Francia M.E. and Striepen B., 2014. Cell division in apicomplexan parasites. *Nature Publishing Group*, 12(2), pp.125–136.
64. Frenkel J., Dubey J. and Miller N., 1970. *Toxoplasma gondii* in Cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science*, 167(1), pp.893–896.
65. Frenkel J.K., 1949. Uveitis and toxoplasmin sensitivity. *American journal of ophthalmology*, 32 Pt. 2(6), pp.127–135.
66. Gambetta M., Oktaba K. and Müller J., 2009. Essential Role of the Glycosyltransferase Sxc/Ogt in Polycomb Repression. *Science*, 325, pp.93–96.
67. Garénaux E., Shams-Eldin H., Chirat F., Bieker U., Schmidt J., Michalski J.C., Cacan R., Guérardel Y., Schwarz R.T. 2008. The dual origin of *Toxoplasma gondii* N-glycans. *Biochemistry*, 47(47) pp.12270-12276
68. Gillmor C. S., Lukowitz W., Brininstool G., Sedbrook J. C., Hamann T., Poindexter, P., Somerville C.R., 2005. Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Proteins Are Required for Cell Wall Synthesis and Morphogenesis in Arabidopsis. *Plant Cell*, 17(4), pp.1128–1140.
69. Gilson P. R., Nebl T., Vukcevic D., Moritz R. L., Sargeant T., Speed T.P., Schofield L., Crabb B. S., 2006. Identification and Stoichiometry of Glycosylphosphatidylinositol-anchored Membrane Proteins of the Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Cellular Proteomics*, 5(7), pp.1286–1299.
70. Gloster T.M., Zandberg W. F., Heinonen J. E., Shen D. L., Deng L., Vocadlo D.J., 2011. Hijacking a biosynthetic pathway yields a glycosyltransferase inhibitor within cells. *Nature chemical biology*, 7(3), pp.174–181.
71. Gloster T.M. and Vocadlo D.J., 2010. Mechanism, Structure, and Inhibition of O-GlcNAc Processing Enzymes. *Current Signal Transduction Therapy*, 5(1), pp.74–91.
72. Greenboim-Wainberg, Y., 2005. Cross Talk between Gibberellin and Cytokinin: The Arabidopsis GA Response Inhibitor SPINDLY Plays a Positive Role in Cytokinin Signaling. *the Plant Cell Online*, 17(1), pp.92–102.

73. Gross B.J., Kraybill B.C. and Walker S., 2005. Discovery of O-GlcNAc transferase inhibitors. *Journal of the American Chemical Society*, pp.14588-14589.
74. Groussaud D., Khair M., Tollenaere A. I., Waast L., Kuo M.S., Mangeney M., Martella C., Fardini Y., Coste S., Souidi M., Benit L., Pique C., Issad T., 2017. Hijacking of the O-GlcNAcZYME complex by the HTLV-1 Tax oncoprotein facilitates viral transcription. *PLoS Pathogens*, 13(7), pp.1–23.
75. Guinez C., Mir A. M., Leroy Y., Cacan R., Michalski J.C., Lefebvre T., 2007. Hsp70-GlcNAc-binding activity is released by stress, proteasome inhibition, and protein misfolding. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 361(2), pp.414–420.
76. Guinez C., Losfeld M.E., Cacan R., Michalski J.C., Lefebvre T., 2006. Modulation of HSP70 GlcNAc-directed lectin activity by glucose availability and utilization. *Glycobiology*, 16(1), pp.22–28.
77. Guo B., Liang Q., Li L., Hu Z., Wu F., Zhang P., Ma Y., Zhao B., Kovács A.L., Zhang Z., Feng D., Chen S., Zhang H., 2014. O-GlcNAc-modification of SNAP-29 regulates autophagosome maturation. *Nature cell biology*, 16(12), pp.1215–1226.
78. Gupta, R. and Brunak, S., 2001. Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. *Biocomputing 2002*, 322, pp.310–322.
79. Gurcel C., Vercoutter-Edouart A.S., Fonbonne C., Mortuaire M., Salvador A., Michalski J.C., Lemoine J., 2008. Identification of new O -GlcNAc modified proteins using a click-chemistry-based tagging. *Analytical and Bionalytical Chemistry*, 390, pp.2089–2097.
80. Hallmann, A., 2011. Evolution of reproductive development in the volvocine algae. *Sexual Plant Reproduction*, 24(2), pp.97–112.
81. Haltiwanger R.S., Blomberg M.A. and Hart, G.W., 1992. Glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins: Purification and characterization of a uridine diphospho-N-acetylglucosamine:polypeptide b-N-acetylglucosaminyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 267(13), pp.9005–9013.

82. Haltiwanger R.S., Grove K. and Philipsberg G.A., 1998. Modulation of O-Linked N Acetylglucosamine Levels on Nuclear and Cytoplasmic Proteins in Vivo Using the Peptide O GlcNAc b-N-acetylglucosaminidase Inhibitor O-(2-Acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene) amino- N -phenylcarbamate , 273(6), *The journal of biological chemistry*, pp.3611–3617.
83. Hanania U., Furman-Matarasso N., Ron M., Avni A., 1999. Isolation of a novel SUMO protein from tomato that suppresses EIX-induced cell death. *Plant Journal*, 19(5), pp.533–541.
84. Hanover J.A., Cohen C.K., Willingham M.C., Park M.K., 1987. O-Linked N-Acetylglucosamine Is Attached to Proteins of the Nuclear Pore. Evidence for cytoplasmic and nucleoplasmic glycoproteins. *Journal of Biological Chemistry*, 262(20), pp.9887–9894.
85. Hanover J.A., Forsythe M.E., Hennessey P.T., Brodigan T.M., Love D.C., Ashwell G., Krause M., 2005. A Caenorhabditis elegans model of insulin resistance: Altered macronutrient storage and dauer formation in an OGT-1 knockout. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(32), pp.11266–11271.
86. Hanover J.A., 2001. Glycan-dependent signaling : O-linked. *The FASEB journal*, 15(11), pp.1865–1876.
87. Hanover J.A., Yu S., Lubas W.B., Shin S.H., Ragano-Caracciola M., Kochran J., Love D.C., 2003. Mitochondrial and nucleocytoplasmic isoforms of O-linked GlcNAc transferase encoded by a single mammalian gene. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 409(2), pp.287–297.
88. Hanover J.A., Krause M.W. and Love, D.C., 2012. Bittersweet memories: Linking metabolism to epigenetics through O-GlcNAcylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(5), pp.312–321.
89. Hartweck L.M., Genger R.K., Grey W.M., Olszewski N.E., 2006. SECRET AGENT and SPINDLY have overlapping roles in the development of Arabidopsis thaliana L. Heyn. *Journal of Experimental Botany*, 57(4), pp.865–875.

90. Hartweck, L.M., Scott, C.L. and Olszewski, N.E., 2002. Two O-linked N-acetylglucosamine transferase genes of *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. Have overlapping functions necessary for gamete and seed development. *Genetics*, 161(3), pp.1279–1291.
91. Häweker H., Rips S., Koiwa H., Salomon S., Saijo Y., Chinchilla D., Robatzek S., von Schaewen A, 2010. Pattern recognition receptors require N-glycosylation to mediate plant immunity. *Journal of Biological Chemistry*, 285(7), pp.4629–4636.
92. Heckel D., Comtesse N., Brass N., Blin N., Zang K.D., Meese E., Novel immunogenic antigen homologous to hyaluronidase in meningioma. 1998. *Human Molecular Genetics*, 7(12), pp.1859–1872.
93. Holt G.D., Snow C.M., Senior A., Haltiwanger R.S., Gerace L., Hart GW 1987. Nuclear pore complex glycoproteins contain cytoplasmically disposed O-linked N-acetylglucosamine. *Journal of Cell Biology*, 104(5), pp.1157–1164.
94. Holts, G.D. and Hart, G.W., 1986. The Subcellular Distribution of Terminal N-Acetylglucosamine Moieties. *The Journal of Biological Chemistry*, 261(17), pp.8049–4305.
95. Horiuchi R., Hirotsu N., Miyanishi N., 2015. Comparative analysis of N-glycans in the ungerminated and germinated stages of *Oriza sativa*. *Carbohydr Res.* 418, pp. 1-8.
96. Horiuchi R., Hirotsu N., Miyanishi N., 2016. N-glycan transition of the early developmental stage in *Oriza sativa*. *Biochem Biophys Res Commun*, 477(3), pp. 426-432.
97. Hu, K., Roos, D.S. and Murray, J.M., 2002. A novel polymer of tubulin forms the conoid of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Cell Biology*, 156(6), pp.1039–1050.
98. Huber, S.C., 2007. Exploring the role of protein phosphorylation in plants: from signalling to metabolism. *Biochemical Society Transactions*, 35(1), pp.28–32.
99. Hunter, C.A. and Sibley, D. 2012. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. *Nature Reviews Microbiology*, 10, pp.766-778.

100. Ingham, P.W., 1984. A gene that regulates the bithorax complex differentially in larval and adult cells of *Drosophila*. *Cell*, 37(3), pp.815–823.
101. Isono, T., 2011. O-glcnaC-specific antibody CTD110.6 cross-reacts with N-GlcNAc2-modified proteins induced under glucose deprivation. *PLoS ONE*, 6(4), pp 1-10.
102. Issar N., Roux E., Mattei D., Scherf A., 2008. Identification of a novel post-translational modification in *Plasmodium falciparum*: Protein sumoylation in different cellular compartments. *Cellular Microbiology*, 10(10), pp.1999–2011.
103. Jacobsen, S.E. and Olszewski, N.E., 1993. Mutations at the SPINDLY locus of *Arabidopsis* alter gibberellin signal transduction. *The Plant cell*, 5(8), pp.887–896.
104. Janet, C.-S., 2012. Zoonotic malaria: *Plasmodium knowlesi*, an emerging pathogen. *Current Opinion in Infectious Diseases.*, 25(5), pp.530–536.
105. Janetzko J., Trauger S.A., Lazarus M.B., Walker S., 2016. How the glycosyltransferase OGT catalyzes amide bond cleavage. *Nature Chemical Biology*, 12(11), pp.900–901.
106. Janetzko J. and Walker S., 2014. The making of a sweet modification: Structure and function of O-GlcNAc transferase. *Journal of Biological Chemistry*, 289(50), pp.34424–34432.
107. Jeffers V. and Sullivan W.J., 2012. Lysine acetylation is widespread on proteins of diverse function and localization in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Eukaryotic Cell*, 11(6), pp.735–742.
108. Jia C., Liu T. and Wang Z., 2013. O-GlcNAcPRED: a sensitive predictor to capture protein O-GlcNAcylation sites. *Molecular biosystems*, 9(11), pp.2909–2913.
109. Jin H., Yan Z., Nam K.H., Li J., Jin H., 2007. Allele-Specific Suppression of a Defective Brassinosteroid Receptor Reveals a Physiological Role of UGGT in ER Quality Control. *Molecular Cell*, 26(6), pp.821–830.
110. Jochmann R., Pfannstiel J., Chudasama P., Kuhn E., Konrad A., Stürzl M., 2013. O-GlcNAc transferase inhibits KSHV propagation and modifies replication relevant viral proteins as detected by systematic O-GlcNAcylation analysis. *Glycobiology*, 23(10), pp.1114–1130.

- 111.Joyce B.R., Queener S.F., Wek R.C., Sullivan W.J. Jr., 2010. Phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2 α promotes the extracellular survival of obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(40), pp.17200–17205.
- 112.Junod A., Lambert A.E., Orci L., Pictet R., Gonet A.E., Renold A.E., 1967. Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 126(1), pp.201–205.
- 113.Kang J.S., Frank J., Kang C.H., Kajiura H., Vikram M., Ueda A., Kim S., Bahk J.D., Triplett B., Fujiyama K., Lee S.Y., von Schaewen A., Koiwa H., 2008. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(15), pp.5933–5938.
- 114.Kapuria V., Röhrig U.F., Bhuiyan T., Borodkin V.S., van Aalten D.M., Zoete V., Herr W., 2016. Proteolysis of HCF-1 by Ser/Thr glycosylation-incompetent O-GlcNAc transferase:UDP-GlcNAc complexes. *Genes and Development*, 30(8), pp.960–972.
- 115.Kaur I., Zeeshan M., Saini E., Kaushik A., Mohammed A., Gupta D., Malhotra P., 2016. Widespread occurrence of lysine methylation in *Plasmodium falciparum* proteins at asexual blood stages. *Scientific Reports*, 6(July), pp.1–24.
- 116.Kerk, D., 2002. The Complement of Protein Phosphatase Catalytic Subunits Encoded in the Genome of Arabidopsis. *Plant Physiology*, 129(2), pp.908–925.
- 117.Khidekel N., Ficarro S.B., Clark P.M., Bryan M.C., Swaney D.L., Rexach J.E., Sun Y.E., Coon J.J., Peters E.C., Hsieh-Wilson L.C., 2007. Probing the dynamics of O-GlcNAc glycosylation in the brain using quantitative proteomics. *Nature chemical biology*, 3(6), pp.339–348.
- 118.Kim E.J., 2011. Chemical arsenal for the study of O-GlcNAc. *Molecules*, 16(3), pp.1987–2022.
- 119.Kim H.B., Lee S.W., Mun C.H., Yoon J.Y., Pai J., Shin I., Park Y.B., Lee S.K., Cho J.W., 2015. O-linked N-acetylglucosamine glycosylation of p65 aggravated the inflammation in both fibroblast-like synoviocytes stimulated by tumor necrosis factor- α and mice with collagen induced arthritis. *Arthritis Research and Therapy*, 17(1), pp.1–8.

120. Kim Y.C., Udeshi N.D., Balsbaugh J.L., Shabanowitz J., Hunt D.F., Olszewski N.E., 2011. O-GlcNAcylation of the Plum pox virus capsid protein catalyzed by SECRET AGENT: Characterization of O-GlcNAc sites by electron transfer dissociation mass spectrometry. *Amino Acids*, 40(3), pp.869–876.
121. Klaren V. and Kijlstra A., 2002. Toxoplasmosis, an overview with emphasis on ocular involvement. *Ocular Immunology and Inflammation*, 10(1), pp.1–26.
122. Konrad R.J., Zhang F., Hale J.E., Knierman M.D., Becker G.W., Kudlow J.E., 2002. Alloxan is an inhibitor of the enzyme O-linked N-acetylglucosamine transferase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 293(1), pp.207–212.
123. Kötzler, M.P. and Withers, S.G., 2016. Proteolytic cleavage driven by glycosylation. *Journal of Biological Chemistry*, 291(1), pp.429–434.
124. Kreppel, L.K., Blomberg, M. a and Hart, G.W., 1997. Dynamic Glycosylation of Nuclear and Cytosolic Proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(14), pp.9308–9315.
125. Kupferschmid M., Aquino-Gil M.O., Shams-Eldin H., Schmidt J., Yamakawa N., Krzewinski F., Schwarz R.T., Lefebvre T., 2017. Identification of O-GlcNAcylated proteins in *Plasmodium falciparum*. *Malaria Journal*, 16(1), pp.1–11.
126. Laibach, F., 1943. *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. als object für genetische und entwicklungsphysiologische untersuchungen. *Botanic Archive*, 44, pp.439–455.
127. Lalanne E., Honys D., Johnson A., Borner G.H., Lilley K.S., Dupree P., Grossniklaus U., Twell D., 2004. Glycosylphosphatidylinositol Anchor Biosynthetic Pathway , Are Required for Pollen Germination and Tube Growth in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 16(1), pp.229–240.
128. Lannoo, N. and Van Damme, E.J.M., 2010. Nucleocytoplasmic plant lectins. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1800(2), pp.190–201.
129. Lazarus B. D., Love D. C., Hanover J. A., 2009. O-GlcNAc cycling: implications for Neurodegenerative disorders. *Int J Biochem Cell Biol*, 41(11): 2134–2146
130. Lefebvre T., Cieniewski C., Lemoine J., Guerardel Y., Leroy Y., Zanetta J.P., Michalski J.C., 2001. Identification of N-acetyl-D-glucosamine-specific lectins from rat liver:

- cytosolic and nuclear compartments as heat-shock proteins. *Biochemical Society*, 188, pp.179–188.
131. Lefebvre T. and Issad T., 2015. *30 years old: O-GlcNAc Reaches Age of Reason - Regulation of Cell Signaling and Metabolism by O-GlcNAcylation* 1st ed. T. Lefebvre and T. Issad, eds., France: Frontiers in Endocrinology.
 132. Leturcq M., Mortuaire M., Hardivillé S., Schulz C., Lefebvre T., Vercoutter-Edouart A.S., 2018. O-GlcNAc transferase associates with the MCM2–7 complex and its silencing destabilizes MCM–MCM interactions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, pp.16–18.
 133. Levine Z.G. and Walker S., 2016. The Biochemistry of O -GlcNAc Transferase: Which Functions Make It Essential in Mammalian Cells? *Annual Review of Biochemistry*, 85(1), pp.631–657.
 134. Lewis B.A., 2013. O-GlcNAcylation at promoters, nutrient sensors, and transcriptional regulation. *Biochimica et Biophysica Acta Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(11), pp.1202–1206.
 135. Lewis B.A., Burlingame A.L. and Myers S.A., 2016. Human RNA polymerase II promoter recruitment in vitro is regulated by O-linked N-acetylglucosaminyltransferase (OGT). *Journal of Biological Chemistry*, 291(27), pp.14056–14061.
 136. Lewis B.A. and Hanover J.A., 2014. O-GlcNAc and the epigenetic regulation of gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, 289(50), pp.34440–34448.
 137. Lewis C. and Barbiers A.R., 1959. Streptozotocin, a new antibiotic. In vitro and in vivo evaluation. *Antibiotics Annual*, 7, pp.247–254.
 138. Lewis B.A., Burlingame A.L., Myers S.A., 2016. Human RNA Polymerase II Promoter Recruitment in Vitro Is Regulated by O-Linked N-Acetylglucosaminyltransferase (OGT). *J Biol Chem*. 291(27):14056-14061
 139. Li M.D., Ruan H.B., Singh J.P., Zhao L., Zhao T., Azarhoush S., Wu J., Evans R.M., Yang X., 2012. O-GlcNAc transferase is involved in glucocorticoid receptor-mediated transrepression. *J Biol Chem*. 287(16) pp. 12904-12912.

- 140.Liu K., Paterson A.J., Chin E., Kudlow J.E., 2000. Glucose stimulates protein modification by O-linked GlcNAc in pancreatic beta cells: linkage of O-linked GlcNAc to beta cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(6), pp.2820–2825.
- 141.Liu Q., Li F.C., Zhou C.X., Zhu X.Q., 2017. Research advances in interactions related to *Toxoplasma gondii* microneme proteins. *Experimental Parasitology*, 176, pp.89–98.
- 142.Liu Y., Ren Y, Cao Y, Huang H, Wu Q, Li W, Wu S, Zhang J, 2017. Discovery of a Low Toxicity O-GlcNAc Transferase (OGT) Inhibitor by Structure-based Virtual Screening of Natural Products. *Scientific Reports*, 7(1), pp.1–11.
- 143.Lopaticki S., Yang A.S.P., John A., Scott N.E., Lingford J.P., O'Neill M.T., Erickson S.M., McKenzie N.C., Jennison C., Whitehead L.W., Douglas D.N., Kneteman N.M., Goddard-Borger E.D., Boddey J.A., 2017. Protein O-fucosylation in *Plasmodium falciparum* ensures efficient infection of mosquito and vertebrate hosts. *Nature Communications*, 8(1) pp 1-10.
- 144.Luk F.C.Y., Johnson T.M. and Beckers C.J., 2008. N-linked glycosylation of proteins in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Molecular and biochemical parasitology*, 157(2), pp.169–178.
- 145.Ma J. and Hart G.W., 2014. O -GlcNAc profiling : from proteins to proteomes. *Clinical Proteomics Journal*, 11(8), pp.1–16.
- 146.Macauley M.S., Whitworth G.E., Debowski A.W., Chin D., Vocadlo D.J., 2005. O-GlcNAcase uses substrate-assisted catalysis: Kinetic analysis and development of highly selective mechanism-inspired inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*, 280(27), pp.25313–25322.
- 147.Macedo C.S., Schwarz R.T., Todeschini A.R., Previato J.O., Mendonça-Previato L., 2010. Overlooked post-translational modifications of proteins in *Plasmodium falciparum*: N- and O-glycosylation - A review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(8), pp.949–956.

148. Machon O., Baldini S.F., Ribeiro J.P., Steenackers A., Varrot A., Lefebvre T., Imberty A., 2017. Recombinant fungal lectin as a new tool to investigate O-GlcNAcylation processes. *Glycobiology*, 27(1), pp.123–128.
149. Manuell A.L. and Mayfield S.P., 2006. A bright future for *Chlamydomonas*. *Genome Biology*, 7(9), pp.7–9.
150. Maruthi M., Singh D., Reddy S.R., Mastan B.S., Mishra S., Kumar K.A., 2017. Modulation of host cell SUMOylation facilitates efficient development of *Plasmodium berghei* and *Toxoplasma gondii*. *Cellular Microbiology*, 19(7), pp.1–13.
151. Mathieu-Rivet E., Kiefer-Meyer M.-C., Vanier G., Ovide C., Burel C., Lerouge P., Bardor M., 2014. Protein N-glycosylation in eukaryotic microalgae and its impact on the production of nuclear expressed biopharmaceuticals, *Frontiers in Plant Science*, 5(July), pp. 1–13.
152. Mathieu-Rivet E., Scholz M., Arias C., Dardelle F., Schulze S., Le Mauff F., Teo G., Hochmal A. K., Blanco-Rivero A., Loutelier-Bourhis C., Kiefer-Meyer M.-C., Fufezan C. Burel C., Lerouge P., Martinez F., Bardor M., Hippler M., 2013. Exploring the *N*-glycosylation Pathway in *Chlamydomonas reinhardtii* Unravels Novel Complex Structures, *Molecular and Cellular Proteomics*, 12(11), pp. 3160–3183.
153. Maymon I., Greenboim-Wainberg Y., Sagiv S., Kieber J.J., Moshelion M., Olszewski N., Weiss D., 2009. Cytosolic activity of SPINDLY implies the existence of a DELLA-independent gibberellin-response pathway. *Plant Journal*, 58(6), pp.979–988.
154. McFadden G.I. and Yeh E., 2017. The apicoplast: now you see it, now you don't. *International Journal for Parasitology*, 47(2–3), pp.137–144.
155. Mehdy A., Morelle W., Rosnoblet C., Legrand D., Lefebvre T., Duvet S., Foulquier F., 2012. PUGNAc treatment leads to an unusual accumulation of free oligosaccharides in CHO cells. *Journal of Biochemistry*, 151(4), pp.439–446.
156. Merchant S.S., Prochnik S.E., Vallon O., Harris E.H., Karpowicz S.J., Witman G.B., Terry A., Salamov A., Fritz-Laylin L.K., Maréchal-Drouard L., Marshall W.F., Qu L.H., Nelson D.R., Sanderfoot A.A., Spalding M.H., Kapitonov V.V., Ren Q., Ferris P., Lindquist E., Shapiro H., Lucas S.M., Grimwood J., Schmutz J., Cardol P., Cerutti H.,

- Chanfreau G., Chen C.L., Cognat V., Croft M.T., Dent R., Dutcher S., Fernández E., Fukuzawa H., González-Ballester D., González-Halphen D., Hallmann A., Hanikenne M., Hippler M., Inwood W., Jabbari K., Kalanon M., Kuras R., Lefebvre P.A., Lemaire S.D., Lobanov A.V., Lohr M., Manuell A., Meier I., Mets L., Mittag M., Mittelmeier T., Moroney J.V., Moseley J., Napoli C., Nedelcu A.M., Niyogi K., Novoselov S.V., Paulsen I.T., Pazour G., Purton S., Ral J.P., Riaño-Pachón D.M., Riekhof W., Rymarquis L., Schroda M., Stern D, Umen J., Willows R., Wilson N., Zimmer S.L., Allmer J., Balk J., Bisova K., Chen C.J., Elias M., Gendler K., Hauser C., Lamb M.R., Ledford H., Long J.C., Minagawa J., Page M.D., Pan J., Pootakham W., Roje S., Rose A., Stahlberg E., Terauchi A.M., Yang P., Ball S., Bowler C., Dieckmann C.L., Gladyshev V.N., Green P., Jorgensen R., Mayfield S., Mueller-Roeber B., Rajamani S., Sayre R.T., Brokstein P., Dubchak I., Goodstein D, Hornick L., Huang Y.W., Jhaveri J., Luo Y., Martínez D., Ngau W.C., Otilar B., Poliakov A., Porter A., Szajkowski L., Werner G., Zhou K., Grigoriev I.V., Rokhsar D.S., Grossman A.R., 2010. The *Chlamydomonas* Genome Reveals the Evolution of Key Animal and Plant Functions. *Science*, 318(5848), pp.245–250.
157. Meyerowitz, E.M., 2001. Prehistory and history of Arabidopsis research. *Plant physiology*, 125(1), pp.15–19.
158. Miao J., Lawrence M., Jeffers V., Zhao F., Parker D., Ge Y., Sullivan W.J. Jr., Cui L., 2013. Extensive lysine acetylation occurs in evolutionarily conserved metabolic pathways and parasite-specific functions during *Plasmodium falciparum* intraerythrocytic development. *Molecular Microbiology*, 89(4), pp.660–675.
159. Moloney, D.J., Lin, A.I. and Haltiwanger, R.S., 1997. The O -Linked Fucose Glycosylation Pathway. *The Journal of biological chemistry*, 272(30), pp.19046–19050.
160. Silmon de Monerri N.C., Yakubu R.R., Chen A.L., Bradley P.J., Nieves E., Weiss L.M, Kim K., 2015. The Ubiquitin Proteome of *Toxoplasma gondii* Reveals Roles for Protein Ubiquitination in Cell- Resource The Ubiquitin Proteome of *Toxoplasma*

- gondii Reveals Roles for Protein Ubiquitination in Cell-Cycle Transitions. *Cell Host and Microbe*, 18(5), pp.621–633.
- 161.Monsigny M., Sene C., Obrenovitch A., Roche A.C, Delmotte F., Boschetti E., 1979. Properties of Succinylated Wheat-Germ Agglutinin. *European Journal of Biochemistry*, 98(1), pp.39–45.
- 162.Morrisette, N.S. and Ajioka, J.W., 2009. The early years of Toxoplasma research : What ' s past is prologue. *Int J Parasitol.*, 39(8), pp.865–869.
- 163.Müller, R., Jenny, A. and Stanley, P., 2013. The EGF Repeat-Specific O-GlcNAc-Transferase Eogt Interacts with Notch Signaling and Pyrimidine Metabolism Pathways in Drosophila. *PLoS ONE*, 8(5) pp 1-17.
- 164.Nagel, A.K. and Ball, L.E., 2014. O-GlcNAc transferase and O-GlcNAcase: Achieving target substrate specificity. *Amino Acids*, 46(10), pp.2305–2316.
- 165.Nagnan-Le Meillour P., Vercoutter-Edouart A.S., Hilliou F., Le Danvic C., Lévy F., 2014. Proteomic analysis of pig (Sus scrofa) olfactory soluble proteome reveals O-linked-N-acetylglucosamylation of secreted odorant-binding protein. *Frontiers in Endocrinology*, 5, pp.1–13.
- 166.Nazarova L.A., Ochoa R.J., Jones K.A., Morrisette N.S., Prescher J.A., 2016. Extracellular Toxoplasma gondii tachyzoites metabolize and incorporate unnatural sugars into cellular proteins. *Microbes and Infection*, 18(3), pp.199–210.
- 167.Nicolle, C. and Manceaux, L., 1908. Sur une infection a corps de Leishman (ou organisms voisins) du gondii. *Comptes Rendus. Academie des Sciences*, 147, pp.763–766.
- 168.Niemann M.C., Bartrina I., Ashikov A., Weber H., Novák O., Spíchal L., Strnad M., Strasser R., Bakker H., Schmülling T., Werner T., 2015. *Arabidopsis* ROCK1 transports UDP-GlcNAc/UDP-GalNAc and regulates ER protein quality control and cytokinin activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(1), pp.291–296.

169. De Niz M., Burda P.C., Kaiser G., Del Portillo H.A., Spielmann T., Frischknecht F., Heussler V.T., 2017. Progress in imaging methods: Insights gained into Plasmodium biology. *Nature Reviews Microbiology*, 15(1), pp.37–54.
170. Ogawa M., Sawaguchi S., Kawai T., Nadano D., Matsuda T., Yagi H., Kato K., Furukawa K., Okajima T., 2015. Impaired O-linked N-acetylglucosaminylation in the endoplasmic reticulum by mutated epidermal growth factor (EGF) domain-specific O-linked N-acetylglucosamine transferase found in adams-oliver syndrome. *Journal of Biological Chemistry*, 290(4), pp.2137–2149.
171. Oh M.H., Wang X., Kota U., Goshe M.B., Clouse S.D., Huber S.C., 2009. Tyrosine phosphorylation of the BRI1 receptor kinase emerges as a component of brassinosteroid signaling in Arabidopsis. *Pnas*, 106(2), pp.658–663.
172. Olivier-Van Stichelen S., Dehennaut V., Buzy A., Zacharyus J.L., Guinez C., Mir A.M., El Yazidi-Belkoura I., Copin M.C., Boureme D., Loyaux D., Ferrara P., Lefebvre T., 2014. O-GlcNAcylation stabilizes β -catenin through direct competition with phosphorylation at threonine 41. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 28(8), pp.3325–3338.
173. Olivier-Van Stichelen S., Drougat L., Dehennaut V., El Yazidi-Belkoura I., Guinez C., Mir A.M., Michalski J.C., Vercoutter-Edouart A.S., Lefebvre T., 2012. Serum-stimulated cell cycle entry promotes ncOGT synthesis required for cyclin D expression. *Oncogenesis*, 1(12), pp.1–6.
174. Olivier-Van Stichelen, S., Abramowitz, L.K. and Hanover, J.A., 2014. X marks the spot: Does it matter that O-GlcNAc Transferase is an X-linked gene? *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 453(2), pp.201–207.
175. Olszewski, N.E., West CM, Sassi SO, Hartweck LM., 2010. O-GlcNAc protein modification in plants: Evolution and function. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1800(2), pp.49–56.
176. Ortiz-Meoz R.F., Jiang J., Lazarus M.B., Orman M., Janetzko J., Fan C., Dubeau D.Y., Tan Z.W., Thomas C.J., Walker S., 2015. A Small Molecule That Inhibits OGT Activity in Cells. *ACS Chemical Biology*, 10(6), pp.1392–1397.

- 177.Ostrowski A., Gundogdu M., Ferenbach A.T., Lebedev A.A., van Aalten D.M., 2015. Evidence for a functional O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) system in the thermophilic bacterium *Thermobaculum terrenum*. *Journal of Biological Chemistry*, 290(51), pp.30291–30305.
- 178.Park H.J., Kim W.Y., Park HC, Lee S.Y., Bohnert H.J., Yun D.J., 2011. SUMO and SUMOylation in plants. *Molecules and Cells*, 32(4), pp.305–316.
- 179.Park S., Lee Y., Pak J.W., Kim H., Choi H., Kim J.W., Roth J., Cho J.W., 2015. O-GlcNAc modification is essential for the regulation of autophagy in *Drosophila melanogaster*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(16), pp.3173–3183.
- 180.Pathak S., Alonso J., Schimpl M., Rafie K., Blair D.E, Borodkin V.S., Albarbarawi O., van Aalten D.M.F, 2015. The active site of O-GlcNAc transferase imposes constraints on substrate sequence. *Nature Structural and Molecular Biology*, 22(9), pp.744–749.
- 181.Perez-Cervera Y., Harichaux G., Schmidt J., Debierre-Grockiego F., Dehennaut V., Bieker U., Meurice E., Lefebvre T., Schwarz R.T., 2011. Direct evidence of O-GlcNAcylation in the apicomplexan *Toxoplasma gondii*: a biochemical and bioinformatic study. *Amino acids*, 40(3), pp.847–856.
- 182.Perez-Cervera Y., Dehennaut V., Aquino Gil M., Guedri K., Solórzano Mata C.J., Olivier-Van Stichelen S., Michalski J.C., Foulquier F., Lefebvre T., 2013. Insulin signaling controls the expression of O-GlcNAc transferase and its interaction with lipid microdomains. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 27(9), pp.3478–3486.
- 183.Pérez J., Juárez S., Chen D., Scott C.L., Hartweck L.M., Olszewski N.E., García J.A., 2006. Mapping of two O-GlcNAc modification sites in the capsid protein of the potyvirus Plum pox virus. *FEBS Letters*, 580(25), pp.5822–5828.
- 184.Petithory, J.-C., 1995. A propos de la découverte de l'hématozoaire du paludisme par A. Laveran Bône 1878 -Constantine 1880*. *Histoire des sciences médicales*, 1, p.57.

185. Peyron F., McLeod R., Ajzenberg D., Contopoulos-Ioannidis D., Kieffer F., Mandelbrot L., Sibley L.D., Pelloux H., Villena I., Wallon M., Montoya J.G., 2017. Congenital Toxoplasmosis in France and the United States: One Parasite, Two Diverging Approaches. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(2), pp.4–9.
186. Photini S. and Lee Sim B.K.L., 2015. Cell invasion by the vertebrate stages of Plasmodium. *Trends Microbiology*, 91(2), pp.165–171.
187. Pickart, C.M., 2001. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annual Review of Biochemistry*, 70(1), pp.503–533.
188. Pratelli R., Guerra D.D, Yu S., Wogulis M., Kraft E., Frommer W.B., Callis J., Pilot G., 2012. The Ubiquitin E3 Ligase LOSS OF GDU2 Is Required for GLUTAMINE DUMPER1-Induced Amino Acid Secretion in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 158(4), pp.1628–1642.
189. Pröschold, T., Harris, E.H. and Coleman, A.W., 2005. Portrait of a species: Chlamydomonas reinhardtii. *Genetics*, 170(4), pp.1601–1610.
190. Ramakrishnan, B. and Qasba, P.K., 2002. Structure-based design of β 1,4-galactosyltransferase I (β 4Gal-T1) with equally efficient N-acetylgalactosaminyltransferase activity: Point mutation broadens β 4Gal-T1 donor specificity. *Journal of Biological Chemistry*, 277(23), pp.20833–20839.
191. Ren X., Jiang S., Li D., Sun H., Wang D., 2013. Crystallization and preliminary crystallographic studies of AAL-2, a novel lectin from Agrocybe aegerita that binds nonreducing terminal N-acetylglucosamine. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 69(6), pp.650–652.
192. Riou-Khamlichi C., Huntley R., Jacquemard A., Murray J. A., 1999. Cytokinin activation of Arabidopsis cell division through a D-type cyclin. *Science*. Vol 283 (5407), pp. 1541-1544.
193. Rips S., Bentley N., Jeong I.S., Welch J.L., von Schaewen A, Koiwa H, 2014. Multiple N-Glycans Cooperate in the Subcellular Targeting and Functioning of Arabidopsis KORRIGAN1. *The Plant Cell*, 26(9), pp.3792–3808.

194. Oh M.H., Wang X., Kota U., Goshe M.B., Clouse S.D., Huber S.C., 1998. Streptozotocin, an analog of N-acetylglucosamine, blocks the removal of O-GlcNAc from intracellular proteins. *Send to Proc Assoc Am Physicians*, 110(5), pp.422–432.
195. Roos, M.D. and Hanover, J.A., 2000. Structure of O-linked GlcNAc transferase: mediator of glycan-dependent signaling. *Biochemical and biophysical research communications*, 271(2), pp.275–280.
196. Ruan, H.-B., Nie, Y. and Yang, X., 2013. Regulation of Protein Degradation by O-GlcNAcylation: Crosstalk with Ubiquitination. *Molecular and Cellular Proteomics*, 12(12), pp.3489–3497.
197. Sakaidani Y., Nomura T., Matsuura A., Ito M., Suzuki E., Murakami K., Nadano D., Matsuda T., Furukawa K., Okajima T., 2011. O-linked-N-acetylglucosamine on extracellular protein domains mediates epithelial cell-matrix interactions. *Nature communications*, 2, p.1-9.
198. Sanz S., López-Gutiérrez B., Bandini G., Damerow S., Absalon S., Dinglasan R.R., Samuelson J., Izquierdo L., 2016. The disruption of GDP-fucose de novo biosynthesis suggests the presence of a novel fucose-containing glycoconjugate in Plasmodium asexual blood stages. *Scientific Reports*, 6(July), pp.1–8.
199. von Schaewen A., Sturm A., O'Neill J., Chrispeels M.J., 1993. Isolation of a Mutant Arabidopsis Plant That Lacks N-Acetyl Glucosaminyl Transferase-I and Is Unable to Synthesize Golgi-Modified Complex N-Linked Glycans. *Plant Physiology*, 102(4), pp.1109–1118.
200. Schirm M., Kalmokoff M., Aubry A., Thibault P., Sandoz M., Logan S.M., 2004. Flagellin from *Listeria monocytogenes* Is Glycosylated with β -O-Linked N Flagellin from *Listeria monocytogenes* Is Glycosylated with. *Journal of Bacteriology*, 186(20), pp.6721–6727.
201. Schmidt C.Q., Kennedy A.T. and Tham, W.H., 2015. More than just immune evasion: Hijacking complement by *Plasmodium falciparum*. *Molecular Immunology*, 67(1), pp.71–84.

- 202.Schmidt E., Seifert M. and Baumeister R., 2007. *Caenorhabditis elegans* as a model system for Parkinson's disease. *Neurodegenerative Diseases*, 4(2–3), pp.199–217.
- 203.Schumacher R.-F. and Spinelli E., 2012. Malaria in Children. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 4(1).
- 204.Selvam C. and Jachak S.M., 2004. A cyclooxygenase (COX) inhibitory biflavonoid from the seeds of *Semecarpus anacardium*. *Journal of Ethnopharmacology*, 95(2–3), pp.209–212.
- 205.Sermwittayawong N., Singh B., Nishibuchi M., Sawangjaroen N., Vuddhakul V., 2012. Human *Plasmodium knowlesi* infection in Ranong province, southwestern border of Thailand. *Malaria Journal*, 11(Figure 1), pp.1–6.
- 206.Shafi R., Iyer S.P., Ellies L.G., O'Donnell N., Marek K.W., Chui D., Hart G.W., Marth J.D., 2000. The O-GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(11), pp.5735–5739.
- 207.Shen A, Kamp H.D., Gründling A., Higgins D.E., 2006. A bifunctional O-GlcNAc transferase governs flagellar motility through anti-repression. *Genes and Development*, 20(23), pp.3283–3295.
- 208.Showalter A.M., Keppler B., Lichtenberg J., Gu D., Welch L.R., 2010. A Bioinformatics Approach to the Identification, Classification, and Analysis of Hydroxyproline-Rich Glycoproteins. *Plant Physiology*, 153(2), pp.485–513.
- 209.Silverstone A.L., Tseng T.S., Swain S.M., Dill A., Jeong S.Y., Olszewski N.E., Sun T.P., 2007. Functional analysis of SPINDLY in gibberellin signaling in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 143(2), pp.987–1000.
- 210.Snow, C.M., Senior, A. and Gerace, L., 1987. Monoclonal Antibodies Identify a Group of Nuclear Pore Complex Glycoproteins. *The Journal of cell biology*, 104, pp.1143–1156.
- 211.Soldati, D., Dubremetz, J.F. and Lebrun, M., 2001. Microneme proteins: Structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the

- apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, 31(12), pp.1293–1302.
- 212.Song W., Henquet M.G., Mentink R.A., van Dijk A.J., Cordewener J.H., Bosch D., America A.H., van der Krol A.R., 2011. N-glycoproteomics in plants: Perspectives and challenges. *Journal of Proteomics*, 74(8), pp.1463–1474.
- 213.Splendore, A., 1908. Un nuovo parassita deconigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uomo. *Rev. Soc. Sci. Sao Paulo*, 3, pp.109–112.
- 214.Steenackers A., Olivier-Van Stichelen S., Baldini S.F., Dehennaut V., Toillon R.A., Le Bourhis X., El Yazidi-Belkoura I., Lefebvre T., 2016. Silencing the Nucleocytoplasmic O-GlcNAc Transferase Reduces Proliferation, Adhesion, and Migration of Cancer and Fetal Human Colon Cell Lines. *Frontiers in endocrinology*, 7(May), pp. 1-11.
- 215.Steiner E., Livne S., Kobinson-Katz T., Tal L., Pri-Tal O., Mosquna A., Tarkowská D., Mueller B., Tarkowski P., Weiss D., 2016. SPINDLY inhibits class I TCP proteolysis to promote sensitivity to cytokinin. *Plant Physiology*, 171, pp.1485-1494.
- 216.Steiner E., Livne S., Kobinson-Katz T., Tal L., Pri-Tal O., Mosquna A., Tarkowská D., Mueller B., Tarkowski P., Weiss D., 2012. The Arabidopsis O-Linked N-Acetylglucosamine Transferase SPINDLY Interacts with Class I TCPs to Facilitate Cytokinin Responses in Leaves and Flowers. *The Plant Cell*, 24(1), pp.96–108.
- 217.Steinfeldt T., Könen-Waisman S., Tong L., Pawlowski N., Lamkemeyer T., Sibley L.D., Hunn J.P., Howard J.C., 2010. Phosphorylation of mouse immunity-related gtpase (IRG) resistance proteins is an evasion strategy for virulent *Toxoplasma gondii*. *PLoS Biology*, 8(12) pp 1-14.
- 218.Strasser R., Altmann F., Mach L., Glössl J., Steinkellner H., 2004. Generation of Arabidopsis thaliana plants with complex N-glycans lacking β 1,2-linked xylose and core α 1,3-linked fucose. *FEBS Letters*, 561(1–3), pp.132–136.
- 219.Strasser, R., 2016. Plant protein glycosylation. *Glycobiology*, 26(9), pp.926–939.
- 220.Tan, E.P., Duncan, F.E. and Slawson, C., 2017. The sweet side of the cell cycle. *Biochemical Society Transactions*, 45(2), pp.313–322.

221. Tashima, Y. and Stanley, P., 2014. Antibodies that detect o-linked-b-D-N-Acetylglucosamine on the extracellular domain of cell surface glycoproteins. *Journal of Biological Chemistry*, 289(16), pp.11132–11142.
222. Taylor R.P., Parker G.J., Hazel M.W., Soesanto Y., Fuller W., Yazzie M.J., McClain D.A., 2008. Glucose deprivation stimulates O-GlcNAc modification of proteins through up-regulation of O-linked N-acetylglucosaminyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 283(10), pp.6050–6057.
223. Taylor R.P., Geisler T.S., Chambers J.H., McClain D.A., 2009. Up-regulation of O-GlcNAc transferase with glucose deprivation in HepG2 cells is mediated by decreased hexosamine pathway flux. *Journal of Biological Chemistry*, 284(6), pp.3425–3432.
224. Teo C.F., Ingale S., Wolfert M.A., Elsayed G.A., Nöt L.G., Chatham J.C., Wells L., Boons G.J., 2010. Glycopeptide-specific monoclonal antibodies suggest new roles for O-GlcNAc. *Nature Chemical Biology*, 6(5), pp.338–343.
225. The Arabidopsis Genome Initiative, 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408(6814), pp.796–815.
226. Toleman C., Paterson A.J., Whisenhunt T.R., Kudlow J.E., 2004. Characterization of the histone acetyltransferase (HAT) domain of a bifunctional protein with activable O-GlcNAcase and HAT activities. *Journal of Biological Chemistry*, 279(51), pp.53665–53673.
227. Torres, C.R. and Hart, G.W., 1984. Topography and Polypeptide distribution of Terminal N-Acetylglucosamine Residues on the surfaces of Intact Lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc. *The Journal of Biological Chemistry*, 259, pp.3308–3317.
228. Trapannone R., Mariappa D., Ferenbach A.T., van Aalten DM, 2016. Nucleocytoplasmic human O-GlcNAc transferase is sufficient for O-GlcNAcylation of mitochondrial proteins. *The Biochemical journal*, 473, pp.1693–1702.

229. Tryfona T., Liang H.C., Kotake T., Tsumuraya Y., Stephens E., Dupree P., 2012. Structural Characterization of Arabidopsis Leaf Arabinogalactan Polysaccharides. *Plant Physiology*, 160(2), pp.653–666.
230. Tseng T.-S., 2004. SPINDLY and GIGANTEA Interact and Act in Arabidopsis thaliana Pathways Involved in Light Responses, Flowering, and Rhythms in Cotyledon Movements. *the Plant Cell Online*, 16(6), pp.1550–1563.
231. Turner J.R., Tartakoff a M. and Greenspan N.S., 1990. Cytologic assessment of nuclear and cytoplasmic O-linked N-acetylglucosamine distribution by using anti-streptococcal monoclonal antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(15), pp.5608–5612.
232. Vallon, O. and Wollman, F.-A. (1995) Mutations Affecting O-Glycosylation in Chlamydomonas reinhardtii Cause Delayed Cell Wall Degradation and Sex-Limited Sterility, *Plant Physiol*, 108(1995), pp. 703–712.
233. Vercoutter-Edouart A.S., El Yazidi-Belkoura I., Guinez C., Baldini S., Leturcq M., Mortuaire M., Mir A.M., Steenackers A., Dehennaut V., Pierce A., Lefebvre T., 2015. Detection and identification of O -GlcNAcylated proteins by proteomic approaches. *Proteomics*, 15, pp.1039–1050.
234. Vierstra, R.D., 2009. The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(6), pp.385–397.
235. Vocadlo, D.J., 2012. O-GlcNAc processing enzymes: Catalytic mechanisms, substrate specificity, and enzyme regulation. *Current Opinion in Chemical Biology*, 16(5–6), pp.488–497.
236. Wang J., Torii M., Liu H., Hart G.W., Hu Z.Z., 2011. dbOGAP - An Integrated Bioinformatics Resource for Protein O-GlcNAcylation. *BMC Bioinformatics*, 12(1), p.1-14.
237. Wang P., Lazarus B.D., Forsythe M.E., Love D.C., Krause M.W., Hanover J.A., 2012. O-GlcNAc cycling mutants modulate proteotoxicity in Caenorhabditis elegans models of human neurodegenerative diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(43), pp.17669–17674.

238. Wang Z., Gucek M. and Hart G.W., 2008. Cross-talk between GlcNAcylation and phosphorylation: site-specific phosphorylation dynamics in response to globally elevated O-GlcNAc. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(37), pp.13793–13798.
239. Weigel D. and Mott R., 2009. The 1001 Genomes Project for *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biology*, 10(5).
240. Weiss L. and Dubey J., 2009. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. *International Journal for Parasitology*, 39(8), pp.895–901.
241. Wells L., Gao Y., Mahoney J.A., Vosseller K., Chen C., Rosen A., Hart G.W., 2002. Dynamic O-Glycosylation of Nuclear and Cytosolic Proteins: Further characterization of the nucleocytoplasmic B-N-Acetylglucosaminidase, O-GlcNAcase. *The Journal of biological chemistry*, 277(3), pp.1755–1761.
242. Wen J.-Q., 2002. Two Novel Mitogen-Activated Protein Signaling Components, OsMEK1 and OsMAP1, Are Involved in a Moderate Low-Temperature Signaling Pathway in Rice. *Plant Physiology*, 129(4), pp.1880–1891.
243. Whisenhunt T.R., Yang X., Bowe D.B., Paterson A.J., Van Tine B.A., Kudlow J.E., 2006. Disrupting the enzyme complex regulating O-GlcNAcylation blocks signaling and development. *Glycobiology*, 16(6), pp.551–563.
244. WHO, 2017. *World Malaria Report 2017*.
245. Wilson R.N. and Somerville C.R., 1995. Phenotypic Suppression of the Gibberellin-Insensitive Mutant (gai) of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 108, pp.495–502.
246. Woo C.M., Lund P.J., Huang A.C., Davis M.M., Bertozzi C.R., Pitteri S.J., 2018. Mapping and quantification of over 2,000 O-linked glycopeptides in activated human T cells with isotope-targeted glycoproteomics (IsoTaG). *Molecular and Cellular Proteomics*, 17(4), pp 764-775.
247. Wrabl J.O. and Grishin N. V, 2001. Homology between O-linked GlcNAc transferases and proteins of the glycogen phosphorylase superfamily. *Journal of molecular biology*, 314(3), pp.365–374.

248. Wu H.Y., Lu C.T., Kao H.J., Chen Y.J., Chen Y.J., Lee T.Y., 2014. Characterization and identification of protein O-GlcNAcylation sites with substrate specificity. *BMC Bioinformatics*, 15(16), pp 1-12.
249. Xing L., Liu Y., Xu S., Xiao J., Wang B., Deng H., Lu Z., Xu Y., Chong K., 2018. Arabidopsis O-GlcNAc transferase SEC activates histone methyltransferase ATX1 to regulate flowering. *The EMBO Journal*, pp. 1-12.
250. Xu S.L., Chalkley R.J., Maynard J.C., Wang W., Ni W., Jiang X., Shin K., Cheng L., Savage D., Hühmer A.F., Burlingame A.L., Wang Z.Y., 2017. Proteomic analysis reveals O-GlcNAc modification on proteins with key regulatory functions in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(8), pp.1536–1543.
251. Yakubu R.R., Silmon de Monerri N.C., Nieves E., Kim K., Weiss L.M., 2017. Comparative Monomethylarginine Proteomics Suggests that Protein Arginine Methyltransferase 1 (PRMT1) is a Significant Contributor to Arginine Monomethylation in *Toxoplasma gondii*. *Molecular and Cellular Proteomics*, 16(4), pp.567–580.
252. Yakubu, R.R., Weiss, L.M. and Silmon de Monerri, N.C., 2018. Post-translational modifications as key regulators of apicomplexan biology: insights from proteome-wide studies. *Molecular Microbiology*, 107(1), pp.1–23.
253. Yang X., Ongusaha P.P., Miles P.D., Havstad J.C., Zhang F., So W.V., Kudlow J.E., Mitchell R.H., Olefsky J.M., Field S.J., Evans R.M., 2008. Phosphoinositide signalling links O-GlcNAc transferase to insulin resistance. *Nature*, 451(7181), pp.964–969.
254. Yang X. and Qian K., 2017. Protein O-GlcNAcylation: emerging mechanisms and functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(7), pp.452–465.
255. Yasuda S., Sato T., Maekawa S., Aoyama S., Fukao Y., Yamaguchi J., 2014. Phosphorylation of arabidopsis ubiquitin ligase ATL31 is critical for plant carbon/nitrogen nutrient balance response and controls the stability of 14-3-3 proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 289(22), pp.15179–15193.

256. Yuzwa S.A., Macauley M.S., Heinonen J.E., Shan X., Dennis R.J., He Y., Whitworth G.E., Stubbs K.A., McEachern E.J., Davies GJ, Vocadlo DJ., 2008. A potent mechanism-inspired O-GlcNAcase inhibitor that blocks phosphorylation of tau in vivo. *Nature Chemical Biology*, 4(8), pp.483–490.
257. Zachara N., Akimoto Y. and Hart G.W., 2017. Chapter 19. The O-GlcNAc Modification. eds. *Essentials of Glycobiology (Internet)*. NY: Cold Spring Harbor.
258. Zachara N.E., O'Donnell N., Cheung W.D., Mercer J.J., Marth J.D., Hart G.W., 2004. Dynamic O-GlcNAc modification of nucleocytoplasmic proteins in response to stress: A survival response of mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279(29), pp.30133–30142.
259. Zachara N.E., Vosseller K. and Hart G.W., 2011. Detection and Analysis of Proteins Modified by O-Linked N -Acetylglucosamine. In *National Institutes of Health*. pp. 1–38.
260. Zeeshan M., Kaur I., Joy J., Saini E., Paul G., Kaushik A., Dabral S., Mohammed A., Gupta D., Malhotra P., 2017. Proteomic Identification and Analysis of Arginine-Methylated Proteins of Plasmodium falciparum at Asexual Blood Stages. *J. proteome Res*, 16(2), pp.368–383.
261. Zentella R., Hu J., Hsieh W.P., Matsumoto P.A., Dawdy A., Barnhill B., Oldenhof H., Hartweck L.M, Maitra S., Thomas S.G, Cockrell S., Boyce M., Shabanowitz J., Hunt D.F., Olszewski N.E., Sun T.P., 2016. O-GlcNAcylation of master growth repressor DELLA by SECRET AGENT modulates multiple signaling pathways in Arabidopsis. *Genes and Development*, 30(2), pp.164–176.
262. Zentella R., Sui N., Barnhill B., Hsieh W.P., Hu J., Shabanowitz J., Boyce M., Olszewski N.E., Zhou P., Hunt D.F., Sun T.P., 2017. The Arabidopsis O-fucosyltransferase SPINDLY activates nuclear growth repressor della. *Nature Chemical Biology*, 13(5), pp.479–485.
263. Zhao X., Ning Q., Chai H., Ai M., Ma Z., 2015. PGlcS: Prediction of protein O-GlcNAcylation sites with multiple features and analysis. *Journal of Theoretical Biology*, 380, pp.524–529.

Annexes

Annexe 1

Review Article

OGT: a short overview of an enzyme standing out from usual glycosyltransferases

Moyira Aquino-Gil^{1,2,3}, Annick Pierce¹, Yobana Perez-Cervera³, Edgar Zenteno⁴ and Tony Lefebvre¹

¹CNRS, UMR 8576, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UGSF), Université Lille, 59000 Lille, France; ²Instituto Tecnológico de Oaxaca, Tecnológico Nacional de México, Oaxaca, Mexico; ³Centro de Investigación UNAM-UABJO, Facultad de Odontología, Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca, Oaxaca, Mexico; and ⁴Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal, Mexico

Correspondence: Moyira Aquino-Gil (moaging@gmail.com)

O-GlcNAcylation is a highly dynamic post-translational modification whose level depends on nutrient status. Only two enzymes regulate O-GlcNAcylation cycling, the glycosyltransferase OGT (O-GlcNAc transferase) and the glycoside hydrolase OGA (O-GlcNAcase), that add and remove the GlcNAc moiety to and from acceptor proteins, respectively. During the last 30 years, OGT has emerged as a master regulator of cell life with O-GlcNAcylation being found in viruses, bacteria, insects, protists and metazoans. The study of OGT in different biological systems opens new perspectives for understanding this enzyme in many kingdoms of life. In this review, we summarize recent and older findings regarding the distribution of OGT in living organisms.

O-GlcNAcylation at a glance

In 1984, while studying the distribution of terminal *N*-acetylglucosamine residues on the surface of lymphocytes, Hart and Torres brought to light a new form of glycosylation, *O*-linked β -*N*-acetylglucosaminylation now called O-GlcNAcylation [1]. O-GlcNAcylation involves the transfer of a single *N*-acetylglucosamine moiety onto serine and threonine residues of proteins confined within the cytoplasm, nucleus and mitochondria [2]. This modification can compete with phosphorylation for the same or neighboring sites [3]. However, contrary to phosphorylation which is managed by a myriad of kinases and phosphatases [4], only two enzymes control the dynamism of O-GlcNAc. *O*-linked β -*N*-acetyl-D-glucosaminyltransferase, OGT (O-GlcNAc transferase; GT41 in CAZy classification), adds the sugar from the nutrient sensor/high-energy donor UDP-GlcNAc onto target proteins, and *O*-linked β -*N*-acetyl-D-glucosaminidase, OGA (GH84 in CAZy classification), hydrolyses it [5] (Figure 1). Despite that how O-GlcNAcylation fulfills its roles is not completely understood, many studies described its implication in nutrient sensing, response to stress and environmental cues. More precisely, at the molecular level, O-GlcNAcylation interferes with transcription, protein synthesis, proteasomal degradation, cell signaling or cytoskeleton organization.

OGT's main structural characteristics

OGT is a Leloir-type glycosyltransferase [6]. Leloir enzymes use nucleotide-based molecules as substrates, and thus nucleotide sugars (high-energy donors) allow glycosylation processes to be carried out. OGT is an inverting enzyme that adopts a GT-B fold [7], a structure made of two Rossman-type domains in which the UDP-GlcNAc-binding region is located at the cleft between the two domains. Also, OGT is homologous to the glycogen phosphorylase/glycosyltransferase superfamily [8].

Human OGT is encoded by a unique gene located on chromosome X at the locus Xq13.1 in close proximity to the X-inactivation center [9–12]. Three isoforms of OGT are generated by alternative splicing: a 110 kDa full-length nucleocytoplasmic form (ncOGT), a 75 kDa short form (sOGT) and a 103 kDa mitochondrial form (mOGT) (Figure 2) [10,13]. mOGT harbors a mitochondrial targeting sequence (MTS), although a recent report argued that this isoform is only expressed in some primates

Received: 8 November 2016
Revised: 10 January 2017
Accepted: 30 January 2017

Version of Record published:
13 April 2017

isoforms' C-terminal region contains the glycosyltransferase catalytic activity [15,16]. This second part of OGT is divided into two domains, catalytic domain I (CDI) and CDII, separated by the intervening domain (Int-D) of unknown function (Figure 2). CDI carries the catalytic activity of OGT and CDII binds UDP-GlcNAc [8,17].

Of note, extracellular O-GlcNAcylation was characterized a few years ago [18]. This novel form of glycosylation is catalyzed by EOGT (EGF repeat-specific OGT) that resides in the endoplasmic reticulum. EOGT was first observed in *Drosophila* [18] and further studies indicated that it is also found in pig (*Sus scrofa*, [19]). EOGT does not show any obvious homology with OGT; in contrast, it displays a 19.4% identity with the *Arabidopsis thaliana* β 2-xylosyltransferase.

Inhibiting OGT: a major challenge

As with all enzymes, the use of potent and selective OGT inhibitors would be helpful in understanding its relevance in many biological systems [20,21]. While unspecific, the diabetogenic agent alloxan was the first reported OGT inhibitor [22]. This uracil analog was tested in β -cells that exhibit high amounts of OGT, and it was suggested that it directly competes with UDP-GlcNAc in the binding domain of OGT. Its lack of specificity compels scientists to avoid its use. Latter, the synthetic carbohydrate precursor 5SGlcNAc and its cell-permeant derivative Ac₄-5SGlcNAc were shown to dramatically decrease O-GlcNAc levels [23]. When in cells, these compounds generate the very poor OGT substrate UDP-5SGlcNAc, through the GlcNAc salvage pathway (Figure 2). More recently OSMI-1 was described as a cell-permeant small-molecule inhibitor of OGT [24]. According to the authors, OSMI-1 does not affect complex glycosylation reducing target promiscuity of the inhibitor contrary to Ac₄-5SGlcNAc that, in their hands, seemed to affect mucin-type O-glycans and other cell surface glycans. Finally, the bisubstrate inhibitors goblin1 and goblin2 that mimic an acceptor peptide coupled to UDP were designed [25]. However, the lack of cell permeability of these molecules limits their use in biological systems.

OGT: a pivotal actor of basic biological properties

OGT is crucial to embryogenesis of mammalian cells [9]; on the contrary, its loss has no dramatic effect on lethality in *Caenorhabditis elegans* [26]. The plant model *A. thaliana* expresses two OGTs, SPY (SPINDLY) and SEC (SECRET AGENT) [27]. The *sec/spy* double mutant showed embryo-lethal phenotype, whereas the single *sec* mutant did not show particular phenotype [27].

In 1984, the same year of the discovery of O-GlcNAc, Ingham reported that the *Drosophila melanogaster*'s homeotic gene *sxc* (*super sex combs*) was necessary during embryogenesis and cell development [28]. *Sxc* is part of the Polycomb group gene (PcG); of which, the Polycomb protein Polyhomeotic is O-GlcNAcylated [29]. Moreover, it was surprisingly shown that *sxc* encodes OGT. This suggested that O-GlcNAcylation by *Sxc*/OGT plays an essential role in PcG repression [30]. Silencing of OGT decreases proliferation, adhesion and migration of normal and cancer human colon cell lines [31]. OGT is necessary for cell cycle entry and progression since pharmacological blockade or silencing of OGT prevents the synthesis of cyclin D1 in an unknown manner, and it delays activation of PI3K and MAPK pathways [32]. OGT localizes preferentially in the cytosol and the nucleus, but in response to insulin it is recruited to the plasma membrane where it interacts with PIP3 (phosphatidyl-inositol-3-phosphate), a product of PI3K, via the PPO (PIP-binding activity of OGT) domain located in the carboxyl-terminal part of the protein (Figure 2) [33]. Moreover, following hormonal stimulation, OGT is resident in lipid rafts [34]. It is therefore proposed that the physical interaction of OGT with rafts takes a major part in the control of the PI3K signaling pathway.

OGT is widely expressed in the living world

SPY and its paralog SEC contain 11 and 14 TPRs, respectively, the two regions forming the CD and the PPO domain [35]. SPY was previously recognized a decade ago as a negative regulator of the gibberellin (GA, tetracyclic diterpenoid phytohormones that control growth, development germination and flowering) signaling pathway [36]. Plant OGTs seem to interfere with diverse processes including development, circadian rhythm, intracellular transport and response to hormones [35]. Analysis of *spy* mutants indicated that TPRs 6, 8 and 9 and the C-terminal CD of SPY are necessary for the GA signaling [37]. SPY seems to suppress the GA response by enhancing the activity of RGA (Repressor of *ga1-3*) [38]. RGA is a member of the DELLA family of transcription factors acting as growth repressors and that consists of five members: GAI (GA-insensitive) which with RGA blocks stem elongation and floral induction, RGL1 (RGA-like 1), RGL2 that inhibits seed germination and RGL3. All DELLA proteins repress GA signaling in *A. thaliana*. In return, GA derepresses their activity by promoting proteolysis of DELLA proteins through an E3 ubiquitin ligase SCF^{SLY1}-dependent

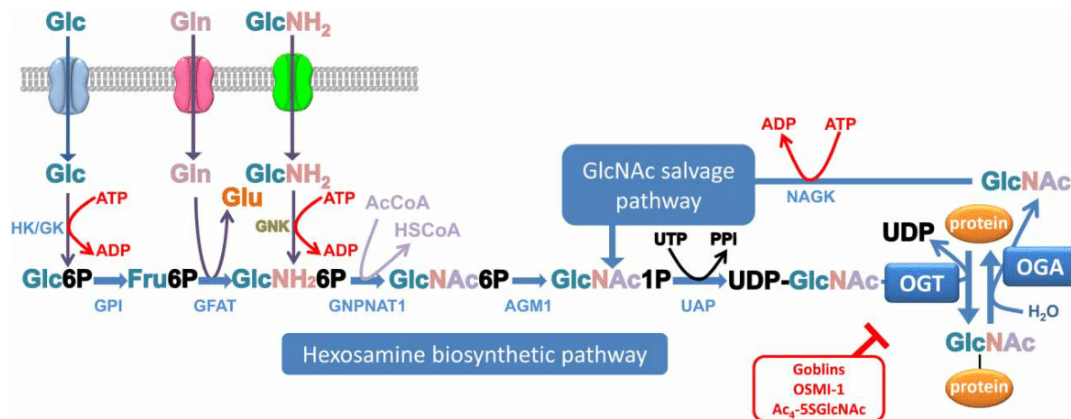


Figure 1. The O-GlcNAcylation cycling.

UDP-GlcNAc, the OGT substrate, is produced through the hexosamine biosynthetic pathway or the GlcNAc salvage pathway. UDP-GlcNAc is at the crossroad of metabolic pathways making the nucleotide sugar — a nutritional sensor. Known OGT inhibitors are indicated. OGT and OGA are responsible for the O-GlcNAcylation cycling. HK/GK, hexokinase/glucokinase; GPI, glucose-6-phosphate isomerase; GFAT, glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase; GNPNAT1, GlcNH₂-6-phosphate *N*-acetyltransferase; AGM1, phospho-GlcNAc mutase; UAP, UDP-GlcNAc pyrophosphorylase; NAGK, GlcNAc kinase; GNK, GlcNH₂ kinase; OGT, O-GlcNAc transferase; OGA, O-GlcNAcase.

and not necessary for O-GlcNAcylation of mitochondrial proteins [14]. Along with MTS, the three isoforms differ one from another by the number of tetratricopeptide repeats (TPRs forming a right-handed superhelix); the N-terminal part comprises, respectively, 13, 9 and 2.5 TPRs for ncOGT, mOGT and sOGT. All three

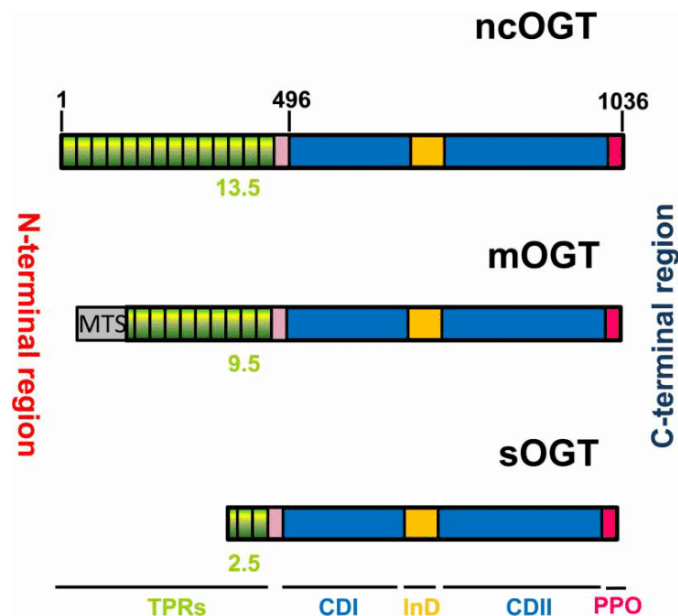


Figure 2. OGT isoforms in animal cells.

Three isoforms for OGT have been described in animal cells: ncOGT for nuclear and cytoplasmic OGT, sOGT for short OGT and mOGT for mitochondrial OGT which displays, respectively, 13.5, 9.5 and 2.5 TPRs (green), two catalytic domains I and II (blue), an InD of unknown function (orange) and a PPO (pink) domain that allows OGT to bind to phosphoinositides. TPRs, tetratricopeptide repeats; CD, catalytic domain; InD, intervening domain; PPO, PIP-binding activity of OGT; MTS, mitochondrial targeting sequence.

mechanism. It is suggested that SPY is a repressor of GA signaling by modifying at least RGA or other DELLA proteins. More recently, a study showed that DELLA proteins are O-GlcNAcylated by SEC [39]. Specifically, glycosylation of RGA inhibits its interaction with BZR1, PIF3, PIF4 and JAZ1 that intervene in light, jasmonate and brassinosteroid signaling [39].

Listeria monocytogenes is the first bacteria in which an O-GlcNAc-modified protein was identified [40]. This protein is the globular flagellin, one of the principal components of flagella, crucial for colonization and virulence. Latter, GmaR was identified as the glycosyltransferase capable to O-GlcNAcylate flagellin [41]. GmaR is also an antirepressor involved in the repression of the transcription of flagellar motility genes. Therefore, GmaR is a bifunctional component that permits expression of its target genes and thereafter their modification by O-GlcNAc [41].

OGT (*TtOGT*) and OGA (*TtOGA*) orthologs were uncovered in the thermophilic eubacterium *Thermobaculum terrenum* [42]. Surprisingly, and contrary to the OGA ortholog, no *in vitro* activity was found for the bacterial OGT. On the other hand, the OGT inhibitor Ac₄-5SGlcNAc [23] showed a bacteriostatic activity on *T. terrenum* but not on *Bacillus subtilis*. The authors concluded that despite the lack of activity measured for *TtOGT*, the O-GlcNAc cycling is rather specific to *T. terrenum* than an overall mechanism displayed by the bacteria kingdom.

OGTs were characterized at the molecular level for different protists in 2009 [43]. The authors predicted putative *ogt* genes of *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, *Toxoplasma gondii* and *Dictyostelium discoideum*, the presence of TPRs and of the SPY catalytic domain. In contrast, OGA homologs were not found. A second report focused more particularly on O-GlcNAcylation processes in *T. gondii* and *Plasmodium falciparum* [44]. The observations comforted those from Banerjee et al. [43], while the expression of OGT in *P. falciparum* remains elusive despite O-GlcNAcylation being found in the Apicomplexa.

Many structural proteins from viruses were described to be modified by O-GlcNAc, as shown for the first time for the serotype-2 adenovirus fiber [45]. Surprisingly, among the 85 proteins encoded by the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, 18 were shown to be O-GlcNAcylated [46]. Viruses do not express their own OGT, and thus, viral proteins are modified by host glycosyltransferase. For example, in plant, the capsid protein of the Plum pox virus bears O-GlcNAc residues in the N-terminus [47] added by SEC [48].

Proteolysis of host cell factor-1: the unexpected activity of OGT

In 2011, Capotosti et al. [49] showed that, in addition to managing GlcNAc transfer onto target proteins, OGT was endowed of proteolytic cleavage properties towards the cell cycle regulator HCF-1 (host cell factor-1). HCF-1 cleavage in two N- and C-termini fragments and its concomitant GlcNAcylation are necessary for G1 phase entry and exit, and M-phase progresses [50]. HCF-1 contains stretches of 20–26 amino acids located in the central part of the protein and necessary for proteolytic cleavage and glycosylation by OGT [15,51]. OGT transfers a GlcNAc residue onto a glutamate to form a first intermediate GlcNAc-Glu via a glycosyl-ester bond, the GlcNAc moiety is released, a pyroglutamate is generated (intermediate 2) and then the cleavage of HCF-1 occurs [52].

Abbreviations

CD, catalytic domain; EOGT, EGF repeat-specific OGT; GA, gibberellin; HCF-1, host cell factor-1; mOGT, mitochondrial form of OGT; ncOGT, nucleocytoplasmic form of OGT; OGA, O-GlcNAcase; OGT, O-GlcNAc transferase; PcG, Polycomb group gene; PPO, PIP-binding activity of OGT; RGA, repressor of *ga1-3*; SEC, SECRET AGENT; sOGT, short form of OGT; SPY, SPINDLY; *sxc*, *super sex combs*; TPRs, tetratricopeptide repeats.

Acknowledgements

The authors thank the University of Lille and the 'Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)' for their financial support. The authors are also grateful to FRABio FR 3688 and to Mr James Biwi, a native English speaker.

Competing Interests

M.A.-G. is a recipient of a fellowship from CONACyT.

References

- Torres, C.R. and Hart, G.W. (1984) Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **259**, 3308–3317 PMID:6421821
- Lefebvre, T. and Issad, T. (2015) *30 Years old: O-GlcNAc Reaches Age of Reason — Regulation of Cell Signaling and Metabolism by O-GlcNAcylation*, 1st edn, Frontiers in Endocrinology, France
- Hart, G.W. (1997) Dynamic O-linked glycosylation of nuclear and cytoskeletal proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 315–335 doi:10.1146/annurev.biochem.66.1.315
- Wang, Z., Gucek, M. and Hart, G.W. (2008) Cross-talk between GlcNAcylation and phosphorylation: site-specific phosphorylation dynamics in response to globally elevated O-GlcNAc. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 13793–13798 doi:10.1073/pnas.0806216105
- Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Freeze, H.H., Stanley, P., Bertozzi, C.R. et al. (2009) *Essentials of Glycobiology*, 2nd edn (Hart, G.W. and Etzler, M.E. eds), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Wang, D. and Huang, J. (1950) Isolation of the enzyme of the galactose phosphate-glucose phosphate transformation. *J. Biol. Chem.* **184**, 333–350 PMID:15422002
- Clarke, A.J., Hurtado-Guerrero, R., Pathak, S., Schüttelkopf, A.W., Borodkin, V., Shepherd, S.M. et al. (2008) Structural insights into mechanism and specificity of O-GlcNAc transferase. *EMBO J.* **27**, 2780–2788 doi:10.1038/emboj.2008.186
- Wrabl, J.O. and Grishin, N.V. (2001) Homology between O-linked GlcNAc transferases and proteins of the glycogen phosphorylase superfamily. *J. Mol. Biol.* **314**, 365–374 doi:10.1006/jmbi.2001.5151
- Shafi, R., Iyer, S.P., Ellies, L.G., O'Donnell, N., Marek, K.W., Chui, D. et al. (2000) The O-GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 5735–5739 doi:10.1073/pnas.100471497
- Hanover, J.A., Yu, S., Lubas, W.B., Shin, S.-H., Ragano-Caracciola, M., Kochran, J. et al. (2003) Mitochondrial and nucleocytoplasmic isoforms of O-linked GlcNAc transferase encoded by a single mammalian gene. *Arch. Biochem. Biophys.* **409**, 287–297 doi:10.1016/S0003-9861(02)00578-7
- Merchant, S.S., Prochnik, S.E., Vallon, O., Harris, E.H., Karpowicz, J., Witman, G.B. et al. (2010) The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* **318**, 245–250 doi:10.1126/science.1143609
- Olivier-Van Stichelen, S., Abramowitz, L.K. and Hanover, J.A. (2014) X marks the spot: does it matter that O-GlcNAc transferase is an X-linked gene? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **453**, 201–207 doi:10.1016/j.bbrc.2014.06.068
- Levine, Z.G. and Walker, S. (2016) The biochemistry of O-GlcNAc transferase: which functions make it essential in mammalian cells? *Annu. Rev. Biochem.* **85**, 631–657 doi:10.1146/annurev-biochem-060713-035344
- Trapannone, R., Mariappa, D., Ferenbach, A.T. and van Aalten, D.M.F. (2016) Nucleocytoplasmic human O-GlcNAc transferase is sufficient for O-GlcNAcylation of mitochondrial proteins. *Biochem. J.* **473**, 1693–1702 doi:10.1042/BCJ20160092
- Janetzko, J. and Walker, S. (2014) The making of a sweet modification: structure and function of O-GlcNAc transferase. *J. Biol. Chem.* **289**, 34424–34432 doi:10.1074/jbc.R114.604405
- Vocadlo, D.J. (2012) O-GlcNAc processing enzymes: catalytic mechanisms, substrate specificity, and enzyme regulation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **16**, 488–497 doi:10.1016/j.cbpa.2012.10.021
- Roos, M.D. and Hanover, J.A. (2000) Structure of O-linked GlcNAc transferase: mediator of glycan-dependent signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **271**, 275–280 doi:10.1006/bbrc.2000.2600
- Sakaidani, Y., Nomura, T., Matsuura, A., Ito, M., Suzuki, E., Murakami, K. et al. (2011) O-linked-N-acetylglucosamine on extracellular protein domains mediates epithelial cell-matrix interactions. *Nat. Commun.* **2**, 583 doi:10.1038/ncomms1591
- Nagnan-Le Meillour, P., Vercoutter-Edouart, A.-S., Hilliou, F., Le Danvic, C. and Lévy, F. (2014) Proteomic analysis of pig (*Sus scrofa*) olfactory soluble proteome reveals O-linked-N-acetylglucosaminylation of secreted odorant-binding protein. *Front. Endocrinol.* **5**, 202 doi:10.3389/fendo.2014.00202
- Gloster, T.M. and Vocadlo, D.J. (2010) Mechanism, structure, and inhibition of O-GlcNAc processing enzymes. *Curr. Signal Transduct. Ther.* **5**, 74–91 doi:10.2174/157436210790226537
- Gross, B.J., Kraybill, B.C. and Walker, S. (2005) Discovery of O-GlcNAc transferase inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 14588–14589 doi:10.1021/ja0555217
- Konrad, R.J., Zhang, F., Hale, J.E., Knierman, M.D., Becker, G.W. and Kudlow, J.E. (2002) Alloxan is an inhibitor of the enzyme O-linked N-acetylglucosamine transferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**, 207–212 doi:10.1016/S0006-291X(02)00200-0
- Gloster, T.M., Zandberg, W.F., Heinonen, J.E., Shen, D.L., Deng, L. and Vocadlo, D.J. (2011) Hijacking a biosynthetic pathway yields a glycosyltransferase inhibitor within cells. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 174–181 doi:10.1038/nchembio.520
- Ortiz-Meoz, R.F., Jiang, J., Lazarus, M.B., Orman, M., Janetzko, J., Fan, C. et al. (2015) A small molecule that inhibits OGT activity in cells. *ACS Chem. Biol.* **10**, 1392–1397 doi:10.1021/acschembio.5b00004
- Borodkin, V.S., Schimpl, M., Gundogdu, M., Rafie, K., Dorfmueller, H.C., Robinson, D.A. et al. (2014) Bisubstrate UDP-peptide conjugates as human O-GlcNAc transferase inhibitors. *Biochem. J.* **457**, 497–502 doi:10.1042/BJ20131272
- Bond, M.R. and Hanover, J.A. (2015) A little sugar goes a long way: the cell biology of O-GlcNAc. *J. Cell Biol.* **208**, 869–880 doi:10.1083/jcb.201501101
- Hartweck, L.M., Scott, C.L. and Olszewski, N.E. (2002) Two O-linked N-acetylglucosamine transferase genes of *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. Have overlapping functions necessary for gamete and seed development. *Genetics* **161**, 1279–1291 PMID:12136030
- Ingham, P.W. (1984) A gene that regulates the bithorax complex differentially in larval and adult cells of *Drosophila*. *Cell* **37**, 815–823 doi:10.1016/0092-8674(84)90416-1
- Gambetta, M.C. and Müller, J. (2014) O-GlcNAcylation prevents aggregation of the polycomb group repressor polyhomeotic. *Dev. Cell* **31**, 629–639 doi:10.1016/j.devcel.2014.10.020
- Gambetta, M.C., Oktaba, K., and Müller, J. (2009) Essential role of the glycosyltransferase Sxc/Ogt in polycomb repression. *Science* **325**, 93–96 doi:10.1126/science.1169727
- Steenackers, A., Olivier-Van Stichelen, S., Baldini, S.F., Dehennaut, V., Toillon, R.-A., Le Bourhis, X. et al. (2016) Silencing the nucleocytoplasmic O-GlcNAc transferase reduces proliferation, adhesion, and migration of cancer and fetal human colon cell lines. *Front. Endocrinol.* **7**, 46 doi:10.3389/fendo.2016.00046

- 32 Olivier-Van Stichelen, S., Drougat, L., Dehennaut, V., El Yazidi-Belkoura, I., Guinez, C., Mir, A.-M. et al. (2012) Serum-stimulated cell cycle entry promotes ncOGT synthesis required for cyclin D expression. *Oncogenesis* **1**, 1–6 doi:10.1038/oncsis.2012.36
- 33 Yang, X., Ongusaha, P.P., Miles, P.D., Havstad, J.C., Zhang, F., So, W.V. et al. (2008) Phosphoinositide signalling links O-GlcNAc transferase to insulin resistance. *Nature* **451**, 964–969 doi:10.1038/nature06668
- 34 Perez-Cervera, Y., Dehennaut, V., Aquino Gil, M., Guedri, K., Solórzano Mata, C.J., Olivier-Van Stichelen, S. et al. (2013) Insulin signaling controls the expression of O-GlcNAc transferase and its interaction with lipid microdomains. *FASEB J.* **27**, 3478–3486 doi:10.1096/fj.12-217984
- 35 Olszewski, N.E., West, C.M., Sassi, S.O., and Hartweck, L.M. (2010) O-GlcNAc protein modification in plants: evolution and function. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **1800**, 49–56 doi:10.1016/j.bbagen.2009.11.016
- 36 Jacobsen, S.E. and Olszewski, N.E. (1993) Mutations at the SPINDLY locus of *Arabidopsis* alter gibberellin signal transduction. *Plant Cell* **5**, 887–896 doi:10.1105/tpc.5.8.887
- 37 Silverstone, A.L., Tseng, T.-S., Swain, S.M., Dill, A., Jeong, S.Y., Olszewski, N.E. et al. (2007) Functional analysis of SPINDLY in gibberellin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **143**, 987–1000 doi:10.1104/pp.106.091025
- 38 Maymon, I., Greenboim-Wainberg, Y., Sagiv, S., Kieber, J.J., Moshellon, M., Olszewski, N. et al. (2009) Cytosolic activity of SPINDLY implies the existence of a DELLA-independent gibberellin-response pathway. *Plant J.* **58**, 979–988 doi:10.1111/j.1365-3113.2009.03840.x
- 39 Zentella, R., Hu, J., Hsieh, W., Matsumoto, P.A., Dawdy, A., Barnhill, B. et al. (2016) O-GlcNAcylation of master growth repressor DELLA by SECRET AGENT modulates multiple signaling pathways in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* **30**, 164–176 doi:10.1101/gad.270587.115
- 40 Schirm, M., Kalmokoff, M., Aubry, A., Thibault, P., Sandoz, M. and Logan, S.M. (2004) Flagellin from *Listeria monocytogenes* is glycosylated with β -O-linked N-flagellin from *Listeria monocytogenes* is glycosylated with. *J. Bacteriol.* **186**, 6721–6727 doi:10.1128/JB.186.20.6721-6727.2004
- 41 Shen, A., Kamp, H.D., Gründling, A. and Higgins, D.E. (2006) A bifunctional O-GlcNAc transferase governs flagellar motility through anti-repression. *Genes Dev.* **20**, 3283–3295 doi:10.1101/gad.1492606
- 42 Ostrowski, A., Gundogdu, M., Ferenbach, A.T., Lebedev, A.A. and van Aalten, D.M.F. (2015) Evidence for a functional O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) system in the *Thermophilic bacterium Thermobaculum terrenum*. *J. Biol. Chem.* **290**, 30291–30305 doi:10.1074/jbc.M115.689596
- 43 Banerjee, S., Robbins, P.W. and Samuelson, J. (2009) Molecular characterization of nucleocytosolic O-GlcNAc transferases of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum*. *Glycobiology* **19**, 331–336 doi:10.1093/glycob/cwn107
- 44 Perez-Cervera, Y., Harichaux, G., Schmidt, J., Debierre-Grockiego, F., Dehennaut, V., Bieker, U. et al. (2011) Direct evidence of O-GlcNAcylation in the apicomplexan *Toxoplasma gondii*: a biochemical and bioinformatic study. *Amino Acids* **40**, 847–856 doi:10.1007/s00726-010-0702-4
- 45 Caillat-Boudin, M.-L., Strecker, G. and Michalski, J.-C. (1989) O-linked GlcNAc in serotype-2 adenovirus fibre. *Eur. J. Biochem.* **184**, 205–211 doi:10.1111/j.1432-1033.1989.tb15008.x
- 46 Jochmann, R., Pfannstiel, J., Chudasama, P., Kuhn, E., Konrad, A. and Stürzl, M. (2013) O-GlcNAc transferase inhibits KSHV propagation and modifies replication relevant viral proteins as detected by systematic O-GlcNAcylation analysis. *Glycobiology* **23**, 1114–1130 doi:10.1093/glycob/cwt028
- 47 Fernandez-Fernandez, R.M., Camafeita, E., Bonay, P., Meacute, E., Albar, J.P. and Garcia, J.A. (2002) The capsid protein of a plant single-stranded RNA virus is modified by O-linked N-acetylglucosamine. *J. Biol. Chem.* **277**, 135–140 doi:10.1074/jbc.M106883200
- 48 Chen, D., Juárez, S., Hartweck, L., Alamillo, J.M., Simón-Mateo, C., Pérez, J.J. et al. (2005) Identification of secret agent as the O-GlcNAc transferase that participates in Plum pox virus infection. *J. Virol.* **79**, 9381–9387 doi:10.1128/JVI.79.15.9381-9387.2005
- 49 Capotosti, F., Guernier, S., Lammers, F., Waridel, P., Cai, Y., Jin, J. et al. (2011) O-GlcNAc transferase catalyzes site-specific proteolysis of HCF-1. *Cell* **144**, 376–388 doi:10.1016/j.cell.2010.12.030
- 50 Kötzler, M.P. and Withers, S.G. (2016) Proteolytic cleavage driven by glycosylation. *J. Biol. Chem.* **291**, 429–434 doi:10.1074/jbc.C115.698696
- 51 Kapuria, V., Röhrig, U.F., Bhuiyan, T., Borodkin, V.S., van Aalten, D.M.F., Zoete, V. et al. (2016) Proteolysis of HCF-1 by Ser/Thr glycosylation-incompetent O-GlcNAc transferase:UDP-GlcNAc complexes. *Genes Dev.* **30**, 960–972 doi:10.1101/gad.275925.115
- 52 Janetzko, J., Trauger, S.A., Lazarus, M.B. and Walker, S. (2016) How the glycosyltransferase OGT catalyzes amide bond cleavage. *Nat. Chem. Biol.* **12**, 899–901 doi:10.1038/nchembio.2173

Annexe 2

RESEARCH

Open Access



Identification of O-GlcNAcylated proteins in *Plasmodium falciparum*

Mattis Kupferschmid¹, Moyira Osny Aquino-Gil^{2,3,4}, Hosam Shams-Eldin¹, Jörg Schmidt¹, Nao Yamakawa², Frédéric Krzewinski², Ralph T. Schwarz^{1,2†} and Tony Lefebvre^{2*†}

Abstract

Background: Post-translational modifications (PTMs) constitute a huge group of chemical modifications increasing the complexity of the proteomes of living beings. PTMs have been discussed as potential anti-malarial drug targets due to their involvement in many cell processes. O-GlcNAcylation is a widespread PTM found in different organisms including *Plasmodium falciparum*. The aim of this study was to identify O-GlcNAcylated proteins of *P. falciparum*, to learn more about the modification process and to understand its eventual functions in the Apicomplexans.

Methods: The *P. falciparum* strain 3D7 was amplified in erythrocytes and purified. The proteome was checked for O-GlcNAcylation using different methods. The level of UDP-GlcNAc, the donor of the sugar moiety for O-GlcNAcylation processes, was measured using high-pH anion exchange chromatography. O-GlcNAcylated proteins were enriched and purified utilizing either click chemistry labelling or adsorption on succinyl-wheat germ agglutinin beads. Proteins were then identified by mass-spectrometry (nano-LC MS/MS).

Results: While low when compared to MRC5 control cells, *P. falciparum* disposes of its own pool of UDP-GlcNAc. By using proteomics methods, 13 O-GlcNAcylated proteins were unambiguously identified (11 by click-chemistry and 6 by SWGA-beads enrichment; 4 being identified by the 2 approaches) in late trophozoites. These proteins are all part of pathways, functions and structures important for the parasite survival. By probing clicked-proteins with specific antibodies, Hsp70 and α -tubulin were identified as *P. falciparum* O-GlcNAc-bearing proteins.

Conclusions: This study is the first report on the identity of *P. falciparum* O-GlcNAcylated proteins. While the parasite O-GlcNAcome seems close to those of other species, the structural differences exhibited by the proteomes provides a glimpse of innovative therapeutic paths to fight malaria. Blocking biosynthesis of UDP-GlcNAc in the parasites is another promising option to reduce *Plasmodium* life cycle.

Keywords: *Plasmodium falciparum*, O-GlcNAcylation, Proteomics, α -Tubulin, Hsp70, Glycolysis

Background

The estimated malaria death rate declined by over 50% during the last 15 years. This has been the result of a considerable international effort to globally provide potent anti-malarial drugs, insecticide-impregnated bed nets and indoor residual spraying. However, malaria still caused over 400,000 deaths in 2015 worldwide, most of them being young children. History taught that if

alternatives in malaria treatment are lacking the tide of success in eradication may turn quickly. The 1955 WHO-Global Eradication of Malaria Programme was declared to have failed its aims after 14 years. The emergence of resistances against chloroquine and DDT, considered at this time as the two pillars in the fight against malaria, led to the end of the progress and even in some regions to a severe relapse [1, 2].

Indeed the emergence of resistance against artemisinins which are part of the current first-line treatment [3], and of insecticide-resistant *Anopheles* mosquitoes [4], is threatening the current progress. Hence it remains important to push forward the search for

*Correspondence: tony.lefebvre@univ-lille1.fr

[†]Ralph T. Schwarz and Tony Lefebvre contributed equally to this work

² Univ. Lille, CNRS, UMR 8576, UGSF, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, 59000 Lille, France

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2017. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

alternative targets of anti-malarial therapies. Therefore, more information about basic regulatory functions of the parasite's life cycle is needed. Post translational modifications (PTMs) form a huge group of regulators that are not encoded by DNA and for some that control cell functions. A group of PTMs expressed by *Plasmodium* including phosphorylation and acetylation but that neglected glycosylation has been described and discussed as potential drug targets [5]. *O*-GlcNAcylation that was discovered by Hart's team in the early 80s [6], is a PTM involved in many different cell processes. The authors undertook the radiolabelling of GlcNAc residues exhibited by surface glycoproteins and were amazed when they found that in fact a majority of the amino sugar moieties occur inside the cell [7]. This was in contrast to the dogma claiming that glycosylation only occurs on cell membranes or inside organelles. The authors further found that this uncommon form of glycosylation, unlike to the complex branched sugar-trees of *N*-glycosylation, consisted of one single GlcNAc residue directly linked through a β -linkage on the hydroxyl group of serine or threonine [5]. In ensuing experiences it was shown that contrary to other known forms of glycosylation, *O*-GlcNAcylation is a dynamic modification [8]. It cycles on and off proteins thanks to a pair of enzymes: the *O*-GlcNAc transferase (OGT) adds the monosaccharide [9] and the *O*-GlcNAcase (OGA) catalyzes its hydrolysis [10]. Given these features differences *O*-GlcNAcylation endows some functions that are distinct from complex glycosylations such as transcriptional processes, protein synthesis or proteasomal degradation. *O*-GlcNAcylation is akin to phosphorylation with which it can compete at the same or at neighbouring amino acid residues [11]. Deregulations in *O*-GlcNAcylation processes are found in different diseases including metabolic disorders [12], as well as neoplastic [13] and neurodegenerative diseases [14].

OGTs are expressed in mammals [9], insects [15], fishes [16] and worms [17] as well as in plants [18], bacteria [19], viruses [20] and protists [21]. The latter has been a rather neglected field with few more than a handful of publications considering *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum* and *Plasmodium falciparum* [21–23]. In *P. falciparum*, *O*-GlcNAcylation was first reported by Dieckman-Schuppert et al. [22] in 1993 by using the same approach than Torres and Hart [7]. More recently, Perez-Cervera et al. visualized *P. falciparum* *O*-GlcNAc-modified proteins by western blot [23]. In the present study, the level of UDP-GlcNAc, the donor of the GlcNAc moiety, was measured and, albeit low, confirmed that *P. falciparum* possesses its own nucleotide sugar stock. Different tools were used to confirm the occurrence of *O*-GlcNAcylation in *P. falciparum*, and *O*-GlcNAcylation

proteins were purified and enriched which enabled to identify 13 of them by mass spectrometry.

Methods

Plasmodium falciparum culture and stage separation

The 3D7 strain was obtained from Behring Co. (Marburg, Germany) and was cultured according to Trager and Jensen [24] in human A+ erythrocytes and in a RPMI medium containing neomycin, glutamine, Na_2CO_3 and human fresh frozen plasma (FFP) to reach a final haematocrit of 5% (v/v). The culture bottles were incubated in an environment containing 5% (v/v) O_2 , 5% (v/v) CO_2 and 90% (v/v) N_2 at 37 °C. The medium was changed every 1–2 days. The culture was microscopically monitored by Giemsa-stained smears. Contamination with Mycoplasma was ruled out by PCR control. The erythrocytes were separated by using SuperMACS columns (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) in a magnetic field, hereby erythrocytes infected with late trophozoites were isolated from uninfected red blood cells and erythrocytes containing parasites in the ring form in a magnetic field [25]. The parasites were extracted by lysis of the erythrocyte's membranes using a saponin buffer [26].

Protein extraction

The parasites were lysed on ice in the following buffer: 10 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% (v/v) Triton X-100, 0.5% (w/v) sodium deoxycholate, 0.1% (w/v) SDS, pH 7.4. After vigorous mixing and sonication, the lysate was centrifuged at 20,000g for 10 min at 4 °C. The pellet was discarded and the supernatant saved for further analyses. For incubation with PNGase F parasites were lysed in the following buffer: 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA and 0.5% (v/v) Triton X-100, pH 7.5. For sWGA (succinylated-wheat germ agglutinin)-beads enrichment, a hypotonic buffer was used; the composition was as follows: 10 mM Tris/HCl, 1 mM MgCl_2 , 10 mM NaCl, 15 mM 2-mercaptoethanol, pH 7.2. A cocktail of proteases inhibitors was added to each buffer.

SDS-PAGE and western blot

Proteins were resolved on 8 or 10% SDS-PAGE and either brilliant blue stained or electroblotted onto nitrocellulose sheet. Equal loading and transfer efficiency were checked using Ponceau red staining. Membranes were saturated in 5% (w/v) non-fatty milk in Tris buffered Saline (TBS)-Tween [15 mM Tris, 140 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween, pH 8.0] for 1 h or in 5% (w/v) bovine serum albumin (BSA) in TBS-Tween overnight. The primary antibodies (anti-*O*-GlcNAc, anti-tubulin and anti-HSP70) were incubated overnight at 4 °C. Then nitrocellulose membranes were washed three times for 10 min each in

TBS-Tween and incubated with horseradish peroxidase-labelled secondary antibodies for 1 h or with Streptavidin-HRP over 45 min. Finally, three washes of 10 min each were performed with TBS-Tween and the detection was carried out with enhanced chemiluminescence (GE Healthcare).

Succinylated-WGA protein enrichment

Prior to sWGA-beads enrichment, 100 µg of proteins were incubated with PNGase F (New England Bio-Labs) according to the manufacturer's instructions. Then, proteins were incubated with sWGA beads overnight in a buffer containing 10 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 0.4% (w/v) sodium deoxycholate, 0.3% (w/v) SDS and 0.2% (w/v) Nonidet P-40, pH 7.5. Beads were washed four times using the same buffer without and then with free GlcNAc. After boiling in Laemmli buffer proteins were run by SDS-PAGE.

Labelling of O-GlcNAcylated proteins by click-chemistry

Labelling of O-GlcNAc-bearing proteins by GalNAz and biotin alkyne were done using the Click-it O-GlcNAc enzymatic labelling system and the Click-it glycoprotein detection kit (biotin alkyne) according to the manufacturer's instructions (Fischer Scientific) (Fig. 1) [27]. Bovine α -crystallin was used as a positive control. After labelling, proteins were precipitated using the methanol/chloroform kit protocol and resuspended in 50 µL of Tris/HCl pH 8.0 containing 0.1% (m/v) SDS. 700 µL of enrichment buffer [1% (v/v) Triton X-100 and 0.1% (w/v) SDS in PBS] was added to the sample before incubating with 50 µL of avidin-coupled beads (1 h, 4 °C). Avidin-bound proteins were collected, washed three times with the enrichment buffer, resuspended in Laemmli buffer and boiled. Controls of labelling and enrichment followed the same procedure except that the chemical labelling with UDP-GalNAz was omitted.

Mass spectrometry

Specific bands were excised from brilliant blue stained gels. The pieces of gel were reduced using a 50:50 dilution of 50 mM ammonium bicarbonate (Bic) (HPLC Grade, Prolabo) and acetonitrile (ACN) (Sigma A) followed by 100% (v/v) ACN. They were then reduced in 20 mM DTT (Sigma) in 50 mM Bic and alkylated in 100 mM iodoacetamide (Bio-Rad) in 50 mM Bic. After washing in ACN/Bic the bands were digested with 100–200 ng trypsin gold (Promega) in 25 mM Bic. Extraction was done using 45% (v/v) ACN and 10% (v/v) formic acid (Sigma). The extracted peptides were purified using C₁₈-Zip-Tip cones using 0.1% (v/v) formic acid for washing and 50:50 ACN/0.1% (v/v) formic acid to elute the purified sample. The nano-LC MS/MS analysis was performed on a

HPLC system with two LC-20AD nano-flow LC pumps, a SIL-20 AC auto-sampler and a LC-20AB micro-flow LC pump (Shimadzu, Kyoto, Japan) connected to an ion-trap mass spectrometer (amaZon ETD, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipped with a Captive Spray ion source. Hystar (Version 3.2, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) was used to couple and control Shimadzu CBM-20A module (Shimadzu, Kyoto, Japan) for MS acquisition for all experiments.

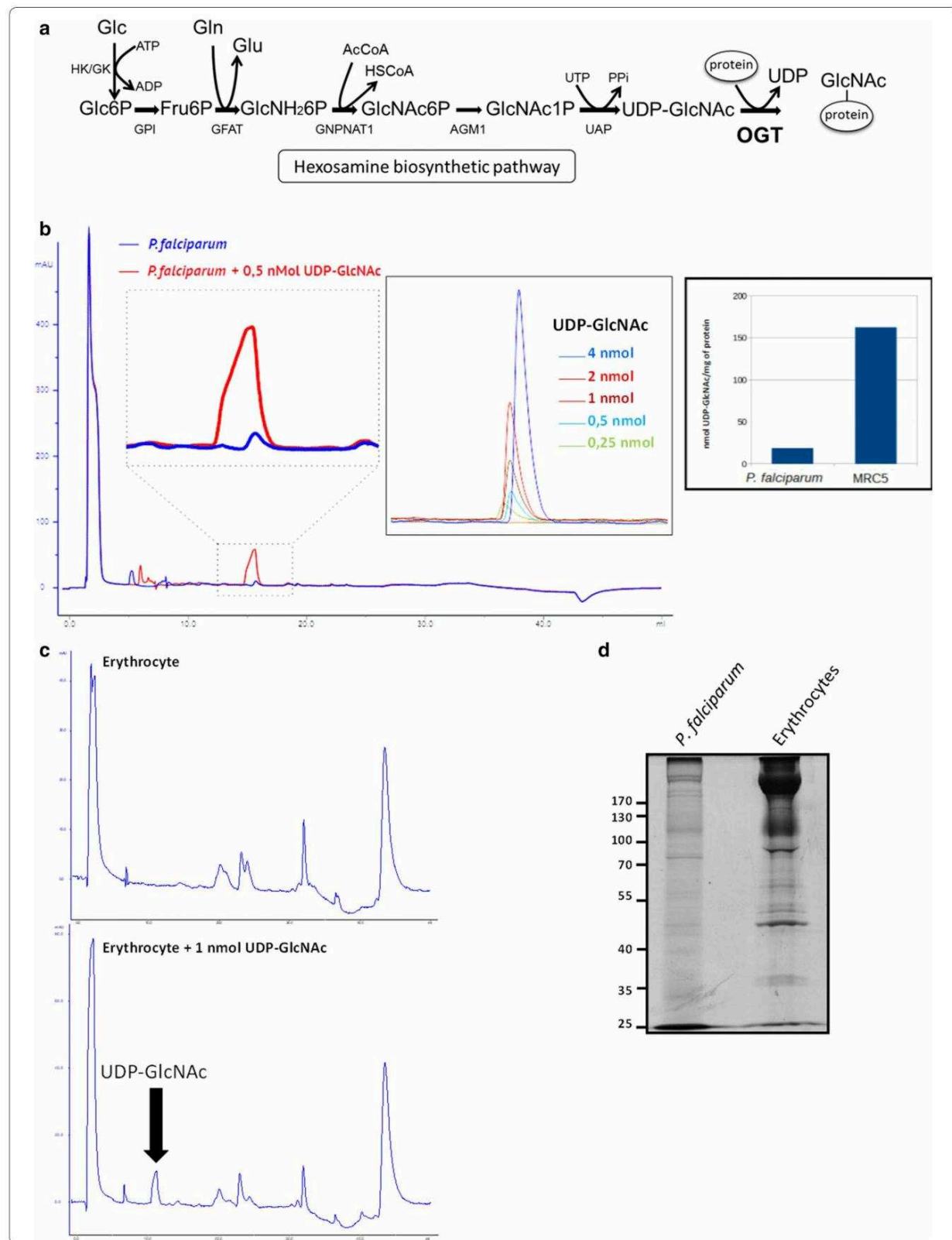
Trapping and desalting of the peptides was carried out on nano trapping column (Zorbax 300SB-C18, 5 µm, 0.3 × 5 mm, Agilent) using 0.05% (v/v) trifluoroacetic acid solution for 10 min at a flow rate of 10 µL/min. After back-flushing from the trapping column, peptides were separated on a reversed-phase column, ACQUITY UPLC® M-Class Peptide BEH C18 Column (1.7 µm, 130 Å, 100 × 0.75 mm i.d., Waters) using an acetonitrile/0.1% (v/v) formic acid gradient from 15 to 50% (v/v) acetonitrile within 30 min. Fine tuning was achieved using the smart parameter setting (SPS) option for m/z 800, compound stability and trap drive level were set at 100%. Optimization of the captive spray source resulted in dry gas temperature, 150 °C, dry gas, 3.0 L/min, capillary voltage, – 1200 V, end plate offset, 0 V. The MS1 and MS2 ion detection window was set at m/z 100–1700. The five highest nonsingly charged peaks in each MS1 spectrum were automatically fragmented through collision-induced dissociation (CID).

Data processing

The LC-MS/MS data was analysed using DataAnalysis 4.1 software (Bruker Daltonics). Within this program, the function Compounds-AutoMS(n) was used to generate 1200 compound spectra, and these data were exported as a mascot generic file. Protein identification through primary sequence database searching was performed using the MASCOT search algorithm (MASCOT free version; Matrix Science, London, UK). The following MASCOT settings were used: taxonomy: *P. falciparum*; database: SwissProt; enzyme: trypsin; fixed modifications: carbamidomethyl (C); variable modifications: oxidation (M, HW), deamidation (NQ), phosphorylation (ST), pyro-Glu (N-term E), and HexNAc (ST); max missed cleavages: 1; MS1 peptide tolerance: 0.6 Da; MS/MS tolerance: 0.6 Da.

UDP-GlcNAc pools monitoring

UDP-GlcNAc pools measurement using FPLC system. The procedure was described by Guinez et al. [28]. Briefly, parasites, erythrocytes or MRC5 cells were lysed in 0.5 mL of hypotonic buffer. 25 µL of 1 M HCl was added to the lysate for proteins acidification. The solution was passed through a column containing 1.5 mL of Dowex



(See figure on previous page.)

Fig. 1 Monitoring of the UDP-GlcNAc content in *Plasmodium falciparum*. UDP-GlcNAc is the end-product of the hexosamine biosynthetic pathway (a). Among other GlcNAc transferases, UDP-GlcNAc is the substrate of OGT (adapted from Aquino-Gil et al. [58]). HK/GK, hexokinase/glucokinase; GPI, glucose-6-phosphate isomerase; GFAT, glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase; GNPAT1, GlcNH₂-6-phosphate *N*-acetyltransferase 1; AGM1, phospho-GlcNAc mutase 1; UAP, UDP-GlcNAc pyrophosphorylase; OGT, O-GlcNAc transferase. Late trophozoite UDP-GlcNAc contents were analysed by using a FPLC system (AKTA purifier; ProPAC-PA1 column; detection carried out at 256 nm) as described in the materials session (blue line) (b). A co-injection of the sample with 0.5 nmol UDP-GlcNAc is shown in red. Increasing amounts of standard UDP-GlcNAc were injected for calibration (top insert). The quantity of UDP-GlcNAc was normalized for 1 mg of proteins for comparison with MRC5 cells (bottom insert). c Uninfected erythrocytes were analysed alone according to their UDP-GlcNAc content or co-injected with 1 nmol of UDP-GlcNAc. d Total proteins from *P. falciparum* and erythrocytes were run using SDS-PAGE (right panel). The gel was stained with brilliant blue

50WX2-400 in its H+ form. Washes were performed with 3 mL of 18 MΩ water. The unbound fraction and washes were collected on ice and adjusted with 250 μL of 1 M Tris/HCl to pH 8.0. 1.5 mL of the diluted fraction was injected using a ProPAC-PA1 column (4 × 250 mm) on AKTA Purifier 10 system. The elution programme analysis was the following: 20 mM Tris/HCl, pH 9.2 (solution A) for 1 min; elution gradient for 29 min with 85% of A and 15% NaCl at 2 M (solution B); plateau of 5 min in these conditions; an elution gradient of 10 min until 100% of B was reached; a plateau at 100% of B was maintained for 5 min. The column was then re-equilibrated in 100% of A. The flow rate was of 0.8 mL/min. Detection was performed at 256 nm.

Results

Determination of the UDP-GlcNAc level displays by *Plasmodium falciparum*

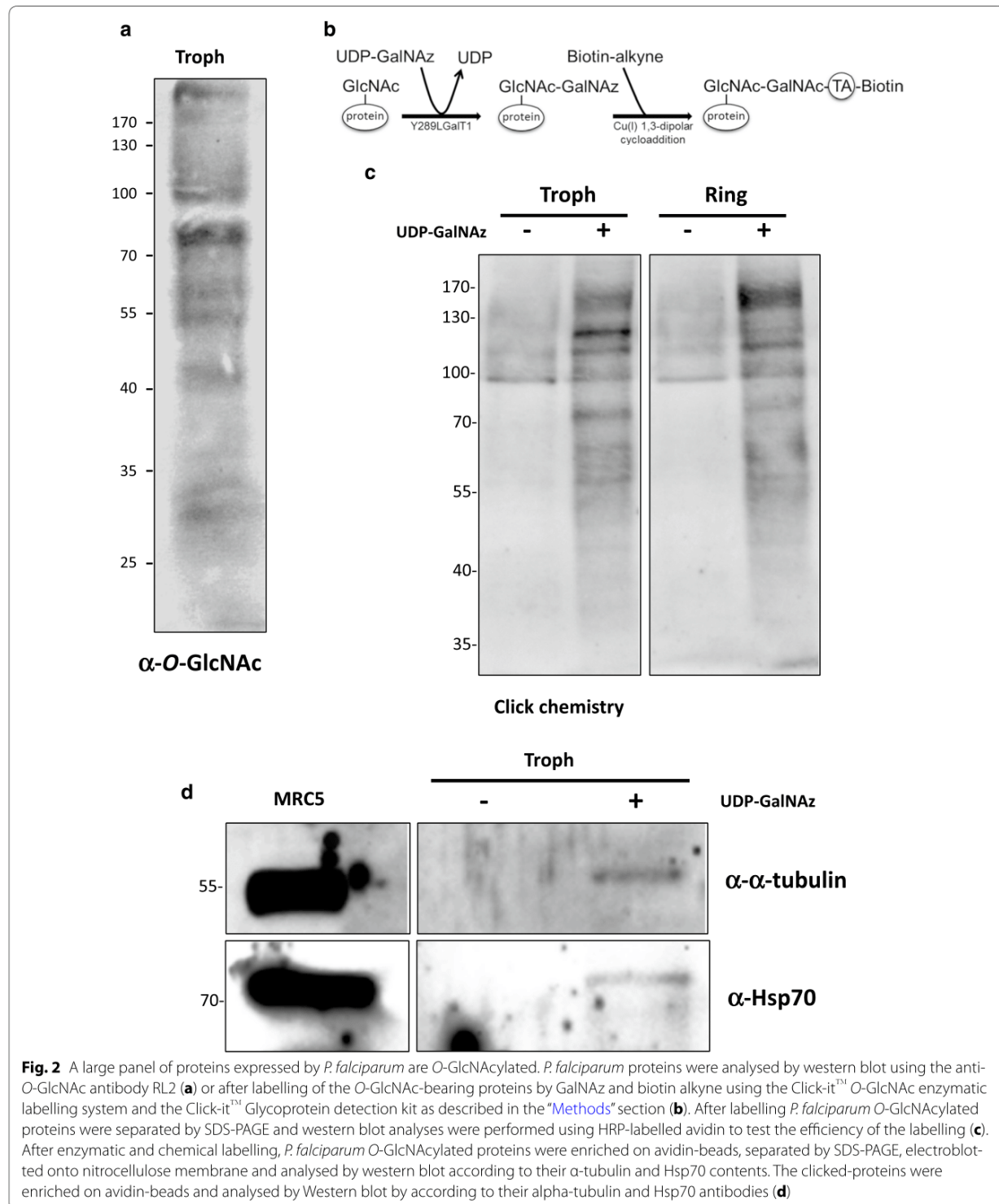
In order to learn about the resources the parasite can draw on for its O-GlcNAcylation processes, the level of UDP-GlcNAc was assayed (Fig. 1). This nucleotide sugar is the substrate of OGT and, therefore, it is crucial for O-GlcNAcylation processes. UDP-GlcNAc is the end product of the hexosamine biosynthesis pathway (Fig. 1a), a metabolic pathway highly sensitive to nutrient levels and glucose sensitizing in somatic cells. Besides O-GlcNAcylation it is used for the biosynthesis of complex glycans and glycosylphosphatidyl-inositol (GPI)-anchors. To determine the UDP-GlcNAc pool, late trophozoites lysates were processed as described under the methods session (Fig. 1b). The calibration was done by measuring the response of increasing amounts of standard UDP-GlcNAc by high performance anion exchange chromatography (HPAEC). The procedure was then applied to late trophozoites. The same samples were assayed for their protein contents and ratio of nmol of UDP-GlcNAc per milligram of proteins calculated. Although the UDP-GlcNAc level is around tenfold lower when compared to human fibroblasts (MRC5 cell line was used as a control), the study showed that there is a pool of precursor for the O-GlcNAcylation processes managed by *P. falciparum*. To discard the possible contamination of *P. falciparum* with erythrocytes components two controls were performed;

UDP-GlcNAc was monitored in uninfected erythrocytes and protein profiles from the Apicomplexan and erythrocytes were compared. No trace of UDP-GlcNAc was detected in the erythrocyte that is devoid of most of its organelles and lost the capacity to synthesis proteins and to perform complex glycosylation (Fig. 1c). This observation is also in accordance with [29] that does not mention the existence of UDP-GlcNAc in this cell. Lastly, SDS-PAGE revealed that the two cell types display distinct protein profiles proving that no cross-contamination occurred during the preparation of *P. falciparum* (Fig. 1d).

Visualization of the *Plasmodium falciparum* O-GlcNAcome

To visualize the occurrence of the O-GlcNAc modification in *P. falciparum* approaches based on enzymatic labelling (Click-chemistry) and antibodies were used. Trophozoites O-GlcNAcylated proteins were exposed to the anti-O-GlcNAc antibody RL2 (Fig. 2a). This antibody was first described to recognize eight nuclear pore complex proteins and was found to actually identify O-GlcNAc moieties of those proteins [30]. Afterwards, crude extracts of late trophozoites and parasites in their ring stage were processed as described under the "Methods" section. A mutant galactosyltransferase was used to add azidomodified galactose onto O-GlcNAc residues. In a second step biotin-alkyne was added to bind to the azido group into a cycloaddition reaction. This conjugate makes the O-GlcNAcylated proteins detectable with avidin-labelled peroxidase (Fig. 2b). This technique is very sensitive, however a negative control (UDP-GalNAz is omitted) is needed to distinguish natural biotinylation from biotin-labeling. Clicked-proteins were further run by SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose and stained with peroxidase-labelled avidin (Fig. 2c). The trophozoites and the ring stage parasites display some differences in the protein profiles. In analogy to previous findings [23] the parasites proteome is vastly O-GlcNAcylated.

Clicked-proteins were enriched on avidin-beads and analysed by western blot by using anti-α-tubulin and anti-Hsp70 antibodies (Fig. 2d) since both proteins are heavily expressed in many living systems and that their O-GlcNAcylation is well-recognized in varying systems



[23, 31–33]. Accordingly, this approach revealed that α -tubulin and Hsp70 are also O-GlcNAc-modified in *P. falciparum*.

This approach attempting to identify *P. falciparum* O-GlcNAcylated proteins is limited since it implies to predict which protein may be modified and to have

available antibodies that react with *P. falciparum* proteins. Then, the approaches that were selected combine enrichment of glycosylated proteins and mass spectrometry identification of the candidates.

Identification of O-GlcNAcylated proteins in *Plasmodium falciparum*

Lectins are proteins that bind sugar moieties. In plants, they act as a defense against insects and other predators [34]. Wheat germ agglutinin has a high specificity towards GlcNAc and sialic acid [35]. But, when the lectin is succinylated (sWGA) it loses its affinity towards sialic acid, making it a highly specific detector of terminal GlcNAc [36]. Besides O-GlcNAcylation, N-linked glycosylated, oligosaccharides on the cell surface, often contain GlcNAc partly in terminal positions. To avoid those false positives protein extracts were previously treated with PNGase F an enzyme that cleaves the oligosaccharides at their link to asparagine in the proteins [37]. The sWGA-labelled beads allowed to purify proteins that were resolved by SDS-PAGE. Proteins were stained with brilliant blue (Fig. 3a). In a last approach, the Click-iT™ system was used to biotin-label O-GlcNAcylated proteins after treatment with PNGase F (Fig. 3b). Besides the detection by western blot with avidin-labelled HRP, proteins were enriched using avidin-labelled agarose beads, the eluate was loaded on a gel and brilliant blue stained (Fig. 3b). Bands of the proteins enriched using either sWGA or Click-iT™ were excised from the gels. Proteins were digested with trypsin and analysed by tandem mass spectrometry. Protein identification was performed using the Mascot search engine against the SwissProt database restricted to *P. falciparum* taxonomy. This allowed the identification of 13 proteins (Table 1). The identified proteins can be classified according to their function. They take part in glycolysis, in the organization of cytoskeleton, act as chaperones, or have other cellular functions. The Click-iT™ method showed to be more sensitive compared to the sWGA-method, with 11 in contrast to 6 identified proteins. Note that Hsp70 first detected by probing Clicked-proteins with specific antibodies was also found with the Click-iT™ method. Alpha-tubulin—and beta-tubulin—was also detected (by Click-chemistry and WGA-enrichment) but with a low percentage of sequence recovery.

Discussion

The O-GlcNAcylation in *P. falciparum*, that belongs to Apicomplexa, a phylum grouping obligate intracellular parasites, was suggested in a previous paper that described the PTM in *T. gondii* [23]. Therefore, here is the very first work reporting proteomics data regarding the O-GlcNAcome in *P. falciparum*. By a combination of

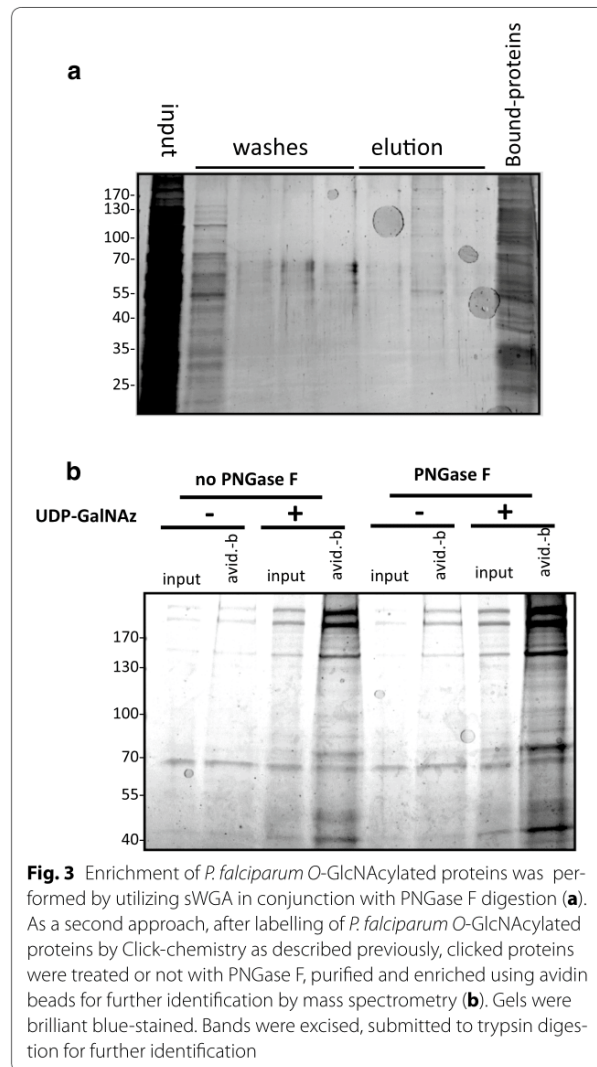


Fig. 3 Enrichment of *P. falciparum* O-GlcNAcylated proteins was performed by utilizing sWGA in conjunction with PNGase F digestion (a). As a second approach, after labelling of *P. falciparum* O-GlcNAcylated proteins by Click-chemistry as described previously, clicked proteins were treated or not with PNGase F, purified and enriched using avidin beads for further identification by mass spectrometry (b). Gels were brilliant blue-stained. Bands were excised, submitted to trypsin digestion for further identification

different approaches fourteen O-GlcNAcylated proteins expressed by *P. falciparum* were identified. When compared to classical animal cell lines usually called upon for proteomics approaches, the difficulty to identify Apicomplexan O-GlcNAcylated proteins stems from the fact that it is necessary to culture high amounts of parasites (so as to produce enough quantities of proteins) and that the level of O-GlcNAcylation of *P. falciparum* is relatively low. The combination of these two obstacles renders the project challenging and explains why so few candidates were found in this work.

Four of the identified proteins are enzymes of the glycolysis pathway (while Hexokinase is not specific to glycolysis). Owing to the parasites lack of a complete citric acid cycle glycolysis is its only source of ATP [38]. Hsp70 and α -tubulin were identified by western blot;

Table 1 *Plasmodium falciparum* O-GlcNAcylated proteins identified by mass spectrometry

UniProtKB (accession number)	Score	Coverage	Mass	Matches	Sequences	Full name	Confirmed by using sWGA	[Ref.] (biological model)
Click-chemistry								
ACT1_PLAF7	169	0.12	42,072	8 (7)	4 (4)	Actin-1	X	[27] (<i>Xenopus laevis</i>); [59] (human breast cancer cell line MCF7)
ACT2_PLAF7	30	0.07	42,977	4 (4)	3 (3)	Actin-2		[59] (human breast cancer cell line MCF7)
ALF_PLAFA	1566	0.36	40,479	39 (38)	15 (14)	Fructose-bisphosphate aldolase		[60] (<i>Rattus norvegicus</i>)
CH60_PLAFG	96	0.08	79,738	6 (3)	5 (3)	Chaperonin CPN60, mitochondrial		[61] (rat pancreatic b-cell line Rin-m5f)
EF1A_PLAFK	732	0.23	49,238	25 (21)	10 (9)	Elongation factor 1-alpha	X	[27] (<i>Xenopus laevis</i>); [59] (human breast cancer cell line MCF7)
ENO_PLAFA	694	0.18	49,015	20 (16)	8 (5)	Enolase		[27] (<i>Xenopus laevis</i>); [59] (human breast cancer cell line MCF7); [60, 62] (<i>Rattus norvegicus</i>)
GRP78_PLAFO	1864	0.27	72,845	49 (46)	22 (21)	78 kDa glucose-regulated protein homolog	X	ER-specific O-GlcNAc (eOGT, EGF repeat-specific O-GlcNAc-transferase)?
HSP70_PLAFA	1889	0.31	74,754	66 (59)	21 (20)	Heat shock 70 kDa protein = 2	X	[59] (human breast cancer cell line MCF7); [49] (human hepatocarcinoma derived cell line HepG2)
HXK_PLAFA	38	0.07	56,166	4 (1)	3 (1)	Hexokinase		No previous report
OAT_PLAFD	519	0.19	46,938	15 (10)	9 (6)	Ornithine aminotransferase		No previous report
PGK_PLAF7	562	0.29	45,569	21 (21)	11 (11)	Phosphoglycerate kinase		[57] (<i>Rattus norvegicus</i>)
sWGA								
MYOA_PLAFB	224	0.08	93,017	10 (5)	7 (2)	Myosin-A		[54, 60] (<i>Rattus norvegicus</i>)
KC1_PLAF4	69	0.09	38,036	5 (3)	3 (1)	Casein kinase I		No previous report

interestingly the former is in the list of the proteins found by mass spectrometry. Alpha-tubulin was also identified but with a low percentage of coverage; this poor rank can be ascribed to a problem of extraction of the tryptic peptides from the gel or by their masking by trouble components during the MS analysis, it is why it was not include in this list. Both Hsp70 and α -tubulin have already been described to be O-GlcNAcylated in different species, including *T. gondii* for Hsp70 [23], and have been discussed as potential drug targets in *P. falciparum*.

The hyper-O-GlcNAcylation of α -tubulin inhibits its ability to polymerize and form microtubules [31]. Due to the crucial role of tubulins as part of the cytoskeleton (intracellular transport of proteins and vesicles, mitotic

spindle that pulls apart the chromosomes during division), microtubules have been largely discussed as a drug target in anti-malaria therapies. Inhibiting microtubule polymerization has been shown to lead to disruption of mitotic division of schizonts [39], decrease invasion of erythrocytes [40], interrupt development of gametocytes [41] and block liver stage [42]. The microtubules are targets of anticancer medication for decades, it is though not possible to use those drugs against *P. falciparum* due to its low susceptibility to classical microtubule-inhibitors. The concentrations needed would be equally toxic to human cells [43]. Influencing *P. falciparum* O-GlcNAcylation might be an alternative option to intervene in the parasite microtubule polymerization. Using

the YinOYang algorithm, an online prediction server that allows the bioinformatic estimation of potential O-GlcNAcylation sites, for α -tubulin one site with very high O-GlcNAcylation score (S178) and three sites with high score (S271, S277, T361) were predicted. Ji et al. identified a specific O-GlcNAcylated site in the protein sequence of human α -tubulin by mass spectrometry [31]. The predicted S178 lies within this site. Sequence alignment showed that the entire protein sequence and also this specific site is highly preserved in *P. falciparum*.

Heat shock proteins are chaperone proteins, their main function is to facilitate the correct folding of proteins and assembly of oligomers. In heat shocked cells they can bind proteins, maintaining their solubility [43]. Hsp70 is involved in various other processes including protein unfolding and translocation [44], degradation of proteins [45], and proinflammatory signal transduction [46]. Its role in protein transport from the nucleus to the apicomplexan has shown to be crucial; inhibition of this traffic with 15-deoxyspergualin in *P. falciparum* cultures leads to the parasites death [47]. In that context, O-GlcNAcylation was discussed to act as a signal for nuclear residence [48], Hsp70 is O-GlcNAcylated in human cells [48–52], and beyond that it is able to bind O-GlcNAc acting as a lectin [49, 52]. Lastly the expression of Hsp70 is influenced by the cellular O-GlcNAcylation level [53]. Despite its importance for the parasites survival, it proves to be difficult to use as a drug target due to the proteins high conservation between human and *P. falciparum*. In the YinOYang algorithm for *P. falciparum*-Hsp70 one site with very high potential to be O-GlcNAcylated and/or phosphorylated at T49 and five other sites with high potential of O-GlcNAcylation (S92, T170, T286, S394, T443) were predicted.

Surprisingly, no nuclear pore proteins or other commonly O-GlcNAc-proteins (except chaperones and glycolytic enzymes) were found herein. These discrepancies can be related to the lack or to the low level of O-GlcNAcylation of these proteins in *P. falciparum*, and to a detection limitation. In contrast, actin was easily identified in the proteomics analyses. Actin was previously found to be O-GlcNAcylated [27, 54] and it is crucial for the motility of the parasite and for invasion of host cell [55]. It is not yet known whether O-GlcNAcylation promotes or hampers actin polymerization but, if true, O-GlcNAcylated-actin could be an interesting target to limit *P. falciparum* infection and dissemination.

The O-GlcNAcylation patterns observed in the two different stages of *P. falciparum*, trophozoite and ring, while showing similarities also harbor differences notably for proteins having an apparent molecular weight up to 100 kDa (Fig. 2b). These differences may result from a distinct expression of either OGT and/or of its protein

substrates, and from the concentration of UDP-GlcNAc that can vary from one stage to another. This detection of UDP-GlcNAc—albeit relatively low—shows that the parasite possesses its own donor for O-GlcNAcylation processes. This observation is not completely surprising since it is known that *P. falciparum* synthesizes GPIs that need UDP-GlcNAc as the donor for the glucosamine moiety characteristic of these complex structures [56].

Recently, Maria Mota's group proposed on rodent malaria models that, despite the lack of nutrient-sensing pathways in *P. falciparum*, the parasite can sense nutrients fluctuations of the host cell [57]. Thus, it is shown that the transcriptional programming of *P. falciparum* obeys to modifications of dietary through the parasite kinase KIN that orchestrates the response to caloric restriction. Interestingly, caloric restriction reduced parasitaemia whereas supplementation of glucose and re-feeding reversed this effect. Due to the pivotal position of the nutrient-sensor UDP-GlcNAc at the crossroad of metabolic pathways, it is tempting to propose that nutrients drive *P. falciparum* blood-stages parasites growth. Experiments in which *P. falciparum* was cultured with increasing concentrations of thiamet-G, a potent inhibitor of OGA, were done. No significant decrease in parasitaemia was observed. Nevertheless, since nothing is known neither about OGT nor OGA in *P. falciparum*, doubts remain about the efficacy of the small-molecule inhibitor in the parasite. In this way, given that OGT has not yet been detected in *P. falciparum*, neither by using immunological methods nor by data-searching with sequence alignment [23], there remains two options how *P. falciparum* O-GlcNAcylates its proteins. Either it possesses an OGT that is different in its sequence compared to other OGTs in plants and animals, or it imports the host OGT what seems unlikely in view of the membrane barriers the enzyme had to cross. The first assumption seems more likely, in consideration of the unlikelihood of an OGT being active in erythrocytes, given that they do not have any active protein biosynthesis. As discussed in the introduction session, due to the emergence of resistances against the sesquiterpenic artemisinin derivatives it is urgent to develop new therapeutics against *P. falciparum*. Blocking OGT seems compromise because of the doubts that remain regarding its occurrence, but one possible avenue would be to impinge the parasite hexosamine biosynthetic pathway (Fig. 1a). Nevertheless, many efforts have to be made in understanding the different enzymes of this metabolic pathway before envisaging the discovery of a new class of anti-malarial drugs. However, the identification of some of the parasite O-GlcNAc-bearing proteins provides the base for further research on the modification functions in cellular processes.

Conclusions

Although the occurrence of *O*-GlcNAcylation in *P. falciparum* was clearly demonstrated by Dieckmann-Schuppert et al. who used radioactive methods in crude preparations of the parasite [22], no individual *O*-GlcNAcylated proteins were identified. After the advent of modern mass-spectrometry coupled with bioinformatic methods a profound reinvestigation became possible. Here, isolated parasites were analysed using non-radioactive quantitative methods. The identification of individual *O*-GlcNAcylated proteins of different families was achieved; they are involved in glycolysis, protein folding, and cell shape, equivalent to their already known mammalian counterparts.

The origin of the *O*-GlcNAc transferase is not certain as no equivalent gene sequences could be found in the PlasmoDB data bank suggesting a fundamental structural difference. Thus, inhibitors might be found that inhibit interaction of *P. falciparum* *O*-GlcNAc transferase with its partner molecules without interfering with the human *O*-GlcNAc transferase.

Authors' contributions

MK, RTS and TL developed the hypotheses, contributed to writing and discussing the manuscript. MK performed most of the biochemical experiments, interpreted data, and drafted the manuscript. MOAG performed experiments and gave important technical training and advised to MK. HS and JS contributed materials and contributed to the culture of *P. falciparum*. NY performed the mass spectroscopic analysis and provided the resulting data. FK perfected the measurements of the UDP-GlcNAc pool and contributed the corresponding paragraph for the methods section. All authors contributed to refining the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹ Institute for Virology, Laboratory of Parasitology, Philipps-University, Marburg, Germany. ² Univ. Lille, CNRS, UMR 8576, UGSF, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, 59000 Lille, France. ³ Instituto Tecnológico de Oaxaca, Tecnológico Nacional de México, Oaxaca, Mexico. ⁴ Centro de Investigación UNAM-UABJO, Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca, Oaxaca, Mexico.

Acknowledgements

Mattis Kupferschmid was holding a fellowship of the German Centre for Infection Research (DZIF) and acknowledges support for his stay at the University of Lille by a fellowship of the ERASMUS Program of the EU. MOAG is holding a fellowship of CONACyT from the government of Mexico. The investigations were supported by CNRS, Lille 1 University, SFR 3688 FRABio and PAGés. RTS and MK are grateful for financial support for reagents by the Roland und Elfriede Schauer Stiftung and thank Prof. S. Becker for his interest and support.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 17 July 2017 Accepted: 23 November 2017

Published online: 29 November 2017

References

- World Health Organization. World malaria report 2015. Geneva: World Health Organization; 2015. p. 243.
- Nájera JA, González-Silva M, Alonso PL. Some lessons for the future from the global malaria eradication programme (1955–1969). *PLoS Med*. 2011;8:e1000412.
- Dondorp AM, Yeung S, White L, Nguon C, Day NPJ, Socheat D, et al. Artemisinin resistance: current status and scenarios for containment. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8:530.
- Djouaka R, Riveron JM, Yessoufou A, Tchigossou G, Akoton R, Irving H, et al. Multiple insecticide resistance in an infected population of the malaria vector *Anopheles funestus* in Benin. *Parasit Vectors*. 2016;9:453.
- Doerig C, Rayner JC, Scherf A, Tobin AB. Post-translational protein modifications in malaria parasites. *Nat Rev Microbiol*. 2015;13:160–72.
- Torres CR, Hart GW. Topography and polypeptide distribution of terminal *N*-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc. *J Biol Chem*. 1984;259:3308–17.
- Holt GD, Hart GW. The subcellular distribution of terminal *N*-acetylglucosamine moieties. *J Biol Chem*. 1986;261:8049–57.
- Roquemore EP, Chevrier MR, Cotter RJ, Hart GW. Dynamic O-GlcNAcylation of the small heat shock protein RB-crystallin. *Biochemistry*. 1996;35:3578–86.
- Haltiwanger RS, Blomberg MA, Hart GW. Glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins: purification and characterization of a uridine diphospho-*N*-acetylglucosamine: polypeptide *b*-*N*-acetylglucosaminyl-transferase. *J Biol Chem*. 1992;267:9005–13.
- Dong DL, Hart GW. Purification and characterization of an O-GlcNAc selective *N*-acetyl-beta-D-glucosaminidase from rat spleen cytosol. *J Biol Chem*. 1994;269:19321–30.
- Whelan SA, Hart GW. Proteomic approaches to analyze the dynamic relationships between nucleocytoplasmic protein glycosylation and phosphorylation. *Circ Res*. 2003;93:1047–58.
- Peterson SB, Hart GW. New insights: a role for O-GlcNAcylation in diabetic complications. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2016;51:150–61.
- Fardini Y, Dehennaut V, Lefebvre T, Issad T. O-GlcNAcylation: a new cancer hallmark? *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013;4:1–14.
- Su C, Schwarz TL. O-GlcNAc transferase is essential for sensory neuron survival and maintenance. *J Neurosci*. 2017;37:2125–36.
- Kelly GW, Hart GW. Glycosylation of chromosomal proteins: localization of O-linked *N*-acetylglucosamine in *Drosophila* chromatin. *Cell*. 1989;57:243–51.
- Webster DM, Teo C, Sun Y, Wloga D, Gay S, Klonowski KD, et al. O-GlcNAc modifications regulate cell survival and epiboly during zebrafish development. *BMC Dev Biol*. 2009;9:28.
- Hanover JA, Forsythe ME, Hennessey PT, Brodigan TM, Love DC, Ashwell G, et al. A *Caenorhabditis elegans* model of insulin resistance: altered macronutrient storage and dauer formation in an OGT-1 knockout. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:11266–71.
- Hartweck LM, Scott CL, Olszewski NE. Two O-linked *N*-acetylglucosamine transferase genes of *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. Have overlapping functions necessary for gamete and seed development. *Genetics*. 2002;161:1279–91.
- Nothaft H, Szymanski CM. Protein glycosylation in bacteria: sweeter than ever. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8:765–78.
- Benko DM, Haltiwanger RS, Hart GW, Gibson W. Virion basic phosphoprotein from human cytomegalovirus contains O-linked *N*-acetylglucosamine. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988;85:2573–7.
- Banerjee S, Robbins PW, Samuelson J. Molecular characterization of nucleocytoplasmic O-GlcNAc transferases of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum*. *Glycobiology*. 2009;19:331–6.
- Dieckmann-Schuppert A, Bause E, Schwarz RT. Studies on O-glycans of *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes. Evidence for O-GlcNAc and O-GlcNAc-transferase in malaria parasites. *Eur J Biochem*. 1993;216:779–88.
- Perez-Cervera Y, Harichaux G, Schmidt J, Debierre-Grockiego F, Dehennaut V, Bieker U, et al. Direct evidence of O-GlcNAcylation in the apicomplexan *Toxoplasma gondii*: a biochemical and bioinformatic study. *Amino Acids*. 2011;40:847–56.

24. Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*. 1976;193:673–5.
25. Ribaut C, Berry A, Chevalley S, Reybier K, Morlais I, Parzy D, et al. Concentration and purification by magnetic separation of the erythrocytic stages of all human *Plasmodium* species. *Malar J*. 2008;7:45.
26. Umlas J, Fallon JN. New thick-film technique for malaria diagnosis. Use of saponin stromatolytic solution for lysis. *Am J Trop Med Hyg*. 1971;20:527–9.
27. Dehennaut V, Slomianny M-C, Page A, Vercoutter-Edouart A-S, Jessus C, Michalski J-C, et al. Identification of structural and functional O-linked *N*-Acetylglucosamine-bearing proteins in *Xenopus laevis* oocyte. *Mol Cell Proteomics*. 2008;7:2229–45.
28. Guinez C, Mir AM, Leroy Y, Cacan R, Michalski JC, Lefebvre T. Hsp70-GlcNAc-binding activity is released by stress, proteasome inhibition, and protein misfolding. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;361:414–20.
29. Beutler E. Red cell metabolism. A manual of biochemical methods. 3rd ed. Grune & Stratton; 1984.
30. Snow CM, Senior A, Gerace L. Monoclonal antibodies identify a group of nuclear pore complex glycoproteins. *J Cell Biol*. 1987;104:1143–56.
31. Ji S, Kang JG, Park SY, Lee J, Oh YJ, Cho JW. O-GlcNAcylation of tubulin inhibits its polymerization. *Amino Acids*. 2011;40:809–18.
32. Walgren JL, Vincent TS, Schey KL, Buse MG. High glucose and insulin promote O-GlcNAc modification of proteins, including alpha-tubulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003;284:E424–34.
33. Netsirisan P, Chokchaichamnankit D, Srisomsap C, Svasti J, Champat-tanachai V. Proteomic analysis reveals aberrant O-GlcNAcylation of extracellular proteins from breast cancer cell secretion. *Cancer Genomics Proteomics*. 2015;12:201–9.
34. Pusztai A, Ewen SW, Grant G, Brown DS, Stewart JC, Peumans WJ, et al. Antinutritive effects of wheat-germ agglutinin and other *N*-acetylglucosamine-specific lectins. *Br J Nutr*. 1993;70:313–21.
35. Bains G, Lee RT, Lee YC, Freire E. Microcalorimetric study of wheat germ agglutinin binding to *N*-acetylglucosamine and its oligomers. *Biochemistry*. 1992;31:12624–8.
36. Zachara NE, Vosseller K, Hart GW. Detection and analysis of proteins modified by O-linked *N*-acetylglucosamine. *Curr Protoc Mol Biol*. 2011;12:1–38.
37. Lefebvre T, Baert F, Bodart JF, Flament S, Michalski JC, Vilain JP. Modulation of O-GlcNAc glycosylation during xenopus oocyte maturation. *J Cell Biochem*. 2004;93:999–1010.
38. Roth J. *Plasmodium falciparum* carbohydrate metabolism: a connection between host cell and parasite. *Blood Cells*. 1990;16:453–60.
39. Fennell BJ, Naughton JA, Dempsey E, Bell A. Cellular and molecular actions of dinitroaniline and phosphorothioamide herbicides on *Plasmodium falciparum*: tubulin as a specific antimalarial target. *Mol Biochem Parasitol*. 2006;145:226–38.
40. Bell A. Microtubule inhibitors as potential antimalarial agents. *Parasitol Today*. 1998;14:234–40.
41. Pinder JC, Fowler RE, Bannister LH, Dluzewski AR, Mitchell GH. Motile systems in malaria merozoites: how is the red blood cell invaded? *Parasitol Today*. 2000;16:240–5.
42. Dempsey E, Prudêncio M, Fennell BJ, Gomes-Santos CS, Barlow JW, Bell A. Antimitotic herbicides bind to an unidentified site on malarial parasite tubulin and block development of liver-stage *Plasmodium* parasites. *Mol Biochem Parasitol*. 2013;188:116–27.
43. Ellis R. Proteins as molecular chaperones. *Nature*. 1987;328:378–9.
44. Gambill BD, Voos W, Kang PJ, Miao B, Langer T, Craig EA, et al. A dual role for mitochondrial heat shock protein 70 in membrane translocation of preproteins. *J Cell Biol*. 1993;123:109–17.
45. Bercovich B, Stancovski I, Mayer A, Blumenfeld N, Laszlo A, Schwartz AL, et al. Ubiquitin-dependent degradation of certain protein substrates in vitro requires the molecular chaperone Hsc70. *J Biol Chem*. 1997;272:9002–10.
46. Asea A, Rehli M, Kibingu E, Boch JA, Baré O, Auron PE, et al. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70. Role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem*. 2002;277:15028–34.
47. Ramya TN, Karthikeya K, Suroliya A, Suroliya N. 15-deoxyspergualin primarily targets the trafficking of apicoplast proteins in *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*. 2007;282:6388–97.
48. Guinez C, Morelle W, Michalski JC, Lefebvre T. O-GlcNAc glycosylation: a signal for the nuclear transport of cytosolic proteins? *Int J Biochem Cell Biol*. 2005;37:765–74.
49. Guinez C, Lemoine J, Michalski JC, Lefebvre T. 70-kDa-heat shock protein presents an adjustable lectinic activity towards O-linked *N*-acetylglucosamine. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;319:21–6.
50. Zachara NE, O'Donnell N, Cheung WD, Mercer JJ, Marth JD, Hart GW. Dynamic O-GlcNAc modification of nucleocytoplasmic proteins in response to stress: a survival response of mammalian cells. *J Biol Chem*. 2004;279:30133–42.
51. Varki A, Cummings R, Esko J, Freeze H, Stanley P, Bertozzi C, et al. Essentials of glycobiology. In: Hart GW, Etzler M, editors. 2nd ed. NY: Cold Spring Harbor; 2009.
52. Lefebvre T, Cieniewski C, Lemoine J, Guerardel Y, Leroy Y, Zanetta J, et al. Identification of *N*-acetyl-D-glucosamine-specific lectins from rat liver cytosolic and nuclear compartments as heat-shock proteins. *Biochem J*. 2001;360:179–88.
53. Gong J, Jing L. Glutamine induces heat shock protein 70 expression via O-GlcNAc modification and subsequent increased expression and transcriptional activity of heat shock factor-1. *Minerva Anestesiol*. 2011;77:488–95.
54. Hédou J, Bastide B, Page A, Michalski JC, Morelle W. Mapping of O-linked beta-*N*-acetylglucosamine modification sites in key contractile proteins of rat skeletal muscle. *Proteomics*. 2009;9:2139–48.
55. Olshina MA, Angrisano F, Marapana DS, Riglar DT, Bane K, Wong W, et al. *Plasmodium falciparum* coronin organizes arrays of parallel actin filaments potentially guiding directional motility in invasive malaria parasites. *Malar J*. 2015;14:280.
56. Gerold P, Dieckmann-Schuppert A, Schwarz RT. Glycosylphosphatidylinositols synthesized by asexual erythrocytic stages of the malarial parasite, *Plasmodium falciparum*. Candidates for plasmodial glycosylphosphatidylinositol membrane anchor precursors and pathogenicity factors. *J Biol Chem*. 1994;269:2597–606.
57. Mancio-Silva L, Slavic K, Grilo Ruivo MT, Grosso AR, Modrzynska KK, Vera IM, et al. Nutrient sensing modules malaria parasite virulence. *Nature*. 2017;547:213–6.
58. Aquino-Gil M, Pierce A, Perez-Cervera Y, Zenteno E, Lefebvre T. OGT: a short overview of an enzyme standing out from usual glycosyltransferases. *Biochem Soc Trans*. 2017;45:365–70.
59. Gurcel C, Vercoutter-Edouart AS, Fonbonne C, Mortuaire M, Salvador A, Michalski JC, et al. Identification of new O-GlcNAc modified proteins using click-chemistry-based tagging. *Anal Bioanal Chem*. 2008;390:2089–97.
60. Cieniewski-Bernard C, Bastide B, Lefebvre T, Lemoine J, Mounier Y, Michalski JC. Identification of O-linked *N*-acetylglucosamine proteins in rat skeletal muscle using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*. 2004;3:577–85.
61. Kim HS, Kim EM, Lee J, Yang WH, Park TY, Kim YM, et al. Heat shock protein 60 modified with O-linked *N*-acetylglucosamine is involved in pancreatic beta-cell death under hyperglycemic conditions. *FEBS Lett*. 2006;580:2311–6.
62. Wells L, Vosseller K, Cole RN, Cronshaw JM, Matunis MJ, Hart GW. Mapping sites of O-GlcNAc modification using affinity tags for serine and threonine post-translational modifications. *Mol Cell Proteomics*. 2002;1:791–804.

Annexe 3



Apart From Rhoptries, Identification of *Toxoplasma gondii*'s O-GlcNAcylated Proteins Reinforces the Universality of the O-GlcNAcome

OPEN ACCESS

Edited by:

Xiaoyong Yang,
Yale School of Medicine, Yale
University, United States

Reviewed by:

Chad Slawson,
Kansas University of Medical Center
Research Institute, United States
Michelle R. Bond,
National Institutes of Health (NIH),
United States

*Correspondence:

Tony Lefebvre
tony.lefebvre@univ-lille.fr

[†] These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Molecular and Structural
Endocrinology,
a section of the journal
Frontiers in Endocrinology

Received: 14 May 2018

Accepted: 20 July 2018

Published: 20 August 2018

Citation:

Aquino-Gil MO, Kupferschmid M,
Shams-Eldin H, Schmidt J,
Yamakawa N, Mortuaire M,
Krzewinski F, Hardivillé S, Zenteno E,
Rolando C, Bray F, Pérez Campos E,
Dubremetz J-F, Perez-Cervera Y,
Schwarz RT and Lefebvre T (2018)
Apart From Rhoptries, Identification of
Toxoplasma gondii's O-GlcNAcylated
Proteins Reinforces the Universality of
the O-GlcNAcome.
Front. Endocrinol. 9:450.
doi: 10.3389/fendo.2018.00450

Moyira Osny Aquino-Gil^{1,2,3}, Mattis Kupferschmid⁴, Hosam Shams-Eldin⁴, Jörg Schmidt⁴, Nao Yamakawa¹, Marlène Mortuaire¹, Frédéric Krzewinski¹, Stéphan Hardivillé¹, Edgar Zenteno⁵, Christian Rolando⁶, Fabrice Bray⁶, Eduardo Pérez Campos^{2,3}, Jean-François Dubremetz⁷, Yobana Perez-Cervera^{2,3}, Ralph T. Schwarz^{1,4†} and Tony Lefebvre^{1*†}

¹ Univ. Lille, CNRS, UMR 8576, UGSF, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Lille, France, ² Instituto Tecnológico de Oaxaca, Tecnológico Nacional de México, Oaxaca, Mexico, ³ Centro de Investigación Facultad de Medicina UNAM-UABJO, Facultad de Odontología, Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca, Oaxaca, Mexico, ⁴ Laboratory of Parasitology, Institute for Virology, Philipps-University, Marburg, Germany, ⁵ Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, ⁶ CNRS, MSAP USR 3290, FR 3688 FRABIO, FR 2638 Institut Eugène-Michel Chevreul, Université de Lille, Lille, France, ⁷ Unité Mixte de Recherche 5235, Dynamique des Interactions Membranaires Normales et Pathologiques, Université Montpellier, Montpellier, France

O-linked β -N-acetylglucosaminylation or O-GlcNAcylation is a widespread post-translational modification that belongs to the large and heterogeneous group of glycosylations. The functions managed by O-GlcNAcylation are diverse and include regulation of transcription, replication, protein's fate, trafficking, and signaling. More and more evidences tend to show that deregulations in the homeostasis of O-GlcNAcylation are involved in the etiology of metabolic diseases, cancers and neuropathologies. O-GlcNAc transferase or OGT is the enzyme that transfers the N-acetylglucosamine residue onto target proteins confined within the cytosolic and nuclear compartments. A form of OGT was predicted for *Toxoplasma* and recently we were the first to show evidence of O-GlcNAcylation in the apicomplexans *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*. Numerous studies have explored the O-GlcNAcome in a wide variety of biological models but very few focus on protists. In the present work, we used enrichment on sWGA-beads and immunopurification to identify putative O-GlcNAcylated proteins in *Toxoplasma gondii*. Many of the proteins found to be O-GlcNAcylated were originally described in higher eukaryotes and participate in cell shape organization, response to stress, protein synthesis and metabolism. In a more original way, our proteomic analyses, confirmed by sWGA-enrichment and click-chemistry, revealed that rhoptries, proteins necessary for invasion, are glycosylated. Together, these data show that regardless of proteins strictly specific to organisms, O-GlcNAcylated proteins are rather similar among living beings.

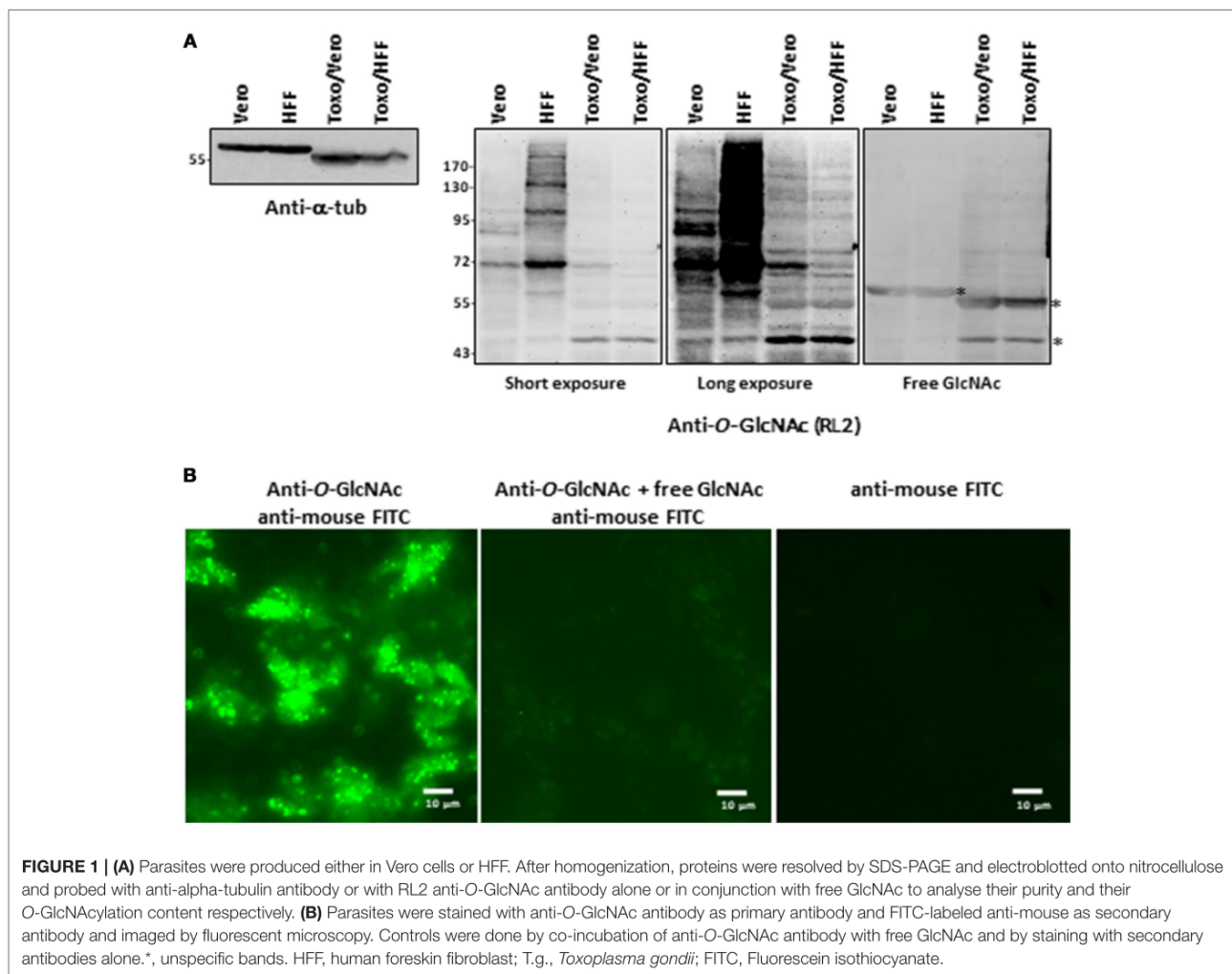
Keywords: *T. gondii*, O-GlcNAcome, O-GlcNAcylation, proteomics, toxoplasmosis, rhoptries

INTRODUCTION

Most of the proteins are subjected to covalent chemical modifications that occur co- or post-translationally. Post-translational modifications (PTMs) are very diverse and consist in the addition—usually enzymatically—of simple or complex (e.g., peptides, proteins, glycosylphosphatidylinositol) groups, or in the proteolytic cleavage to enlarge the complexity of the proteome (1). To date, many hundreds of PTMs have been described among which are found a wide variety of glycosylations including the O-linked β -N-acetylglucosaminylation (O-GlcNAcylation). O-GlcNAcylation is a modification of cytosolic, nuclear and mitochondrial proteins by a single residue of N-acetylglucosamine transferred from UDP-GlcNAc which is provided by the hexosamine biosynthetic pathway (HBP). O-GlcNAcylation cycles on and off targeted proteins, and the addition and hydrolysis of the GlcNAc moiety is respectively controlled by OGT (O-GlcNAc transferase) and OGA (O-GlcNAcase) (2, 3). The functions managed by O-GlcNAcylation abound as testified by the non-exhaustive list of processes in

which the PTM is involved: cell signaling, adaptation to stress, epigenetics, gene expression, protein synthesis and degradation, glycolysis, glucose sensing, enzymatic activity, circadian clock, immune response [for recent reviews see (3–6)]. Regulation of protein-to-protein interactions by O-GlcNAcylation (1, 7) directly or in close cooperation with other PTMs (1) seems to be at the nexus of such diversity of functions. Surprisingly, it was found that beyond protein O-GlcNAcylation, OGT also proteolytically processes the cell cycle regulator HCF-1 (Host cell factor-1) into a mature form through a glutamate glycosylation dependent manner (8, 9). Deregulations in O-GlcNAcylation cycling were reported in different human pathologies: cancers, type-2 diabetes, cardiovascular and neuronal disorders (10).

While extensively studied in cultured cell lines and animal models, few investigations have been reported regarding O-GlcNAcylation in intracellular parasites. In the early nineties, Dieckman-Schuppert and collaborators documented, for the very first time, O-GlcNAcylation in apicomplexans (11). Analyses of erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum* indicated that parasite's O-glycans exhibiting terminal GlcNAc were O-GlcNAc.



Ten years were necessary to identify MSP1 (Merozoite Surface Protein-1) expressed and GPI-anchored at the cell surface of *P. falciparum* to bear O-GlcNAc moieties (12). Nevertheless, due to its extracellular localization, MSP1 O-glycosylation is likely related to the extracellular glycosylation and not to the nucleocytoplasmic O-GlcNAcylation. But, in the late 2000's, OGTs expressed by *Cryptosporidium parvum*, that is phylogenetically close to *Plasmodium* and *Toxoplasma gondii*, and by the minimalist protist *Giardia lamblia* were characterized (13). Later, our team revealed that *T. gondii* unambiguously expresses the nuclear and cytoplasmic modification and strongly suggested its occurrence in *P. falciparum* (14). Very recently, we identified 13 O-GlcNAcylated proteins expressed in *P. falciparum* among which Hsp70, alpha-tubulin, actin and glycolytic enzymes (15). In the present report, we used similar approaches and revealed part of *Toxoplasma gondii*'s O-GlcNAcome which, except rhoptry proteins, is very close to those found not only in *Plasmodium falciparum* but also in higher eukaryotes. Together, these findings tend to demonstrate that a large part of the O-GlcNAcome is universal, that is conserved through species.

MATERIALS AND METHODS

Culture and Preparation of the Parasites

T. gondii grown in African green monkey kidney cells (Vero cells, ATCC CCL-81) or in human foreskin fibroblast (HFF, ATCC SCRC-1041), were cultured in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco BRL), and supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (FCS, Gibco), 2 mM glutamine, 100 units/mL

penicillin, and 0.1 mg/mL streptomycin. Parasites (5×10^7) were added to confluent monolayer of cells (175 cm^2), harvested after being cultivated for 72 h, and liberated from their host cells using a Mixer Mill homogenizer (Retsch). The suspension was run through a 20 mL glass-wool column to remove cellular debris. The purity of the tachyzoite suspension was monitored microscopically. Cell lines and parasites were routinely tested for *Mycoplasma* contamination. To control the efficiency of parasite purification, *T. gondii* cells liberated from their host cells were mixed with homogenized Vero cells, and the mixture was purified using glass-wool columns as described previously (16).

Protein Extraction

The parasites were lysed on ice in the following buffer: 10 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% (v/v) Triton X-100, 0.5% (w/v) sodium desoxycholate, 0.1% (w/v) SDS, pH 7.4. After vigorous mixing, the lysate was centrifuged at 20,000 g for 10 min at 4°C. The pellet was discarded and the supernatant saved for further analyses. For sWGA (succinylated-Wheat Germ Agglutinin)-beads enrichment, parasites were lysed in homogenization buffer containing 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.5% (v/v) Triton X-100, pH 7.5. A cocktail of proteases inhibitors was added freshly to buffers before use.

SDS-PAGE and Western Blot

Proteins were resolved on 8 or 10% SDS-PAGE and either silver stained or electroblotted onto nitrocellulose membrane. Equal loading and transfer efficiency were checked using Ponceau red staining. Membranes were saturated in 5% (w/v) non-fatty milk in Tris buffered Saline (TBS)-Tween (15 mM Tris,

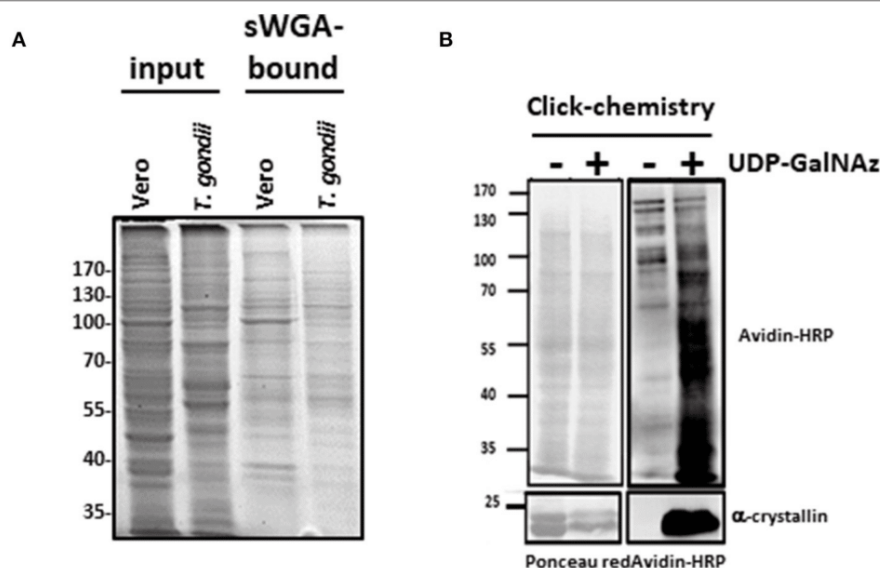


FIGURE 2 | (A) O-GlcNAc-bearing proteins from Vero cells (host cells) and *T. gondii* were enriched by sWGA-beads. Gels were brilliant blue stained. **(B)** *T. gondii* proteins were analyzed after labeling of the O-GlcNAc-bearing proteins by GalNAz and biotin alkyne using the Click-it™ O-GlcNAc enzymatic labeling system and the Click-it™ Glycoprotein detection kit as described in the Material and methods section. After labeling, *T. gondii* samples were separated by SDS-PAGE and Western blot was performed using HRP-labeled avidin to assess presence of the labeled O-GlcNAc-proteins. Equal loading was controlled by staining proteins with Ponceau red. Alpha-crystallin was used to control labeling efficiency.

140 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween) for 1 h or in 5% (w/v) bovine serum albumin (BSA) in TBS-Tween overnight. The primary antibodies anti-O-GlcNAc, anti-tubulin and anti-rhoptries were incubated overnight at 4°C. Then nitrocellulose membranes were washed three times for 10 min each in TBS-Tween and incubated with horseradish peroxidase-labeled secondary antibodies for 1 h or with avidin-HRP for 45 min. HRP-rPVL was used as previously described (17). Finally, three washes of 10 min each were performed with TBS-Tween and detection was carried out with enhanced chemiluminescence (GE Healthcare).

Succinylated-WGA Protein Enrichment

Prior to sWGA-beads enrichment, 500 µg of proteins were incubated with sWGA beads overnight in a buffer containing 10 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 0.4% (w/v) sodium

deoxycholate, 0.3% (w/v) SDS and 0.2% (w/v) Nonidet P-40. Beads were washed four times using the same buffer without and then with free GlcNAc. After boiling in Laemmli buffer, proteins were resolved by SDS-PAGE.

Labelling of O-GlcNAcylated Proteins by Click-Chemistry

Labelling of O-GlcNAc-bearing proteins by GalNAz and biotin alkyne was done using the Click-it O-GlcNAc enzymatic labeling system and the Click-it Glycoprotein detection kit (Biotin alkyne) according to the manufacturer's instructions (Fischer Scientific) (18). Bovine α-crystallin was used as a positive control. After labeling, proteins were precipitated using the methanol/chloroform protocol and resuspended in 50 µL of Tris/HCl pH 8.0 containing 0.1% (w/v) SDS. 700 µL of

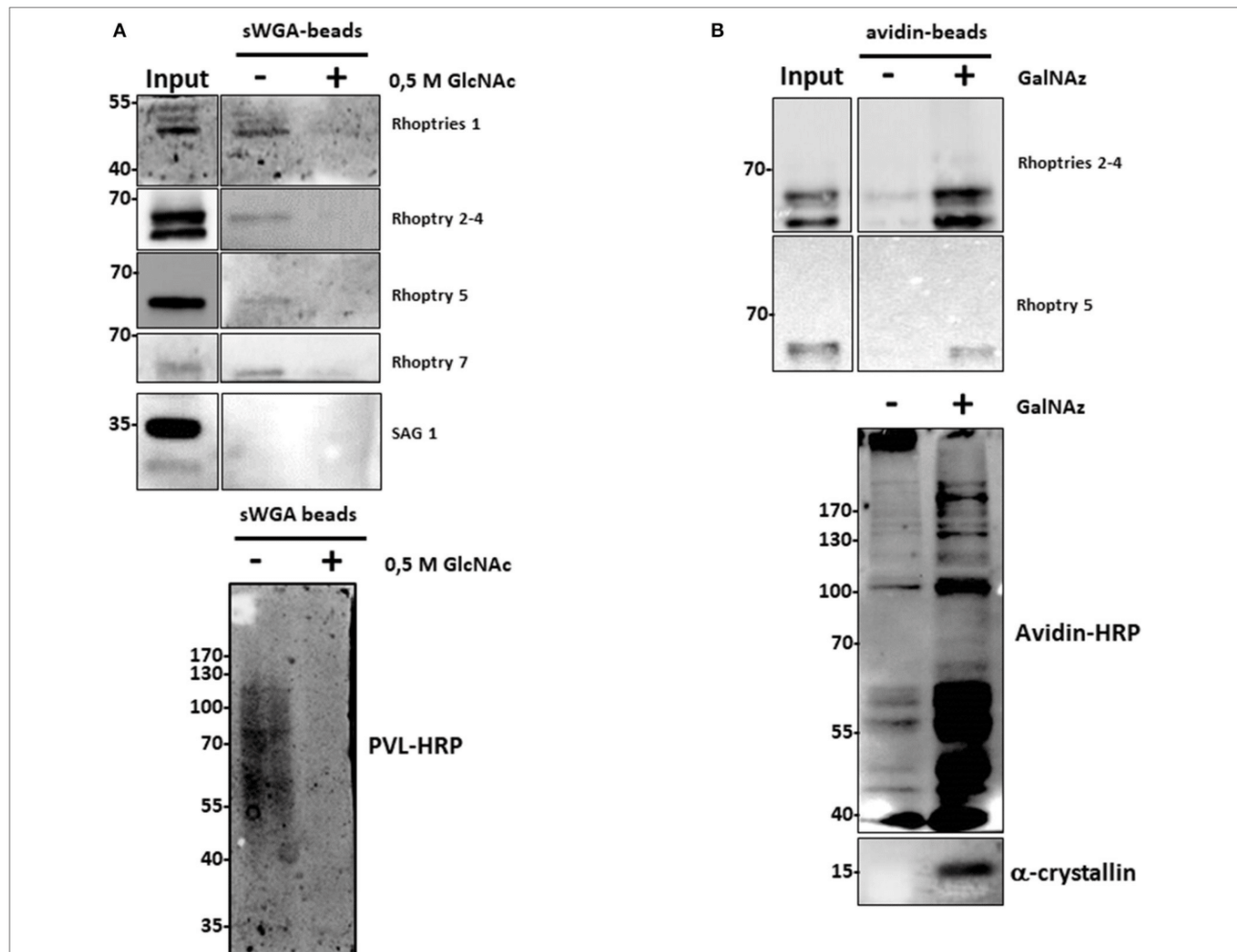


FIGURE 3 | (A) After enrichment on sWGA-beads as described in the materials and methods section, bound proteins were submitted to SDS-PAGE and Western blot. Membranes were probed with different anti-rhoptries antibodies, anti-SAG 1 antibody or with the lectin PVL-HRP. Specificity of PVL-HRP was confirmed by incubation in presence of free GlcNAc. **(B)** *T. gondii* proteins were enzymatically labeled with GalNAz and then chemically with avidin. Proteins were enriched by avidin-beads and samples were resolved by SDS-PAGE and western blotted. Membranes were probed with indicated anti-rhoptries antibodies. Control was performed by staining clicked-proteins with avidin-HRP. Alpha-crystallin was used as a control of labeling.

enrichment buffer (1% (v/v) Triton X-100 and 0.1% (w/v) SDS in PBS) was added to the sample before incubating with 50 μ L of avidin-coupled beads (1 h, 4°C). Avidin-bound proteins were collected, washed three times with enrichment buffer, resuspended in Laemmli buffer and boiled. Controls of labeling and enrichment followed the same procedure except that the chemical labeling with UDP-GalNAz was omitted.

Mass Spectrometry

Proteins from *T. gondii* were enriched using either sWGA as specified above or using the anti-O-GlcNAc antibody RL2 as described in Dehennaut et al. (18). Bound-proteins were resolved by SDS-PAGE and silver stained or Coomassie blue stained. Specific bands were excised from the gels. The pieces of gel were dehydrated using a 50:50 dilution of 50 mM

Ammonium Bicarbonate (Bic) (HPLC Grade, Prolabo) and Acetonitrile (ACN) (Sigma A) followed by 100% ACN. They were then reduced in 20 mM DTT (Sigma) in 50 mM Bic and alkylated in 100 mM iodoacetamide (Bio-Rad) in 50 mM Bic. After washes with ACN/Bic, the bands were digested with 100–200 ng Trypsin Gold (Promega) in 25 mM Bic. Extraction was done using 45% (v/v) ACN and 10% (v/v) formic acid (Sigma). Extracted peptides were purified using C₁₈-Zip-Tip cones using 0.1% (v/v) Formic Acid for washes and 50:50 ACN/0.1% (v/v) Formic Acid for elution. The nano-LC MS/MS analysis was performed on a HPLC system with two LC-20AD nano-flow LC pumps, an SIL-20 AC auto-sampler and an LC-20AB micro-flow LC pump (Shimadzu, Kyoto, Japan) connected to an ion-trap mass spectrometer (amaZon ETD, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipped with a Captive Spray ion source. Hystar (Version 3.2, Bruker Daltonics, Bremen,

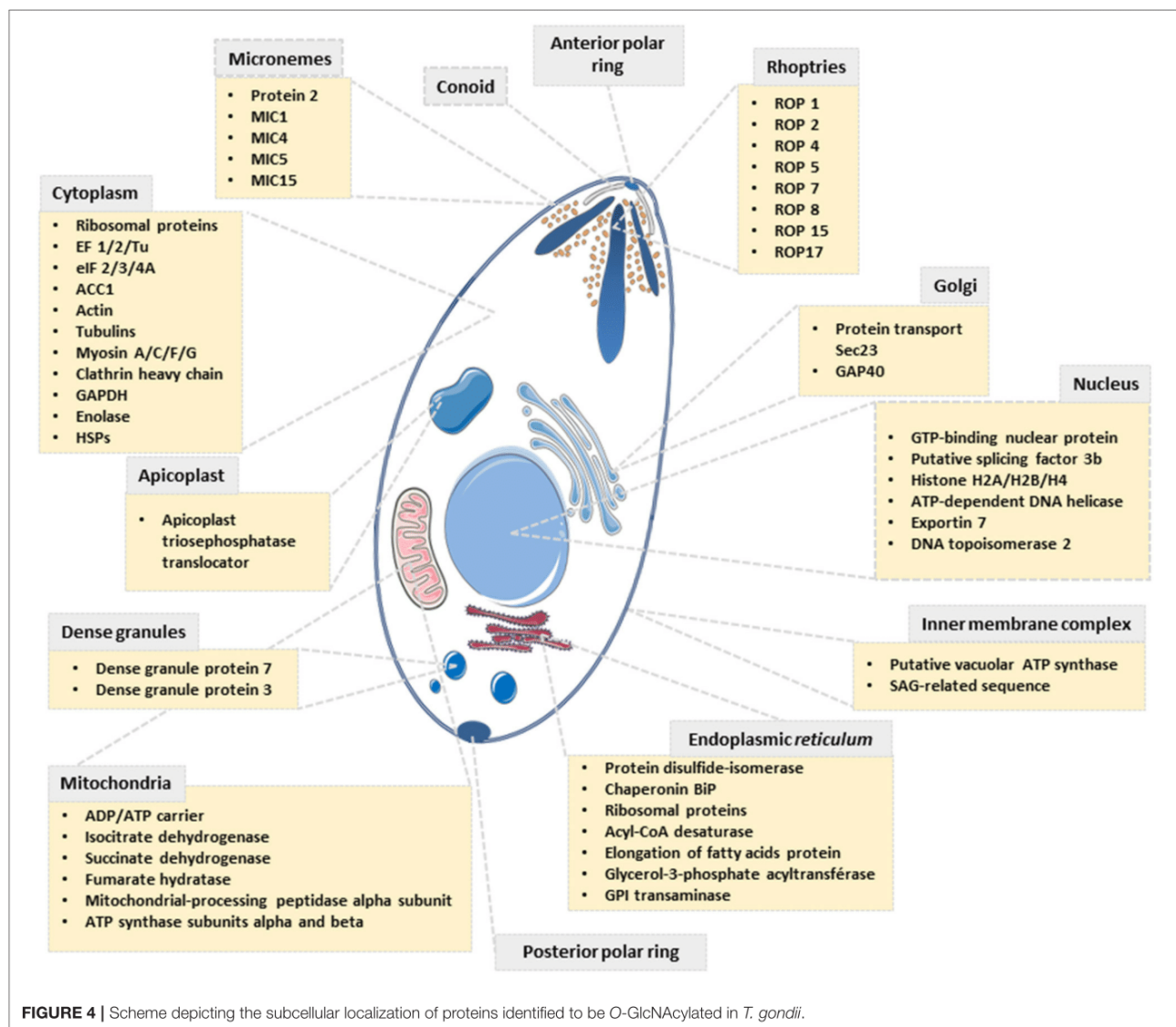


FIGURE 4 | Scheme depicting the subcellular localization of proteins identified to be O-GlcNAcylated in *T. gondii*.

Germany) was used to couple and control Shimadzu CBM-20A module (Shimadzu, Kyoto, Japan) for MS acquisition for all experiments.

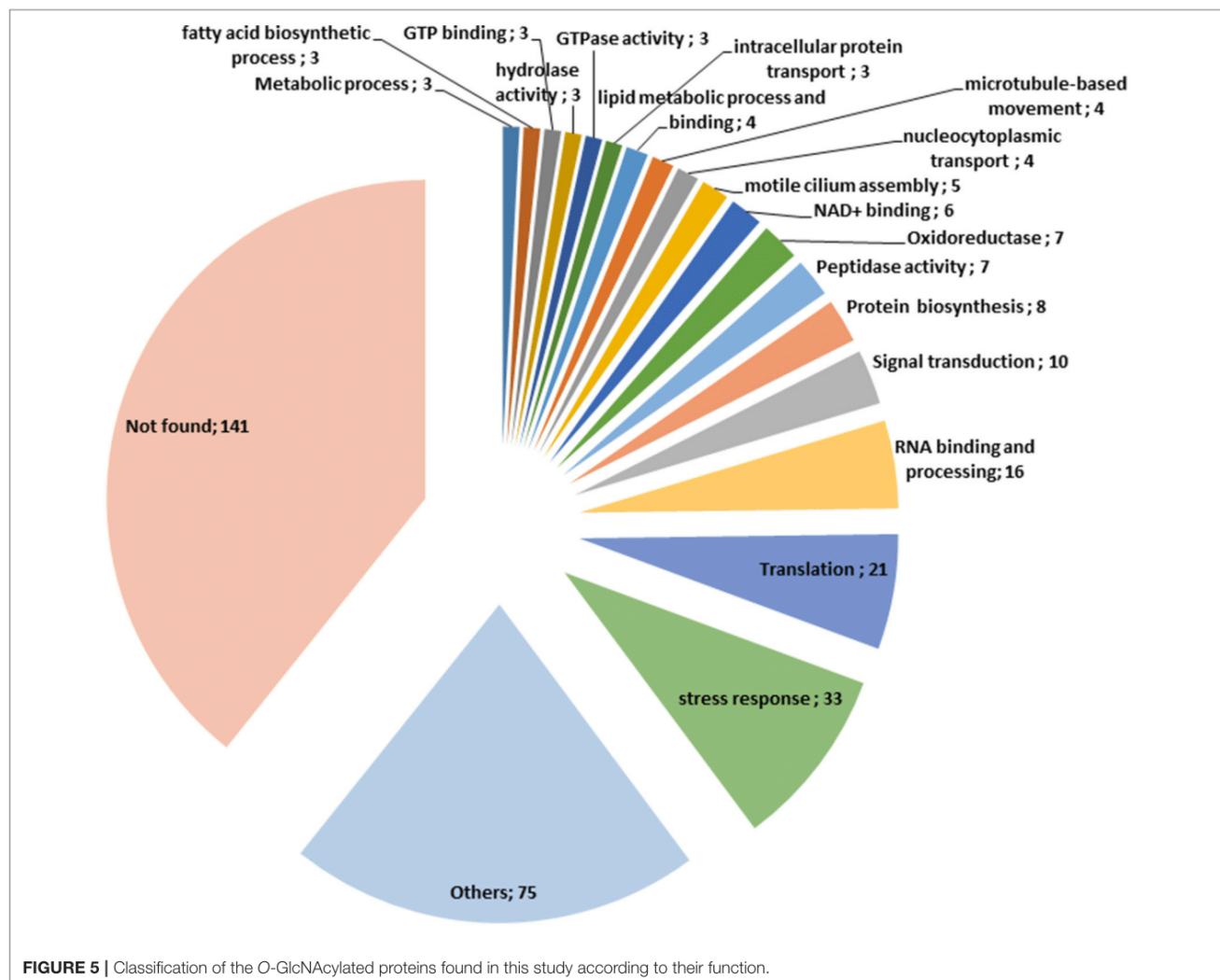
Trapping and desalting of the peptides was carried out on nano trapping column (Zorbax 300SB-C18, 5 μ m, 0.3 $\times$ 5 mm, Agilent) using 0.05% (v/v) trifluoroacetic acid solution for 10 min at a flow rate of 10 μ L/min. After back-flushing from the trapping column, peptides were separated on a reversed-phase column, ACQUITY UPLC[®] M-Class Peptide BEH C18 Column (1.7 μ m, 130 Å, 100 $\times$ 0.75 mm i.d., Waters) using an acetonitrile/0.1% (v/v) formic acid gradient from 15 to 50% (v/v) acetonitrile within 30 min. Fine tuning was achieved using the smart parameter setting (SPS) option for m/z 800, compound stability and trap drive level were set at 100%. Optimization of the Captive Spray source resulted in dry gas temperature, 150°C, dry gas, 3.0 L/min, capillary voltage, -1,200 V, end plate offset, 0 V. The MS1 and MS2 ion detection windows were set at m/z 100–1,700. The five highest no singly charged peaks in each MS1 spectrum were automatically fragmented through collision-induced dissociation (CID).

Data Processing

The LC-MS/MS data was analyzed using DataAnalysis 4.1 software (Bruker Daltonics) and the function Compound-sAutoMS(n) was used to generate 1,200 compound spectra. Generated data were exported as a mascot generic file. Protein identification through primary sequence database searching was performed using the MASCOT search algorithm (MASCOT free version; Matrix Science, London, UK). The following MASCOT settings were used: taxonomy: *Toxoplasma gondii*; database: SwissProt; enzyme: trypsin; fixed modifications: carbamidomethyl (C); variable modifications: oxidation (M, HW), deamidation (NQ), phosphorylation (ST), pyro-Glu (N-term E), and HexNAc (ST); maximum missed cleavages: 1; MS1 peptide tolerance: 0.6 Da; MS/MS tolerance: 0.6 Da.

Immunofluorescence Microscopy

Immuno-labeling of parasites was done in tube (solution) and then were observed on glass slides. Purified *T. gondii* were fixed in 3% (m/v) of paraformaldehyde in cold PBS for 15 min and subsequently washed with PBS. Unreacted aldehyde groups were



quenched with a solution of 50 mM ammonium chloride for 10 min. After several washes with PBS, cells were permeabilized with 0.1% (v/v) Triton-X100 for 5 min. Nonspecific sites were blocked with goat serum. *T. gondii* were then incubated for 30 min with a dilution of 1:100 in a 10% (v/v) goat serum solution (in PBS) of anti-O-GlcNAc antibodies (RL2), complemented or not with free GlcNAc. After 3 washes with PBS, parasites were incubated with fluorescein isothiocyanate (FITC) antibodies (dilution 1:50). *T. gondii* were visualized using an Axioplan 2 imaging microscope (Zeiss, Jena, Germany) and an Axio Cam HRC camera (AxioVision; Zeiss).

RESULTS

Visualization of the *Toxoplasma gondii* O-GlcNAcome

T. gondii used in this study were prepared by infecting either Vero cells or HFF (human foreskin fibroblasts). The absence of contamination of parasite preparations by host cells was unequivocally attested by microscopy examination and anti- α -tubulin staining (Figure 1A). α -tubulin is expressed in Vero cells, HFF and *T. gondii* but the difference of molecular weight observed between the two cell types and the parasite asserts that there was no contamination during *T. gondii* purification. Host cells and *T. gondii* proteins were also Coomassie brilliant blue stained and the different protein profiles compared (data not shown).

Distinct approaches based on antibodies, click-chemistry and lectin-beads enrichment were used to visualize the occurrence of O-GlcNAcylation in *T. gondii*. First, protein extracts prepared from parasites grown either in Vero or in HFF cells and resolved by SDS-PAGE and electrotransferred onto nitrocellulose membranes were stained with the anti-O-GlcNAc antibody RL2—originally raised against nuclear pore proteins (19) (Figure 1A). We found that the parasites display distinct O-GlcNAcylated proteins profiles, which differ from those of Vero or HFF cells indicating further absence of any cross-contamination by host cells. Incubation of the anti-O-GlcNAc antibody with 0.5 M of free N-acetylglucosamine abolished most of the signal, asserting the specificity of the reaction. O-GlcNAcylation was also detected by immunofluorescent microscopy by incubating the purified parasites with the RL2 antibodies alone or in conjunction with free GlcNAc, or with the secondary antibodies alone (Figure 1B).

Parasite protein extracts were enriched on sWGA-coupled beads (Figure 2A) or processed through a Click-chemistry procedure (Figure 2B). sWGA is the plant lectin WGA chemically modified with a succinyl group to prevent the lectin to bind to sialic acids. Therefore, when compared to unmodified WGA, sWGA interacts only with GlcNAc residues (20). sWGA was immobilized on beads and incubated with *T. gondii* extracts. After intensive washes (not shown), bound fractions were eluted, resolved by SDS-PAGE and brilliant blue stained as described in Kupferschmid et al. (15). Vero cells were processed according to

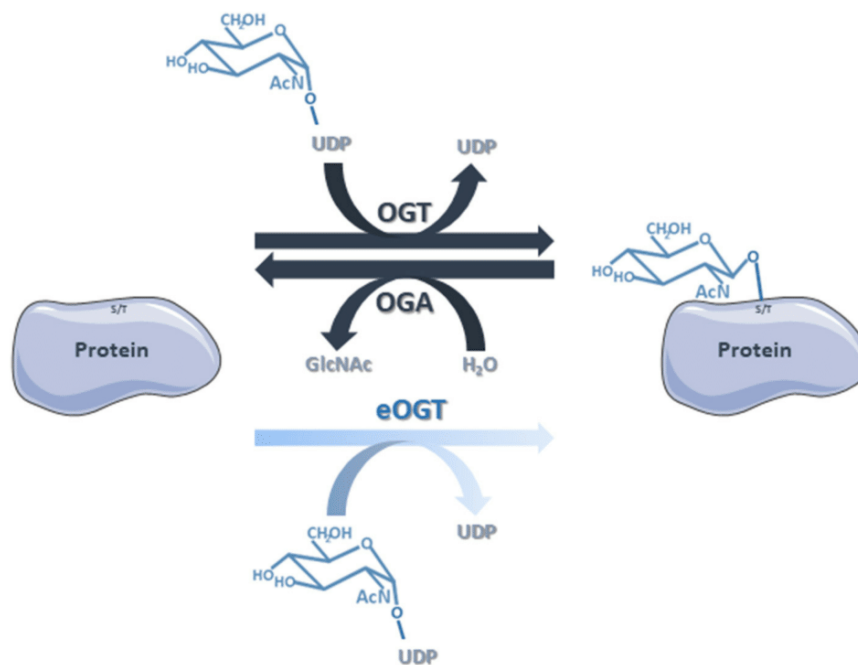


FIGURE 6 | The classical O-GlcNAcylation cycling is managed by OGT that transfers the GlcNAc group from the donor UDP-GlcNAc to the target proteins, and OGA that removes the residue by hydrolysis. Nevertheless, we do not rule out that some of the proteins identified in this study are substrates of eOGT. eOGT is located in the endoplasmic reticulum where it glycosylates secreted and membrane proteins, and is suggested to modify proteins confined within intracellular compartments. In contrast to O-GlcNAcylation driven by OGT/OGA, it is unlikely that eOGT-catalyzed O-GlcNAcylation is versatile.

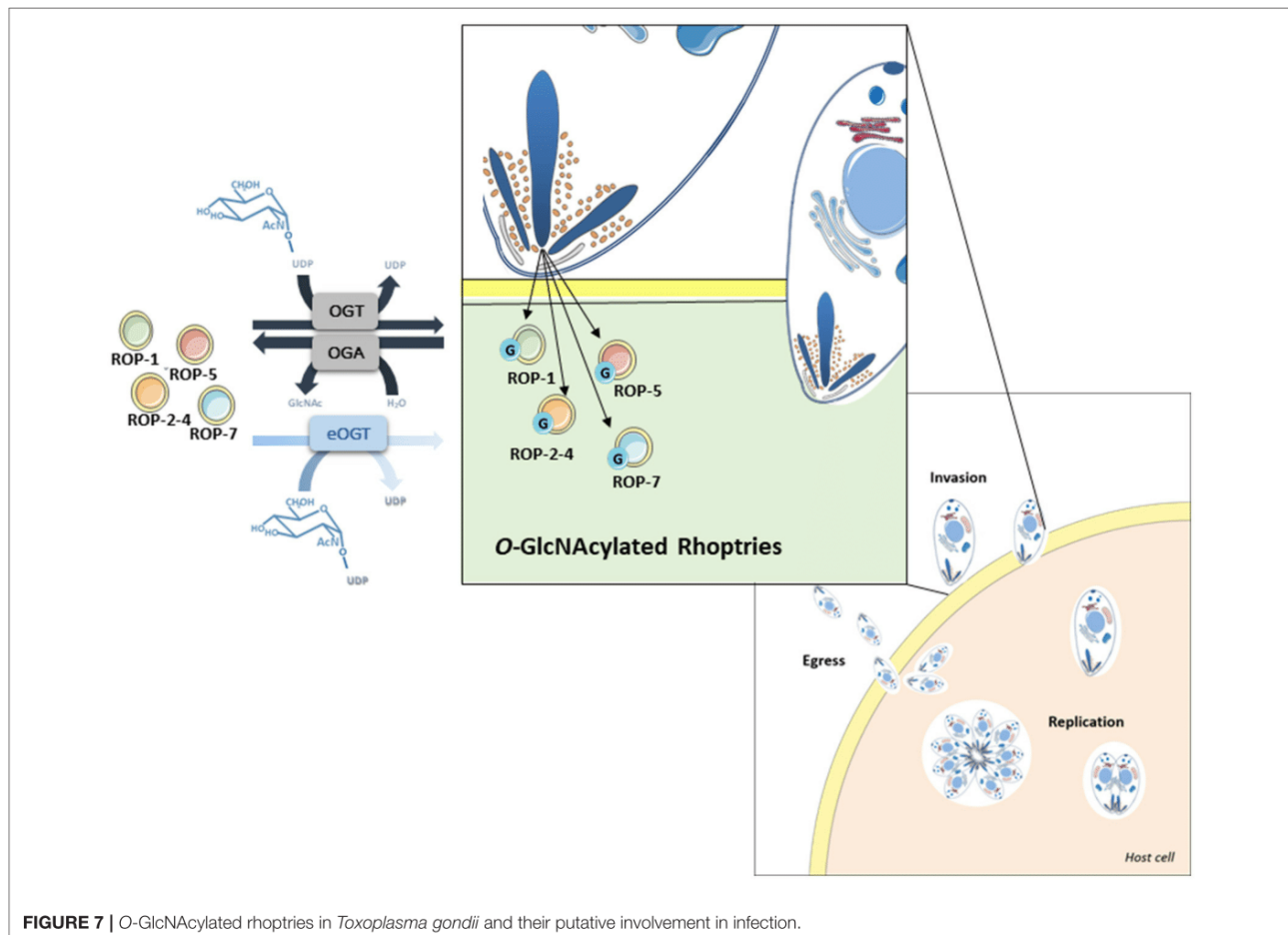
the same procedure and compared to parasites: distinct profiles of sWGA-bound proteins can be observed (**Figure 2A**). Regarding the Click-chemistry approach, we used the Click-iT™ system to biotin-label O-GlcNAcylated proteins. Clicked proteins were detected with avidin-labeled HRP (**Figure 2B**). This technique is highly sensitive as attested by the strong signal observed after staining the clicked-proteins with peroxidase-labeled avidin. A negative control, in which UDP-GalNAz has been omitted, was used to differentiate endogenous biotinylation from biotin-labeling. Nevertheless, GalNAz can be grafted to any terminal GlcNAc, therefore this approach alone is not sufficient to discriminate strictly O-GlcNAcylation. It is why it was necessary to combine distinct tools (anti-O-GlcNAc antibody, sWGA and click-chemistry) to confirm that *T. gondii*'s proteome is largely O-GlcNAcylated, and thus, like many other species, possesses its own O-GlcNAcome (**Figures 1, 2**) in accordance with previous reports (14, 21) RL2.

Exploration of *T. gondii*'s O-GlcNAcome by Two Independent Approaches

To increase the chance to identify O-GlcNAcylated proteins expressed in *T. gondii*, we conducted experiments through two distinct approaches. First, the anti-O-GlcNAc antibody

RL2 was used to enrich O-GlcNAcylated proteins, control experiment was done with non-immune immunoglobulin. The chemically modified plant lectin sWGA was used as a second approach. Bands of the proteins enriched using either the anti-O-GlcNAc antibody or sWGA were excised from the gels. Proteins were digested with trypsin and analyzed by tandem mass spectrometry as detailed in the materials and methods section. The protein identification was performed using the Mascot search engine against the SwissProt database restricted to *T. gondii* taxonomy. This allowed the identification of numerous proteins (**Supplementary Data Table 1**): 65.5% using sWGA and 34.5% using the anti-O-GlcNAc antibody, fifty proteins being identified by both approaches. Identified proteins can be classified according to their functions and take part in ribosome biogenesis, RNA binding and processing, intracellular transport, signal transduction, lipids metabolism, glycolysis, tricarboxylic acids cycle, organization of cytoskeleton, as well as many other cellular functions.

Surprisingly, several proteins involved in the infection process of *T. gondii*, called rhoptries, were identified by both approaches (sWGA and anti-O-GlcNAc antibodies). To confirm that rhoptries are indeed O-GlcNAcylated proteins, we tested antibodies specifically directed against this group of proteins



(Figure 3). Lysates from *T. gondii* were either enriched using sWGA-beads or processed through the click-chemistry approach followed by enrichment on avidin-beads, resolved by SDS-PAGE and analyzed by Western blot. Rhoptries 1, 2, 5, and 7, and rhoptries 2, 4, and 5 were recovered by sWGA (Figure 3A) or click-chemistry (Figure 3B) enrichment respectively. SAG 1 was used as a negative control since it is known that its glycans exhibit terminal mannose (22). These two methods associated to our proteomic analyses revealed the O-GlcNAcylation of rhoptries.

DISCUSSION

Since its discovery in the eighties (23, 24), O-GlcNAcylation has not ceased to arouse the interest of the scientific community. First due to its ubiquitous feature since it is widespread in a large panel of living beings, and secondly because it affects countless proteins, confined within the cytosolic, nuclear and mitochondrial compartments, involved in the regulation of many fundamental biological processes (3, 25). In a recent review, we came back on the different living organisms expressing their own OGT or hijacking the O-GlcNAcylation machinery of host cells (2), and stated that OGT emerged as a master regulator of cell homeostasis.

During the last years, O-GlcNAcomes of diverse biological models (cell lines, tissues, whole organisms) were explored (1, 15, 18, 25–29). However, very few studies have described *T. gondii*'s glycome and virtually none have investigated its O-GlcNAcome. *T. gondii* is an obligate intracellular parasite identified in 1908 in the North African rodent gundi (*Ctenodactylus gundi*) by Nicolle and Manceaux (30). Like other apicomplexans (*Plasmodium* and *Theileria*), *T. gondii* is responsible for debilitating diseases in humans and warm-blooded animals. The worldwide zoonosis toxoplasmosis is one of these major infectious diseases. In France, its seroprevalence in pregnant women is near 54% (31) and it is estimated that a third of human population is infected worldwide. In the majority of the cases, the infection has no serious consequences for immunocompetent patients; nevertheless, a reactivation of the latent parasite in immune compromised individuals may cause encephalitis. It is also noteworthy that cerebral toxoplasmosis is a major cause of morbidity and mortality among AIDS patients. Therefore, fighting the infection by *T. gondii* remains a major challenge to public health, and anything that can contribute to increase the current knowledge on the biology of the parasite can be considered as breakthroughs and opportunities to open novel therapeutic solutions.

Our proteomic analyses revealed the O-GlcNAcylation of many proteins involved in a large panel of biological functions (heat shock proteins, glycolytic enzymes, ribosomal proteins, actors of protein synthesis and lipid metabolism) (Figures 4, 5). Most of the O-GlcNAcyated proteins identified in this study were previously reported to be O-GlcNAc proteins in other models reinforcing the ubiquitous role of O-GlcNAcomes found in diverse species. More originally, we highlighted proteins involved in the infection process: rhoptries, microneme proteins and dense granules, all part of secretory organelles and characteristic of the motility of apicomplexans (Figure 4). The two former are

part of a specific apical complex that also includes a conoid that consists of tubulin fibers (32). Microneme proteins are synthesized by micronemes, specialized organelles involved in secretion, which support several key cellular processes such as invasion, motility and migration through host cells (33). Microneme proteins are first released during infection followed, thereafter, by a second wave of secretion that involves rhoptry proteins. Rhoptry proteins are trafficked from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus, and then are addressed to secretory organelles. Therefore, it cannot be rule out that O-GlcNAcylation of rhoptries is performed by EOGT—for EGF (Epidermal Growth Factor) domain-specific OGT (34)—that controls a second form of O-GlcNAcylation affecting proteins of the secretory pathway (extracellular matrix proteins, extracellular region of transmembrane proteins) such as Notch receptors (Figure 6). A default in the activity of EOGT is responsible for the rare congenital disorder Adams-Oliver syndrome (35). Previously, two independent studies have reported glycosylation of rhoptries (21, 36) by conducting different strategies. Luo and collaborators used a combination of lectins (ConA, WGA and Jacalin) to identify 132 glycoproteins among which rhoptries and microneme proteins (36). Later, *T. gondii*'s glycoproteome has been investigated by the use of unnatural sugars through a bioorthogonal chemical reporter strategy (21). The function of the glycosylation of rhoptries (Figure 7) and micronemes in the infection remains unknown, but it should be of interest to determine whether interfering with their O-GlcNAcylation reduces motility and invasion of *T. gondii*.

O-GlcNAcylation levels correlate with nutrients status of the cell. UDP-GlcNAc, the substrate of OGT, is at the crossroad of many metabolic pathways (2). Diet may then affect the ability of *T. gondii* to infect host cells and further investigation on whether infectious process of the parasite depends on O-GlcNAcylation and/or nutrient is of great interest. It remains also to determine in a near future whether O-GlcNAcylation cycling regulates the fate of rhoptry proteins at the expression and degradation levels. Also, it is now well recognized that O-GlcNAcylation, like other PTMs, controls protein-protein interactions (1, 7) and the impact of O-GlcNAcylation dynamics on biogenesis of rhoptry organelle remains to be investigated.

This paper provides a large-scale analysis of putative *T. gondii*'s O-GlcNAcome. Understanding the role of the glycosylation of these proteins may help to elucidate mechanisms involved in invasion and cell life cycle (Figure 7), which would lead to improve drug therapy as well as to identify glycoproteins that may prove to be useful as therapeutic targets.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MA-G, YP-C, RS, and TL developed the hypotheses. MA-G performed most of the biochemical experiments and interpreted the data. MK and MM performed experiments and gave important technical training to MA-G. SH gave important advices and help experimenting. HS-E and JS contributed to the culture of *T. gondii*. J-FD produced and provided antibodies against rhoptries. NY, FK, FB, and CR performed the mass

spectroscopic analysis and provided the resulting data. TL, RS, EP, and YP-C initiated the project. MA-G, J-FD, YP-C, EZ, RS, and TL analyzed the results. TL drafted the manuscript. All authors contributed to refining the manuscript, read and approved the final version.

ACKNOWLEDGMENTS

MA-G is holding a fellowship of CONACyT from the government of Mexico. MK was holding a fellowship of the German Centre for Infection Research (DZIF) and acknowledges support for his stay at the University of Lille by a fellowship of the ERASMUS Program of the EU. The authors thank the University of Lille and the Centre National de la Recherche Scientifique,

for their financial support. The investigations were supported by CNRS, University of Lille, SFR 3688 FRABio and PAGés. RS and MK thank Prof. S. Becker for his interest and support. The authors thank Mrs. Anja Heiner for helping with the culturing of cells.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2018.00450/full#supplementary-material>

Supplementary Data Table 1 | List of the proteins identified in this study.

Proteins identified by enrichment with sWGA are in green, and by enrichment with RL2 are in pink.

REFERENCES

- Vercoutter-Edouart A-S, Yazidi-belkoura I El, Baldini S, Mir A, Steenackers A, Dehennaut V, et al. Detection and identification of O-GlcNAcylated proteins by proteomic approaches. *Proteomics* (2015) 15:1039–50. doi: 10.1002/pmic.201400326
- Aquino-Gil M, Pierce A, Perez-Cervera Y, Zenteno E, Lefebvre T. OGT: a short overview of an enzyme standing out from usual glycosyltransferases. *Biochem Soc Trans.* (2017) 45:365–70. doi: 10.1042/BST20160404
- Yang X, Qian K. Protein O-GlcNAcylation: emerging mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (2017) 18:452–65. doi: 10.1038/nrm.2017.22
- Machacek M, Slawson C, Fields PE. O-GlcNAc: a novel regulator of immunometabolism. *J Bioenerg Biomembr.* (2018) 50:223–9. doi: 10.1007/s10863-018-9744-1
- Bacigalupa ZA, Bhadiadra CH, Reginato MJ. O-GlcNAcylation: key regulator of glycolytic pathways. *J Bioenerg Biomembr.* (2018) 50:189–90. doi: 10.1007/s10863-018-9742-3
- Leturcq M, Lefebvre T, Vercoutter-Edouart AS. O-GlcNAcylation and chromatin remodeling in mammals: an up-to-date overview. *Biochem Soc Trans.* (2017) 45:323–38. doi: 10.1042/BST20160388
- Tarbet HJ, Toleman CA, Boyce M. A sweet embrace: control of protein-protein interactions by O-linked β -N-acetylglucosamine. *Biochemistry* (2018) 57:13–21. doi: 10.1021/acs.biochem.7b00871
- Kötzler MP, Withers SG. Proteolytic cleavage driven by glycosylation. *J Biol Chem.* (2016) 291:429–34.
- Lazarus MB, Jiang J, Kapuria V, Bhuiyan T, Janetzko J, Zandberg WF, et al. HCF-1 is cleaved in the active site of O-GlcNAc transferase. *Science* (2013) 342:1235–9. doi: 10.1126/science.1243990
- Lefebvre T, Dehennaut V, Guinez C, Olivier S, Drougat L, Mir AM, et al. Dysregulation of the nutrient/stress sensor O-GlcNAcylation is involved in the etiology of cardiovascular disorders, type-2 diabetes and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* (2010) 1800:67–79. doi: 10.1016/j.bbagen.2009.08.008
- Dieckmann-Schuppert A, Bause E, Schwarz RT. Studies on O-glycans of *Plasmodium-falciparum*-infected human erythrocytes evidence for O-GlcNAc and O-GlcNAc-transferase in malaria parasites. *Eur J Biochem.* (1993) 216:779–88.
- Hoessli DC, Poincelot M, Gupta R, Ilangumaran S, Nasir-ud-Din. *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1: GLYCOSYLATION and localization to low-density, detergent-resistant membranes in the parasitized erythrocyte. *Eur J Biochem.* (2003) 270:366–75. doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03397.x
- Banerjee S, Robbins PW, Samuelson J. Molecular characterization of nucleocytosolic O-GlcNAc transferases of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum*. *Glycobiology* (2009) 19:331–6. doi: 10.1093/glycob/cwn107
- Perez-Cervera Y, Harichaux G, Schmidt J, Debierre-Grockiego F, Dehennaut V, Bieker U, et al. Direct evidence of O-GlcNAcylation in the apicomplexan *Toxoplasma gondii*: a biochemical and bioinformatic study. *Amino Acids* (2011) 40:847–56. doi: 10.1007/s00726-010-0702-4
- Kupferschmid M, Aquino-Gil MO, Shams-Eldin H, Schmidt J, Yamakawa N, Krzewinski F, et al. Identification of O-GlcNAcylated proteins in *Plasmodium falciparum*. *Malar J.* (2017) 16:1–11. doi: 10.1186/s12936-017-2131-2
- Grimwood BG, Hechemy K, Stevens ROYW. *Toxoplasma gondii*: purification of trophozoites propagated in cell culture. *Exp Parasitol.* (1979) 286:282–6.
- Machon O, Baldini SF, Ribeiro JP, Steenackers A, Varrot A, Lefebvre T, et al. Recombinant fungal lectin as a new tool to investigate O-GlcNAcylation processes. *Glycobiology* (2017) 27:123–8. doi: 10.1093/glycob/cww105
- Dehennaut V, Slomianny MC, Page A, Vercoutter-Edouart AS, Jessus C, Michalski JC, et al. Identification of structural and functional O-linked N-acetylglucosamine-bearing proteins in xenopus laevis oocyte. *Mol Cell Proteomics* (2008) 7:2229–45. doi: 10.1074/mcp.M700494-MCP200
- Snow CM, Senior A, Gerace L. Monoclonal antibodies identify a group of nuclear pore complex glycoproteins. *J Cell Biol.* (1987) 104:1143–56.
- Monsigny M, Sene C, Obrenovitch A, Roche AC, Delmotte F, Boschetti E. Properties of succinylated wheat germ agglutinin. *Eur J Biochem.* (1979) 98:39–45.
- Nazarova LA, Ochoa RJ, Jones KA, Morrisette NS, Prescher JA. Extracellular *Toxoplasma gondii* tachyzoites metabolize and incorporate unnatural sugars into cellular proteins. *Microbes Infect.* (2016) 18:199–210. doi: 10.1016/j.micinf.2015.11.004
- Zinecker CF, Striepen B, Geyer H, Geyer R, Dubremetz JF, Schwarz RT. Two glycoforms are present in the GPI-membrane anchor of the surface antigen 1 (P30) of *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol.* (2001) 116:127–35. doi: 10.1016/S0166-6851(01)00313-9
- Torres CR, Hart GW. Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. evidence for O-linked GlcNAc. *J Biol Chem* (1984) 259:3308–17.
- Hanover JA, Cohen CK, Willingham MC, Park MK. O-linked N-acetylglucosamine is attached to proteins of the nuclear pore. Evidence for cytoplasmic and nucleoplasmic glycoproteins. *J Biol Chem.* (1987) 262:9887–94.
- Ma J, Hart GW. O-GlcNAc profiling : from proteins to proteomes. *Clin Proteomics* (2014) 11:1–16. doi: 10.1186/1559-0275-11-8
- Cieniewski-Bernard C, Bastide B, Lefebvre T, Lemoine J, Mounier Y, Michalski J-C. Identification of O-linked N-acetylglucosamine proteins in rat skeletal muscle using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* (2004) 3:577–85. doi: 10.1074/mcp.M400024-MCP200
- Gurcel C, Vercoutter-Edouart AS, Fonbonne C, Mortuaire M, Salvador A, Michalski JC, et al. Identification of new O-GlcNAc modified proteins using a click-chemistry-based tagging. *Anal Bioanal Chem.* (2008) 390:2089–97. doi: 10.1007/s00216-008-1950-y
- Xu SL, Chalkley RJ, Maynard JC, Wang W, Ni W, Jiang X, et al. Proteomic analysis reveals O-GlcNAc modification on proteins with key regulatory functions in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2017) 114:E1536–43. doi: 10.1073/pnas.1610452114

29. Woo CM, Lund PJ, Huang AC, Davis MM, Bertozzi CR, Pitteri S. Mapping and quantification of over 2,000 O-linked glycopeptides in activated human T cells with isotope-targeted glycoproteomics (IsoTaG). *Mol Cell Proteomics* (2018) 17:764–75. doi: 10.1074/mcp.RA117.000261
30. Nicolle C, Manceaux L. Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondii. *Comptes Rendus Acad des Sci.* (1908) 147:763–6.
31. Flegr J, Prandota J, Sovičková M, Israili ZH. Toxoplasmosis - A global threat. Correlation of latent toxoplasmosis with specific disease burden in a set of 88 countries. *PLoS ONE* (2014) 9:e90203. doi: 10.1371/journal.pone.0090203
32. Mueller C, Klages N, Jacot D, Santos JM, Cabrera A, Gilberger TW, et al. The toxoplasma protein ARO mediates the apical positioning of rhoptry organelles, a prerequisite for host cell invasion. *Cell Host Microbe*. (2013) 13:289–301. doi: 10.1016/j.chom.2013.02.001
33. Liu Q, Li FC, Zhou CX, Zhu XQ. Research advances in interactions related to *Toxoplasma gondii* microneme proteins. *Exp Parasitol*. (2017) 176:89–98. doi: 10.1016/j.exppara.2017.03.001
34. Sakaidani Y, Nomura T, Matsuura A, Ito M, Suzuki E, Murakami K, et al. O-linked-N-acetylglucosamine on extracellular protein domains mediates epithelial cell-matrix interactions. *Nat Commun*. (2011) 2:583. doi: 10.1038/ncomms1591
35. Shaheen R, Aglan M, Keppler-Noreuil K, Faqih E, Ansari S, Horton K, et al. Mutations in EOGT confirm the genetic heterogeneity of autosomal-recessive Adams-Oliver syndrome. *Am J Hum Genet.* (2013) 92:598–604. doi: 10.1016/j.ajhg.2013.02.012
36. Luo Q, Upadhyay R, Zhang H, Madrid-Aliste C, Nieves E, Kim K, et al. Analysis of the glycoproteome of *Toxoplasma gondii* using lectin affinity chromatography and tandem mass spectrometry. *Microbes Infect.* (2011) 13:1199–210. doi: 10.1016/j.micinf.2011.08.013

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Aquino-Gil, Kupferschmid, Shams-Eldin, Schmidt, Yamakawa, Mortuaire, Krzewinski, Hardivillé, Zenteno, Rolando, Bray, Pérez Campos, Dubremetz, Perez-Cervera, Schwarz and Lefebvre. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Annexe 4. Liste des protéines identifiées chez *Toxoplasma gondii* par deux différentes méthodes, enrichissement par la SWGA (vert) et par l'immunoprécipitation avec l'anticorps anti-O-GlcNAc (RL2)

No.	Protein name (accession number)	Log Prob	Best Log Prob	Best score	Total Intensity	# of spectra	# of unique peptides	# of mod peptides	Coverage %	# AA's in protein	Protein DB number	MW (Da)
1	14-3-3 protein (>tr B9Q0N7 B9Q0N7_TOXGV)	1.04	0.91	352.70	668878.5	8	1	0	2.17	323	539	37,174
2	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase, putative (>tr B9PPK8 B9PPK8_TOXGV)	13.31	5.04	397.10	512994.9	7	5	0	26.33	281	3355	31,851
3	28 kDa antigen (>tr B9Q8A2 B9Q8A2_TOXGV)	0.62	0.57	194.30	131887.4	2	2	0	11.89	185	2158	19,843
4	28 kDa antigen (>tr B9Q8A2 B9Q8A2_TOXGV)	15.68	8.69	751.80	#####	34	8	3	25.95	185	2158	19,843
5	2-oxoglutarate dehydrogenase, putative (>tr A0A125YT5 A0A125YT5_TOXGV)	29.88	5.01	467.30	#####	17	16	0	20.88	1116	1122	124,251
6	2-oxoglutarate dehydrogenase, putative (>tr A0A125YT5 A0A125YT5_TOXGV)	1.49	1.33	217.40	489446.9	4	4	0	4.75	1116	1122	124,251
7	3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase (>tr B9PT27 B9PT27_TOXGV)	0.66	0.27	338.10	#####	4	4	0	8.93	347	8030	40,102
8	40S ribosomal protein S11, putative (>tr B9PMU7 B9PMU7_TOXGV)	10.16	4.28	496.20	617953.8	8	8	0	45.96	161	2455	18,677
9	40S ribosomal protein S14, putative (>tr A0A125YXW4 A0A125YXW4_TOXGV)	2.92	2.64	298.40	167744.4	3	3	0	27.56	156	3767	16,302
10	40S ribosomal protein S2, putative (>tr B9PZF2 B9PZF2_TOXGV)	7.09	3.33	428.50	#####	18	9	2	28.25	269	15	29,336
11	40S ribosomal protein S24 (>tr A0A125YKH1 A0A125YKH1_TOXGV)	6.29	6.15	565.30	471903.5	8	1	0	4.87	267	4807	30,375
12	40S ribosomal protein S3a (>tr B9PGG2 B9PGG2_TOXGV)	20.83	7.76	556.90	#####	18	9	1	29.73	259	2869	29,371
13	40S ribosomal protein S3a (>tr B9PGG2 B9PGG2_TOXGV)	1.80	1.81	239.40	143579.7	1	1	0	4.25	259	2869	29,371
14	40S ribosomal protein S4 (>tr B9PXE4 B9PXE4_TOXGV)	26.70	5.79	576.60	#####	46	22	4	51.92	312	3770	35,507
15	40S ribosomal protein S4 (>tr B9PXE4 B9PXE4_TOXGV)	26.94	7.07	662.20	#####	31	17	3	37.18	312	3770	35,507
16	40S ribosomal protein S6 (>tr B9PVR5 B9PVR5_TOXGV)	43.32	9.59	703.80	#####	60	20	4	47.27	256	2391	28,956
17	40S ribosomal protein S8 (>tr B6KGK3 B6KGK3_TOXGV)	15.91	6.15	568.90	#####	23	6	1	35.12	205	2734	23,561
18	40S ribosomal protein S8 (>tr B6KGK3 B6KGK3_TOXGV)	11.15	4.45	396.50	606425.1	9	6	0	33.66	205	2734	23,561
19	60S ribosomal protein L10, putative (>tr B9PTX0 B9PTX0_TOXGV)	2.28	2.29	271.20	43567.0	1	1	0	5.43	221	4700	24,801
20	60S ribosomal protein L13a, putative (>tr B9PT75 B9PT75_TOXGV)	3.76	2.27	320.90	340075.4	4	4	0	18.18	286	995	32,749
21	60S ribosomal protein L17, putative (>tr B9Q363 B9Q363_TOXGV)	2.81	2.81	339.70	253658.8	2	2	1	12.31	195	3777	22,269
22	60S ribosomal protein L23, putative (>tr B9PK53 B9PK53_TOXGV)	7.27	4.46	389.20	366094.5	4	4	0	29.50	139	816	14,818
23	60S ribosomal protein L7a, putative (>tr B9PKF7 B9PKF7_TOXGV)	7.33	4.56	433.30	452172.8	4	4	0	11.59	276	1610	31,032
24	60S ribosomal protein L7a, putative (>tr B9PKF7 B9PKF7_TOXGV)	2.84	2.53	286.40	#####	18	1	0	2.90	276	1610	31,032
25	60S ribosomal protein L8, putative (>tr B9PU56 B9PU56_TOXGV)	27.17	8.38	660.40	#####	42	13	2	40.00	260	3690	28,255
26	AAA domain protein (>tr V4Z9I7 V4Z9I7_TOXGV)	0.95	0.76	363.40	#####	15	1	0	0.47	1487	5770	157,620
27	Acetyl-CoA carboxylase ACC1 (>tr B9QH60 B9QH60_TOXGV)	8.00	3.93	405.20	377661.2	6	6	0	2.68	2612	5632	287,579
28	Acetyl-coenzyme A synthetase (>tr A0A125YT22 A0A125YT22_TOXGV)	4.08	2.68	313.50	114198.7	2	2	0	3.78	714	4746	79,991
29	Acid phosphatase GAP50 (>tr A0A0F7VDV9 A0A0F7VDV9_TOXGV)	3.80	3.63	381.60	103141.1	3	3	0	9.05	431	3171	46,607
30	Acid phosphatase GAP50 (>tr A0A0F7VDV9 A0A0F7VDV9_TOXGV)	21.26	5.98	528.30	#####	7	7	1	19.03	431	3171	46,607
31	Actin (>tr A0A0F7UTC9 A0A0F7UTC9_TOXGV)	5.22	4.96	414.20	853040.8	15	1	0	4.79	376	3114	41,908
32	Actin (>tr A0A0F7UTC9 A0A0F7UTC9_TOXGV)	6.03	5.76	533.00	#####	15	1	0	4.79	376	3114	41,908
33	Adenosylhomocysteinase (>tr V4ZBD9 V4ZBD9_TOXGV)	1.10	0.91	200.70	70275.9	2	2	0	4.76	588	8156	64,085
34	Adenosylhomocysteinase (>tr V4ZBD9 V4ZBD9_TOXGV)	6.17	5.04	469.30	208646.9	2	2	0	4.93	588	8156	64,085
35	Adenylate and guanylate cyclase catalytic domain-containing protein (>tr V4Z8G0 V4Z8G0_TOXGV)	1.07	0.67	217.60	164749.8	4	4	0	1.24	4367	293	
36	Adenylate kinase, putative (>tr B9PM93 B9PM93_TOXGV)	2.50	2.23	338.40	517123.7	8	5	0	22.96	257	988	28,561
37	Adenylate kinase associated protein (>tr B9PJM1 B9PJM1_TOXGV)	1.17	0.97	192.70	336377.4	3	3	0	16.26	203	2898	22,484
38	Adenylate kinase associated protein (>tr B9PJM1 B9PJM1_TOXGV)	7.63	5.11	389.00	495750.4	4	2	0	10.84	203	2898	22,484
39	ADP/ATP carrier, putative (>tr B9PRA8 B9PRA8_TOXGV)	39.81	5.69	524.90	#####	23	15	4	45.28	318	40	35,256
40	ADP/ATP carrier, putative (>tr B9PRA8 B9PRA8_TOXGV)	52.79	6.68	643.90	#####	61	22	4	53.46	318	40	35,256
41	AGC kinase (>tr B9PMK9 B9PMK9_TOXGV)	2.15	1.53	323.60	524927.4	4	3	0	7.58	343	341	39,411
42	AGC kinase TgPKG1 (>tr B6K8K4 B6K8K4_TOXGV)	7.16	2.80	384.80	307787.3	6	6	0	6.74	994	126	111,242
43	Aldehyde dehydrogenase (NAD) family protein (>Reverse >tr A0A125YVI3 A0A125YVI3_TOXGV)	0.85	0.67	331.50	#####	12	1	0	1.10	637	14264	
44	Amidohydrolase domain-containing protein (>tr A0A125YWW1 A0A125YWW1_TOXGV)	2.53	2.51	380.10	#####	2	2	1	3.89	514	353	55,117
45	Aminoalcoholphosphotransferase, putative (>tr B6K801 B6K801_TOXGV)	0.86	0.88	233.50	64005.7	1	1	0	2.78	467	920	

46	AMP-binding enzyme domain-containing protein (>Reverse >tr V4ZF64 V4ZF64_TOXGV)	2.36	2.02	228.30	#####	19	2	0	0.49	3265	16689	
47	AP2 domain transcription factor AP2Vila-7 (>Reverse >tr B9QFW3 B9QFW3_TOXGV)	0.62	0.26	209.90	#####	29	1	0	0.35	3112	12012	
48	Apicoplast triosephosphate translocator APT1 (>tr A0A0F7V2H9 A0A0F7V2H9_TOXGV)	1.10	0.85	193.30	586562.2	2	2	0	9.09	352	833	
49	Arginine decarboxylase (>tr B9QPQ2 B9QPQ2_TOXGV)	1.90	1.82	290.10	251564.1	3	2	0	1.71	1225	2218	135,674
50	Asparaginyl-tRNA synthetase (NOB+tRNA synthase) (>tr B9Q605 B9Q605_TOXGV)	2.84	2.70	294.20	620684.5	5	5	1	7.40	676	4663	74,931
51	ATP synthase subunit alpha (>tr V5BCJ1 V5BCJ1_TOXGV)	35.76	5.71	547.20	#####	40	18	0	30.85	577	8088	62,077
52	ATP synthase subunit alpha (>tr V5BCJ1 V5BCJ1_TOXGV)	4.40	3.76	297.80	658657.8	6	3	0	5.03	577	8088	62,077
53	ATP synthase subunit beta (>tr A0A0F7UVN4 A0A0F7UVN4_TOXGV)	54.25	10.51	775.60	#####	29	14	1	35.00	560	1425	59,917
54	ATPase, AAA family domain-containing protein (>tr B6KM09 B6KM09_TOXGV)	3.47	1.25	293.40	798453.7	9	9	1	15.99	588	1563	66,807
55	ATP-dependent DNA helicase, RecQ family protein (>tr B6KRA7 B6KRA7_TOXGV)	2.30	1.52	265.90	757651.3	14	2	1	0.55	1626	916	175,307
56	ATP-dependent DNA helicase, RecQ family protein (>tr B6KRA7 B6KRA7_TOXGV)	2.17	1.67	342.50	#####	27	2	1	0.55	1626	916	175,307
57	ATP-dependent RNA helicase, putative (>tr B6K8Y9 B6K8Y9_TOXGV)	20.30	5.73	545.60	#####	11	9	0	22.11	475	2184	53,434
58	ATP-dependent RNA helicase, putative (>tr B6K8Y9 B6K8Y9_TOXGV)	15.93	5.61	504.00	#####	15	10	1	19.79	475	2184	53,434
59	ATP-dependent RNA helicase, putative (>tr B9Q0C6 B9Q0C6_TOXGV)	17.26	8.38	665.20	#####	9	7	1	17.28	434	665	49,114
60	Branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase E1 component beta chain, putative (>tr B9PIV3 B9PIV3_TOXGV)	4.55	4.58	366.00	150249.7	1	1	0	5.20	423	658	45,599
61	CAAX metallo endopeptidase (Fragment) (>tr V4YPG9 V4YPG9_TOXGV)	2.65	2.53	360.90	350958.8	3	2	0	9.50	200	6100	23,208
62	CAAX metallo endopeptidase (Fragment) (>tr V5B2X9 V5B2X9_TOXGV)	4.43	3.18	522.50	508364.6	4	2	0	8.62	232	6985	26,229
63	Calcium-dependent protein kinase CDPK1 (>tr A0A125YH31 A0A125YH31_TOXGV)	9.72	2.89	429.30	790762.8	6	5	0	11.00	582	5178	65,421
64	Calcium-transporting ATPase, putative (>tr B6KID0 B6KID0_TOXGV)	10.71	4.86	352.00	291189.4	6	5	0	6.13	1093	996	118,877
65	CAM kinase, CDPK family TgCDPK1_2 (TGTPK4) (>tr A0A0F7V4V1 A0A0F7V4V1_TOXGV)	2.27	2.27	342.20	174755.3	2	1	0	2.23	537	605	60,430
66	cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit (>tr A0A0F7UTU3 A0A0F7UTU3_TOXGV)	0.95	0.67	316.00	479420.1	4	4	0	10.13	385	4365	42,796
67	CASC3/barentsz eIF4AIII-binding protein (>tr B6KJ68 B6KJ68_TOXGV)	0.72	0.71	256.90	553314.6	2	1	0	1.96	409	3305	44,843
68	Cation channel family transporter (>tr B9PWQ2 B9PWQ2_TOXGV)	5.26	4.91	398.80	108577.7	2	2	0	18.70	230	1273	25,352
69	CBF/Mak21 family protein (>tr A0A125YUK5 A0A125YUK5_TOXGV)	4.54	3.67	357.80	445849.4	4	4	0	3.38	1359	4514	148,847
70	Centromere/microtubule binding protein, putative (>tr B9PZG9 B9PZG9_TOXGV)	11.09	4.42	307.90	#####	10	10	0	19.80	505	551	56,744
71	Chaperonin protein BiP (>tr A0A0F7V8D8 A0A0F7V8D8_TOXGV)	39.73	6.98	581.90	#####	38	25	4	36.23	668	3078	73,253
72	Chaperonin protein BiP (>tr A0A0F7V8D8 A0A0F7V8D8_TOXGV)	13.92	5.20	422.20	351079.7	6	4	0	8.08	668	3078	73,253
73	Clathrin heavy chain (>tr B9PTE8 B9PTE8_TOXGV)	94.56	7.14	666.80	#####	77	47	3	28.08	1731	2735	194,476
74	Clathrin heavy chain (>tr B9PTE8 B9PTE8_TOXGV)	5.14	2.50	275.80	756016.7	7	6	0	3.99	1731	2735	194,476
75	Cleft lip and palate transmembrane protein 1 (Clptm1) (>tr B6KVA6 B6KVA6_TOXGV)	5.86	3.74	382.50	348783.5	5	4	0	6.46	619	1684	71,269
76	Cleft lip and palate transmembrane protein 1 (Clptm1) protein (>tr V4YYT6 V4YYT6_TOXGV)	2.58	0.92	286.50	657172.3	6	5	0	6.82	792	5333	88,894
77	Coatome alpha subunit, putative (>tr B9QK32 B9QK32_TOXGV)	20.18	4.77	334.70	#####	34	13	0	11.15	1300	674	142,954
78	Coatome protein complex subunit beta, putative (>tr V5B518 V5B518_TOXGV)	12.82	3.33	388.70	#####	15	15	0	13.69	1256	1516	137,043
79	Coatome subunit beta (>tr B9QPA4 B9QPA4_TOXGV)	0.82	0.32	198.40	249151.6	5	4	0	3.72	1103	2240	
80	Coatome subunit gamma (>tr B6KDL6 B6KDL6_TOXGV)	2.04	2.04	299.70	160987.9	2	2	0	2.01	1044	2197	112,294
81	Coatome subunit gamma (>tr B6KDL6 B6KDL6_TOXGV)	4.67	4.53	467.40	#####	7	4	2	4.02	1044	2197	112,294
82	COPI associated protein, putative (>tr B9PKM9 B9PKM9_TOXGV)	5.02	2.24	414.90	#####	9	7	1	18.15	270	3275	29,924
83	Corepressor complex CRC230 (>tr A0A0F7V117 A0A0F7V117_TOXGV)	5.17	5.11	368.60	118379.3	3	3	0	1.83	1916	4642	207,303
84	CPSF A subunit region protein (>Reverse >tr V5BDD5 V5BDD5_TOXGV)	0.73	0.85	266.40	774637.2	2	2	0	0.63	2077	16185	
85	Cysteine repeat modular protein, putative (>tr B9QEHS B9QEHS_TOXGV)	21.26	5.46	461.50	#####	22	20	0	3.11	7428	3621	799,284
86	Cytochrome C family oxidase subunit III subfamily protein (Fragment) (>tr V4YI37 V4YI37_TOXGV)	1.40	1.39	241.60	146773.7	2	1	0	7.33	150	8117	
87	Cytochrome c oxidase subunit 2 (>tr A0A0F7V207 A0A0F7V207_TOXGV)	2.78	2.63	355.30	606795.2	4	2	0	6.02	299	4307	34,489
88	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 17 (>tr B9PVZ6 B9PVZ6_TOXGV)	4.71	4.30	344.50	657495.0	5	5	1	12.91	550	3548	59,938
89	DEAD/DEAH box helicase domain-containing protein (>tr B9PYA4 B9PYA4_TOXGV)	39.72	5.47	509.20	#####	41	28	1	13.72	2434	4842	273,734
90	DEAD/DEAH box RNA helicase family protein (>tr B9QLU2 B9QLU2_TOXGV)	0.77	0.61	171.50	224913.5	3	3	1	3.13	959	1808	

91	Dense granular protein GRA10 (>tr B9Q5A4 B9Q5A4_TOXGV)	0.94	0.77	259.00	551706.3	11	2	0	2.80	894	7287	
92	Dense granule protein 3 (>tr A0A0F7V5E7 A0A0F7V5E7_TOXGV)	4.23	3.13	510.60	#####	10	7	2	19.37	222	3307	24.18
93	Dense granule protein 7 (>tr A0A0F7U213 A0A0F7U213_TOXGV)	32.28	8.79	666.90	#####	29	10	3	34.75	236	1241	25.922
94	Dgat2l1-prov protein (>tr B9PMN6 B9PMN6_TOXGV)	4.96	3.32	259.30	167857.2	3	3	0	10.26	380	3952	43,642
95	DNA topoisomerase 2 (>tr V5B218 V5B218_TOXGV)	0.67	0.73	284.70	#####	8	3	0	2.08	1440	6068	154,618
96	DNA topoisomerase 2 (>tr V5B218 V5B218_TOXGV)	1.71	1.34	395.90	#####	29	4	2	2.71	1440	6068	154,618
97	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB1 (>tr V4YZ17 V4YZ17_TOXGV)	2.53	2.54	248.60	844580.1	2	2	1	1.46	1298	2134	
98	DnaJ domain-containing protein (>tr B9PKL4 B9PKL4_TOXGV)	1.43	0.77	249.10	361743.3	4	4	0	5.19	675	589	
99	DnaK family protein (>tr V4ZFG5 V4ZFG5_TOXGV)	8.16	4.45	368.30	238974.1	6	6	0	6.60	955	2166	105,316
100	DnaK family protein (>tr V4ZFG5 V4ZFG5_TOXGV)	3.98	3.95	365.70	788941.5	5	3	0	4.40	955	2166	105,316
101	Domain K-type RNA binding proteins family protein (>tr B9PW48 B9PW48_TOXGV)	2.86	2.11	288.10	612808.7	6	6	1	10.35	570	7154	64,265
102	Dynein heavy chain (>tr A0A125YWN6 A0A125YWN6_TOXGV)	3.50	2.79	419.50	612828.4	8	7	1	1.39	4974	4991	558,602
103	EF hand domain-containing protein (>tr A0A125YVX3 A0A125YVX3_TOXGV)	1.84	1.43	334.20	92004.2	2	2	0	6.56	305	5176	34,590
104	EF hand domain-containing protein (>tr B6KT39 B6KT39_TOXGV)	27.76	4.92	540.60	#####	20	19	1	6.92	3700	2781	
105	Elongation factor 1-alpha (>tr A0A0F7U518 A0A0F7U518_TOXGV)	112.48	9.91	701.80	#####	71	28	9	51.79	448	119	49,006
106	Elongation factor 1-alpha (>tr A0A0F7U518 A0A0F7U518_TOXGV)	11.51	3.81	502.20	868650.8	13	6	0	12.50	448	119	49,006
107	Elongation factor 2 family protein (>tr V4YQV9 V4YQV9_TOXGV)	1.82	1.87	308.90	97762.6	1	1	0	1.55	774	6966	87,330
108	Elongation factor 2 family protein (>tr V4YQV9 V4YQV9_TOXGV)	4.23	2.96	276.50	103057.3	2	2	0	3.23	774	6966	87,330
109	Elongation factor Tu GTP binding domain-containing protein (>tr A0A125YMW2 A0A125YMW2_TOXGV)	0.87	0.94	339.30	144886.4	1	1	0	0.31	2560	1312	275,065
110	Elongation of fatty acids protein (>tr B9Q055 B9Q055_TOXGV)	4.21	2.75	310.70	897606.3	6	4	1	11.95	318	811	37,974
111	Emp24/gp25L/p24 family protein (>tr B6KAE3 B6KAE3_TOXGV)	15.73	5.03	396.60	518703.8	7	6	0	16.81	601	306	64,977
112	Enolase 2 (>tr B9PH46 B9PH46_TOXGV)	13.44	5.76	528.20	#####	8	5	0	12.21	475	570	52,114
113	Eukaryotic porin protein (>tr B9Q0Q9 B9Q0Q9_TOXGV)	6.30	2.53	311.70	#####	10	9	0	27.59	290	4523	31,352
114	Eukaryotic translation initiation factor 2 gamma subunit, putative (>tr B9PW44 B9PW44_TOXGV)	6.37	5.41	544.20	352122.4	4	3	0	10.11	465	3593	50,509
115	Eukaryotic translation initiation factor 2 gamma subunit, putative (>tr B9PW44 B9PW44_TOXGV)	2.16	2.13	224.20	#####	4	4	0	12.04	465	3593	50,509
116	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B (>tr B9PYW7 B9PYW7_TOXGV)	20.52	4.53	479.70	#####	36	23	1	22.75	756	50	88,392
117	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C (>tr A0A125YXF0 A0A125YXF0_TOXGV)	5.58	4.44	361.20	421108.1	6	6	3	7.21	971	4832	109,193
118	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C (>tr A0A125YXF0 A0A125YXF0_TOXGV)	43.04	5.80	481.20	#####	23	22	2	22.25	971	4832	109,193
119	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L (>tr B9PFX5 B9PFX5_TOXGV)	2.73	2.69	303.50	140527.9	2	2	0	3.60	639	1581	75,024
120	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L (>tr B9PFX5 B9PFX5_TOXGV)	17.71	4.49	431.70	#####	26	17	0	26.13	639	1581	75,074
121	Eukaryotic translation initiation factor 4A (>tr A0A0F7VFL4 A0A0F7VFL4_TOXGV)	2.44	1.77	290.90	281101.0	5	4	0	8.25	412	1093	46,673
122	Eukaryotic translation initiation factor 4A (>tr A0A0F7VFL4 A0A0F7VFL4_TOXGV)	29.77	5.50	468.90	#####	17	14	1	29.13	412	1093	46,673
123	Exportin 7, putative (>tr B9PYV2 B9PYV2_TOXGV)	0.69	0.72	233.40	102480.4	1	1	0	1.05	1147	4056	129,488
124	Facilitative glucose transporter GT1 (>tr A0A0F7V8D9 A0A0F7V8D9_TOXGV)	10.70	2.47	355.00	#####	14	7	1	10.21	568	3610	61,688
125	Fatty acyl-CoA desaturase, putative (>tr A0A125YNX2 A0A125YNX2_TOXGV)	3.70	2.96	280.10	349924.3	5	5	0	4.41	1042	4434	117,092
126	Fibrillarin (>tr B6K8L1 B6K8L1_TOXGV)	6.67	2.99	418.70	735360.7	9	7	0	25.66	304	124	31,989
127	Formate/nitrite transporter protein (>tr A0A0F7UUK6 A0A0F7UUK6_TOXGV)	1.81	1.40	199.60	270955.5	4	3	0	11.17	412	3611	
128	Fumarate hydratase (>Reverse >tr V5BD96 V5BD96_TOXGV)	1.10	0.98	241.30	#####	20	1	0	1.68	776	15518	
129	Fusaric acid resistance-like protein (>tr V4Z9B7 V4Z9B7_TOXGV)	2.58	2.39	265.20	81138.0	2	2	0	2.00	1600	4373	174,767
130	FUSE-binding protein 2/ KH-type splicing regulatory protein (>tr B6KT44 B6KT44_TOXGV)	5.75	3.99	361.90	802173.7	7	6	0	7.86	941	634	100,094
131	GAP40 (>tr B9PRA3 B9PRA3_TOXGV)	8.10	3.11	391.20	#####	20	6	1	10.13	385	549	43,082
132	GAP45 OS=Toxoplasma gondii (>tr A0A0F7V9A2 A0A0F7V9A2_TOXGV)	16.60	7.22	631.60	#####	13	6	0	24.90	245	3038	27,318
133	Gbp1p protein, putative (>tr B9PLQ7 B9PLQ7_TOXGV)	17.49	4.52	506.50	#####	31	10	2	34.81	293	1016	31.76
134	Glideosome-associated protein with multiple-membrane spans GAPM3 (>tr B9PIA4 B9PIA4_TOXGV)	4.93	2.50	433.30	#####	9	3	1	7.74	310	3163	34,282
135	Glucosaminyltransferase, putative (>tr A0A125YWA4 A0A125YWA4_TOXGV)	19.73	5.14	538.80	#####	14	12	0	15.03	905	1169	102,143

136	Glucosaminyltransferase, putative (>tr A0A125YWA4 A0A125YWA4_TOXGV)	18.79	5.22	421.20	#####	19	19	4	20.77	905	1169	102.143
137	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (>tr A0A0F7USN9 A0A0F7USN9_TOXGV)	36.26	5.73	536.40	#####	25	21	6	41.43	560	1866	62.736
138	Glutamate/leucine/phenylalanine/valine dehydrogenase family protein (>tr A0A125YQU5 A0A125YQU5_TOXGV)	8.61	4.73	366.20	#####	9	9	0	9.37	1206	5236	135.701
139	Glutamine-dependent NAD() synthetase protein, putative (>tr B9Q5R8 B9Q5R8_TOXGV)	2.15	2.17	250.90	32356.9	1	1	0	1.86	862	813	94.470
140	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (>tr A0A125YJ41 A0A125YJ41_TOXGV)	15.12	5.46	471.30	#####	13	9	2	17.38	489	7577	53.339
141	Glycerol-3-phosphate acyltransferase, putative (>tr B6KAW1 B6KAW1_TOXGV)	1.40	1.44	325.10	#####	21	4	0	3.89	1002	2520	110.282
142	Gorasp2-prov protein (>tr B9QAU9 B9QAU9_TOXGV)	1.11	1.12	348.00	128321.1	1	1	0	2.11	475	2702	50.486
143	GPI transamidase subunit PIG-U protein (>tr A0A125YKP3 A0A125YKP3_TOXGV)	6.30	3.23	319.30	89989.0	2	2	0	3.65	548	1066	60.947
144	GTP-binding nuclear protein (>tr A0A125YV47 A0A125YV47_TOXGV)	6.03	4.34	377.10	171027.9	3	3	0	17.03	229	6417	25.998
145	GTP-binding nuclear protein (>tr A0A125YV47 A0A125YV47_TOXGV)	21.71	7.58	603.70	#####	13	9	1	43.23	229	6417	25.998
146	Guanylate binding protein, putative (>tr B6KR20 B6KR20_TOXGV)	4.68	2.13	391.60	424560.2	6	6	0	5.46	1281	100	142.697
147	Heat shock protein (>tr B6KHU4 B6KHU4_TOXGV)	61.76	5.92	564.20	#####	36	30	11	46.70	728	89	78.251
148	Heat shock protein 60 (>tr B9PPQ1 B9PPQ1_TOXGV)	4.46	2.39	306.80	#####	7	7	0	12.87	575	4331	60.914
149	Heat shock protein 70, putative (>tr A0A0F7V4M1 A0A0F7V4M1_TOXG)	124.31	9.98	717.40	#####	70	42	8	52.62	667	3648	72.293
150	Heat shock protein 90 (>tr A0A0F7V6Y1 A0A0F7V6Y1_TOXGV)	7.32	4.66	320.50	136670.2	4	4	0	6.78	708	3967	81.933
151	Heat shock protein 90, putative (>tr B9QJ54 B9QJ54_TOXGV)	10.72	5.59	481.30	313071.5	5	5	0	6.61	847	28	96.793
152	Heat shock protein 90, putative (>tr B9QJ54 B9QJ54_TOXGV)	1.89	1.44	255.50	#####	5	5	0	6.14	847	28	96.793
153	HECT-domain (Ubiquitin-transferase) domain-containing protein (>tr V4Z409 V4Z409_TOXGV)	0.65	0.70	278.40	510431.6	3	1	0	0.53	1709	940	185.642
154	Histone deacetylase SIR2 (>tr B9PMV3 B9PMV3_TOXGV)	0.76	0.74	278.60	490661.9	3	1	0	1.67	360	3820	40.008
155	Histone H2A (>tr A0A0F7V6C1 A0A0F7V6C1_TOXGV)	0.72	0.26	462.90	#####	19	2	0	10.32	155	4694	15.92
156	Histone H2B (>tr A0A0F7UN59 A0A0F7UN59_TOXGV)	0.84	0.67	317.70	#####	10	1	0	5.69	123	415	13.732
157	Histone H4 (>tr A0A0F7V6C1 A0A0F7V6C1_TOXGV)	5.29	5.09	448.30	#####	12	2	1	23.30	103	1020	11.439
158	Histone H4 (>tr B9PNK6 B9PNK6_TOXGV)	1.81	1.82	243.90	41260.7	1	1	0	11.65	103	1020	
159	H-translocating inorganic pyrophosphatase T V P, putative (>tr B6KH90 B6KH90_TOXGV)	1.27	0.76	254.70	284304.1	3	3	0	4.90	816	3182	
160	Ion-transport protein yf putative (>tr B6KA89 B6KA89_TOXGV)	0.96	1.01	141.50	39226.7	1	1	0	2.54	788	2025	
161	Isocitrate dehydrogenase ((>tr A0A125YST2 A0A125YST2_TOXGV)	6.13	5.93	422.50	218278.3	3	3	0	5.96	621	6598	68.296
162	Kinesin heavy chain, putative (>tr B6KDN4 B6KDN4_TOXGV)	2.94	2.04	241.90	240358.2	5	5	1	3.11	1641	982	
163	Kringle domain-containing protein (>tr V4ZA01 V4ZA01_TOXGV)	5.77	2.15	336.90	683420.0	10	10	0	3.77	3051	6651	337.555
164	Lactate dehydrogenase (>tr A0A0F7UY31 A0A0F7UY31_TOXGV)	6.07	3.03	354.30	218410.4	6	4	1	15.20	329	11	35.548
165	Large subunit ribosomal protein IMG2 (>tr B6KGN5 B6KGN5_TOXGV)	2.51	2.52	314.70	112277.0	1	1	0	2.90	310	1409	33.416
166	Leucine rich repeat-containing protein (>tr A0A125YH03 A0A125YH03_TOXGV)	0.78	0.80	281.20	316820.5	2	2	0	3.18	440	7824	50.196
167	Leucine rich repeat-containing protein (>tr A0A125YH03 A0A125YH03_TOXGV)	0.67	0.62	299.40	#####	4	1	0	1.59	440	7824	50.196
168	Lipase maturation factor (>tr B9QHF5 B9QHF5_TOXGV)	5.26	3.21	318.30	373062.8	3	3	0	3.67	709	1679	77.524
169	Longevity-assurance (LAG1) domain-containing protein (>tr B9PSW9 B9PSW9_TOXGV)	3.28	2.11	392.10	#####	8	5	0	9.36	342	2629	39.556
170	Lysine--tRNA ligase (>tr B9Q018 B9Q018_TOXGV)	1.21	1.18	320.90	65189.2	2	2	0	3.95	658	4242	74.337
171	Major facilitator superfamily domain-containing protein (>tr V4Z712 V4Z712_TOXGV)	12.73	4.39	353.00	#####	11	8	1	16.33	588	2395	62.998
172	Microneme protein 2 (>tr A0A0F7UZH2 A0A0F7UZH2_TOXGV)	3.93	2.11	272.60	108829.7	2	2	0	3.12	769	388	82.620
173	Microneme protein 2 (>tr A0A0F7UZH2 A0A0F7UZH2_TOXGV)	7.54	4.13	342.40	207624.0	3	3	1	5.07	769	388	82.620
174	Microneme protein MIC1 (>tr B6KL08 B6KL08_TOXGV)	4.00	3.79	423.30	526270.1	4	4	0	7.02	456	2902	48.629
175	Microneme protein MIC15 (>tr V5BFN0 V5BFN0_TOXGV)	3.54	1.73	296.10	373875.0	8	6	1	1.98	2924	2262	319.958
176	Microneme protein MIC4 (>tr B9PXJ3 B9PXJ3_TOXGV)	5.40	2.97	335.10	#####	7	7	0	9.66	580	791	63.021
177	Mitochondrial carrier domain-containing protein (>tr B6KP76 B6KP76_TOXGV)	4.11	3.98	353.60	169296.9	3	2	0	9.03	310	41	33.687
178	Mitochondrial carrier domain-containing protein (>tr B6KP76 B6KP76_TOXGV)	5.38	2.35	318.20	422235.0	6	4	0	13.55	310	41	33.687
179	Mitochondrial-processing peptidase alpha subunit, putative (>tr B9PUJ6 B9PUJ6_TOXGV)	4.05	4.08	399.60	40586.5	1	1	0	2.31	563	106	62.162
180	Mitochondrial-processing peptidase alpha subunit, putative (>tr B9PUJ6 B9PUJ6_TOXGV)	16.32	5.56	448.70	#####	8	4	0	13.32	563	106	62.162

181	Multi-pass transmembrane protein (>tr A0A125YH19 A0A125YH19_TOXGV)	14.67	4.36	437.70	434416.2	7	6	0	17.52	508	3995	57,684
182	Multi-pass transmembrane protein (>tr B9PQM0 B9PQM0_TOXGV)	3.47	3.34	317.80	274665.4	2	2	0	6.68	389	2175	43,033
183	Myosin A (>tr B9Q788 B9Q788_TOXGV)	23.96	6.97	620.50	#####	21	15	3	19.98	831	326	93,362
184	Myosin C (>tr B6KAL4 B6KAL4_TOXGV)	1.73	1.24	251.00	137278.4	4	4	0	3.67	1171	53	
185	Myosin F (>tr B9QML2 B9QML2_TOXGV)	46.76	6.27	637.00	#####	29	26	0	15.46	1953	161	216,384
186	Myosin G (>tr B6K9E4 B6K9E4_TOXGV)	29.48	4.56	477.80	#####	18	17	0	11.75	2059	639	227,272
187	Myosin light chain MLC1 (>tr A0A0F7V1A1 A0A0F7V1A1_TOXGV)	8.61	5.66	433.30	#####	9	5	1	24.88	213	4631	24,124
188	Na+/H+ exchanger NHE1 (Fragment) (>tr V4YV15 V4YV15_TOXGV)	13.23	5.06	540.30	479151.0	10	8	0	7.78	1440	7420	155,855
198	Noc2p family protein (>tr B9QB60 B9QB60_TOXGV)	0.60	0.36	292.00	602988.1	4	3	0	2.70	1036	2593	115,354
190	NOL1/NOP2/sun family domain-containing protein (>tr B9PTZ1 B9PTZ1_TOXGV)	2.47	1.70	254.40	188632.6	2	2	0	3.23	804	913	
191	NTPase (Fragment) (>tr V4Z362 V4Z362_TOXGV)	8.91	5.03	550.90	572101.3	4	4	0	8.33	372	4794	41,139
192	NTPase II (Fragment) (>tr V4YI32 V4YI32_TOXGV)	1.80	1.81	387.70	330850.6	1	1	0	1.83	383	8010	42,467
193	NUC173 domain protein (>Reverse >tr B9QFR6 B9QFR6_TOXGV)	0.61	0.70	243.10	172979.9	2	1	0	0.47	1915	8851	
194	Nuclease and tudor domain-containing protein (>tr B9PNS2 B9PNS2_TOXGV)	4.53	2.23	297.60	812194.3	5	4	0	5.53	941	915	104,042
195	Nuclease and tudor domain-containing protein (>tr B9PNS2 B9PNS2_TOXGV)	19.79	5.87	477.60	#####	12	12	0	15.73	941	915	104,042
196	Nucleolar protein 5A, putative (>tr B9PPQ9 B9PPQ9_TOXGV)	10.50	6.15	554.40	874633.4	10	8	0	17.91	536	620	59.94
197	Nucleoside-diphosphatase (>Reverse >tr V4Z9M8 V4Z9M8_TOXGV)	0.78	0.82	260.20	113509.2	1	1	0	1.18	592	16200	
198	Nucleoside-triphosphatase (>tr V5AWC8 V5AWC8_TOXGV)	14.43	3.62	539.20	#####	10	7	1	24.86	370	6606	40,505
199	Nucleoside-triphosphatase (Fragment) (>tr V4YID2 V4YID2_TOXGV)	2.88	2.89	335.50	107722.2	1	1	0	4.15	313	7090	34,353
200	Oxidoreductase, short chain dehydrogenase/reductase family protein (>tr A0A125YR71 A0A125YR71_TOXGV)	6.85	5.62	596.10	351220.3	4	4	0	4.90	837	5499	89,336
201	Oxidoreductase, short chain dehydrogenase/reductase family protein (>tr A0A125YR71 A0A125YR71_TOXGV)	3.68	3.70	303.10	46260.7	1	1	0	1.55	837	5499	89,336
202	Peptidase, M28 family protein (>tr B9Q7W2 B9Q7W2_TOXGV)	23.14	4.97	412.40	836824.6	12	11	0	8.68	1555	8238	167,874
203	Peptidase, M50 family protein (>tr B9Q199 B9Q199_TOXGV)	4.61	4.64	585.10	50384.4	1	1	0	3.97	378	827	41,662
204	PET112 family, C terminal region domain-containing protein (>tr A0A125YUA7 A0A125YUA7_TOXGV)	1.01	0.74	285.70	#####	26	1	0	0.84	1070	6737	113,836
205	PGAP1 family protein (>tr B9QFB6 B9QFB6_TOXGV)	2.63	1.98	223.90	158241.9	4	4	0	2.61	2110	2080	
206	Phosphate carrier protein, putative (>tr B9PRN1 B9PRN1_TOXGV)	25.23	5.18	493.40	#####	29	17	5	27.97	479	81	53,093
207	Phosphatidate cytidyltransferase (>tr A0A125YJA7 A0A125YJA7_TOXGV)	7.70	5.02	491.10	182160.7	3	2	0	9.02	255	5965	27,500
208	Phosphatidyl serine synthase (>tr B9QAY6 B9QAY6_TOXGV)	8.03	4.16	405.10	430653.9	5	5	0	9.63	540	2704	60,804
209	Phosphatidylcholine transfer protein, putative (>tr A0A125YIG1 A0A125YIG1_TOXGV)	3.84	2.09	246.50	91444.5	2	2	0	3.03	857	468	
210	Phosphatidylinositol transfer protein (>tr A0A125YYR2 A0A125YYR2_TOXGV)	2.22	1.26	304.20	138297.2	3	3	0	1.78	1912	6718	209,656
211	Phosphodiesterase (>tr B6KFK7 B6KFK7_TOXGV)	4.04	4.12	275.20	31407.0	1	1	0	1.33	1281	2481	142,518
212	Phosphodiesterase (>tr B9Q7L9 B9Q7L9_TOXGV)	14.38	3.93	438.20	463642.6	8	7	1	5.36	1324	355	146,744
213	Phosphodiesterase (>tr B9QFV9 B9QFV9_TOXGV)	7.01	4.36	269.70	287524.1	4	4	0	2.74	1676	2013	183,184
214	Phosphodiesterase (>tr B9QPM2 B9QPM2_TOXGV)	1.55	0.56	238.80	469865.8	6	6	0	5.81	1085	975	
215	Phosphoglycerate mutase (>tr A0A125YK30 A0A125YK30_TOXGV)	1.75	1.76	338.70	109776.2	1	1	0	2.06	339	4908	38,160
216	Phospholipase/carboxylesterase (>tr B9PX11 B9PX11_TOXGV)	16.11	3.89	448.80	535727.5	8	8	0	15.49	497	537	54,218
217	Phospholipid-translocating ATPase (>tr B6KH13 B6KH13_TOXGV)	1.30	1.04	249.40	735348.2	14	3	0	1.60	1871	960	
218	Phospholipid-translocating P-type ATPase, flippase subfamily protein (>tr A0A125YWX7 A0A125YWX7_TOXGV)	4.01	4.15	479.70	110574.4	2	2	0	1.11	2427	7900	265,776
219	Phosphorylase family protein (>tr A0A0F7V4E5 A0A0F7V4E5_TOXGV)	0.78	0.80	121.50	26624.0	1	1	0	4.95	303	3809	
220	Phosphorylated CTD-interacting factor 1 (>tr B9PMV8 B9PMV8_TOXGV)	0.78	0.82	371.90	102267.2	1	1	0	0.83	722	3801	81,422
221	Plasma-membrane choline transporter (>tr B9Q3S1 B9Q3S1_TOXGV)	1.12	0.74	163.20	134855.3	3	3	0	6.55	687	3601	
222	PP-loop domain-containing protein (>Reverse >tr B6K9Z3 B6K9Z3_TOXGV)	0.72	0.76	304.20	198439.0	1	1	0	1.19	672	9034	
223	PQ loop repeat-containing protein (>tr V4ZDB0 V4ZDB0_TOXGV)	0.80	0.82	96.00	36410.8	1	1	0	5.37	410	7800	
224	Pre-mRNA processing splicing factor PRP8 (>tr B6KJP5 B6KJP5_TOXGV)	8.93	4.76	474.20	#####	14	11	0	4.33	2538	442	291,848
225	Proteasome subunit alpha type (>tr B9PL62 B9PL62_TOXGV)	3.47	2.70	367.30	112003.3	2	2	0	9.39	245	3662	27,081

226	Protein disulfide-isomerase (>tr A0A0F7UU04 A0A0F7UU04_TOXGV)	48.33	7.97	668.40	#####	39	19	2	41.83	471	1596	52.802
227	Protein kinase (>Reverse >tr A0A125YLH3 A0A125YLH3_TOXGV)	1.63	1.73	356.20	169340.2	1	1	0	0.51	1763	12587	
228	Protein phosphatase PP2C-hn (>tr V4YXJ8 V4YXJ8_TOXGV)	1.77	1.80	180.70	32081.0	1	1	0	3.35	478	5192	
229	Protein transport protein Sec23, putative (>tr B6KKZ7 B6KKZ7_TOXGV)	5.61	4.83	405.50	479818.5	3	2	0	4.68	791	1193	87,610
230	Protein transport protein Sec61 alpha subunit isoform 1, putative (>tr B9PHN7 B9PHN7_TOXGV)	11.24	2.83	527.80	#####	27	10	1	17.12	473	992	52,165
231	Protein tyrosine phosphatase family protein, ptpla protein (>tr B6K8J7 B6K8J7_TOXGV)	2.07	1.74	240.70	284534.5	4	3	0	9.49	274	2179	
232	P-type Ca(2)-ATPase, putative (>tr B9QMJO B9QMJO_TOXGV)	15.12	5.20	374.90	627749.0	10	8	0	7.32	1338	330	144,621
233	Putative activating signal cointegrator 1 complex subunit 3 family 1 ASCC3L1 (>tr A0A125YK31 A0A125YK31_TOXGV)	25.55	3.83	421.20	#####	31	20	1	12.42	2207	2652	248,413
234	Putative acyltransferase, WS/DGAT/MGAT protein (>tr B9QC07 B9QC07_TOXGV)	2.23	2.26	269.90	217001.1	2	2	0	2.84	670	2605	75,164
235	Putative asparagine synthetase (>tr B9PWN3 B9PWN3_TOXGV)	2.09	2.06	340.00	#####	2	2	0	2.89	588	4905	65,868
236	Putative ATP-dependent DNA helicase II, 70 kDa subunit (>tr A0A125YKA6 A0A125YKA6_TOXGV)	5.49	1.53	438.10	#####	203	1	0	0.73	1102	5444	122,418
237	Putative ATP-dependent DNA helicase II, 70 kDa subunit (>tr A0A125YKA6 A0A125YKA6_TOXGV)	6.55	1.60	434.60	#####	255	1	0	0.73	1102	5444	122,418
238	Putative eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 7 (>tr V4YY60 V4YY60_TOXGV)	13.61	3.72	509.60	#####	9	8	2	36.11	288	6970	32,314
239	Putative eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 7 (>tr V5AWM3 V5AWM3_TOXGV)	5.98	5.99	496.20	#####	6	2	0	10.19	314	8186	35,385
240	Putative MBOAT domain, related protein (>tr V4Z481 V4Z481_TOXGV)	4.08	3.04	296.00	360474.6	5	5	0	5.31	1243	8338	138,881
241	Putative myosin heavy chain (>tr V4ZD64 V4ZD64_TOXGV)	1.05	1.11	318.80	190582.5	2	1	0	0.83	1082	5676	118,597
242	Putative phosphatidylserine synthase (>tr A0A125YQZ2 A0A125YQZ2_TOXGV)	0.72	0.76	134.50	20231.5	1	1	0	2.28	614	6570	
243	Putative polypeptide n-acetylglucosaminyltransferase 12 (>tr B6KBA7 B6KBA7_TOXGV)	2.35	2.39	227.10	57484.6	1	1	0	1.73	692	783	
244	Putative RER1 protein (>tr B9PTC2 B9PTC2_TOXGV)	5.42	3.60	354.20	246687.6	3	3	0	14.41	222	1976	25,351
245	Putative rhoptry protein (>tr A0A125YNJ7 A0A125YNJ7_TOXGV)	3.02	2.27	295.00	453519.0	3	3	0	3.29	1063	8185	118,496
246	Putative rhoptry protein (>tr A0A125YXY8 A0A125YXY8_TOXGV)	13.02	4.75	511.10	#####	8	7	0	6.04	1010	7718	115,860
247	Putative splicing factor 3b, subunit 3 (>tr B9PGZ9 B9PGZ9_TOXGV)	12.64	5.48	438.00	665334.3	10	10	0	11.84	1233	82	135,744
248	Putative T complex chaperonin (>tr A0A125YSE3 A0A125YSE3_TOXGV)	2.31	2.04	214.70	74065.7	2	2	0	5.22	556	773	
249	Putative T-complex protein 1, epsilon subunit (TCP-1-epsilon) (>tr B9PUM9 B9PUM9_TOXGV)	1.03	1.04	243.70	53387.5	1	1	0	1.49	536	4739	58,632
250	Putative TDC1 (>tr V4YTV2 V4YTV2_TOXGV)	7.05	3.96	374.60	419842.3	7	6	0	13.87	584	5030	63,318
251	Putative thioredoxin (>tr B9PM19 B9PM19_TOXGV)	0.72	0.63	340.10	440873.8	4	4	0	5.95	622	614	68,948
252	Putative transmembrane protein (>tr B9QR10 B9QR10_TOXGV)	0.73	0.74	123.50	29426.1	1	1	0	12.43	169	2881	
253	Putative transport protein Sec24 (>tr B9PS36 B9PS36_TOXGV)	11.07	4.67	340.50	290650.6	5	3	0	5.59	1019	4073	108,035
254	Putative U5 small nuclear ribonuclear protein (Fragment) (>tr V4ZE39 V4ZE39_TOXGV)	4.86	2.53	357.90	266335.8	2	2	0	13.62	257	5638	28,584
255	Putative vacuolar ATP synthase subunit A (>tr B6KAW0 B6KAW0_TOXGV)	11.09	5.55	412.40	976234.5	6	5	0	8.60	616	2063	68,122
256	Putative vacuolar ATP synthase subunit b (>tr B9PQR4 B9PQR4_TOXGV)	40.80	9.75	740.10	#####	28	17	3	45.35	505	3543	
257	Putative vacuolar protein sorting-associated protein 26 (>tr V4Z8Z4 V4Z8Z4_TOXGV)	2.34	2.11	308.70	119674.0	2	2	0	6.25	368	7965	42,382
258	Putative vacuolar proton translocating ATPase subunit (>tr A0A125YIQ1 A0A125YIQ1_TOXGV)	5.65	2.72	343.10	229292.9	4	4	0	4.22	1066	2493	118,340
259	Pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase domain-containing protein (>tr B6KNZ3 B6KNZ3_TOXGV)	6.05	5.64	519.00	378961.6	5	4	0	6.63	664	790	71,159
260	Queuine tRNA-ribosyltransferase (>tr V5BF03 V5BF03_TOXGV)	0.91	0.72	361.90	#####	13	1	0	0.88	911	524	97,837
261	Rab 5 (>tr B9QP57 B9QP57_TOXGV)	7.42	4.65	358.80	227792.2	4	3	0	18.26	241	2012	26,489
262	Rab 5 (>tr B9QP57 B9QP57_TOXGV)	3.89	3.90	368.10	109725.2	2	1	0	5.81	241	2012	26,489
263	Rab1 protein (>tr A0A125YFT6 A0A125YFT6_TOXGV)	0.96	0.85	246.00	219511.0	2	1	0	7.87	216	1284	
264	Rab5-interacting (Rab5ip) protein (>tr B9PY55 B9PY55_TOXGV)	0.78	0.78	93.90	14893.6	1	1	0	12.03	133	254	
265	Ras family domain-containing protein (>tr B9PLD0 B9PLD0_TOXGV)	1.10	0.93	303.20	#####	10	1	0	3.74	214	2180	23,581
266	Reactive mitochondrial oxygen species modulator 1 domain-containing protein (>tr B9PIA8 B9PIA8_TOXGV)	7.73	3.53	332.30	278498.7	4	4	0	22.43	263	3255	27,846
267	Rhomboid-like protein (>tr V4Z806 V4Z806_TOXGV)	10.91	4.60	300.30	699328.4	9	8	0	14.89	665	8262	72,385
268	Rhoptry kinase family protein (Incomplete catalytic triad) (>tr V5AWD9 V5AWD9_TOXGV)	0.86	0.85	377.10	521760.3	3	1	0	1.25	481	7308	53,226
269	Rhoptry kinase family protein ROP17 (>tr B6KB88 B6KB88_TOXGV)	7.58	3.72	303.70	#####	15	8	2	14.97	608	985	69,087
270	Rhoptry kinase family protein ROP17 (>tr B6KB88 B6KB88_TOXGV)	9.62	4.75	390.50	#####	7	6	1	14.97	608	985	69,087

271	Rhoptry kinase family protein ROP39 (>tr V429F7 V429F7_TOXGV)	5.66	2.32	347.30	#####	9	7	0	13.27	588	2574	65,119
272	Rhoptry neck protein RON2 (>tr V4YYL5 V4YYL5_TOXGV)	19.27	5.65	462.00	737801.2	13	10	0	8.65	1479	5521	166,474
273	Rhoptry neck protein RON3 (>tr V4YW47 V4YW47_TOXGV)	101.18	7.39	698.40	#####	102	56	5	28.70	1958	1404	222,930
274	Rhoptry neck protein RON3 (>tr V4YW47 V4YW47_TOXGV)	6.08	3.59	337.20	989968.9	12	12	2	6.69	1958	1404	222,930
275	Rhoptry neck protein RON5 (>tr A0A125YSX9 A0A125YSX9_TOXGV)	4.37	4.47	316.30	913256.4	4	4	0	2.35	1702	4834	187,410
276	Rhoptry neck protein RON5 (>tr A0A125YSX9 A0A125YSX9_TOXGV)	1.24	0.67	245.80	131986.2	3	3	0	2.76	1702	4834	187,410
277	Rhoptry neck protein RON8 (>tr A0A125YRV5 A0A125YRV5_TOXGV)	15.08	4.18	391.30	#####	18	15	0	6.95	2980	5312	328,900
278	Rhoptry protein ROP1 (>tr B6KA38 B6KA38_TOXGV)	0.85	0.88	246.00	103177.9	1	1	0	1.79	446	471	
279	Rhoptry protein ROP1 (>tr B6KA38 B6KA38_TOXGV)	3.81	2.92	418.40	#####	30	7	0	8.07	446	471	47,995
280	Rhoptry protein ROP14 (>tr A0A0F7VAM4 A0A0F7VAM4_TOXGV)	10.30	2.78	371.50	#####	13	9	0	9.71	1061	4076	121,911
281	Rhoptry protein ROP15 (>tr B9QHX6 B9QHX6_TOXGV)	1.20	1.00	237.00	131241.4	2	2	0	9.61	333	1833	
282	Rhoptry protein ROP2A (>tr B9QM22 B9QM22_TOXGV)	4.36	4.35	355.40	335812.0	2	1	0	2.96	575	2496	65,402
283	Rhoptry protein ROP4 (>tr V4Z117 V4Z117_TOXGV)	5.78	5.55	408.00	#####	7	4	0	13.42	365	7937	40,181
284	Rhoptry protein ROP5 (>tr V4Z6U4 V4Z6U4_TOXGV)	33.72	7.41	716.10	#####	74	20	6	28.96	549	6560	60,776
285	Rhoptry protein ROP5 (>tr V4Z6U4 V4Z6U4_TOXGV)	31.93	4.57	536.20	#####	70	19	5	33.70	549	6560	60,776
286	Rhoptry protein ROP5 (>tr V4Z6U8 V4Z6U8_TOXGV)	7.33	4.67	363.10	572904.6	5	5	0	10.56	549	8258	60,906
287	Rhoptry protein ROP7 (>tr A0A0F7UN57 A0A0F7UN57_TOXGV)	3.48	2.56	240.70	164586.8	3	3	0	5.22	575	1416	
288	Rhoptry protein ROP7 (>tr A0A0F7UN57 A0A0F7UN57_TOXGV)	51.42	8.71	671.60	#####	47	17	1	30.09	575	1416	63,395
289	Rhoptry protein ROP8 (>tr V5B6B7 V5B6B7_TOXGV)	17.83	4.00	317.30	#####	23	14	1	24.02	587	5963	66,973
290	Rhoptry protein ROP8 (>tr V5B6B7 V5B6B7_TOXGV)	39.20	6.98	599.40	#####	73	21	2	34.75	587	5963	66,973
291	Ribonucleoside-diphosphate reductase (>tr B9PYC5 B9PYC5_TOXGV)	0.75	0.76	198.80	187910.6	3	1	0	1.25	877	252	
292	Ribosomal protein (>tr B9PZT4 B9PZT4_TOXGV)	13.40	5.55	481.90	#####	15	7	0	31.34	217	2695	24,603
293	ribosomal protein L13 (>tr A0A125YI12 A0A125YI12_TOXGV 60S)	3.35	1.46	299.80	#####	8	5	0	16.06	355	5295	39,682
294	Ribosomal protein L15 (>tr B9PN66 B9PN66_TOXGV)	15.21	4.16	395.80	#####	12	8	1	32.19	205	63	24,326
295	Ribosomal protein L21, putative (>tr A0A125YMU1 A0A125YMU1_TOXGV)	6.51	3.27	337.20	371238.1	5	5	0	25.48	157	2009	17,894
296	ribosomal protein L3, putative (>tr B9PMX8 B9PMX8_TOXGV 60S)	19.98	4.36	542.50	#####	29	19	1	35.99	389	1196	44,057
297	Ribosomal protein L34, putative (>tr B9PMZ3 B9PMZ3_TOXGV)	4.55	4.56	420.80	233709.9	1	1	0	8.96	134	1885	15,383
298	Ribosomal protein L41 (>tr B9PU99 B9PU99_TOXGV)	0.79	0.55	243.30	110331.5	2	2	0	20.00	105	1459	
299	Ribosomal protein L5, putative (>tr B9PV52 B9PV52_TOXGV)	22.19	4.79	434.30	#####	27	14	2	40.97	310	1464	35,342
300	ribosomal protein L8, putative (>tr B9PU56 B9PU56_TOXGV 60S)	14.82	4.57	385.20	410467.5	8	6	1	23.46	260	3690	28,255
301	Ribosomal protein L9, putative (>tr B9PT01 B9PT01_TOXGV)	3.37	2.43	379.30	158876.0	2	2	0	10.53	190	2934	21,424
302	Ribosomal protein RPL27 (Fragment) (>tr A0A125YU34 A0A125YU34_TOXGV)	3.82	1.95	467.40	#####	9	8	2	36.62	142	5585	16,331
303	Ribosomal protein RPL4 (>tr A0A125YJY9 A0A125YJY9_TOXGV)	0.80	0.65	360.90	449456.9	5	3	0	5.36	448	8037	49,258
304	Ribosomal protein RPL6 (>tr A0A125YZB5 A0A125YZB5_TOXGV)	1.17	1.19	186.70	852067.2	5	2	0	7.80	282	7666	
305	Ribosomal protein RPL7 (>tr B9PIY5 B9PIY5_TOXGV)	15.40	5.70	520.70	#####	18	9	2	34.50	258	5396	30,122
306	Ribosomal protein RPS3 (>tr A0A125YYN8 A0A125YYN8_TOXGV)	16.45	5.47	433.30	#####	25	11	1	31.37	255	8001	28,737
307	Ribosomal protein RPS3 (>tr A0A125YYN8 A0A125YYN8_TOXGV)	3.66	3.57	305.50	112754.3	2	2	0	8.63	255	8001	28,737
308	ribosomal protein S26, putative (>tr B9PP49 B9PP49_TOXGV 40S)	3.80	3.18	455.40	407851.2	4	3	0	25.00	112	3929	12,726
309	ribosomal protein S26, putative (>tr B9PP49 B9PP49_TOXGV 40S)	2.48	2.47	262.60	64468.2	2	1	0	10.71	112	3929	12,726
310	Ribosomal-ubiquitin protein RPL40 (>tr B9PTM6 B9PTM6_TOXGV)	1.05	1.04	327.50	343524.5	2	1	0	4.65	129	1335	14,685
311	RNA binding protein, putative (>tr B9PZC9 B9PZC9_TOXGV)	3.51	3.54	316.60	32357.9	1	1	0	3.76	372	67	39,168
312	RNA binding protein, putative (>tr B9QR64 B9QR64_TOXGV)	2.44	1.50	283.10	505181.4	7	5	0	3.28	2072	4652	218,557
313	RNA recognition motif-containing protein (>tr B9Q3U3 B9Q3U3_TOXGV)	3.29	3.27	436.20	#####	5	3	0	7.44	430	6004	45,032
314	RNA recognition motif-containing protein (>tr V5B5J6 V5B5J6_TOXGV)	30.13	6.01	503.90	#####	29	14	3	29.24	513	1100	53,409
315	RNA recognition motif-containing protein (Fragment) (>tr V4Z2A3 V4Z2A3_TOXGV)	1.18	0.74	181.00	486639.5	5	3	0	5.40	667	7541	

316	SAG-related sequence SRS29B (>tr V4Z6M2 V4Z6M2_TOXGV)	12.36	4.55	403.60	290669.2	5	4	0	16.37	336	5852	34,732
317	SAG-related sequence SRS29B (>tr V4Z6M2 V4Z6M2_TOXGV)	16.96	5.46	513.20	#####	14	7	1	21.73	336	5852	34,732
318	SAM-dependent methyltransferase (>Reverse >tr V4ZR02 V4ZR02_TOXGV)	0.72	0.70	240.80	414367.6	4	1	0	1.05	760	14944	
319	Sec7 domain-containing protein (>tr V5BDM3 V5BDM3_TOXGV)	0.76	0.67	245.40	#####	12	4	1	1.15	3987	4657	426,027
320	Signal peptidase (>tr B9QND8 B9QND8_TOXGV)	6.40	3.65	307.20	#####	8	7	0	4.95	1859	1945	203,246
321	Signal peptidase (>tr B9QND8 B9QND8_TOXGV)	1.26	1.19	303.80	#####	8	2	0	0.91	1859	1945	203,426
322	Small nucleolar RNA-associate (>tr B6KAG9 B6KAG9_TOXGV)	11.79	4.98	389.20	459161.0	8	8	0	2.84	3738	4104	402,506
323	SNARE associated Golgi protein (>tr A0A125YQT4 A0A125YQT4_TOXGV)	0.98	1.01	232.90	71723.1	1	1	0	3.30	394	4263	
324	SNARE associated Golgi protein (>tr B9QP69 B9QP69_TOXGV)	0.83	0.85	214.00	36486.1	1	1	0	1.90	422	426	
325	START domain-containing protein (>tr V5B2A1 V5B2A1_TOXGV)	5.02	3.02	326.40	94093.6	2	2	0	5.42	424	7859	46,417
326	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial (>tr B9PZU5 B9PZU5_TOXGV)	5.89	3.03	564.10	#####	12	9	1	12.41	669	2017	72,733
327	Sulfite exporter TauE/SafE protein (>tr A0A125YYA8 A0A125YYA8_TOXGV)	0.75	0.77	120.90	58144.6	1	1	0	4.47	380	7217	
328	SWI2/SNF2 Brahma (>tr V4Z301 V4Z301_TOXGV Putative)	0.68	0.78	111.20	43602.3	1	1	0	0.92	1628	3044	
329	Thioredoxin domain protein (>tr A0A0F7UZN1 A0A0F7UZN1_TOXGV)	3.42	3.47	350.90	32534.5	1	1	0	1.18	1014	1781	11,841
330	TLC domain protein (>tr B9QJK9 B9QJK9_TOXGV)	3.61	3.63	291.60	84167.2	1	1	0	2.53	435	1087	49,179
331	TLC domain protein (>tr V4ZD29 V4ZD29_TOXGV)	2.98	3.00	386.70	37210.6	1	1	0	2.98	369	2863	41,151
332	TPR domain-containing protein (>tr B6KAM8 B6KAM8_TOXGV)	0.84	0.92	235.40	770024.7	2	1	0	0.41	1697	378	
333	Transcription elongation factor SPT6 (>tr B6K9Y2 B6K9Y2_TOXGV)	34.78	4.69	497.10	#####	28	25	0	8.30	3132	4021	349,888
334	Transmembrane 9 superfamily member (>tr A0A125YQ71 A0A125YQ71_TOXGV)	12.70	5.69	462.30	843751.8	9	6	0	11.47	654	7088	73,599
335	Transmembrane 9 superfamily member (>tr B9PSX1 B9PSX1_TOXGV)	5.65	3.34	357.30	151565.8	2	2	0	4.45	674	2310	76,342
336	Transmembrane amino acid transporter protein (>tr B9Q7Y3 B9Q7Y3_TOXGV)	1.65	1.69	285.10	63497.9	1	1	0	1.65	726	3125	78,921
337	Transmembrane domain-containing protein (>tr B9PMK8 B9PMK8_TOXGV)	2.80	2.72	413.50	101871.7	2	2	0	5.26	589	2462	64,569
338	Transporter, major facilitator family domain containing protein (>tr V4ZD88 V4ZD88_TOXGV)	0.93	1.00	174.50	26937.9	1	1	0	1.31	1302	3771	
339	Transporter, major facilitator family protein (>tr B6KB03 B6KB03_TOXGV)	2.98	2.88	226.90	409189.3	2	2	0	6.55	504	3115	
340	Trehalose-6-phosphate synthase domain-containing protein (>tr B9QHQ6 B9QHQ6_TOXGV)	0.61	0.63	133.10	188706.7	3	3	0	4.50	1222	123	
341	tRNA binding domain-containing protein (>tr V4Z3K0 V4Z3K0_TOXGV)	3.81	3.80	333.20	321026.7	3	2	0	4.87	472	7584	51,027
342	Tryptophanyl-tRNA synthetase (TrpRS2) (>tr B9PU09 B9PU09_TOXGV)	13.26	5.94	438.80	#####	12	12	1	20.03	689	6994	77,003
343	Tubulin alpha chain (>tr B9PJD4 B9PJD4_TOXGV)	10.63	3.49	463.20	#####	19	9	3	22.74	453	1592	50,114
344	Tubulin beta chain (>tr B9PWK0 B9PWK0_TOXGV)	6.91	2.56	432.20	#####	5	4	1	12.92	449	683	50,052
345	Tubulin beta chain (>tr B9PYN1 B9PYN1_TOXGV)	4.65	4.41	400.10	835600.0	6	4	0	10.47	449	35	50,037
346	Tubulin beta chain (>tr B9PYN1 B9PYN1_TOXGV)	1.70	1.03	283.10	223134.7	7	2	1	5.35	449	35	50,037
347	Tubulin beta chain (>tr B9Q1T8 B9Q1T8_TOXGV)	38.93	5.36	536.50	#####	36	17	8	33.85	449	3148	50,073
348	Tumor suppressor mitostatin (>tr A0A125YSL8 A0A125YSL8_TOXGV)	1.48	1.28	378.00	691957.0	12	1	0	1.38	507	8081	60,633
349	Tumor suppressor mitostatin (>tr A0A125YSL8 A0A125YSL8_TOXGV)	2.00	1.63	396.60	#####	16	2	0	2.96	507	8081	60,633
350	Tyrosine kinase-like (TKL) protein (>tr V5AXL6 V5AXL6_TOXGV)	1.69	1.02	187.60	168383.1	4	2	0	0.90	3571	1219	
351	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase family 2 protein (>tr V4ZIR0 V4ZIR0_TOXGV)	10.11	4.99	396.70	242657.6	4	4	0	2.83	2294	4179	248,139
352	UDP-galactose transporter family protein (>tr B9QJ78 B9QJ78_TOXGV)	3.33	3.35	289.70	65073.9	1	1	0	6.30	413	4422	45,481
353	utative chaperonin cpn60 (>tr B6KFE8 B6KFE8_TOXGV)	9.95	3.84	387.80	#####	23	10	1	17.09	667	1294	72,237
354	V Ca2-ATPase (>tr B6K8Q8 B6K8Q8_TOXG)	27.46	6.02	545.40	#####	17	15	0	10.43	1822	678	199,143
355	V-type proton ATPase subunit a (>tr B6KJX9 B6KJX9_TOXGV)	3.92	3.62	379.00	125964.6	2	2	0	3.08	909	1826	101,077
356	Zinc finger (C3HC4 RING finger) protein, putative (>Reverse >tr B9QR35 B9QR35_TOXGV)	0.59	0.61	388.60	#####	2	1	0	1.27	710	8526	

Immunoprecipitation RL2

Enrichissement par la sWGA