

Université des Sciences et Technologies De Lille



Laboratoire de Chimie Biologique
Unité Mixte de Recherche du C.N.R.S. N° 8576



THESE de doctorat

pour l'obtention du grade de

Docteur de l'université de Lille I

Discipline : **Biochimie**
présentée et soutenue publiquement par :

Tony LEFEBVRE

Le 24 novembre 2000



**Implication de la O-N-Acétylglucosaminylation dans sa
compétition vis-à-vis de la phosphorylation, le transport nucléaire
des protéines cytosoliques et la maturation.**

Directeur de thèse : Docteur Jean-Claude Michalski

Membres du jury :

Professeur René Cacan, Président
Docteur Simon Saule, Rapporteur
Docteur Annie-Claude Roche, Rapporteur
Docteur Marie-Laure Caillet-Boudin, Examineur
Professeur Jean-Pierre Vilain, Examineur

Docteur Jean-Claude Michalski, Directeur de Thèse

*A Christelle, mon épouse
Nathan, mon petit garçon,
mes parents,
ma belle-maman,
ma famille,*

A la mémoire du Professeur André VERBERT.

REMERCIEMENTS

Je tiens avant toute chose à remercier et à rendre hommage au Professeur André VERBERT, qui m'a accueilli au sein de l'UMR 8576. Je retiendrai de vous Monsieur VERBERT, surtout votre bonne humeur, votre dynamisme et vos goûts pour le contact et l'enseignement. Merci de m'avoir fait découvrir la biochimie, lorsque que j'étais en DEUG.

Jean-Claude, tu es pour beaucoup dans ce travail. Merci de m'avoir confié ce sujet tout neuf et merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir donné les moyens de réussir. Je te remercie de m'avoir accueilli au sein de ton équipe et te remercie pour ta grande humanité quotidienne. Je sais à quel point est lourde cette charge qui pèse désormais sur tes épaules depuis que tu as pris la direction de l'UMR. Je tiens à te souhaiter, Monsieur le Directeur, bonne chance dans tes nouvelles fonctions que, j'en suis sûr, tu mèneras à bien. Ne perds jamais cette bonne humeur et cette simplicité qui te caractérisent si bien.

Marie-Laure vous êtes également pour beaucoup dans ce travail. C'est avec vous que nous avons commencé l'étude de la O-GlcNAc et depuis le démarrage de ces travaux notre collaboration n'a cessé de se renforcer. Vous avez su m'aiguiller dans ces recherches et je ne peux compter aujourd'hui le nombre de choses que vous m'avez apprises sur le métier de chercheur. J'ai pu également apprécier vos qualités humaines. Je tiens à vous adresser Marie-Laure un très grand merci.

Je remercie également le Dr André DELACOURTE pour m'avoir accueilli dans son laboratoire.

Simon, je vous remercie pour tout ce que vous avez fait pour moi. J'ai pu apprécier chez vous une rigueur scientifique et un sérieux peu communs. Merci également pour votre disponibilité et pour la vitesse à laquelle vous avez pu répondre à toutes nos attentes aussi bien pour les expériences que pour tout ce qui était manuscrit. Merci également d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse.

Stéphane, nous avons démarré nos études assez tard et malgré tout celles-ci ont très vite progressées. Ceci est en grande partie dû à votre dynamisme et votre grand sérieux. Merci Stéphane de nous avoir fait emprunter une nouvelle voie d'étude de la O-GlcNAc qui me tarde de continuer. Bon courage pour la suite de votre carrière, Monsieur le Professeur.

Je remercie aussi le Professeur Jean-Pierre VILAIN pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et d'avoir accepté d'être examinateur de cette thèse.

Je remercie le Docteur Annie-Claude ROCHE d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse.

Monsieur René CACAN, c'est un honneur pour moi de vous avoir en tant que Président du jury de cette thèse. Jamais vous n'avez refusé un conseil ou une explication, et vos talents de pédagogue ne sont pas pour rien aujourd'hui dans l'intérêt que je porte à la biochimie.

Je tiens à remercier le Docteur Jean-Pierre ZANETTA pour ces nombreux conseils, notamment sur les lectines animales et pour sa mine de matériels et de produits qu'il ne rechigne jamais à donner. Merci également pour ta lecture (très) attentive de cette thèse.

Je ne veux surtout pas oublier les personnes qui m'ont initié aux différentes techniques de recherches et qui m'ont souvent aidé et conseillé techniquement dans ce travail : Stéphane LANDAIS et Saïd MAHBOUB (électrophorèses), Catherine ALONSO (HPLC), Marie-Joëlle DUPIRE et Stéphanie FERREIRA (culture cellulaire), Manuella BAILLY (culture cellulaire, immunoprécipitation), Anne-Marie MIR (dissection et perfusion des rats), Maryse MASSON et Joël MAZURIER (électrophorèse bidimensionnelle), Marie-Christine SLOMIANNY (FPLC), Denis LELEU (HPAEC, Dionex) et Yann GUERARDEL (techniques de dessalage). Votre aide a été en tout point indispensable.

Merci aux Docteurs Christophe MARILLER et Jérôme LEMOINE pour leurs conseils scientifiques et pour la lecture de ce travail. Un grand merci également au Professeur Ole Kristian TOLLERUD pour les corrections en anglais des articles.

Je remercie tous mes amis pour leur bonne humeur et leur soutien dans les moments parfois difficiles : Yann, Christine, Christelle, Alexandra, Alexandre, Bénédicte, Guy, Manu, Willy, Christophe M, Christophe F, Calliope, Xavier, Catherine (R et A), Olivier, Julio, Denis, Caroline, Saïd, Stéphane (L)...

Merci à tout le personnel du C9, aux secrétaires, aux J&J...

Merci aux Docteurs Frédéric CHIRAT et Christophe MARILLER de m'avoir initié et donné goût à l'enseignement.

....ET SURTOUT MILLE MERCI A CEUX QUI ONT CRU EN MOI ET QUI ONT PATIENTE JUSQU'ICI.

Ce travail a été réalisé à l'Université des Sciences et Technologies de Lille (Lille I) au sein de l'Unité Mixte de Recherches n°8576, Glycobiologie structurale et fonctionnelle, dirigée par le Professeur André VERBERT, dans le laboratoire du Docteur Jean-Claude MICHALSKI. Nous avons bénéficié pour ce travail d'une Allocation de recherches MRT.

Avis au lecteur

Ce mémoire de thèse débute par des généralités sur la O-*N*-Acétylglucosaminylation, et par la suite chacune des parties de résultats, hormis la première, est introduite par des généralités sur le système ou le modèle étudié (les protéines Tau, le gène Pax-6, les lectines animales et la maturation des ovocytes de Xénope) : il y a ainsi cinq parties de généralités. Les figures et les tableaux de ces cinq parties sont numérotés à la suite, alors que les figures des différentes parties de résultats sont numérotées de façon indépendante d'une partie à l'autre.

RESUME

Mise en évidence pour la première fois en 1984, la O-GlcNAc constitue la forme majeure de glycosylation retrouvée dans les compartiments cytosolique et nucléaire des cellules eucaryotes. Bien que la liste des protéines O-N-Acétyleglucosaminylées ne cesse de s'allonger, peu de choses sont connues sur le rôle de cette glycosylation. Nous avons tenté d'apporter un certain nombre d'éléments de réponse susceptibles de faire progresser notre connaissance des différentes fonctions de cette glycosylation particulière.

En utilisant un inhibiteur de phosphatases, nous avons démontré, sur une lignée de neuroblastomes, d'une part et sur les protéines Tau d'autre part, que l'augmentation de l'occupation de certains sites hydroxylés par les groupements phosphates coïncidait avec une diminution de la O-N-Acétyleglucosaminylation. Nous avons montré que cette balance entre la phosphorylation et la O-N-Acétyleglucosaminylation est associée avec la localisation nucléaire des protéines Tau. L'étude de la glycosylation des produits du gène Pax-6 est venue renforcer la relation entre la O-GlcNAc et la localisation nucléaire : en effet sur les cinq isoformes étudiées, seules les deux isoformes exclusivement nucléaires sont modifiées par la O-GlcNAc, les autres, de localisation à la fois cytosolique et nucléaire ne l'étant pas. A partir du foie de rat, nous avons pu isoler des lectines spécifiques de la GlcNAc, ces lectines se retrouvant à la fois dans le cytosol et dans le noyau. Nous avons pu montrer que le degré de phosphorylation de ces lectines diffère dans les deux compartiments. Les lectines cytosoliques reconnaissent des ligands O-N-Acétyleglucosaminylés localisés tant dans le cytosol, que dans le noyau. Ceci suggère que ces lectines pourraient intervenir dans le transport des protéines cytosoliques vers le noyau. Enfin, nous avons pu montrer que le phénomène de maturation des ovocytes de Xénope induisait une augmentation du taux de O-GlcNAc de certaines protéines cytoplasmiques.

Mots clés : O-GlcNAc, phosphorylation, transport nucléaire, protéines Tau, Pax-6, maturation, ovocytes, et lectines nucléaires.

TABLE DES MATIERES

Résumé	1
Table des matières	2
Liste des abréviations	9
Liste des acides aminés et de leur symbole	10
Communications écrites et orales	11
Présentations écrites.....	11
Présentations orales.....	11
Publications scientifiques	13
Collaborations	14
Introduction	15
Généralités sur la O-N-Acétylglucosaminylation	17
I- Introduction : la glycosylation dans les compartiments cytosolique et nucléaire.....	18
II- La O-N-Acétylglucosaminylation (O-GlcNAc).....	18
1- Définition.....	18
2- Les protéines à O-GlcNAc.....	21
3- Sites peptidiques de O-N-Acétylglucosaminylation.....	21
4- Propriétés communes aux protéines à O-GlcNAc.....	24
5- Les rôles de la O-GlcNAc.....	25
i-O-GlcNAc et phosphorylation : des fonctions antagonistes ?.....	25
ii-La reconnaissance protéine – protéine.....	29
iii-La O-GlcNAc est-elle un signal de translocation nucléaire ?.....	31
a- Rappels sur le transport nucléaire des protéines.....	31
✓ Le pore nucléaire et la membrane nucléaire.....	31
✓ Le signal de localisation nucléaire.....	32
✓ Le processus de transport nucléaire.....	33
b- La O-GlcNAc joue-t-elle un rôle dans le transport des protéines cytosoliques vers le noyau ?.....	34
c- Les protéines du pore nucléaire à O-GlcNAc et l'inhibition du transport nucléaire par la WGA.....	35
d- La phosphorylation et le transport nucléaire.....	36
iv-Activités d'enzyme : l'ARN polymérase II.....	37
v-Activité des facteurs de transcription.....	38
vi-Stabilité protéique.....	39
6- Les enzymes de la O-GlcNAc.....	39
i-La O-N-Acétylglucosaminyltransférase.....	39
ii-La O-N-Acétylglucosaminidase.....	41
7- Le glucose, la voie des hexosamines et la synthèse de la O-GlcNAc : étude dans les cellules béta du pancréas.....	41
i- Introduction.....	41
ii- La streptozotocine (STZ) : un analogue de la N-Acétylglucosamine.....	42

iii-Le glucose est-il une source de O-GlcNAc dans les cellules bêta ?	
Rôle dans la toxicité des cellules bêta, rôle apoptotique ?	42

Résultats et travaux personnels.....46

1^{ère} Partie :Effet de l'acide okadaïque sur les niveaux de O-GlcNAc dans une lignée de neuroblastomes.....47	
I- Résumé du travail.....49	
II-Effect of Okadaic Acid on O-Linked <i>N</i> -Acetylglucosamine levels in a neuroblasma cell line.....52	
1- Abstract.....53	
2- Introduction.....54	
3- Materials and methods.....55	
i- Cell Culture.....55	
ii- Cell fractionation.....55	
iii-Radioactive labelling.....55	
iv-Labeled galactose transfer on GlcNAc residues with galactosyl transferase56	
v- Radioactivity counting.....56	
vi-Polyacrylamide gel electrophoresis, western blotting and PNGase F treatment.....56	
vii- UDP-GlcNAc level assay.....57	
4- Results.....58	
i- Okadaic acid effect on total homogenate58	
ii- Subcellular location of O-linked terminal GlcNAc proteins in Kelly cells.....59	
iii-Study of GlcNAc incorporation on glycoproteins after okadaic acid treatment.....59	
iv-[³ H]Galactose labelling with Galactosyltransferase66	
v- UDP-GlcNAc level assay.....66	
5- Discussion.....66	
6- References.....68	
7- Abbreviations.....73	
8- Acknowledgement.....73	
III- Arguments supplémentaires à l'étude de la balance phosphorylation et O-N-Acétyleglucosaminylation.....74	
1- Utilisation d'un inhibiteur de Protéine Kinase C : la chélérythrine.....74	
2- Incorporation d'UDP-[¹⁴ C]GlcNAc après traitement par la phosphatase alcaline.....74	
3- Influence de l'acide okadaïque sur la glycosylation de l'antigène Large-T.....76	

2^{ème} Partie : Mise en évidence de la balance phosphorylation/O-N-acétylglucosaminylation sur les protéines Tau, rôle dans la localisation nucléaire.....	77
I- Les Protéines Tau.....	78
1- Définition.....	78
2- Le gène codant pour les protéines Tau.....	78
3- Les isoformes de Tau.....	80
4- Les pathologies liées aux protéines Tau (Tauopathies).....	80
i- La maladie d'Alzheimer.....	80
ii- Autres pathologies liées aux protéines Tau.....	82
5- La phosphorylation des protéines Tau.....	83
6- Autres modifications post-traductionnelles des protéines Tau.....	83
i-La glycosylation non-enzymatique ou glycation.....	85
ii- L'ubiquitination.....	85
iii-La O-N-Acétylglucosaminylation.....	85
iv-N- et O- glycanes.....	85
v- Modifications post-traductionnelles diverses.....	85
7- Localisation cellulaire des protéines Tau.....	86
8- Utilisation de l'acide okadaïque.....	86
i- Définition et structure de l'acide okadaïque.....	86
ii- Propriétés.....	86
iii-Intérêt de l'acide okadaïque dans l'étude de la maladie d'Alzheimer.....	88
II-Résultats.....	90
III- Evidence of a balance between O-GlcNAc glycosylation and phosphorylation on tau proteins-Role in the nuclear localization.....	94
1- Abstract.....	95
2- Introduction.....	96
3- Materials and Methods.....	98
i- Construction of the expression vector.....	98
ii- Cell Culture and transfection.....	98
iii-Cell fractionation.....	98
iv-Immunofluorescence method.....	99
v- Isoelectric focusing and polyacrylamide gel electrophoresis.....	99
vi-Western blotting, PNGase F treatment and densitometric analysis.....	100
vii- Labeled galactose transfer on GlcNAc residues with galactosyl transferase. β - elimination and saccharide analysis.....	101
4- Results.....	102
i- Transfection of human Kelly neuroblastoma cells by the longest human Tau isoform cDNA, Tau441.....	102
ii- WGA staining of cytosolic and nuclear Tau proteins.....	102
iii-Okadaic acid effect on the glycosylation of Tau proteins.....	104
iv-Two-dimensional electrophoresis analysis of cytosolic Tau proteins : evidence for a balance between phosphorylation and O-GlcNAc glycosylation.....	107

v- 2-D analysis of the nuclear Tau proteins : influence of phosphorylation level on nuclear localization.....	109
5- Discussion.....	112
6- References.....	116
7- Abbreviations.....	121
8- Acknowledgement.....	121

3^{ème} Partie :O-N-Acétlylglucosaminylation des formes nucléaires des produits

du gène Pax-6.....	122
I- Généralités sur Pax-6 : un gène implique dans le développement de l'œil.....	123
1- Introduction : la famille des gènes Pax.....	123
2- Pax-6 : un gène impliqué dans le développement de l'œil.....	124
i- Définition.....	124
ii- Les produits du gène Pax-6.	124
iii-Localisation cellulaire des produits du gène Pax-6.....	127
iv-Les domaines de liaison à l'ADN des produits du gène Pax-6.....	127
3- Anomalies associées à des mutations du gène Pax-6.....	128
4- La régulation transcriptionnelle de Pax-6.....	129
5- Les rôles de Pax-6.....	129
II-Résultats.....	130
III- O-Glycosylation of the nuclear forms of Pax-6 Products in Quail neuroretina cells.....	134
1- Abstract.....	135
2- Introduction.....	136
3- Materials and Methods.....	138
i- Cells.....	138
ii- Antibodies used.....	138
iii-Lysate and Immunoprecipitation.....	138
iv-PNGase F digestion.....	138
v- Labeled galactose transfer on GlcNAc residues with galactosyl transferase.....	139
vi-Polyacrylamide gel electrophoresis, western blotting.....	139
vii- Nuclear extracts preparation.....	140
viii-β-elimination and saccharide analysis of the Pax-6 products.....	140
ix-In vitro transcription.....	141
x- Pax-6-DNA binding assays.....	141
4- Results.....	143
i- Pax-6 products are specifically bound by WGA.....	143
ii- In vitro labeling of Pax-6 products with galactosyltransferase.....	143
iii-[¹⁴ C]GlcNH ₂ incorporation on the cell culture.....	145
iv-Determination of the nature of the terminal O-linked GlcNAc.....	145

v- Pax-6 products are specifically recognized by WGA in the neuroretina nuclear extracts.....	145
vi- WGA-selected Pax-6 proteins bind DNA efficiently in vitro.....	148
5- Discussion.....	151
6- Acknowledgments	155
7- Abbreviations.....	155
8- References	156
IV- Glycosylation <i>in vitro</i> des différents domaines des produits du gène Pax-6 exprimés chez E. coli.....	161

4^{ème} Partie : Etude des lectines cytosoliques et nucléaires à GlcNAc du foie de rat et de leurs ligands endogènes, implication possible de ces lectines dans le transport des protéines cytosoliques vers le noyau.....

I- Les lectines animales.....	164
1- Définition des lectines.....	164
2- Historique.....	164
3- Rôle des lectines animales.....	165
4- Les différentes familles de lectines animales.....	167
i- Les lectines du type-C.....	168
a- Caractéristiques et rôles des lectines du type-C.....	168
b- Les différentes lectines du type-C.....	168
α -Les récepteurs hépatiques.....	169
β -Les sélectines.....	169
χ -Les collectines.....	169
ii- Les galectines.....	170
a- Caractéristiques des galectines.....	170
b- Localisation tissulaire et cellulaire.....	170
c- Les ligands des galectines.....	170
d- Quelques rôles biologiques des galectines.....	171
iii- Les lectines du type-I.....	172
a- Caractéristiques des lectines du type-I.....	172
b- Les principales lectines du type-I.....	172
α -La CD22.....	172
β -Les sialoadhésines.....	173
χ -Le CD33.....	173
δ -La Myelin Associated Glycoprotein (MAG).....	173
ϵ - Autres lectines du type-I.....	173
iv- Les lectines du type-P	173
a- Caractéristiques des lectines du type-P.....	173
b- Localisation et rôle.....	174
v- La Calnexine et la calréticuline.....	174
vi- Les pentraxines.....	174
vii- Autres lectines animales.....	175

5- Les lectines nucléaires.....	176
i- Les lectines nucléaires connues.....	176
ii- Les ligands des lectines nucléaires.....	176
iii-Localisation des lectines nucléaires.....	176
iv-Rôles des lectines nucléaires.....	177
II- Résultats.....	178
III- Characterization of rat liver cytosolic and nuclear GlcNAc-specific lectins and of their endogenous ligands Possible implication in the nuclear transport of cytosolic proteins.....	181
1- Abstract.....	182
2- Introduction.....	183
3- Materials and Methods.....	185
i- Rat liver nuclei and cytosol preparation.....	185
ii- Affinity chromatography.....	185
iii-Polyacrylamide gel electrophoresis, western blotting.....	186
iv-Isoelectric focusing and Polyacrylamide gel electrophoresis	186
v- Non-denaturant electrophoresis.....	186
vi-Separation of GlcNAc-specific lectins on FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography).....	187
vii- Labeled galactose transfer on GlcNAc residues with galactosyl transferase.....	187
viii- β -elimination and saccharide analysis of cytosolic proteins recognized by biotinylated nuclear GlcNAc-specific lectins.....	187
ix-Preparation of the biotinylated nuclear GlcNAc-specific lectins.....	188
x- Staining of WGA-selected proteins with biotinylated nuclear lectins.....	188
xi-Revelation of endogenous lymphocytes ligands, with biotinylated nuclear lectins.....	188
xii- Phosphatase and glucosaminidase activities assay.....	189
4- Results.....	190
i- Cytosolic and nuclear GlcNAc-specific lectins present identical molecular weight but differ in their pI.....	190
ii- GlcNAc-specific lectins are phosphoproteins but are not modified with O-GlcNAc glycosylation.....	190
iii-GlcNAc-specific lectins are part of high molecular weight complexes in non-denaturing conditions.....	192
iv-Cytosolic and nuclear GlcNAc-specific lectins are associated with phosphatase activity.....	192
v- Biotinylated nuclear GlcNAc-specific lectins are able to recognize endogenous substrates in cytosolic and nuclear compartments.....	196
5- Discussion.....	201
6- References.....	204

7- Acknowledgments	207
III- Identification des ligands des lectines à GlcNAc.....	209
5^{ème} Partie : Etude de la O-GlcNAc lors de la maturation de	
l'ovocyte de Xénope.....	212
I- Généralités sur la maturation de l'ovocyte de Xénope.....	213
1- Introduction – l'ovocyte de Xénope.....	213
2- La maturation de l'ovocyte de Xénope.....	213
i- Fixation de la Pg à son récepteur.....	215
ii- Etapes précoces de la maturation.....	215
a- Inhibition de l'adénylate cyclase.....	215
b- Activation de la phosphatidylinositol kinase.....	215
c- Alcalinisation.....	217
iii-Activation des kinases.....	217
a- la voie MAPK.....	217
b- le MPF.....	218
α –Activation du MPF.....	218
β –Migration du MPF vers le noyau.....	220
iv- Evénements cytologiques.....	220
v- Fin de la maturation.....	220
II- Introduction au travail sur la maturation des ovocytes de Xénope.....	222
III- Résultats.....	223
1- Etude de la O-GlcNAc sur des ovocytes immatures (phase G2) et	
des ovocytes matures (phase M).....	223
2- Cinétique de maturation.....	223
3- Transfert de galactose tritié sur les O-GlcNAc terminaux.....	226
4- Localisation cellulaire des protéines ayant leur O-GlcNAc qui	
augmente au cours de la maturation	228
5- Maturation des ovocytes de Xénope en présence d'un inhibiteur	
de la synthèse protéique.....	228
6- Enrichissement des protéines à O-GlcNAc par WGA-sépharose.....	231
7- Dosage des activités glucosaminidase et O-GlcNAc transférase au	
cours de la maturation.....	231
Conclusion générale.....	235
Références bibliographiques.....	239

Liste des abréviations

- AD**, Alzheimer disease
ADN, Acide désoxyribonucléique
AMP, Adénosine 5'-monophosphate
AMPC, Adénosine 5'-monophosphate cyclique
ARN, Acide ribonucléique (m, messenger ; t, de transfert)
ATCA, Acide trichloro-acétique
ATP, Adénosine 5'-triphosphate
AO, Acide okadaïque
BSA, Bovine serum albumin
CHAPS, 3-[(3-Cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propane-sulfonate
Che, Chébérythrine
Ctrl, Contrôle
DTT, Dithiothreitol
ECL, Enhanced chemiluminescence
EDTA, Ethylène di-amine tetra-acetic acid
EGTA, Ethylene Glycol-bis (β -aminoethyl ether) N, N, N'-tetracetic acid
FPLC, fast protein liquid chromatography
GalNAc, N-Acetylgalactosamine
GFAT, Glutamine : fructose-6-phosphate amidotransférase
GlcNAc, N-Acetylglucosamine
GST, Glutathione S-transférase
GTP, Guanosine 5'-Triphosphate
GVBD, Germinal Vesicle Breackdown
HEPES, N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]
HPAEC, High-pH anion exchange chromatography
HPLC, High-performance liquid chromatography
kb, kilobase
K.CI 16, Kelly Clone 16
kDa, kilodalton
MALDI-TOF, Matrix assisted laser desorption ionization Time of flight
Man-6-P, Mannose-6-phosphate
MAP-kinase, Mitogen Activated Protein-Kinase
MOPS, 4-morpholinepropanesulfonic acid
MPF, M-Phase-promoting factor
NLS, Nuclear Localization Factor
OA, Okadaic acid
O-GlcNAc, O-N-Acetylglucosaminylation
OGT, O-GlcNAc transférase
PB, Phosphate buffer
PBS, Phosphate-buffered saline
PHF, Paired helical filament
Pg, Progestérone
pI, Isoelectric point
PIPES, Piperazine-N, N' bis [2-ethanesulfonic acid] ; 1, 4-piperazine diethanesulfonic acid
pK-A, Protéine kinase A
PMSF, Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride
PNA, Pea nut agglutinin
PNGase F, Peptide-N-glycosidase F
PNP, Para-nitro phenyl
PUGNAc, O-(2-Acetamido-2-deoxy-D-glucosaminopyranosylidene)amino-N-phenylcarbamate
QNR, Quail neuroretina
SDS-PAGE, Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
STZ, Streptozotocine
TBS, Tris-buffered saline
TFA, Tri-fluoroacetic acid
UDP-GlcNAc, Uridine diphospho N-Acetylglucosamine
WGA, Wheat germ agglutinin

Liste des acides aminés et de leur symbole

A : Ala, Alanine

C : Cys, Cystéine

D : Asp, Acide aspartique

E : Glu, Acide glutamique

F : Phe, Phénylalanine

G : Gly, Glycine

H : His, Histidine

I : Ile, Isoleucine

K : Lys, Lysine

L : Leu, Leucine

M : Met, Méthionine

N : Asn, Asparagine

P : Pro, Proline

Q : Gln, Glutamine

R : Arg, Arginine

S : Ser, Sérine

T : Thr, Thréonine

V : Val, Valine

W : Trp, Tryptophane

Y : Tyr, Tyrosine

COMMUNICATIONS ECRITES ET ORALES

COMMUNICATIONS ECRITES

- ✓ Présentation d'un poster au 9th Joint Meeting à Lille les 24 et 25 novembre 1997

Evidence that O-N-Acetylglucosaminylation of cytosolic proteins contributes to their further nuclear translocation

Tony LEFEBVRE, Saïd MAHBOUB, Catherine ALONSO, Jean-Pierre ZANETTA, Marie-Laure CAILLET-BOUDIN and Jean-Claude MICHALSKI

- ✓ Présentation d'un poster au 12th Joint Meeting à Lille les 6 et 7 novembre 2000

O-GlcNAc modulation during Xenopus oocyte maturation

Tony LEFEBVRE, and Jean-Claude MICHALSKI

Stéphane FLAMENT, Frédéric BAERT, Juliette DELEHAYE and Jean-Pierre VILAIN

COMMUNICATIONS ORALES

- ✓ Présentation orale au XXV^{ème} forum des jeunes chercheurs de la Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBBM) du 22 au 25 juin 1998 à Québec :

Implication de la O-N-Acetylglucosaminylation des résidus de sérine et de thréonine dans la translocation des protéines du cytosol vers le noyau

Tony LEFEBVRE, Saïd MAHBOUB, Catherine ALONSO, Jean-Pierre ZANETTA, Marie-Laure CAILLET-BOUDIN et Jean-Claude MICHALSKI

- ✓ Présentation orale au 10th Joint Meeting à Nuland (Hollande) les 10 et 11 novembre 1998 :

Effect of okadaic acid on O-GlcNAc level in a neuroblastoma cell line

Tony LEFEBVRE, Catherine ALONSO, Saïd MAHBOUB, Jean-Pierre ZANETTA, Marie-Laure CAILLET-BOUDIN and Jean-Claude MICHALSKI

- ✓ Présentation orale au 1^{er} Glycojeune le 31 mars 1999 à Villeneuve d'Ascq

(co-organisateur de ce congrès) :

Lectines à N-Acetylglucosamine du noyau et du cytosol de foie de rat

Tony LEFEBVRE, Jean-Pierre ZANETTA and Jean-Claude MICHALSKI

- ✓ Présentation orale au 11th Joint Meeting à Bonn-Röttgen (Allemagne) les 20 et 21 novembre 1999 :

GlcNAc specific nuclear and cytosolic lectins - Role in the nuclear transport of cytosolic proteins ?

Tony LEFEBVRE, Jean-Pierre ZANETTA and Jean-Claude MICHALSKI

- ✓ Présentation orale au 2^{ème} Glycojeune les 30 et 31 mars 2000 à Villeneuve d'Ascq :

La O-N-Acetylglucosamine des protéines : un signal de transport des protéines cytosoliques vers le noyau ?

Tony LEFEBVRE, Marie-Laure CAILLET-BOUDIN, Jean-Pierre ZANETTA and Jean-Claude MICHALSKI

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

- ✓ **Effect of Okadaic Acid On O-Linked N-AcetylGlucosamine Levels In A Neuroblastoma Cell Line**

Tony LEFEBVRE, Catherine ALONSO, Saïd MAHBOUB, Marie-Joëlle DUPIRE, Jean-Pierre ZANETTA, Marie-Laure CAILLET-BOUDIN and Jean-Claude MICHALSKI, *Biochimica and Biophysica Acta* **1472(1, 2)**, 71-81.

- ✓ **Glycosylation Of The Nuclear Forms Of Pax-6 Products In Quail Neuroretina Cells**

Tony LEFEBVRE, Nathalie PLANQUE, Denis LELEU, Manuella BAILLY, Marie-Laure CAILLET-BOUDIN, Simon SAULE and Jean-Claude MICHALSKI (accepté avec révision)

- ✓ **Evidence Of Balance Between O-GlcNAc Glycosylation And Phosphorylation On Tau Proteins- Role In The Nuclear Localization**

Tony LEFEBVRE, Laetitia DUPONT-WALLOIS, Stéphanie FERREIRA, Marie-Joëlle DUPIRE, André DELACOURTE, Jean-Claude MICHALSKI and Marie-Laure CAILLET-BOUDIN (soumis à *J. Neurochem.*).

- ✓ **Characterization Of Rat Liver Cytosolic And Nuclear GlcNAc-Specific Lectins And Of Their Endogenous Ligands - Possible Implication In The Nuclear Transport Of Cytosolic Proteins**

Tony LEFEBVRE, Jean-Pierre ZANETTA and Jean-Claude MICHALSKI (Manuscrit en préparation).

En marge de notre travail, une autre étude est actuellement en cours publication :

- O-Glycan Variability of Egg-Jelly Mucins From *Xenopus Laevis* Characterization Of Four Phenotypes That Differ By The Terminal Glycosylation Of Their Mucins**

Yann GUERARDEL, Ossarath KOL, Emmanuel MAES, Tony LEFEBVRE, Bénoni BOILLY, Monique DAVRIL and Gérard STRECKER *Biochem. J.* **352**, 449-462

COLLABORATIONS

Notre travail a pu bénéficier des collaborations suivantes,

- ✓ **Marie-Laure CAILLET-BOUDIN**, unité INSERM 422, Place de Verdun, 59045 Lille cedex, France
- ✓ **Simon SAULE**, UMR 146 Institut Curie Section Recherche, Bât 110 91405 Orsay cedex France
- ✓ **Stéphane FLAMENT et Jean-Pierre VILAIN**, UPRES EA 1033, Université de Lille 1, bâtiment SN3, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

INTRODUCTION

La O-*N*-Acétylglucosaminylation, que l'on note O-GlcNAc, est le type majeur de glycosylation rencontré dans les compartiments cytosolique et nucléaire des cellules eucaryotes. La liste des protéines modifiées par ce type de glycosylation n'a cessé de s'allonger ces dernières années : entre autres on retrouve cette glycosylation sur des protéines du cytosquelette, des protéines virales ou des facteurs de transcription. Malgré tout, et à l'instar des autres types de glycosylation, les rôles joués par la O-GlcNAc restent obscurs même si certaines fonctions ont pu être proposées. De nombreux auteurs ont comparé cette glycosylation à la phosphorylation, par le fait que cette modification post-traductionnelle est dynamique et qu'elle peut évoluer au cours de différents processus cellulaires tels que l'activation des lymphocytes (Kearse *et al.*, 1991b) ou l'arrêt du cycle cellulaire (Chou *et al.*, 1993). Un blocage des sites O-*N*-Acétylglucosaminylés par « capping » (empêchant ainsi toute labilité de la O-GlcNAc) est létal pour la cellule (Snow *et al.*, 1996). Ceci démontre l'importance de l'aspect dynamique de cette glycosylation atypique pour la vie cellulaire. Il a alors été suggéré que la O-GlcNAc puisse entrer en compétition avec la phosphorylation sur des sites hydroxylés identiques ou adjacents de la chaîne polypeptidique. D'autres fonctions ont pu être proposées telles que l'intervention de la O-GlcNAc dans les interactions protéiques et dans le transport nucléaire. Malgré ces différentes spéculations, il faut reconnaître que dans le domaine des rôles de la O-GlcNAc, il reste beaucoup à faire.

C'est la raison pour laquelle au cours de notre thèse nous avons essayé d'apporter des éléments pouvant éclairer les différentes fonctions de la O-GlcNAc. Ce travail a été l'occasion de bénéficier de différents modèles cellulaires et protéiques, et il a permis la mise en œuvre de différentes approches expérimentales. Les deux premières parties de cette étude se consacreront essentiellement à l'étude de la balance phosphorylation/O-*N*-Acétylglucosaminylation. Ce travail sera effectué sur une lignée cellulaire de neuroblastomes tout d'abord, puis sur une famille de protéines en particulier, les protéines Tau (protéines du cytosquelette). Notre stratégie sera d'utiliser l'acide okadaïque, un inhibiteur de phosphatases, afin de démontrer la réciprocité phosphorylation/O-*N*-Acétylglucosaminylation. Nous ferons la relation entre la balance phosphorylation/O-*N*-Acétylglucosaminylation des protéines Tau et leur localisation nucléaire dans la deuxième partie.

La troisième partie de notre travail portera ensuite sur l'étude de la O-GlcNAc des facteurs de transcription produits du gène Pax-6, exprimés dans la neurorétine et impliqués dans le

développement de l'œil. Il existe différentes isoformes soit de localisation cytoplasmique et nucléaire, soit de localisation exclusivement nucléaire. Il sera intéressant de regarder de quelle manière le résidu de O-GlcNAc substitue ces différentes isoformes.

Dans la quatrième partie, nous rechercherons l'existence de lectines cytosoliques et nucléaires spécifiques du résidu de GlcNAc. En effet, si la O-GlcNAc intervient dans le transport nucléaire des protéines cytosoliques, de telles lectines doivent exister et faire partie de la machinerie de transport.

Enfin et en dernière partie, nous étudierons l'évolution de la O-GlcNAc au cours du processus de maturation des ovocytes de Xénope après stimulation par la progestérone. La maturation est un processus cellulaire important pour le développement de l'ovocyte de Xénope puisqu'elle lui permettra d'être fertilisé. La phosphorylation étant un élément clef du bon déroulement de la maturation, nous devrions observer des variations de O-GlcNAc lors de ce processus.

Généralités

sur la

O-N-Acétylglucosaminylation

I- Introduction : la glycosylation dans les compartiments cytosolique et nucléaire

Il est encore fréquemment admis que la glycosylation des protéines est restreinte à l'appareil de Golgi, au réticulum endoplasmique, au lysosome, à la membrane plasmique et à la sécrétion cellulaire. Ce dogme était dû en grande partie à la connaissance des chemins de biosynthèse des N- et O-glycannes qui a laissé longtemps supposer qu'on ne pouvait retrouver de glycoprotéines ni dans le noyau, ni dans le cytosol (Figure 1).

Or des preuves de glycosylation cytosolique et nucléaire sont apparues au cours de ces dernières années. L'existence de glycoprotéines dans le cytosol et dans le noyau des cellules eucaryotes a été rapportée grâce à l'utilisation de lectines ou par analyse de compositions en monosaccharides. Ces travaux sont restés souvent ignorés. Ceci était dû à la difficulté d'obtenir des fractions cytosolique et nucléaire dépourvues de contaminants (notamment de membranes) et à l'absence d'explication concernant la biosynthèse et le transport de ces glycoprotéines.

Ainsi, on sait aujourd'hui que la glycosylation la plus répandue dans le cytosol et dans le noyau des cellules eucaryotes est la **O-N-Acétyleglucosaminylation** (notée **O-GlcNAc**). Elle n'est pas la seule, on retrouve également : les phospho-mannosyles O-liés dans le cytosol, les oligosaccharides O-liés contenant du fucose, l' α -glucosyl lié sur une tyrosine de la glycogénine, les protéoglycannes à mannose dans le cytosol, les glycoaminoglycannes (GAG) dans le noyau.

II-La O-N-Acétyleglucosaminylation (O-GlcNAc)

1- Définition

La O-GlcNAc est un type de glycosylation qui consiste en l'addition d'un unique monosaccharide, la *N*-Acétyleglucosamine (GlcNAc), sur des résidus de sérine et de thréonine de la chaîne polypeptidique (Figure 2). La O-GlcNAc a été mise en évidence pour la première fois par l'équipe de Gerald W. Hart (Torres *et* Hart, 1984) qui travaillait sur la distribution des structures glycanniques à résidus de *N*-Acétyleglucosamine terminaux à la surface des lymphocytes en fonction de leur stade de développement et de leur phénotype. Pour mettre en évidence cette glycosylation, ils ont utilisé la galactosyltransférase bovine, protocole couramment utilisé aujourd'hui pour l'étude de la O-GlcNAc (Whiteheart *et al*, 1989).

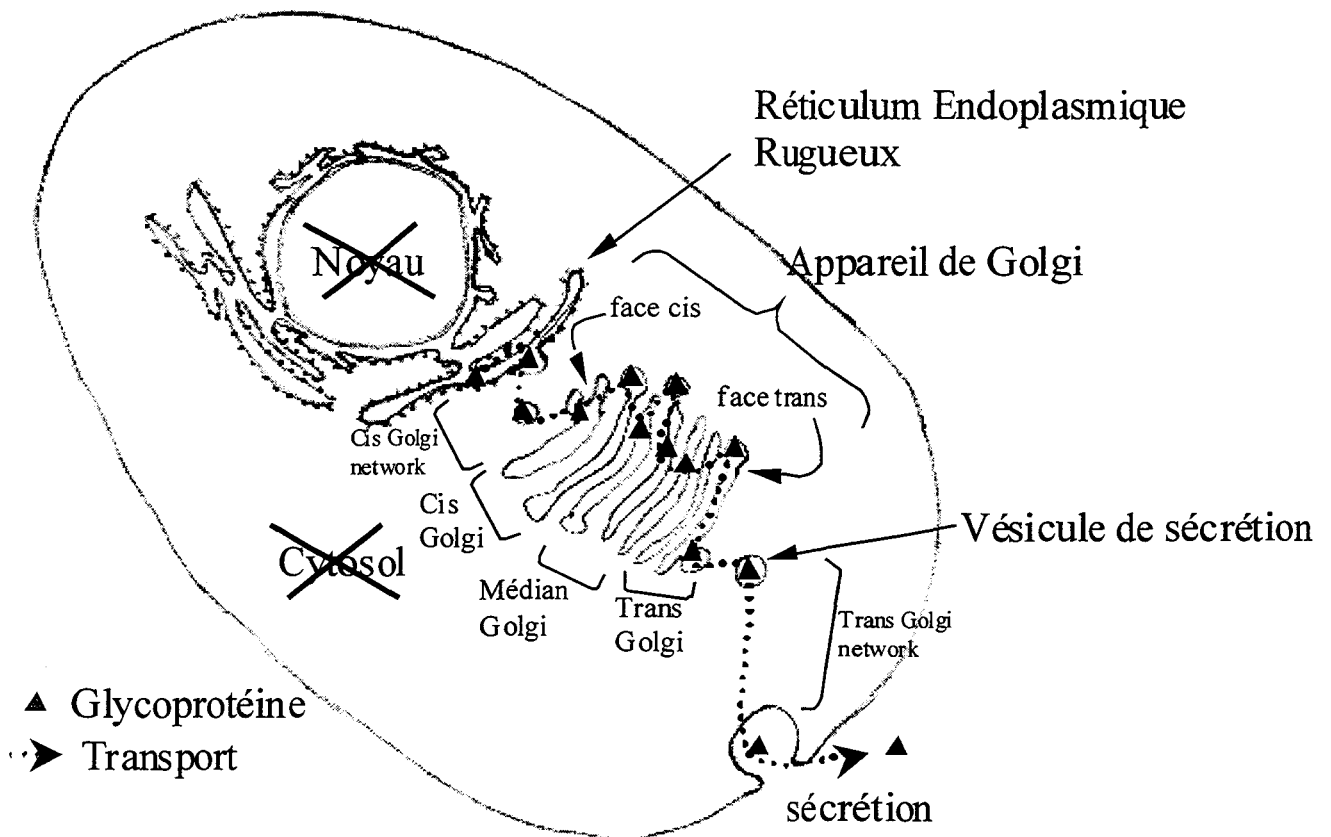


Figure 1 – Biosynthèse et transport des N- et O-glycosylprotéines

(la connaissance du processus de synthèse et de transport des N- et O-glycosylprotéines a longtemps laissé supposer que le cytosol et le noyau des cellules eucaryotes étaient totalement dépourvus de glycoprotéines).

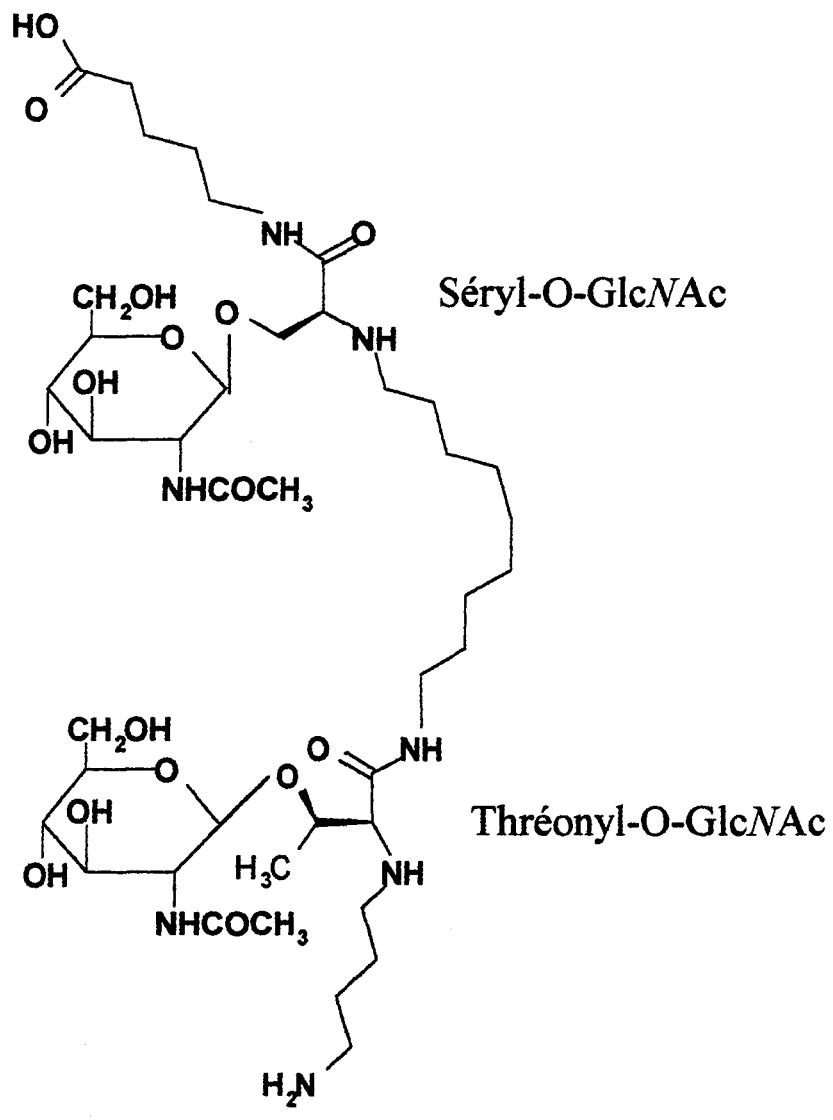
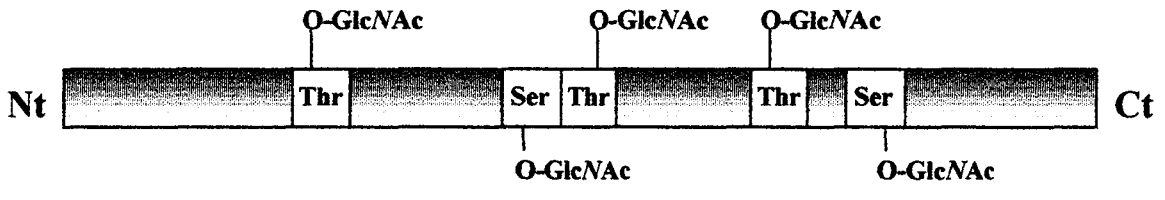


Figure 2 – Schémas de la O-N-Acétylglucosaminylation

Holt *et Hart* montreront en 1986 sur le foie de rat que ce type de glycosylation affecte plus particulièrement les protéines des compartiments cytosolique et nucléaire.

La distribution de la O-GlcNAc sera réexaminée plus tard dans des cultures primaires de lymphocytes avec des techniques de fractionnement des cellules améliorées, et il sera démontré que cette glycosylation se retrouve majoritairement dans les compartiments cytosolique et nucléaire des cellules eucaryotes (Kearse *et Hart*, 1991a). Cette glycosylation est conservée phylogénétiquement car on la retrouve de la levure à l'homme en passant par les plantes, les parasites ainsi que dans de nombreux virus mais elle est absente des cellules procaryotes (Hart *et al*, 1996).

Ainsi, depuis la découverte de cette glycosylation, l'intérêt porté à l'étude de cette modification post-traductionnelle ne cesse d'augmenter comme le montre l'histogramme de la figure 3 relatif à l'abondance des publications sur la O-GlcNAc.

2- Les protéines à O-GlcNAc

Les principales protéines O-*N*-Acétylglucosaminylées sont répertoriées dans le tableau I et représentées sur la figure 4. On y retrouve entre autres : des protéines du cytosquelette, des facteurs de transcription, des protéines virales...

Il convient de noter qu'un nouveau type de glycosylation a été mis en évidence sur des protéines du pore nucléaire de certaines plantes. Il ne s'agit pas exactement de la O-GlcNAc mais d'une polymérisation, sur un même résidu de Ser/Thr, de plusieurs résidus de GlcNAc (Heese-Peck *et al*, 1995).

3- Sites peptidiques de O-*N*-Acétylglucosaminylation

Il n'existe pas à proprement parler de séquence consensus pour la O-*N*-Acétylglucosaminylation comme celle connue pour la N-glycosylation (Asn-X-Ser/Thr). Cependant, l'analyse de sites O-*N*-Acétylglucosaminylés a permis d'établir certaines exigences peptidiques pour la O-GlcNAc et de classer ces sites en deux catégories : les sites du type PSS ou PVS et les sites riches en acides aminés hydroxylés (sérine ou thréonine). Quelques sites connus d'addition de la O-GlcNAc sont représentés dans le tableau II.

Nombre de publications

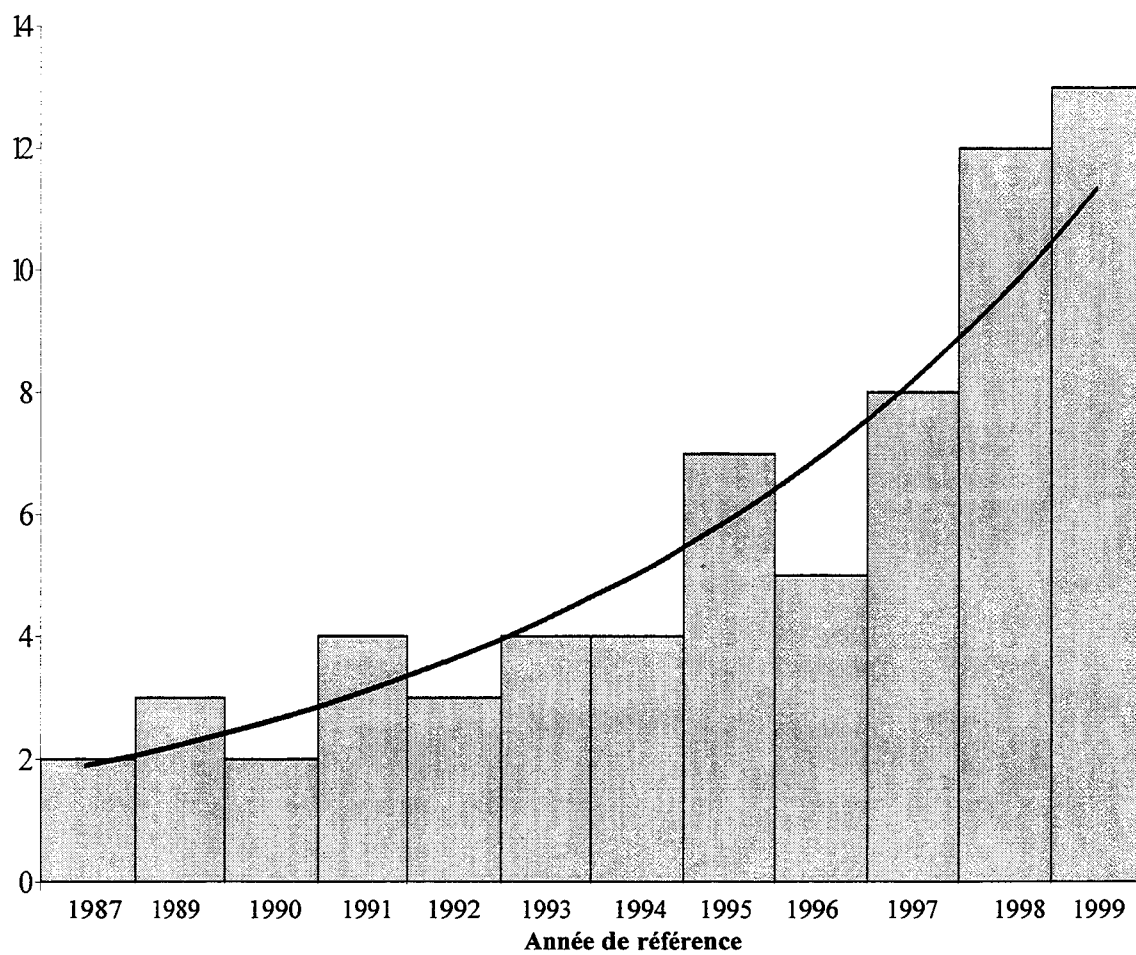


Figure 3 - Evolution du nombre de publications sur la O-N-Acétyleglucosaminylation depuis 1987 (PubMed, mot clé : O-GlcNAc).

Tableau I – les principales protéines à O-GlcNAc connues

Protéines à O-GlcNAc	Références
Protéines de structure	
Synapsines Cytokératine 13 Cytokératines 8 et 18	Cole <i>et al</i> , 1999 King <i>et Hounsell</i> , 1989 Chou <i>et al</i> , 1992
α B-Crystalline Ankyrine G Bande 4.1 de l'érythrocyte Taline Neurofilaments	Roquemore <i>et al</i> , 1996 Zhang <i>et al</i> , 1996 Holt <i>et al</i> , 1987a Hagmann, <i>et al</i> , 1992 Dong <i>et al</i> , 1993
Protéines nucléaires	
Domaine C-terminal de l'ARN polymérase II	Kelly <i>et al</i> , 1991 Kelly <i>et al</i> , 1993
Le facteur de transcription c-Fos (<i>serum response element</i>)	Reason <i>et al</i> , 1991 Reason <i>et al</i> , 1992
eIF-2 (facteur d'initiation de la traduction eucaryotique 2)	Datta <i>et al</i> , 1989
Sp1, AP-1, AP-2, AP-4, CTF, Zeste, GAGA et ADF-1 c-Myc	Jackson <i>et al</i> , 1988 Chou <i>et al</i> , 1995a Chou <i>et al</i> , 1995b
Subpopulation de récepteurs à œstrogènes	Jiang <i>et al</i> , 1997
Protéines du pore nucléaire	Holt <i>et al</i> , 1987b
Protéine du pore nucléaire p62	Cordes <i>et al</i> , 1991 Lubas <i>et al</i> , 1995
Protéines chromatinienne de la drosophile	Kelly <i>et al</i> , 1989
Protéines virales	
Antigène grand T du SV40	Medina <i>et al</i> , 1998
Protéine NS26 du rotavirus	Gonzalez <i>et al</i> , 1991
Phosphoprotéine basique tégumentaire du cytomégalovirus	Greis <i>et al</i> , 1994
Fibre de l'adénovirus	Caillet-Boudin <i>et al</i> , 1989
Protéines neuronales	
Précurseur bêta-amyloïde	Griffith <i>et al</i> , 1995
Neurofilaments	Dong <i>et al</i> , 1993
Protéines associées aux microtubules de haut poids moléculaire	Ding <i>et Vandre</i> , 1996
Protéines Tau bovines	Shane-Arnold <i>et al</i> , 1996
Protéines diverses	
Glycoprotéines synthétisées par <i>Schistosoma mansoni</i>	Nyame <i>et al</i> , 1987
AP-3 (assemblage de la clathrine)	Murphy <i>et al</i> , 1994
Glycoprotéine 83 kDa, axoplasme et noyau des neurones du calamar	Elliot <i>et al</i> , 1993

Tableau II – Séquences peptidiques de O-N-Acétyleglucosaminylation

Protéines	<i>Séquence d'addition de la O-GlcNAc</i>
Type PVS/T ou PS/TV	
α -A-cristalline	...DIPVSREEK...
α -B-cristalline du singe rhésus	...EEKPAVTAAPK...
Protéine de l'érythrocyte humain de 65 kDa	...DSPVSQPSLVGSK...
c-Fos	...LAPVSASVS...
Neurofilament L	...PVSSS...
Neurofilament M	...GSPSTVSSSYK...PSVTISSK...
Type riche en S/T ou quelconque	
c-Fos	...TQTSSSGTVT...
ARN polymérase II	...(S/T)P(S/T)SP...TP ^T SPN...SPTSP ^T ...
Bande 4.1 de l'érythrocyte	...AQTITSETPSSTT...
Protéine p62 du pore nucléaire	...MAGGPADTSDPL...

4- Propriétés communes aux protéines à O-GlcNAc

Toutes les protéines O-N-Acétyleglucosaminylées présentent des caractéristiques communes :

- i. ce sont toutes des phosphoprotéines,
- ii. elles se présentent sous forme d'équilibres monomères/multimères (hétéro ou homo), la phosphorylation jouant un rôle dans la multimérisation,
- iii. elles ont souvent une localisation nucléaire.

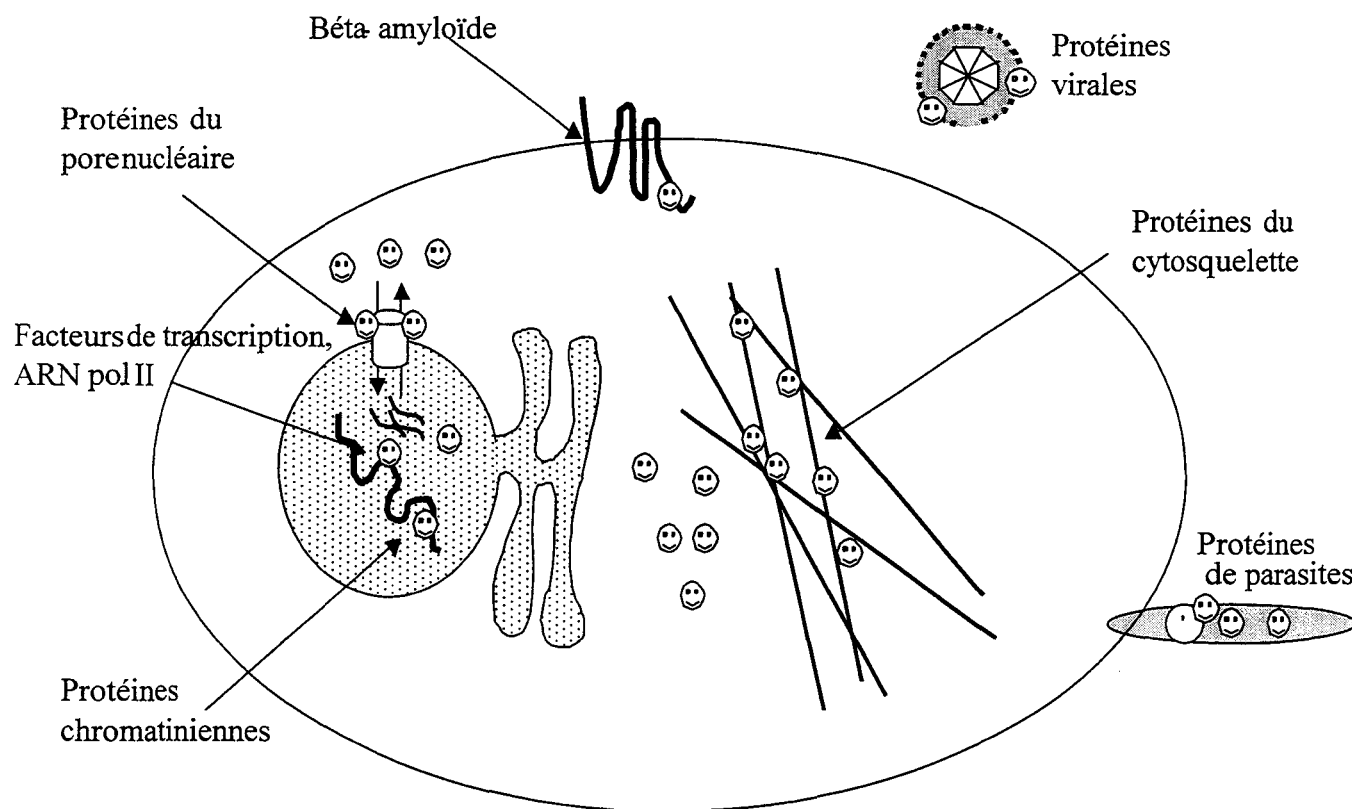


Figure 4- Distribution des protéines à O-GlcNAc

5- Les rôles de la O-GlcNAc

Si l'on connaît aujourd'hui un grand nombre de protéines modifiées par la O-GlcNAc, les rôles joués par cette modification post-traductionnelle restent pratiquement inconnus, bien que différentes fonctions aient été avancées (pour revue Comer *et al.*, 2000). De nombreuses observations vont dans le sens d'un rôle d'antagonisme de la O-GlcNAc vis à vis de la phosphorylation (Haltiwanger *et al.*, 1997). D'autres observations ont permis de suggérer qu'elle pourrait intervenir dans la modulation des interactions protéiques (protéines du cytosquelette ; Shane Arnold *et al.*, 1999), dans la modulation de certaines activités enzymatiques (ARN polymérase II par exemple ; Kelly *et al.*, 1993), dans la modulation de l'activité de facteurs de transcription (Sp1 par exemple ; Comer *et al.*, 1999) ou dans le transport de protéines cytosoliques vers le noyau (Duverger *et al.*, 1996).

i- O-GlcNAc et phosphorylation : des fonctions antagonistes ?

Plusieurs études suggèrent que la O-N-Acétylglucosaminylation serait une modification post-traductionnelle dynamique à l'instar de la phosphorylation. Comme la phosphorylation, la O-GlcNAc pourrait jouer un rôle de régulation de nombreux processus cellulaires (Haltiwanger *et al.*, 1997).

Il y a quarante-cinq ans environ les processus de phosphorylation/déphosphorylation des protéines étaient reconnus comme des processus réversibles de la régulation des fonctions cellulaires (Sutherland *et al.*, 1955). Alors, cette phosphorylation ne semblait être qu'une source de phosphore pour les fonctions de nutrition de la cellule et non une modification post-traductionnelle réversible des protéines. De la même façon, la O-GlcNAc semble jouer un rôle de modification post-traductionnelle dynamique et ayant un rôle dans diverses fonctions cellulaires (la figure 6 montre l'engouement suscité à l'époque par la découverte du phénomène phosphorylation/déphosphorylation, intérêt porté aujourd'hui à la O-GlcNAc).

Différentes observations ont permis d'établir un lien entre la phosphorylation et la O-GlcNAc, et en particulier l'aspect dynamique de la O-GlcNAc. Par exemple des expériences de pulse-chase sur les cytokératines (Chou *et al.*, 1992) et sur une petite protéine de choc thermique, l' α B-cristalline (Roquemore *et al.*, 1996) ont indiqué que le turnover de la O-GlcNAc était beaucoup plus rapide que le turnover de la protéine elle-même, ce qui a permis

d'établir que le résidu de O-GlcNAc n'était pas statique mais dynamique. Kearsse *et* Hart, 1991b, ont démontré que l'activation de lymphocytes murins par différents agents mitogènes et antigènes modifiait les niveaux de O-N-Acétylglucosaminylation dans les minutes qui suivaient cette stimulation. Chou *et* Omary, 1993, ont montré que l'arrêt de la mitose des cellules HT29 augmentait la O-N-Acétylglucosaminylation et la phosphorylation sur les cytokératines K8 et K18, alors que la synchronisation des mêmes cellules en phase S ne modifiait en rien cette glycosylation. De la même manière, Haltiwanger *et* Philipsberg, 1997, ont établi, sur ces mêmes cellules, que le blocage de la mitose induit par le nocodazole, provoquait des changements dans les niveaux de O-N-Acétylglucosaminylation.

Des expériences particulièrement intéressantes ont été effectuées par Snow *et al*, 1996. Ces auteurs ont en effet réussi à bloquer le turnover de la O-GlcNAc par transfection de cellules CHO avec l'ADNc des formes cytoplasmique et nucléaire de la galactosyltransférase bovine (on forme ainsi du Gal β 1, 4GlcNAc à partir de l'UDP-Gal à la place de la O-GlcNAc). Dans ces conditions, les cellules meurent au bout d'un cycle cellulaire, ce qui montre l'importance de l'aspect dynamique de la O-GlcNAc. La même expérience, faite avec l'enzyme localisée dans l'appareil de Golgi, ne provoque aucune mort cellulaire.

D'autres auteurs ont pu démontrer une réciprocité entre la phosphorylation et la O-N-Acétylglucosaminylation. En effet, Haltiwanger *et al*, 1998, par exemple, ont démontré qu'un traitement des cellules cancéreuses de colon humain par la PUGNAc, un inhibiteur potentiel de la O-N-Acétylglucosaminidase, résultait non seulement en une augmentation de la O-GlcNAc sur le facteur de transcription Sp1, mais aussi que cette augmentation s'accompagnait d'une diminution de la phosphorylation sur ce même facteur de transcription. Par ailleurs, Griffith *et* Schmitz, 1999, ont constaté une augmentation de la fixation d'un anticorps anti-O-GlcNAc en utilisant des inhibiteurs de kinases sur des cellules neuronales, alors que l'utilisation d'activateurs de kinases diminuait la fixation de ce même anticorps.

D'autres observations sont venues apporter de nouveaux éléments en faveur de cette balance entre la phosphorylation et la O-N-Acétylglucosaminylation. Les protéines O-N-Acétylglucosaminylées sont toutes des protéines importantes régulées par phosphorylation et l'analyse des sites de glycosylation a établi que les résidus de O-GlcNAc se retrouvent souvent dans des régions protéiques connues comme étant phosphorylées, notamment par la glycogène synthase kinase-3 (GSK-3) et la kinase erk-2 appartenant à la famille des MAP-kinases (Hart *et al*, 1996). De plus, deux cas de sites communs à la phosphorylation et à la O-N-Acétylglucosaminylation ont été décrits : celui de l'oncogène c-Myc, glycosylé sur la Thr 58, phosphorylée et connue comme étant un « hot spot » dans l'apparition de lymphomes

(Chou *et al*, 1995b) et celui de l'antigène grand T glycosylé sur les sérines 111 et 112 (du motif PSS) connues comme étant elles aussi phosphorylées (Medina *et al*, 1998).

Ces différentes observations ont conduit à l'hypothèse que la O-GlcNAc pourrait jouer un rôle analogue à celui de la phosphorylation.

La O-GlcNAc et la phosphorylation feraient donc partie d'un système ternaire (figure 5) et non pas d'un système binaire. Les trois formes de la protéine posséderaient des propriétés physiques et biologiques différentes. Ainsi, il pourrait exister un système de O-N-Acétyleglucosaminyltransférase/O-N-Acétyleglucosaminidase pour la O-N-Acétyleglucosaminylation analogue au système kinase/phosphatase pour la phosphorylation.

Les rôles joués par la O-GlcNAc ne sont pas toujours bien connus et ces dernières années, de nombreux auteurs ont mis à profit l'existence de cette balance O-N-Acétyleglucosaminylation/phosphorylation pour trouver une fonction à leur protéine sous la forme O-GlcNAc : la O-N-Acétyleglucosaminylation jouant alors un rôle inverse à celui de la phosphorylation sur la protéine étudiée. C'est la raison pour laquelle nous avons représenté sur la figure 6 la O-N-Acétyleglucosaminylation comme un mécanisme antagoniste de la phosphorylation.

Il convient de noter qu'un nouveau type de balance glycosylation/phosphorylation a été mise en évidence récemment sur l'ovocléidine (protéine de la coquille d'œuf de poule). Il s'agit de l'exclusion mutuelle entre un N-glycane porté par l'asparagine 59 et la phosphorylation de la sérine 61 appartenant au site consensus ($^{59}\text{N-A-S}^{61}$) (Mann, 1999).

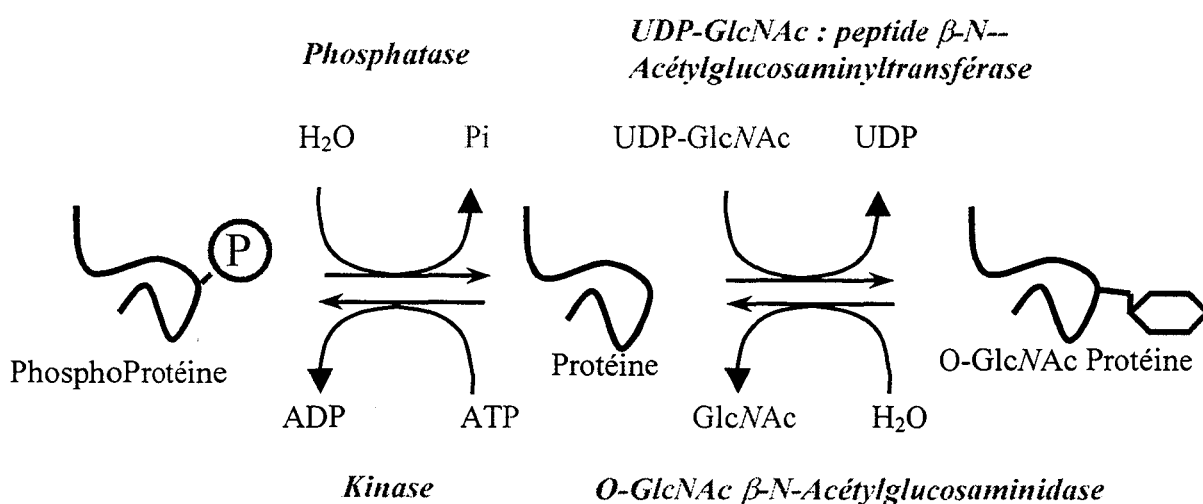
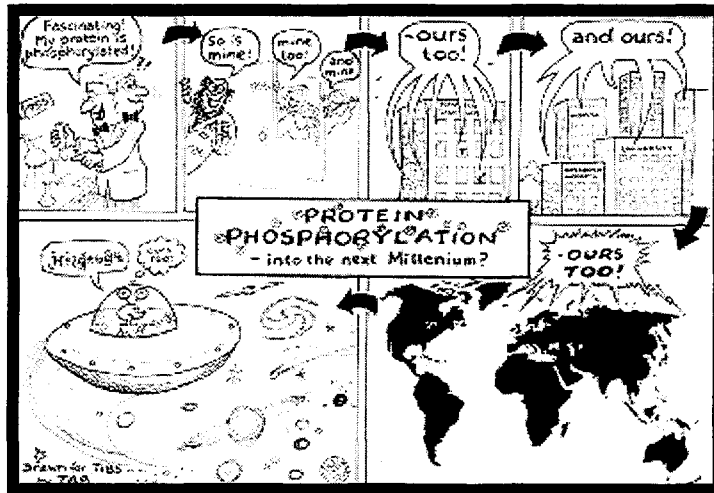


Figure 5 – La balance phosphorylation/O-N-Acétyleglucosaminylation (mécanisme ternaire)



Fascination,
My protein is O-
GlcNAc
glycosylated !!!

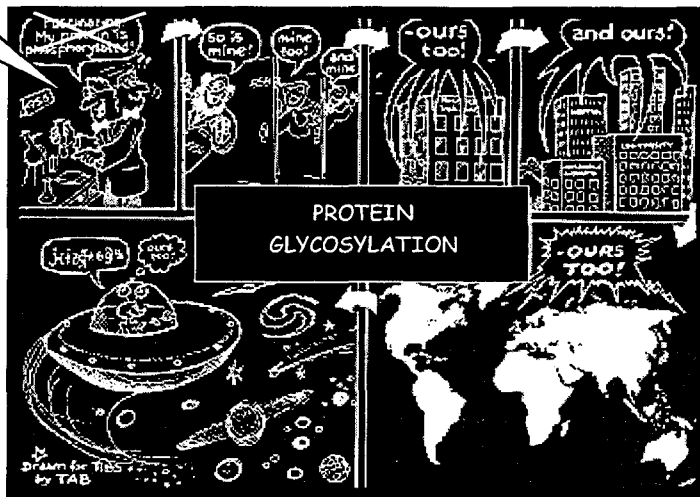


Figure 6 - la O-N-Acétylglucosaminylation est-elle le négatif de la phosphorylation ?
Adaptation de TIBS (1994) 19, 439

ii- La reconnaissance protéine – protéine

Comme préalablement mentionné, de nombreuses protéines à O-GlcNAc sont des phosphoprotéines capables de s'assembler en complexes de manière réversible. Ce phénomène concerne l'assemblage des protéines du cytosquelette, et l'association de facteurs de transcription avec d'autres composants protéiques.

Certaines protéines à O-GlcNAc sont des composants clefs impliqués dans l'assemblage et l'organisation du cytosquelette. On sait que des défauts dans la régulation de l'assemblage de protéines cytosquelettiques sont impliqués dans de nombreux désordres neurodégénératifs (Cf. chapitre consacré aux protéines Tau). Une O-N-Acétylglucosaminylation anormale de certaines protéines cytosquelettiques pourrait être à l'origine du mauvais assemblage de ces protéines et donc de tels désordres (Shane Arnold *et* Hart, 1999).

Pour ce qui concerne la synapsine I, protéine concentrée au niveau des terminaisons nerveuses et ancrant les vésicules synaptiques au cytosquelette, les sept résidus de O-GlcNAc sont tous localisés dans les régions de phosphorylation des domaines B et D (Cole *et* Hart, 1999). La phosphorylation par la CAM kinase II du domaine D réduit l'affinité de la synapsine I pour les vésicules synaptiques et l'actine. On pense donc que la O-GlcNAc peut moduler les interactions de la synapsine I par compétition des sites de phosphorylation (mêmes sites) ou en régulant des sites phosphorylés voisins (il y aurait une compétition entre les résidus de phosphates et de O-GlcNAc sur des sites de phosphorylation et de O-N-Acétylglucosaminylation adjacents). De même, il a été suggéré pour les sous-unités des neurofilaments tous modifiés par la O-GlcNAc (Low, Medium et High), que la O-GlcNAc pouvait être directement impliquée dans l'assemblage de ces protéines (Dong *et al*, 1993).

Il en est de même pour les interactions protéiques impliquant les facteurs de transcription. Par exemple, les résidus de O-GlcNAc de Sp1 inhibent ses interactions (du type hydrophobe) avec TAF110 et holo-Sp1 (Roos *et al*, 1997) : il semblerait que l'hydrolyse des résidus de O-GlcNAc de Sp1 soit un signal pour son association avec d'autres facteurs protéiques.

Par ailleurs, la modification du C-terminal de p53 (suppresseur de tumeurs) par la O-GlcNAc inhibe son interaction avec Sp1 et active la transcription de gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire et dans l'apoptose (Show *et al*, 1996).

Le rôle de la O-GlcNAc dans les interactions protéiques peut, au même titre que le rôle antagoniste joué par la O-GlcNAc sur la phosphorylation, être le déclencheur des autres fonctions portés par la O-N-Acétylglucosaminylation. Cela signifie que certains rôles joués par la O-GlcNAc seraient la conséquence de la balance phosphorylation/O-N-

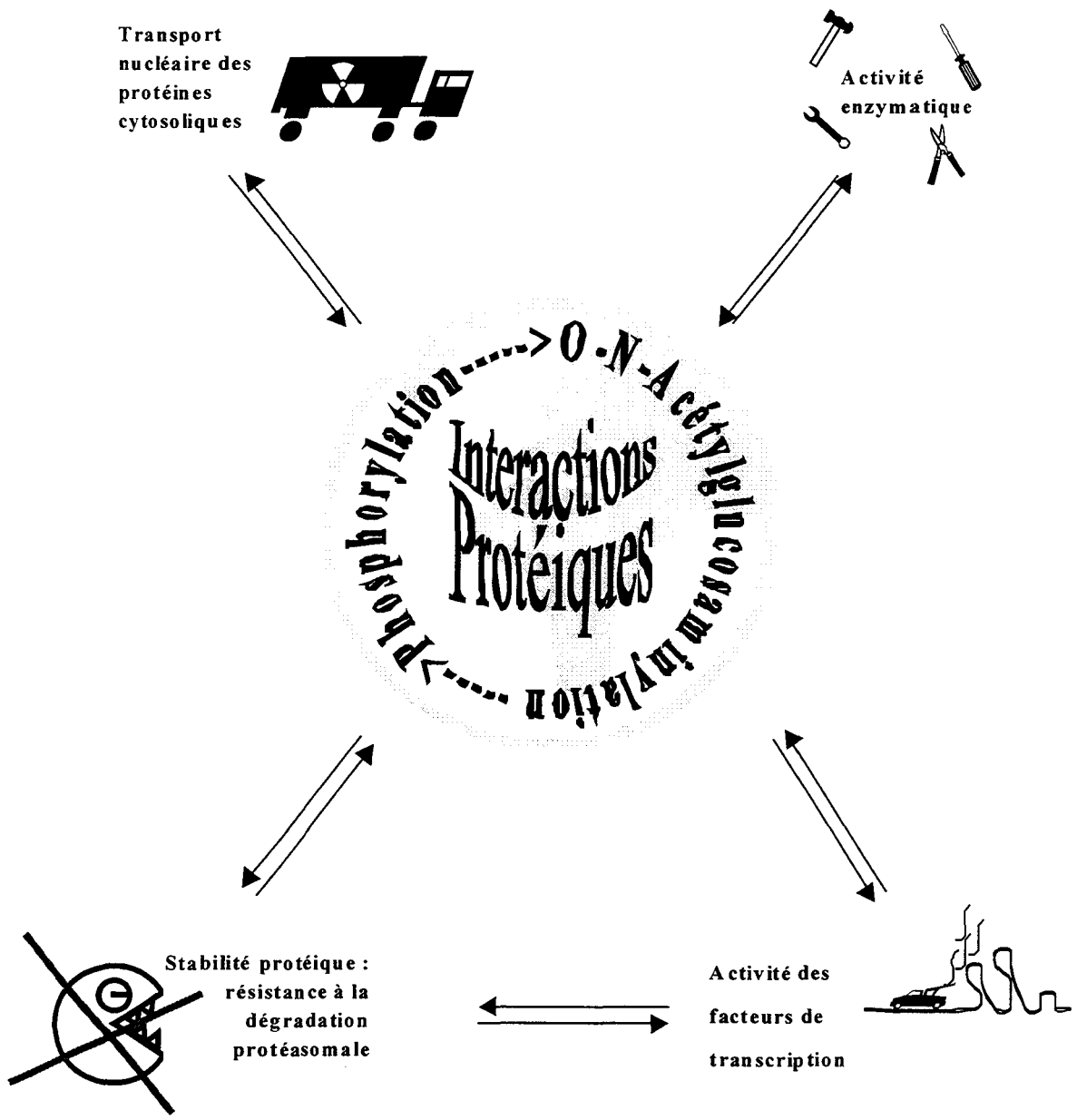


Figure 7 – Relations entre les différents rôles portés par la O-GlcNAc (les rôles joués par la O-GlcNAc pourraient dépendre directement des relations entre la balance phosphorylation/O-GlcNAc et les interactions protéiques)

Acétylglucosaminylation et du rôle de la O-GlcNAc dans les interactions protéiques (figure 7) : la compétition phosphorylation/O-N-Acétylglucosaminylation et les interactions sont certainement étroitement liées.

iii-La O-GlcNAc est-elle un signal de translocation nucléaire ?

Il a été suggéré que la O-GlcNAc pourrait jouer un rôle dans le transport des protéines cytosoliques vers le noyau. Le résidu de N-Acétylglucosamine O-lié pourrait être un signal complémentaire qui s'associerait ou qui suppléerait le système du signal classique de localisation nucléaire (*Nuclear Localization Signal – NLS*).

Il convient de distinguer deux aspects de la O-GlcNAc dans le transport nucléaire : (i) la O-GlcNAc en tant que signal de transport des protéines au noyau (c'est à dire la O-N-Acétylglucosaminylation des protéines elles-mêmes transportées vers le noyau) et (ii) la O-GlcNAc des protéines du pore nucléaire, qui ferait plutôt partie de la machinerie de transport des protéines.

Avant de passer en revue les différents éléments qui font de la O-GlcNAc une modification post-traductionnelle susceptible de jouer un rôle dans le transport nucléaire, nous ferons quelques rappels sur le transport nucléaire NLS-dépendant.

a- Rappels sur le transport nucléaire des protéines (pour revues Moore *et* Blobel, 1994 ; Melchior *et* Gerace, 1995 ; Schatz *et* Dobberstein, 1996 et Yoneda, 1997)

Les protéines cytosoliques devant s'intégrer au noyau se subdivisent en deux catégories : (i) les protéines de masse moléculaire inférieure à 40 kDa pénètrent dans le noyau par simple diffusion à travers le pore nucléaire (exception faite des histones) sans dépense d'énergie, et (ii) les protéines de masse moléculaire supérieure à 40 kDa qui requièrent le NLS et de l'énergie.

✓ Le pore nucléaire et la membrane nucléaire

L'une des caractéristiques des cellules eucaryotes est de séparer la synthèse des ARNs et la réplication de l'ADN qui sont nucléaires, de la synthèse protéique qui est

cytoplasmique. Ceci requiert un transport continu de protéines, d'ARNs et de petites molécules entre les deux compartiments. Le transport nucléocytoplasmique est effectué à travers le pore nucléaire (*Nuclear Pore Complex* ; NPC).

Le pore nucléaire est composé de 100 à 200 protéines et possède une masse moléculaire d'environ 125.10^6 Da. Cet organite mesure 120 nm de diamètre et 70 nm de hauteur (pour revues Finlay *et al*, 1991 ; Panté *et Aebi*, 1993 ; Davis, 1995). Il est ancré dans la double membrane nucléaire. Cette double membrane est continue avec celle du réticulum endoplasmique et sépare le nucléoplasme du cytoplasme. La membrane externe du noyau constitue un continuum avec le réticulum endoplasmique rugueux. La membrane interne est connectée également à la membrane cytoplasmique mais ne ressemble pas au RER et contient son propre contingent de protéines. Elle est liée à un réseau de lamines dont les lamines de type B qui ont une modification lipidique insérée dans la membrane (Goldberg *et Allen*, 1995).

✓ Le signal de localisation nucléaire (NLS)

Les protéines de haute masse transportées vers le noyau sont dotées du *Nuclear Localization Signal*. Le premier NLS connu est celui de l'antigène Large T du SV 40 (*Simian Virus*) (pour revue Görlich *et Mattaj*, 1996). Contrairement aux séquences d'adressage vers le réticulum endoplasmique ou la mitochondrie, le NLS n'est pas supprimé et fait partie intégrante de la protéine après translocation. La greffe d'un NLS sur n'importe quelle protéine lui permet de s'intégrer au noyau. Tous les NLS connus contiennent des séquences riches en acides aminés basiques bien qu'il n'existe pas de séquence consensus stricte (Tableau III).

Tableau III – Quelques signaux de localisation nucléaire

Protéines	Séquence en acides aminés (NLS)
<i>SV40 large T-antigen</i>	PKKKRKV
<i>c-Jun</i>	RKRKL
<i>Nucléoplasmine</i>	KRPAAIKKAGQAKKKK
<i>CBP 80</i>	RRRHSDENDGGQPHKRRK

✓ Le processus de transport nucléaire

Le processus de transport nucléaire peut être divisé en 2 étapes : la première étape est NLS dépendante et ATP indépendante avec ancrage des protéines sur la surface cytoplasmique des pores nucléaires alors que la deuxième étape est ATP dépendante avec translocation des protéines par les pores nucléaires. Plusieurs facteurs solubles sont requis pour le transport de protéines vers le noyau : PTAC 58, PTAC 97, GTPase Ran et p10/NTF2 (Moore *et* Blobel, 1992).

La première étape de la translocation nucléaire peut être subdivisée en 2 parties (étape de *docking*) :

- formation du *Pore Targeting Complex* (PTAC) de 500 kDa dans le cytoplasme ; PTAC 58, PTAC 97 avec la protéine possédant le NLS,
- ancrage du complexe sur les pores nucléaires.

La deuxième étape fait intervenir deux facteurs solubles (étape de translocation) :

- la *GTPase Ran* (petite protéine G),
- le *P10/nuclear transport factor 2* (*NTF 2*), associé à Ran-GDP/PTAC 58 et 97 et à des séquences peptidiques des nucléoporines, mais il ne s'associe pas à Ran-GTP.

Le transport nucléaire NLS-dépendant est schématisé sur la figure 8.

b- La O-GlcNAc joue-t-elle un rôle dans le transport des protéines cytosoliques vers le noyau ?

Dans ce paragraphe nous nous intéresserons à la O-GlcNAc en tant que signal potentiel de transport des protéines cytosoliques vers le noyau.

Les études de Duverger *et al*, 1992 ont démontré que la sérum albumine, couplée à la fluorescéine et substituée par des monosaccharides (fucose, glucose ou mannose), est transportée du cytosol vers le noyau de manière sucre-dépendante, de la température, du temps d'incubation alors que la sérum albumine libre ne pénètre pas dans le noyau. Ils ont aussi démontré que dans des cellules perméabilisées par la digitonine, la sérum albumine

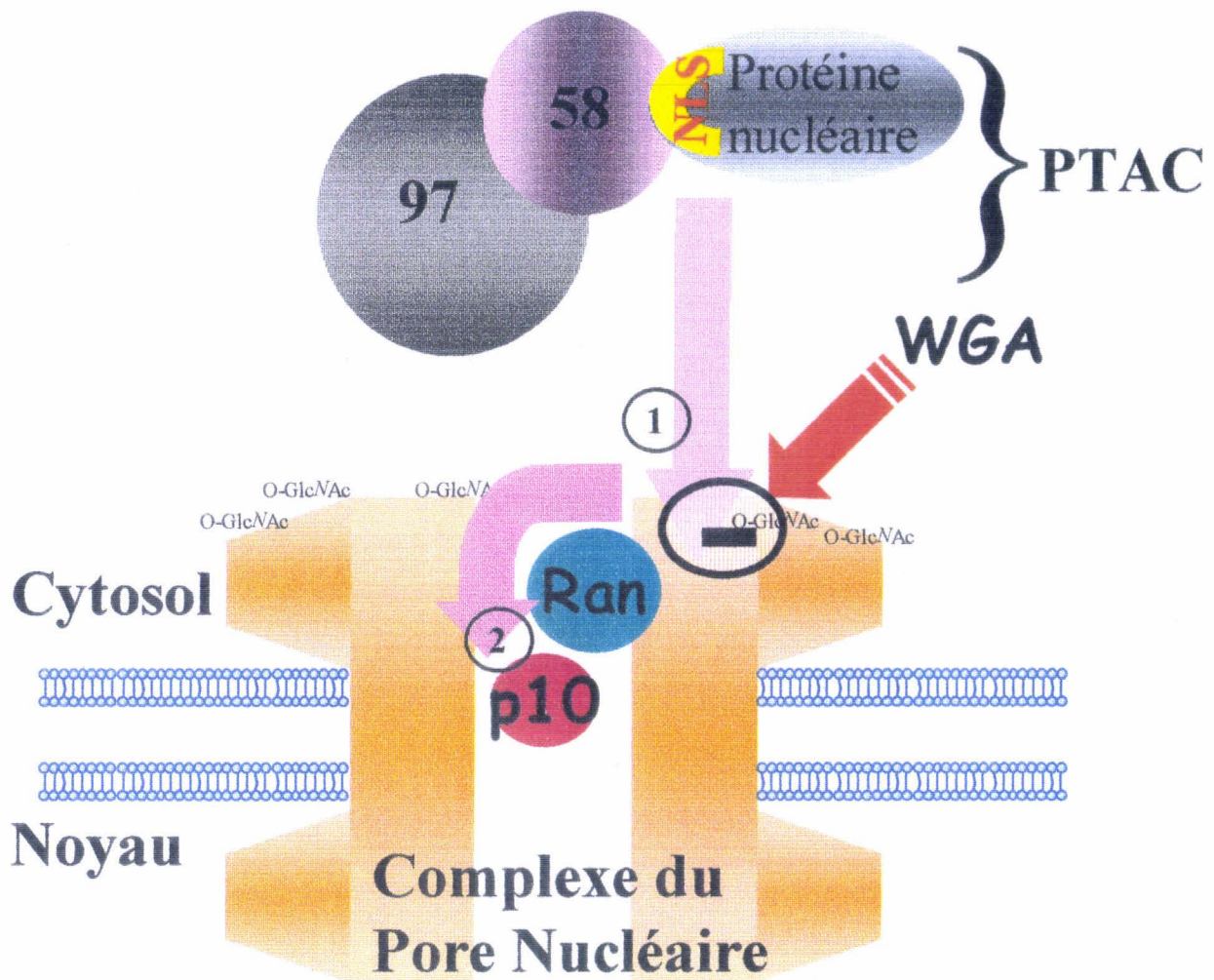


Figure 8- Schéma du transport nucléaire NLS-dépendant des protéines cytosoliques ; inhibition par la WGA

substituée avec le β -di-*N*-acétylchitobioside (GlcNAc β 1,4GlcNAc) est transportée dans le noyau de façon dépendante du temps et de l'ATP (Duverger *et al*, 1996). Un phénomène identique a été démontré avec l' α -glucosyl SAB (Duverger *et al*, 1995). L'import de ces néoglycoprotéines est inhibé par l'incubation concomitante de WGA. Le transport sucre-dépendant ne nécessite pas d'extrait cytosolique contrairement au transport NLS-dépendant. De plus, contrairement au transport NLS dépendant, le transport sucre-dépendant n'est pas inhibé par l'alkylation par le *N*-éthylmaléimide : ceci démontre clairement que les deux types de transport sont indépendants. Il a donc été suggéré que la GlcNAc joue un rôle de signal de translocation nucléaire. L'existence de lectines spécifiques jouant le rôle de navette entre les compartiments cytosolique et nucléaire pour le transport de protéines a donc été envisagée.

c- Les protéines du pore nucléaire à O-GlcNAc et l'inhibition du transport nucléaire par la WGA

Le processus de transport GlcNAc-dépendant des protéines cytosoliques vers le noyau ne semble pas aussi simple qu'il pourrait le paraître *a priori*. En effet, nous l'avons mentionné plus haut, de nombreuses protéines du pore nucléaire existent elles-mêmes sous la forme O-GlcNAc. Ainsi un groupe de huit protéines du pore nucléaire de masse moléculaire de 45, 54, 58, 62, 100, 145, 180 et 210 kDa ont été identifiées comme étant modifiées par la O-*N*-Acétylglucosamine (Holt *et al*, 1987b). Plusieurs de ces protéines O-*N*-Acétylglucosaminylées contiennent de multiples peptides FXFG ou GLFG dégénérés (Davis, 1995), de fonction inconnue, et plusieurs membres de ce groupe sont localisés en périphérie du complexe du pore nucléaire. Les protéines p62, p58 et p54, appartenant toutes à la famille de protéines O-*N*-Acétylglucosaminylées décrite ci-dessus, sont essentielles pour la formation de pores nucléaires fonctionnels (Finlay *et al*, 1991). Ceci a pu être démontré en utilisant un anticorps monoclonal dirigé contre chacune de ces protéines O-*N*-Acétylglucosaminylées. En effet, on peut reformer des pores nucléaires appauvris en chacune de ces protéines et tester ainsi la fonctionnalité des noyaux pour le transport nucléaire. Les noyaux contenant des pores sans ces protéines sont incapables de transporter des protéines cytosoliques vers le noyau.

De même les études sur les œufs de Xénope, portant sur la formation de pores nucléaires fonctionnels après désassemblage, ont montré que les pores nucléaires ne jouent plus leur rôle de transporteur si les polypeptides O-*N*-Acétylglucosaminylés sont exclus par précipitation à la WGA (Miller *et Hanover*, 1994). Cette activité est, par contre, restaurée après addition de glycoprotéines de pore nucléaire de foie de rat ou d'œuf de Xénope.

Toutefois, le transfert de galactose sur les O-GlcNAc ne modifie en rien le réassemblage et l'activité des pores nucléaires.

La microinjection de phycoérythrine (PE, MM 240000 Da), couplée à des peptides synthétiques (correspondant au *Nuclear Localization Signal* de l'antigène Large-T de SV40), dans des cellules perméabilisées constitue un outil permettant de visualiser le transport nucléaire. Cette technique a permis de démontrer que la microinjection de lectine de germe de blé (la WGA pour *Wheat germ agglutinin*) dans le cytoplasme n'altère pas la diffusion de dextran (de masse moléculaire de 10000 Da) dans le noyau mais bloque la PE conjuguée (Wolff *et al*, 1988). Cette inhibition est levée par l'addition d'un sucre compétiteur, en l'occurrence de GlcNAc, dans le cytoplasme. De la même manière, la WGA inhibe complètement le transport de la nucléoplasmine couplée à la fluorescéine, alors qu'aucune autre lectine testée n'affecte le transport nucléaire (Finlay *et al*, 1987). En fait, cette inhibition du transport nucléaire se fait par fixation de la WGA sur les protéines O-N-Acétyleglucosaminylées situées sur la face cytoplasmique du pore nucléaire (voir figure 8).

d- La phosphorylation et le transport nucléaire

Certaines relations entre la phosphorylation des protéines et le transport nucléaire sont bien connues (Kaffman *et O'Shea*, 1999).

Par exemple, la phosphorylation (sur 5 résidus de sérine) du facteur de transcription Pho 4 chez la levure induit la localisation de cette protéine dans le cytosol alors que la déphosphorylation entraîne son accumulation dans le noyau et la transcription de gènes permettant aux cellules de pousser à faible concentration de phosphate (Kaffman *et al*, 1998). En fait, la phosphorylation de Pho 4 dicte sa localisation subcellulaire par une augmentation de son association avec le récepteur de l'export vers le cytosol et une inhibition de son affinité pour le récepteur de l'importation dans le noyau.

Le facteur de transcription NF-AT (*nuclear factor of activated T-cells*) est déphosphorylé par la calcineurine lorsqu'une augmentation en calcium est induite par une stimulation des lymphocytes. Un complexe calcineurine et NF-AT déphosphorylé est alors transloqué dans le noyau avec, comme conséquence, transcription de gènes requis pour l'activation des cellules T (Rao *et al*, 1997).

Chez *Xenopus laevis*, la nucléoline, un composant majeur du nucléole, est distribuée dans le cytoplasme pendant la maturation de l'ovocyte, et, après fertilisation, est réaccumulée dans le noyau de l'embryon. La localisation cytoplasmique de la nucléoline coïncide avec sa

phosphorylation massive par la kinase p34^{cdc2} tandis que le transport nucléaire s'accompagne d'une déphosphorylation de la nucléoline (Schwab *et Dreyer*, 1997).

Comme dernier exemple de relation entre la phosphorylation et la localisation cellulaire on pourra mentionner que v-Jun est accumulé dans le noyau lorsque la Ser²⁴⁸, adjacente au NLS, est sous-phosphorylée (Tagawa *et al*, 1995). La phosphorylation de cette sérine inhibe son transport nucléaire *in vivo* et *in vitro*. (v-Jun est la forme virale de c-Jun, forme cellulaire, où la Ser²⁴⁸ remplace la Cys²⁴⁸). La staurosporine et le composé H7 (deux inhibiteurs de la protéine kinase A) stimulent l'import nucléaire de cette protéine alors que l'acide okadaïque (un inhibiteur de phosphatases) inhibe cet import.

iv- La O-GlcNAc et les activités enzymatiques : l'ARN polymérase II

La O-GlcNAc permet de réguler l'activité de certaines enzymes. C'est le cas en particulier de l'ARN polymérase II.

L'ARN polymérase II humaine possède un domaine C-terminal, appelé CTD, contenant 52 répétitions de séquence : YSPTSPS. Cette séquence est hautement phosphorylable, ce qui implique que l'ARN polymérase II peut exister sous deux formes majeures : hypo- (forme IIA) et hyper-phosphorylées (forme IIO) (Corden, 1990). La phosphorylation du CTD permet le passage de l'ARN polymérase II de la phase d'initiation à la phase d'élongation de la transcription, chacune des deux phases permettant l'association du CTD à des facteurs différents selon son état de phosphorylation. Kelly *et al*, 1991 et 1993 ont démontré que l'ARN polymérase II est O-N-Acétyleglucosaminylée sur le CTD. Or cette glycosylation est indétectable sur la forme IIO, phosphorylée, ce qui renforce l'hypothèse de la balance phosphorylation/O-N-Acétyleglucosaminylation. Ces auteurs suggèrent que la O-GlcNAc et la phosphorylation de l'ARN polymérase II pourraient avoir des effets différents sur les différentes phases de la transcription, par le biais de l'association du CTD à des facteurs différents. L'ARN polymérase II lorsqu'elle est glycosylée serait alors en phase d'initiation, et sous sa forme phosphorylée entrerait en phase d'élongation (Comer *et Hart*, 1999).

Comer *et Hart*, 1996 ont démontré que des inhibiteurs de O-N-Acétyleglucosaminidase ou que des peptides CTD modifiés par la O-GlcNAc bloquaient la transcription d'ARN messagers, alors que des peptides CTD modifiés par la O-GalNAc ne jouaient pas de rôle inhibiteur.

v- La O-GlcNAc et l'activité des facteurs de transcription

De nombreux facteurs de transcription de l'ARN polymérase II sont modifiés par la O-N-Acétyleglucosamine : Sp1 (Jackson *et al*, 1988), c-Myc (Chou *et al*, 1995ab), c-Fos (Reason *et al*, 1992), l'antigène grand T du SV-40 (Medina *et al*, 1998), les récepteurs des œstrogènes (Jiang *et al*, 1997) et Hnf-1 (Lichtsteiner *et al*, 1989). Jackson *et al*, 1988 ont démontré que contrairement à l'ARN polymérase II, aucun facteur de transcription de l'ARN polymérase I et III ne sont glycosylés.

Le rôle de la O-GlcNAc dans la fonction des facteurs de transcription reste, en fait, obscur (Comer *et al*, 1999). Toutefois, Jackson *et al*, 1988 ont pu démontrer que la WGA inhibait spécifiquement la transactivation de la transcription par Sp1, modifié par la O-GlcNAc, mais pas sa reconnaissance de l'ADN. Ceci laisse supposer que les résidus de O-GlcNAc sont indispensables au déroulement de la transcription par la reconnaissance d'autres facteurs protéiques. Ils démontrent ainsi que Sp1 glycosylé est 3 à 5 fois plus efficace pour l'activation de la transcription que la forme non-glycosylée.

Deux autres facteurs de transcription bien connus sont modifiés par la O-GlcNAc dans ce domaine de transactivation de la transcription : c-Myc et c-Fos. c-Myc est O-N-Acétyleglucosaminylé dans le domaine de transactivation de la transcription, sur la thréonine 58 connue comme existant sous la forme phosphorylée et comme étant un « point chaud » de mutation dans les lymphomes humains (Chou *et al*, 1995b). De même, il a été démontré que c-Fos est majoritairement O-GlcNAc sur le *tandem repeat* SSS appartenant au domaine de transactivation de la transcription. D'autres sites situés entre le domaine de fixation à l'ADN et le domaine de transactivation de la transcription sont également modifiés par la O-GlcNAc (Reason *et al*, 1992).

Les récepteurs des œstrogènes sont eux aussi modifiés par la O-N-Acétyleglucosamine (10% des récepteurs à œstrogènes) sur un site majeur : la thréonine 575 située dans une région PEST du domaine C-terminal F (Jiang *et al*, 1997).

Lichtsteiner *et al*, 1989 ont démontré que Hnf-1, un facteur de transcription spécifique du foie, était modifié par la O-GlcNAc. Hnf-1, sous sa forme glycosylée est capable de se fixer à l'ADN et d'activer la transcription *in vitro* du gène codant pour l'albumine.

Enfin, p53, un suppresseur de tumeurs, existe sous la forme O-GlcNAc. On sait que la forme glycosylée fixe mieux l'ADN que la forme non-glycosylée (Show *et al*, 1996).

vi-Rôle dans la stabilité protéique

Comme nous venons de le voir, de nombreux facteurs de transcription sont modifiés par la O-GlcNAc. Or Sp1, le facteur de transcription dont le rôle de la O-GlcNAc semble le mieux connu, a été démontré comme ayant son activité modulée par cette glycosylation. La stabilité de Sp1 est régulée par le protéasome, et dans des conditions de déplétion en O-GlcNAc, Sp1 est rapidement dégradé. Cette dégradation peut être prévenue (stabilisation de Sp1) par un traitement en glucosamine qui inhibe la dégradation protéasomale (Han *et* Kudlow, 1997). Il pourrait y avoir un lien entre la stabilité des facteurs de transcription vis à vis de leur dégradation protéasomale et leur activité.

En conclusion, les différents rôles putatifs de la O-*N*-Acétylglucosaminylation peuvent être reliés entre eux comme indiqué sur la figure 7.

6- Les enzymes de la O-GlcNAc

Les enzymes qui transfère et qui hydrolyse le résidu de *N*-Acétylglucosamine sur la sérine ou la thréonine de la chaîne polypeptidique ont été caractérisées : il s'agit de la O-*N*-Acétylglucosaminyltransférase et la O-*N*-Acétylglucosaminidase.

i- La O-*N*-Acétylglucosaminyltransférase

Cette enzyme (Uridine diphospho-*N*-Acétylglucosamine : Polypeptide β -*N*-Acétylglucosaminyltransférase ou O-GlcNAc transférase ou OGT) a été caractérisée pour la première fois dans le cytosol de foie de rat par Haltiwanger *et al*, 1990 et 1991 en utilisant un peptide accepteur issu de la combinaison de trois sites connus de O-*N*-Acétylglucosaminylation : YSDSPSTST. Ils ont pu ainsi démontrer que le remplacement de P par G rendait l'OGT inactive alors que le remplacement de D par G n'affectait en rien son efficacité. Ces mêmes auteurs ont démontré que cette enzyme était inhibée par l'UDP mais pas par la GlcNAc, ni la tunicamycine. Comme l'EDTA n'inhibe pas son activité celle-ci est indépendante de cations bivalents, à savoir : Mg^{2+} , Mn^{2+} ou Ca^{2+} . Cette enzyme a été localisée à la fois dans le cytosol et dans le noyau de nombreux tissus.

Des études en SDS-PAGE ont permis de déterminer la masse moléculaire approximative de l'OGT : elle est de 340 kDa. Cette enzyme donne deux bandes de 110 kDa -p110- (X2) et de

78 kDa -p78- (X1), ce qui suppose qu'elle existe sous la forme d'un hétérotrimère. La sous-unité de 110 kDa porte l'activité catalytique, et la sous-unité de 78 kDa pourrait être un fragment de protéolyse ou un produit d'épissage de l'ARN messager de la sous-unité p110. De plus, la sous-unité p110 est capable de former des homo- ou des hétéro-trimères ayant des affinités différentes pour l'UDP-GlcNAc (Kreppel *et al*, 1999). Le Km de l'OGT est très élevé (545 nM) et s'expliquerait par la compétition vis à vis de l'UDP-GlcNAc avec les transporteurs de nucléotides-sucres du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi (Haltiwanger *et al*, 1992). Le mécanisme suivi par l'OGT est une cinétique du type bi-bi aléatoire (Kreppel *et al*, 1999).

Cette glycosyltransférase n'a aucune homologie de séquences avec les autres familles de glycosyltransférases, alors qu'elle est très conservée (80% d'identité de séquences) chez les eucaryotes (de *C. elegans* à l'homme) (Lubas *et al*, 1997), d'où le caractère ubiquitaire de la O-GlcNAc. Ces auteurs ont démontré que l'OGT contient onze *tandems repeats* appelés tétratricopeptides (TPR), peptides de 34 acides aminés, dans sa portion N-terminale. Ces TPR joueraient un rôle dans les interactions protéine-protéine (Kreppel *et al*, 1997), comme c'est le cas pour de nombreuses protéines contenant ce type de motif (Blatch *et al*, 1999), mais ces TPR n'interviennent pas dans l'activité de l'enzyme (Kreppel *et al*, 1999).

L'OGT est phosphorylée sur une tyrosine ce qui laisse supposer qu'elle pourrait être impliquée dans des cascades de phosphorylation. De plus l'OGT est elle-même modifiée par la O-GlcNAc (Kreppel *et al*, 1997).

La localisation chromosomique de l'OGT a été définie sur le chromosome X, région D chez la souris et dans la région Xq13 chez l'homme par Shafi *et al*, 2000. Chez l'homme, cette région est associée avec des maladies neurodégénératives. Une délétion du gène de l'OGT résulte en une perte de la viabilité embryonnaire.

Lubas *et al*, 2000 ont testé l'activité de l'OGT sur différentes kinases : elle est capable de glycosyler des kinases telles que la glycogène synthase kinase-3 et la caséine kinase II. On peut donc penser que certaines kinases pourraient avoir elles-mêmes leur activité modulée par la O-GlcNAc.

Des études de localisation de l'OGT et des ARNm de l'OGT ont été effectuées sur le pancréas de rat (Akimoto *et al*, 1999). Comme nous le verrons plus loin, la résistance à l'insuline induite par le glucose est modulée par une augmentation de la voie des hexosamines dont fait partie l'OGT. Grâce à des ARNc antisens, Akimoto *et al*, 1999 ont pu démontrer qu'il y avait une quantité importante d'ARNm de l'OGT dans les cellules acinaires (exocrines), et plus faiblement au niveau des îlots de Langerhans (cellules endocrines). Des anticorps dirigés

contre l'OGT ont montré une localisation de l'OGT au niveau de la région euchromatique du noyau et autour des vésicules de sécrétion des cellules acinaires et des îlots de Langerhans. Les auteurs suggèrent ainsi un rôle de l'OGT dans la régulation de la transcription et dans la sécrétion granulaire.

ii- La O-N-Acétyleglucosaminidase (*N*-Acétyl- β -D-glucosaminidase) (GlcNAc ase).

La O-N-Acétyleglucosaminidase est moins bien connue. Elle a été purifiée de la rate de rat (Dong *et* Hart, 1991 et 1994). La forme active de l'enzyme a une masse moléculaire de 106 kDa, et elle donne deux bandes en SDS-PAGE de 54 kDa (α) et 51 kDa (β). Elle forme un hétérodimère. Contrairement aux hexosaminidases acides lysosomales, elle n'est pas inhibée par la GalNAc. Par contre deux inhibiteurs ont été décrits : la streptozotocine (Roos *et al*, 1998) et le PUGNAc (Haltiwanger *et al*, 1998). Comme l'OGT, la O-N-Acétyleglucosaminidase est localisée à la fois dans les compartiments nucléaire et cytosolique de tous les tissus.

7- Le glucose, la voie des hexosamines et la synthèse de la O-GlcNAc : étude dans les cellules bêta du pancréas

i- Introduction

Les cellules pancréatiques bêta sont le régulateur du flux de glucose qui permet son stockage sous forme d'énergie dans le foie, les muscles et les tissus adipeux des vertébrés. Les cellules bêta doivent pour cela « mesurer » la concentration en glucose plasmatique et sécréter les quantités appropriées d'insuline.

Ce processus débute par l'entrée de glucose dans les cellules bêta par le transporteur GLUT2. Lorsque la concentration en glucose plasmatique est supérieure à 5mM, il est phosphorylé par la glucokinase et peut de cette manière entrer soit dans la glycolyse soit dans la formation de macromolécules via la glutamine fructose-6-P amidotransférase (GFAT) (Figure 9). L'augmentation du rapport ATP/ADP provenant du glucose est à l'origine de la sécrétion d'insuline. Si l'augmentation de la concentration plasmatique en glucose est prolongée, il y a augmentation de la sécrétion d'insuline, augmentation du nombre de cellules bêta (hyperplasie) ; cette hyperplasie est finalement contrebalancée par une réponse apoptotique.

Chez les diabétiques de type 2 (diabète non-insulinodépendant affectant 90% des diabétiques) cette adaptation aux fortes charges en glucose est défaillante et cette hyperplasie est aussitôt contrecarrée par une forte réponse apoptotique. Cette apoptose chez les diabétiques de type-2 empêche donc les cellules bêta de proliférer et de répondre aux demandes en insuline. Or, il semble que ces deux phénomènes, d'hyperplasie et d'apoptose soient commandés par l'hyperglycémie. Comment certains auteurs sont-ils parvenus à relier le métabolisme de la O-GlcNAc au glucose et la O-GlcNAc à la réponse apoptotique des cellules bêta ?

ii- La streptozotocine (STZ) : un analogue de la N-Acétyleglucosamine

La streptozotocine (STZ) est une drogue couramment utilisée pour créer des modèles animaux de diabète (effet diabétogène).

On sait depuis longtemps que les cellules bêta des îlots de Langerhans présentent une très forte sensibilité à la STZ (effet toxique résultant en une forte mort cellulaire). Roos *et al*, 1998 ont démontré que la STZ était un inhibiteur de la O-N-acétyl- β -D-glucosaminidase (la STZ est un analogue de la N-Acétyleglucosamine avec un groupement nitrosourée en remplacement du groupement acétate de la N-acétyleglucosamine). Cette sensibilité des cellules bêta à la STZ s'explique par le fait que les cellules bêta expriment très fortement la O-N-Acétyleglucosaminyltransférase (taux d'ARNm de l'OGT très élevé comparé aux autres cellules ; Roos *et al*, 1998 et Konrad *et al*, 2000). Comme la STZ est un inhibiteur de l'O-N-acétyl- β -D-glucosaminidase, une accumulation de la O-GlcNAc est observée dans ces cellules bêta : l'inhibition de l'O-N-acétyl- β -D-glucosaminidase et l'expression élevée de l'OGT vont de pair. Il a alors été suggéré que la O-GlcNAc puisse avoir un rôle important sur le comportement des cellules bêta aux charges en glucose. Les cellules non traitées par la STZ ont un turnover normal et non-bloqué de la O-GlcNAc, et ne présentent pas cette forte mort cellulaire.

iii-Le glucose est-il une source de O-GlcNAc dans les cellules bêta ? Rôle dans la toxicité des cellules bêta, rôle apoptotique ?

L'effet combiné du glucose et de la STZ stimule la O-Glycosylation de la p135 dans les cellules bêta (Konrad *et al*, 2000). Cet effet du glucose sur la O-glycosylation de la p135, est bloqué par l'inhibition de la GFAT (glutamine : fructose-6-phosphate amidotransférase),

suggérant qu'une partie du glucose plasmatique entrant dans les cellules bêta par le transporteur GLUT2 puisse former l'UDP-GlcNAc par la voie de synthèse des hexosamines (c'est à dire via la glucosamine).

Han *et al*, 2000 ont démontré sur une protéine du pore nucléaire, p62, que le taux de O-GlcNAc de p62 dépend directement de la concentration en glucose ou en glucosamine (mais pas en galactosamine ni en mannosamine).

Liu *et al*, 2000 ont montré que le taux de O-GlcNAc dans les cellules bêta augmentait en réponse à l'hyperglycémie et que cette augmentation était rapidement réversible lorsque la glycémie revenait à un niveau normal dans des cellules bêta non-pathologiques. Sans infusion de glucose, la STZ n'induit pas d'augmentation de O-GlcNAc, alors que l'infusion de glucose concomitante au traitement à la STZ augmente la O-N-Acétyleglucosaminylation et cette O-GlcNAc ne diminue pas après retour à une glycémie normale (normo-glycémie). Ceci aboutit finalement à la mort cellulaire. Les mêmes auteurs ont utilisé une souris transgénique dans laquelle le métabolisme du glucose en glucosamine est bloqué (Knock out de la GFAT). Chez ces souris, la mort cellulaire induite par la STZ n'est obtenue qu'après infusion de glucosamine mais plus après infusion de glucose : il existe donc une connexion directe entre le métabolisme du glucose en glucosamine et la mort des cellules bêta. Ainsi l'utilisation d'une partie du glucose serait d'une importance vitale pour la formation de la O-GlcNAc des protéines intracellulaires et pour l'adaptation des cellules bêta aux fortes charges en glucose. Comme les cellules bêta normales ont un turnover rapide de la O-GlcNAc, il n'y a pas de réponse apoptotique accrue, sauf si on utilise la STZ en co-incubation avec le glucose ou la glucosamine : celle-ci bloque le cycle O-N-Acétyleglucosaminylation/dé-O-N-Acétyleglucosaminylation par inhibition de la O-N-acétyleglucosaminidase et résulte *in vivo* en une accumulation de protéines O-N-Acétyleglucosaminylées.

Nous avons vu plus haut que de nombreux facteurs de transcription sont modifiés par la O-GlcNAc. Or la stabilité de Sp1 vis-à-vis du protéasome est dépendante de sa O-GlcNAc : dans des conditions de déplétion en O-GlcNAc, Sp1 est rapidement dégradé par le protéasome, alors qu'un traitement par la glucosamine prévient cette dégradation. Ainsi des changements de la O-GlcNAc sur Sp1, et peut-être sur d'autres facteurs de transcription, pourraient influencer la transcription de certains gènes. La réponse en O-GlcNAc au glucose pourrait réguler, via les facteurs de transcription appropriés, l'expression de certains gènes des cellules bêta impliqués dans l'hypertrophie cellulaire ainsi que d'autres gènes impliqués dans la réponse apoptotique (comme p53). Il serait alors intéressant de connaître les substrats (entre autres les facteurs de transcription), de l'OGT, impliqués dans cette réponse apoptotique.

En conclusion, la voie de biosynthèse de la O-GlcNAc à partir du glucose plasmique a pu être tracée (figure 9) et l'étude des effets combinés de la STZ et du glucose sur l'augmentation de la O-N-Acétylglucosaminylation et sur l'augmentation de la mort cellulaire des cellules bêta, devraient nous éclairer sur le mécanisme par lequel l'hyperglycémie cause ses effets chez les diabétiques de type 2.

Récemment, Chang *et al*, 2000 ont démontré que la GFAT était régulée par la protéine kinase A (pK-A), qui est une kinase AMPc dépendante. L'activation de l'adénylate cyclase par la forskoline résulte en une diminution de la O-GlcNAc par activation de la pK-A et une inhibition de la GFAT. Cette inhibition de la synthèse de la O-GlcNAc peut être compensée par une exposition des cellules à la glucosamine mais pas par une exposition au glucose (on contourne la GFAT). On sait ainsi que la GFAT est une enzyme pouvant être inhibée par la pK-A (diminution de l'UDP-GlcNAc nécessaire à la synthèse d'O-GlcNAc). La voie de biosynthèse de la O-GlcNAc à partir du glucose est schématisée et résumée sur la figure 9. L'intervention de la forskoline et la STZ y sont représentées.

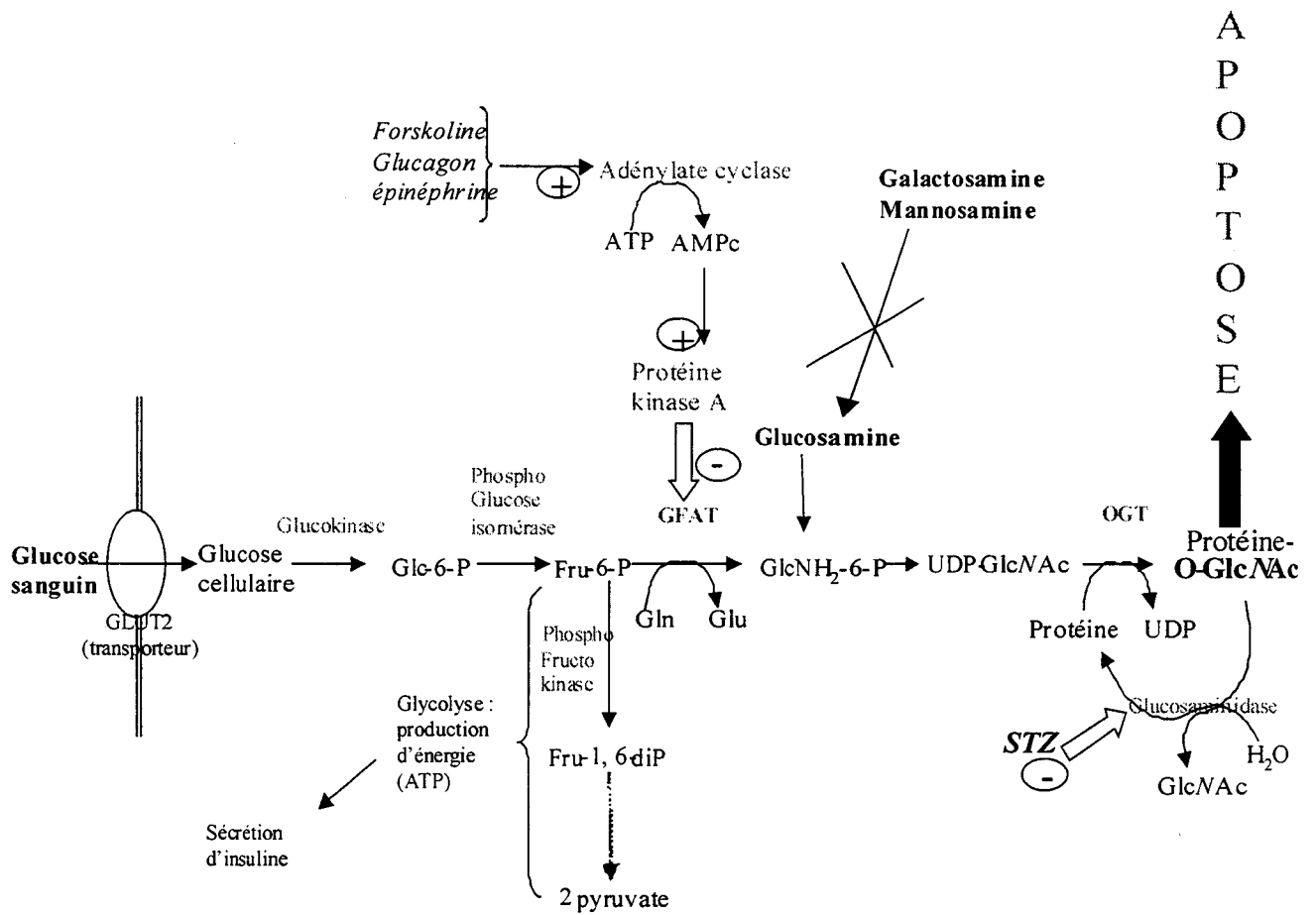


Figure 9- Schéma de la biosynthèse de la O-GlcNAc à partir du glucose, dans les cellules pancréatiques bêta

*Résultats et travaux
personnels*

1^{ère} Partie :

***Effet de l'acide okadaïque sur les
niveaux de O-GlcNAc dans une lignée
de neuroblastomes***

I- Résultats

L'étude de l'effet de l'acide okadaïque sur les niveaux de O-GlcNAc dans une lignée cellulaire de neuroblastome a constitué notre premier travail lors de notre arrivée dans le groupe du Dr Jean-Claude MICHALSKI. Nous avons bénéficié pour cette étude d'une collaboration avec le Dr Marie-Laure CAILLET-BOUDIN de l'équipe INSERM (U422) dirigée par le Dr André DELACOURTE.

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans *Biochimica et Biophysica Acta*.

Ce travail a consisté en l'étude de la balance phosphorylation/O-N-Acétylglucosaminylation dans une lignée cellulaire de neuroblastome. Notre stratégie a consisté à utiliser un inhibiteur de phosphatases à large spectre (Figure 0) : l'acide okadaïque (AO). S'il existe une compétition directe entre la phosphorylation et la O-N-Acétylglucosaminylation sur les mêmes résidus de sérine et thréonine de certaines protéines, l'utilisation de l'AO devait diminuer le taux de O-GlcNAc de ces mêmes protéines par blocage des protéines sous leur forme phosphorylée.

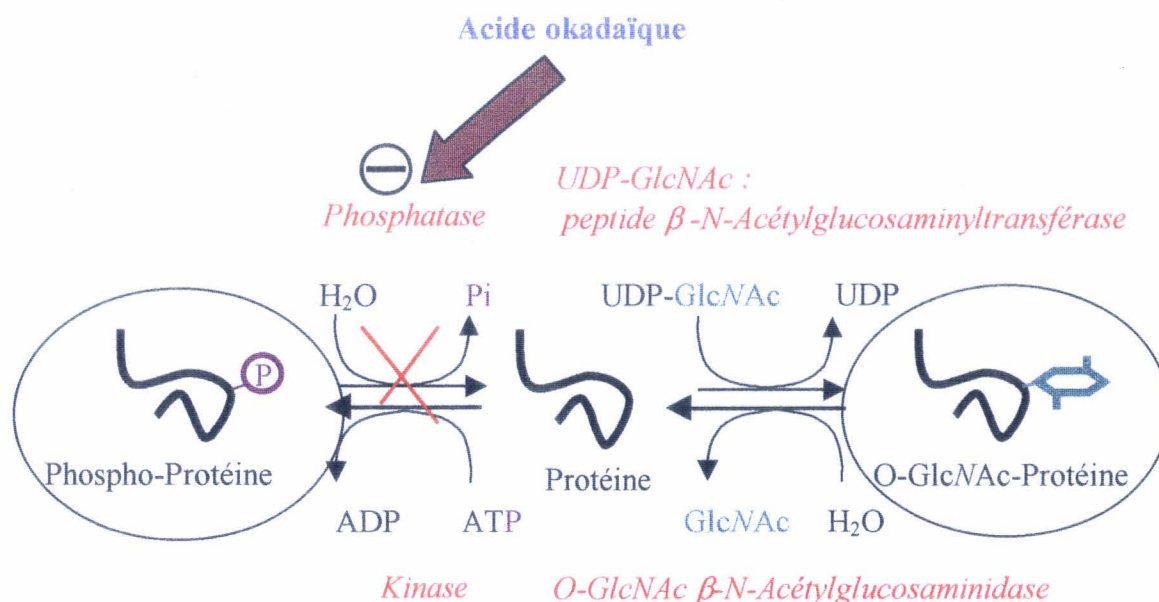


Figure 0 - Stratégie employée pour l'étude de la balance phosphorylation/O-GlcNAc

L'AO se prête particulièrement bien à ce type d'étude en culture cellulaire puisque sa nature hydrophobe lui permet de pénétrer dans les cellules. Les neuroblastomes ont été incubés avec cet inhibiteur de phosphatases à une concentration de 0.25 μ M pendant une durée de 4 heures. Les cellules ainsi traitées ont été soit homogénéisées, soit fractionnées en compartiments cytosolique et nucléaire.

Différentes approches nous ont permis de suivre l'évolution de la O-GlcNAc après traitement par l'acide okadaïque : (i) notre premier outil a été la lectine extraite du germe de blé, la WGA (*Wheat Germ Agglutinin*) afin d'identifier les protéines à GlcNAc terminale. La seconde approche (ii) a été de marquer les cellules avec différents radiomarqueurs : la [14 C]glucosamine afin de suivre l'évolution de la glycosylation, le [33 P]orthophosphate pour suivre l'évolution de la phosphorylation, et enfin la [35 S]Met/Cys pour vérifier qu'au cours du traitement par l'acide okadaïque il n'y a pas d'inhibition de la synthèse protéique. La troisième approche (iii) a été de faire après le fractionnement cellulaire, un marquage *in vitro* des résidus de GlcNAc avec de l'UDP- 3 H]galactose et de la galactosyltransférase bovine.

Afin de nous assurer que la glycosylation affectée par le traitement par l'AO était effectivement la O-GlcNAc, plusieurs contrôles ont été nécessaires. Premièrement une digestion systématique des échantillons avec la PNGase F, une enzyme déglycosylant spécifiquement les N-glycannes, a été effectuée. Le deuxième contrôle a consisté à vérifier que la WGA reconnaissait bien la O-GlcNAc. Pour cela nous avons utilisé en parallèle une deuxième lectine, la PNA (*PeaNut Agglutinin*) spécifique des O-Glycannes qui ont une localisation cellulaire différente de celle de la O-GlcNAc exclusivement cytosolique et nucléaire (on retrouve majoritairement les O-glycannes dans les membranes, le milieu extracellulaire, le RER et le Golgi). Un deuxième contrôle de spécificité de la WGA a consisté à inhiber cette lectine par incubation concomitante avec 0.2 M de GlcNAc. La dernière vérification a été de voir si la diminution de la O-GlcNAc sur nos protéines après traitement par l'AO n'était pas la conséquence d'une diminution du pool intracellulaire d'UDP-GlcNAc, le donneur de GlcNAc pour la formation de la O-GlcNAc.

Les premiers travaux ont été réalisés sur des homogénats totaux de neuroblastomes (cellules Kelly), de cellules épithéliales (cellules HeLa) et de cellules Cos (figure 1). Ces études ont montré qu'il y avait pour certaines protéines des différences de fixation de la WGA après traitement des neuroblastomes par l'AO. Aucune différence n'a été enregistrée

avec les cellules HeLa, tandis que pour les cellules Cos, une bande de masse moléculaire voisine de 90 kDa avait son taux de glycosylation diminué après traitement par l'AO. Sur les neuroblastomes, bien que la fixation de la WGA soit restée inchangée sur certaines protéines après traitement par l'AO, d'autres protéines et notamment une protéine de 55 kDa avaient leur glycosylation diminuée. De plus, ces protéines ont souvent une augmentation de leur masse moléculaire en SDS-PAGE (« shift » de masse vers les hautes masses moléculaires), correspondant à l'hyperphosphorylation induite par le traitement par l'AO. Ce phénomène est retrouvé pour les neuroblastomes avec notamment la protéine de 55 kDa et dans les cellules Cos (avec la protéine de 90 kDa).

Nous avons poursuivi ce travail sur les cellules Kelly. Après traitement par l'AO, les cellules Kelly ont été sujettes à un fractionnement cellulaire (ceci est vrai pour toutes les expériences qui vont suivre). La WGA a été utilisée sur les préparations cytosolique et nucléaire de ces cellules. Nous avons retrouvé les mêmes changements de fixation de la WGA sur les mêmes protéines que dans l'homogénat total mais avec une diminution accrue de la fixation de la WGA dans le noyau (Figure 2).

Notre deuxième stratégie a été d'effectuer un marquage métabolique à la [^{14}C]glucosamine afin de suivre l'évolution de la glycosylation, à l' [^{33}P]orthophosphate pour suivre l'évolution de la phosphorylation, et enfin à la [^{35}S]Met/Cys, en absence et en présence d'acide okadaïque (Figure 3).

Nous avons constaté une augmentation de l'incorporation de [^{33}P]orthophosphate concomitante à une diminution de l'incorporation de [^{14}C]glucosamine dans les compartiments cytosolique et nucléaire après traitement des cellules Kelly par l'AO (Figures 4 et 5). Il est intéressant de noter que le taux de [^{35}S]Met/Cys augmente dans le cytosol (augmentation de la synthèse protéique) et diminue légèrement dans le noyau (cette remarque nous a laissé suggérer que l'hyperphosphorylation/hypoglycosylation des protéines pouvait être un critère de rétention cytosolique, et/ou de diminution du transport nucléaire de ces protéines cytosoliques). Ainsi il semble qu'il existe pour certaines protéines une corrélation entre la phosphorylation et la O-N-Acétyleglucosaminylation : l'état hyperphosphorylé de certaines protéines coïncide avec l'état hypoglycosylé de ces mêmes protéines. (Figure 6).

Enfin le transfert de [^3H]Galactose après le fractionnement cellulaire montre là aussi une diminution de glycosylation dans les deux compartiments (Figure 7).

Pour cette étude, un dosage du pool intracellulaire d'UDP-GlcNAc s'est avéré nécessaire. En effet il fallait démontrer que dans cette étude, l'AO jouait bien son rôle au niveau de la phosphorylation des protéines elles-mêmes et qu'il ne faisait pas décroître le taux

d'UDP-GlcNAc (donneur de GlcNAc nécessaire à la glycosylation des protéines par la O-*N*-Acétylglycosaminyltransférase) (Figure 8). Ainsi il s'est avéré qu'après traitement par l'AO ce pool ne diminuait pas (il avait même tendance à augmenter), ce qui nous a permis de conclure que la diminution de O-GlcNAc après traitement par l'AO n'était pas due à une diminution de l'UDP-GlcNAc.

En conclusion, dans ce travail, nous avons démontré, en utilisant un inhibiteur de phosphatases, qu'il existait au niveau de neuroblastomes, une compétition entre la phosphorylation et la O-*N*-Acétylglycosaminylation sur des mêmes sites ou des sites voisins. Cette diminution de la O-GlcNAc est due à une augmentation de l'occupation des sites par la phosphorylation, mais pas à une diminution du pool intracellulaire d'UDP-GlcNAc.

**II- EFFECT OF OKADAIC ACID ON O-LINKED N-
ACETYLGLUCOSAMINE LEVELS IN A NEUROBLASTOMA
CELL LINE**

**Tony LEFEBVRE^a, Catherine ALONSO^a, Saïd MAHBOUB^a, Marie-Joëlle DUPIRE^b,
Jean-Pierre ZANETTA^a, Marie-Laure CAILLET-BOUDIN^b and Jean-Claude
MICHALSKI^{a*}**

^a*Unité Mixte de Recherches 8576 du CNRS, Laboratoire de Chimie Biologique, 59655
Villeneuve d'Ascq, France*

^b*INSERM U422, Place de Verdun, F-59045 Lille cedex, France*

*To whom correspondence should be addressed : Unité Mixte de Recherches 111 du CNRS,
Laboratoire de Chimie Biologique, 59655 Villeneuve d'Ascq, France. Tel 33-3-20-43-41-46;
Fax 33-3-20-43-65-45; E-mail Jean-Claude.Michalski@univ-lille1.fr.

running title : Phosphorylation-glycosylation balance for cytosolic and nuclear glycoproteins

1- Abstract

O-linked-N-Acetylglucosamine (O-GlcNAc) is a major form of post-translational modification found in nuclear and cytoplasmic proteins. Several authors have advanced the hypothesis according to which phosphorylation and O-GlcNAc glycosylation are reciprocally related to one another [1-2]. In order to test this hypothesis we have investigated the effect of a broad spectrum phosphatase inhibitor, okadaic acid (OA) generally used to induce proteins hyperphosphorylation, on the GlcNAc content of cellular glycoproteins. We demonstrate that in neuronal cells lines OA decreases the level of O-GlcNAc in both nuclear and cytoplasmic proteins with a greater effect in the nuclear fraction. This phenomenon was demonstrated by the use of three different procedures for the detection of O-GlcNAc in conjunction with a systematic treatment with PNGase F. O-linked GlcNAc was characterized using respectively lectin staining with WGA, galactosyltransferase labeling and metabolic labeling of cultured cells with [³H]glucosamine. Although the effects on individual proteins varied, a less pronounced effect was observed on HeLa or COS cells total homogenates. When Kelly cells were treated with OA, the major observation was a decrease in O-GlcNAc content of nuclear proteins. The measurement of the UDP-GlcNAc level clearly demonstrates that the decrease on the O-GlcNAc level in the neuroblastoma cell line after treatment with okadaic acid is not a consequence of the modification of the UDP-GlcNAc pool.

Key words : cytosolic and nuclear glycoproteins, O-GlcNAc, phosphorylation, okadaic acid, nuclear translocation.

2- Introduction

It is now well established that a number of cytosolic and nuclear proteins undergo post-translational modification by addition of a single GlcNAc residue O-glycosidically linked to the side-chain hydroxyl of serine and threonine residues [3-5]. Although the exact functions of this modification remain to be established, many lines of evidence suggest that this type of glycosylation is dynamic and in particular it has been speculated to function as an alternative cellular signalling pathway to phosphorylation [1, 2]. This hypothesis is supported by the finding that O-GlcNAc bearing domains on certain proteins have been demonstrated to coincide with known sites of phosphorylation [6-8]. Direct evidence for competition between O-GlcNAc and phosphorylation was recently demonstrated for threonine-58 of c-myc, a known glycogen synthase kinase-3 phosphorylation site, which is also modified with O-GlcNAc [9]. Among proteins undergoing O-GlcNAc modification are account several neuronal proteins such as neurofilaments [8], microtubule-associated protein Tau [10], or β -amyloid precursor [11]. These proteins are also known to be phosphorylated. Selective inhibitors of protein kinases and phosphatases have been extensively used to modulate the level of phosphate on proteins. In particular, okadaic acid (OA) a well-known phosphatase inhibitor, has been used to increase the phosphate level on proteins [12], but its effect on O-GlcNAc protein modification has not yet been investigated. Recently, it has been demonstrated that an inhibitor of O-GlcNAc- β -N-acetylglucosaminidase, O-(2-Acetamido-2-deoxy-D-glucosaminopyranosylidene) amino-N-phenylcarbamate (PUGNAc), was able to induce a 2-fold increase of O-glycosylation in the human colon cancer cells HT29, resulting in a reciprocal decrease of phosphorylation. Other cell lines were tested (NIH 3T3, CV-1 and HeLa) and were also affected by PUGNAc although the effects on HeLa cells were minimal [13]. In the present study we address the question of what would be the effect of a physiological drug affecting phosphorylation on O-GlcNAc level of cytosolic and nuclear proteins. Okadaic acid (OA) [14-16] was found to decrease O-GlcNAc glycosylation in Kelly cells, a neuroblastoma cell line; in contrast no apparent effect was appreciable with a human uterus cervix cancer cell-line (HeLa) or SV40 virus transformed CV-1 cells (COS).

3- Materials and methods

i- Cell Culture

Kelly, human neuroblastoma cell, were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum (Boehringer), 50 IU/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin (Sigma), 2 mM glutamine (Life Technologies).

HeLa (human uterus cervix cell line) and COS cells (SV40 virus transformed CV-1 cells) were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium supplemented with 10% fetal calf serum, 50 IU/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin, 2 mM glutamine.

Cells were grown to 80% confluency and treated with 0.25 µM Okadaic Acid (Sigma) for 4 hours as described by Dupont-Wallois *et al.*, 1995 [16].

ii- Cell fractionation

Cell pellet was washed in phosphate buffered saline (20 mM phosphate, 150 mM NaCl pH 7.5) and then resuspended in PBS containing 500 µg/ml digitonin and proteases inhibitors (1mM PMSF and 5µg/ml of leupeptine and pepstatine - Sigma) and incubated for 10 min at room temperature as described by Kearse and Hart, 1991 [1]. After centrifugation at 1000 g for 10 min at 4°C, the supernatant corresponding to the cytosoluble material and the pellet containing nucleus and membranous fraction were separated. According to Bronfman *et al.*, [17] at the digitonin concentration used in this study (0.4 mM final concentration) the cytosoluble fraction is free of membrane fragments. The pellet was washed twice in PBS and membranes were solubilized by incubation in 0.5 % [v/v] Triton X100 diluted in PBS. Nucleus were collected by centrifugation at 2000 rpm for 10 min, washed twice in PBS and solubilized in buffer H (50 mM Hepes, 500 mM NaCl, 2% (v/v) Triton X100 and proteases inhibitors).

iii-Radioactive labelling

To label proteins with [³³P]orthophosphate or [³⁵S]Met/Cys, cells were washed and then maintained fifteen minutes in phosphate or Met/Cys depleted medium before adding 100 µCi/ml [³³P]orthophosphate (Amersham) or 50 µCi/ml [³⁵S]Met/Cys (Pro-MixTM *in vivo* cell

labeling mixture, Amersham) respectively. Glucosamine radioactive labelling was done by addition of 5 $\mu\text{Ci/ml}$ [^{14}C]glucosamine added in fresh medium.

The prelabelling experiment consisted to label the cells during 1 hour just before okadaic acid treatment. The cells were then washed with fresh medium free of radioactivity before adding 250 nM OA during 4 hours.

iv-Labeled galactose transfer on GlcNAc residues with galactosyl transferase

Galactosyltransferase is a specific and sensitive probe frequently used in the detection of O-GlcNAc on cytosolic and nuclear proteins [1, 18]. Cytosolic and nuclear fractions were added to an equal volume of sample buffer (56.25 mM Hepes, 11.25 mM MnCl_2 , 250 mM galactose and 12.5 mM AMP) with proteases inhibitor. (1mM PMSF and 5 $\mu\text{g/ml}$ of leupeptine and pepstatine - Sigma) 0.025 U of bovine milk GlcNAc β -1, 4-galactosyltransferase (Sigma) and 5 μCi of UDP-[6- ^3H]Gal (Amersham) were finally added to initiate the reaction. The samples were incubated at 37°C for 2 hours.

v- Radioactivity counting

Radioactivity was measured on 10 μl samples, precipitated by 10% trichloroacetic acid with 1 mg/ml BSA at 4°C. For counting of [^{14}C]Glucosamine and [^3H]Galactose samples were preably treated with PNGase F (BioLabs) according to the manufacturer's kit recommendation.

For each sample, the cpm numbers were calculated per mg of proteins. Proteins were assayed with the BioRad microassay procedure according to the manufacturer's protocol. Radioactive labelling of okadaic acid treated samples was compared to the control ones.

vi-Polyacrylamide gel electrophoresis, western blotting and PNGase F treatment

The radiolabeled proteins were separated on SDS/PAGE [19], coomassie blue stained, dried under vacuum and then exposed on Biomax film. Before electrophoresis, the radiolabeled samples with [^{14}C]Glucosamine were treated with PNGase F as describe above.

The non-radioactive samples were resolved on 10 % SDS/PAGE. Then, proteins were electrophoretically transferred onto nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell). Blots were saturated in 3% BSA in TBS-Tween (15 mM Tris, 140 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween) for 45 min and washed three times for 15 min with TBS-Tween [20]. PNGase F treatment which specifically release N-linked oligosaccharides was directly performed by incubation of the nitrocellulose sheets in 5 ml Phosphate Buffer (pH 7.5 – 50 mM) containing 2500 units PNGase F overnight. Horseradish peroxidase labelled Wheat Germ Agglutinin was incubated in TBS-Tween (1/10.000) for 1 hour. Blots are washed 3 times in TBS-Tween for 15 minutes and detection was done with the ECL Western blotting detection reagents (Amersham).

To control Wheat Germ Agglutinin specificity and avoid non-specific lectin binding, experiments were performed in which 0.5 M free N-Acetylglucosamine was added together with WGA for 1 hour. Moreover since WGA is also known to recognise sialic acid residues, control experiments were done on glycoprotein samples previously chemically desialylated with pH 2.0 formic acid solution.

vii- UDP-GlcNAc level assay

Cytosolic fractions were passed over a 1 ml Dowex AG 1-X2 (HCOO⁻ form) column. The column was washed with 5 ml H₂O, and then acidic material including UDP-GlcNAc was eluted with 600mM ammonium formiate pH4.0. The acidic fraction was evaporated under vacuum and then analyzed for its UDP-GlcNAc content by anion-exchange HPLC using a Spectra Physics HPLC system consisting of a Supelcosyl LC-SAX column 250x4.6mm (Supelco, Inc, Bellefonte, USA), a SP8800 pump, a Spectra 100 detector and a Chromjet integrator. 100% H₂O (solvent A) was passed over the column for 15 min followed by a linear gradient for 30 min to 5% KH₂PO₄ (of a 500mM solvent B stock solution) increase to 40% KH₂PO₄ for 10 min and return to the initial conditions in 5 min (100% H₂O). Peaks were identified by comparison of their retention times to authentic UDP-GlcNAc sample and by co-injection of UDP-GlcNAc standard. Quantification was made by peak integration after calibration with UDP-GlcNAc increasing concentrations.

4- Results

i- Okadaic acid effect on total homogenate

Three cell lines were used to test the effect of OA on cellular proteins : human neuroblastoma cells (Kelly), human epithelial cells (Hela) and monkey transformed kidney cells (COS). Treatment with OA was performed as described under *Materials & Methods*. After treatment, cells were homogenised and proteins analyzed by SDS-PAGE. After de-N-glycosylation by PNGase F, glycoproteins were stained according to their terminal GlcNAc content using WGA-peroxydase conjugate (Fig. 1 A). WGA is known to recognise terminal GlcNAc, clusters beared by glycoproteins. In order to assess the eventual presence of GlcNAc containing O-Glycans other than O-GlcNAc-serine/threonine a PNA staining was performed as a control. PNA lectin reacts specifically with the GalNAc-serine sequence present in most O-Glycans (Fig.1 B).

While no modification in the electrophoretic pattern was observed after PNA staining, two types of changes in electrophoretic pattern of glycoproteins were observed for the neuronal cell line after WGA staining (arrows), but no significant modification in the electrophoretic pattern was detected for the epithelial cell lines (HeLa) and COS cells except for an approximately 90 kDa protein in the COS cells (arrow). A migration shift was observed in the higher molecular weight for some glycoproteins in Kelly cells and which may certainly be related with an hyperphosphorylation content of those proteins after phosphatases inhibition by okadaic acid [15, 16, 21]. Moreover, a decrease in the WGA staining is also remarkable for some other proteins, mostly glycoproteins with an apparent molecular weight over 55 kDa.

This study indicates that:

- i- In neuronal cell phosphorylation and O-linked terminal GlcNAc glycoprotein could occur on the same proteins
- ii- For some of these glycoproteins okadaic acid treatment affects both phosphorylation and O-linked terminal GlcNAc content
- iii- This phenomenon is less pronounced in epithelia derived cells (COS, HeLa)
- iv- This phenomenon doesn't seem to affect GalNAc containing O-glycans since no modification is observed for PNA stained glycoproteins.

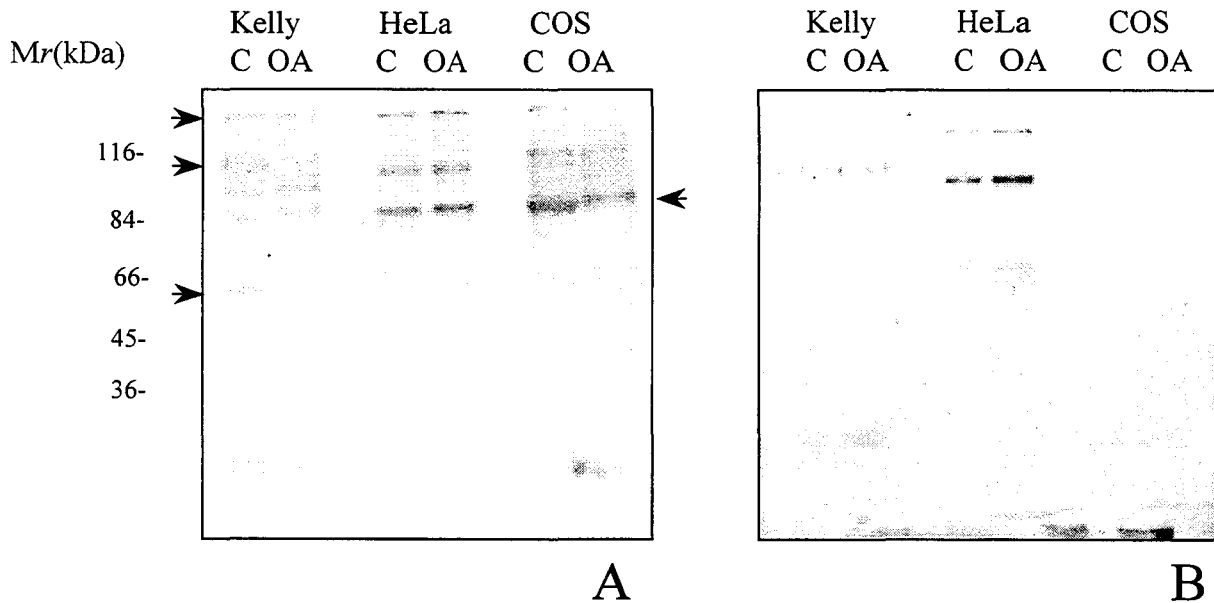


Figure 1- Okadaic acid effect on total homogenate Three cell lines, respectively neuroblastoma cells (Kelly), Hela and COS (CV-1 cells transformed by SV40) were treated by okadaic acid as described in *Material & Methods*. After treatment, cells were homogenised and proteins analysed by SDS-PAGE (10%) and electroblotted on nitrocellulose sheet. After de-N-glycosylation by PNGase F and desialylation with formic acid, glycoproteins were stained according to their O-glycosylated terminal GlcNAc content using WGA-peroxidase (A) or their O-glycosylated terminal GalNAc content using PNA-digoxigenin (B). Ctrl- control, OA- treatment with okadaic acid for 4 hours.

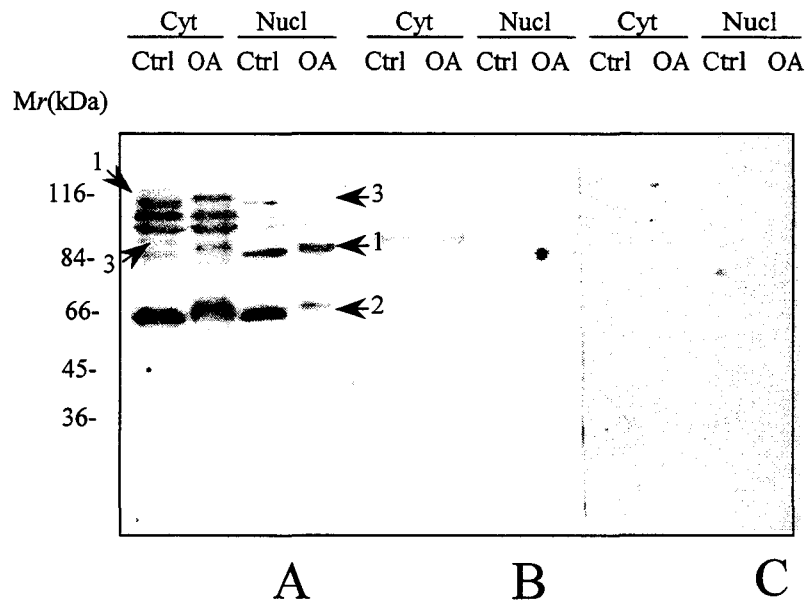


Figure 2- Subcellular location of O-GlcNAc-linked proteins in Kelly cells Kelly cells were further used to more clearly establish the change in O-GlcNAc content induces by okadaic acid treatment. In a first experiment, after homogenisation, subcellular fractionation was performed in order to obtain, a cytosoluble, a nuclear and a membrane fractions respectively. Nuclear and cytosolic fractions were separately analysed for O-GlcNAc containing glycoproteins (A) and according to their GalNAc containing O-glycans (B) as previously described in Fig. 1. The protein loading was normalized in each lane after ponceau red staining. To verify the specificity of the wheat germ agglutinin, control was done with 0.5 M free GlcNAc (C). C- control, OA- treatment with okadaic acid for 4 hours.

ii- Subcellular location of O-linked terminal GlcNAc proteins in Kelly cells

Kelly cells were further used to more clearly establish the change in O-linked terminal GlcNAc content induced by okadaic acid treatment. In a first experiment, after homogenisation, subcellular fractionation was performed in order to obtain respectively, a cytosoluble, a nuclear and a membrane fractions. Nuclear and cytosolic fractions were separately analysed for O-linked terminal GlcNAc containing glycoproteins as previously described (Fig. 2).

Differences in the migration profile similar to that described before in the case of the crude homogenate are observed in the two subcellular compartments. Three major differences were found :

Some proteins (1) just present a lower electrophoretic migration corresponding to an apparent higher molecular weight ; as previously reported for total homogenate this phenomenon may derived from an increase in the phosphorylation status of the protein. O-GlcNAc and phosphorylation could occur on different sites of proteins and may not be always reciprocal.

More interestingly, some other proteins are stained less intensively (2) or no more stained at all (3) by the WGA upon okadaic acid treatment. This last observation supports the idea [1, 2] that O-GlcNAc glycosylation and phosphorylation occur on the same or nearby serine/threonine residues in some glycoproteins. Dephosphorylation blockage by okadaic acid, seems to inhibit the further addition of GlcNAc.

Since O-GlcNAc glycosylation is known to occur in the cytosol, the absence of peculiar glycoprotein containing O-GlcNAc in the nucleus after okadaic acid treatment may account for a specific role of O-GlcNAc in nucleus import of cytosolic proteins as previously suggested by Duverger *et al.* [22-24].

iii- Study of GlcNAc incorporation on glycoproteins after okadaic acid treatment

In order to follow the time course and the extent in GlcNAc incorporation on cytosolic and nuclear glycoproteins, three types of labelling were performed. The [¹⁴C]GlcNH₂ was used to follow O-N-Acetylglucosaminylation, [³³P]orthophosphate to follow

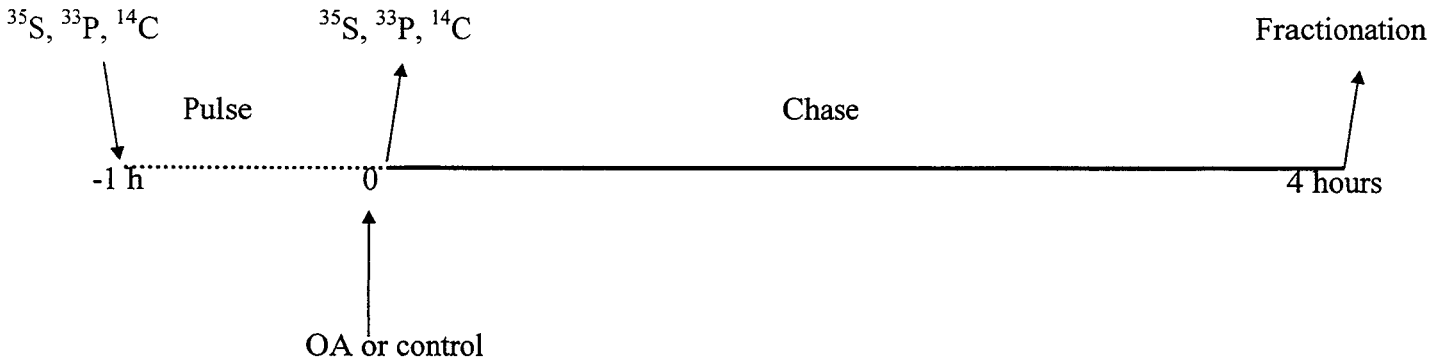


Figure 3- Prelabelling experiment Before treatment with okadaic acid for four hours, Kelly cells were radiolabelled separately with [^{33}P]orthophosphate, [^{14}C]Glucosamine and [^{35}S]Cys/Met for 1 hour.

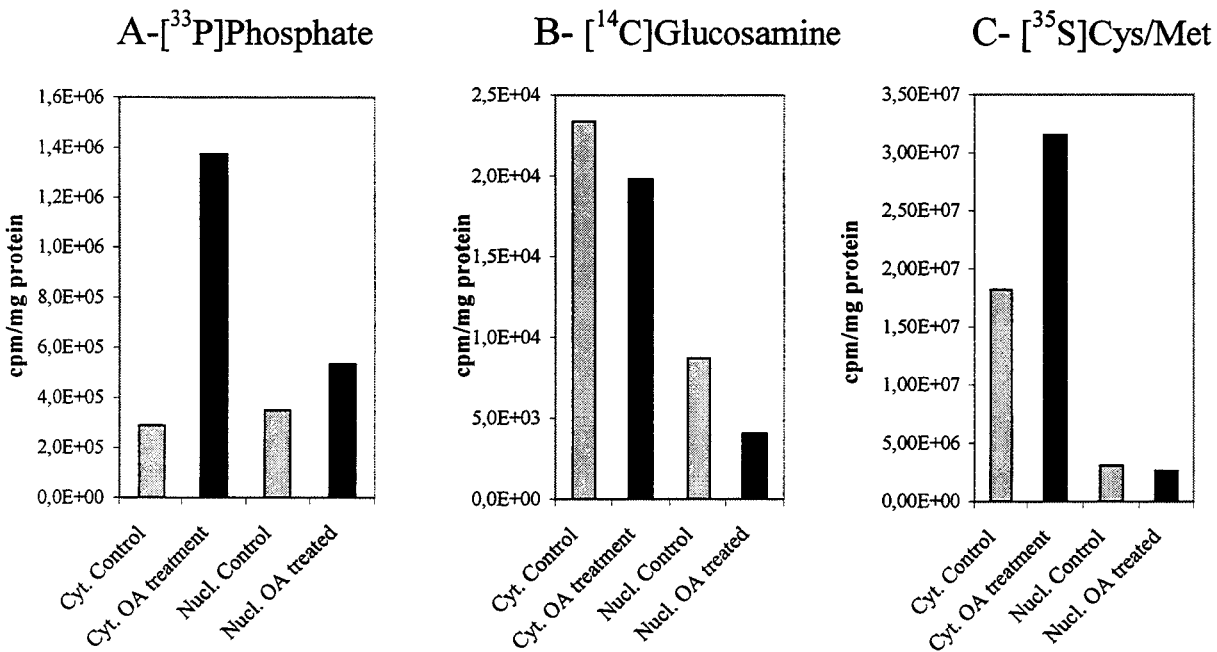


Figure 4- Prelabelling experiment Kelly cells were labelled for 1 hour with the different radioactive precursors. The [^{33}P]orthophosphate was used to follow the phosphorylation (A), [^{14}C]GlcNH₂ was used to follow O-N-Acetylglucosaminylation (B) and [^{35}S]cysteine/methionine to follow the protein synthesis process (C). After labelling, cells were washed with fresh medium and okadaic acid was introduced in the culture medium and cells further cultivated for 4 hours. Then they were fractionate in cytosolic and nuclear compartments. Proteins were precipitated with Trichloroacetic acid 10% and filtrate under vacuum. Grey, control and black, OA treatment

the phosphorylation process and [³⁵S]Cys/Met was used to follow the protein synthesis. This strategy was used to know (fig. 3) the influence of okadaic acid on the incorporation of [¹⁴C]GlcNH₂, [³³P]orthophosphate and [³⁵S]Cys/Met.

In order to improve the becoming of O-GlcNAc after okadaic acid treatment, cells were labelled for 1 hour with the different radioactive precursors. After washing, okadaic acid was introduced in the culture medium and cells further cultivated for 4 hours. In this type of experiment we can determine the fate of the prelabelled proteins (O-N-Acetylglucosaminylated proteins, phosphorylated proteins) upon okadaic acid treatment.

Fig. 4 illustrates the incorporation of the different isotopes. Okadaic acid treatment induces an increase in the phosphate level (fig. 4A) of both cytosolic and nuclear proteins consistent with a phosphatase inhibition. As a result of OA treatment, proteins were not dephosphorylated and phosphorylated proteins accumulate in the different cellular compartments. In contrast, the content of O-GlcNAc residues decreases following OA treatment (fig 4B). Blocking dephosphorylation seems to favour the elimination of O-GlcNAc residues. Furthermore the decrease of O-GlcNAc content was more pronounced in the nucleus than in the cytoplasm (53% of decrease for O-GlcNAc in the nucleus for just 15% in the cytosol). This increase in phosphate content is correlated with a decrease in glucosamine incorporation, which is predominant in the nucleus. On the basis of [³⁵S]Cys/Met labelling, it may be deduced that okadaic acid increases the protein stability. Mainly, the cytosolic level is twice the control value but no change in the protein content is observed for nuclear proteins. This result may be interpreted in two ways : i) an increase of cytosolic proteins half-life induced by okadaic acid, in this respect one may speculate that hyperphosphorylation increase protein stability or O-GlcNAc may also serve as a degradation signal for cytosolic proteins, ii) the second interpretation is that after OA treatment, proteins can no more reach the nucleus and are retained in the cytosol.

Fig. 5 shows the autoradiograms corresponding to labeling experiments. The results corroborate the quantification values presented in Fig. 4. Briefly an increase in phosphate incorporation is observed in cytosol and nucleus in okadaic acid treated extracts.

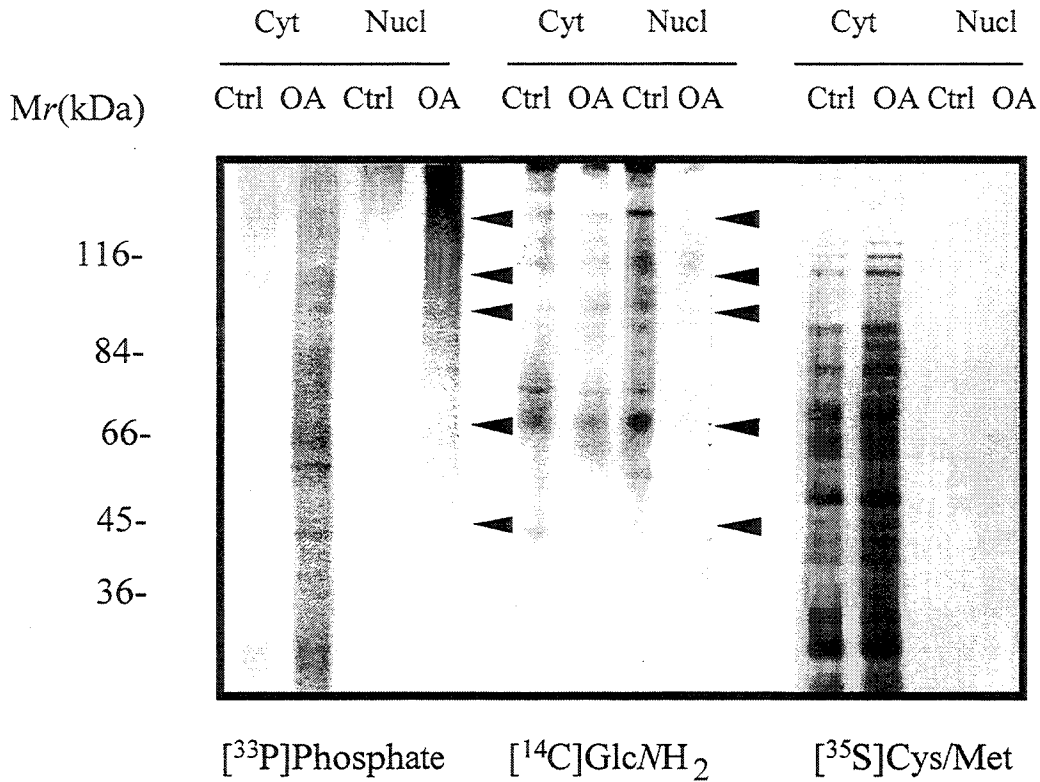


Figure 5- Autoradiograms of the different prelabelling experiments For the [¹⁴C]Glucosamine prelabelled proteins were treated with PNGaseF. The different prelabelled proteins were separated on a 10% SDS-PAGE gel, coomassie blue stained, dry under vacuum and expose to Kodak film.

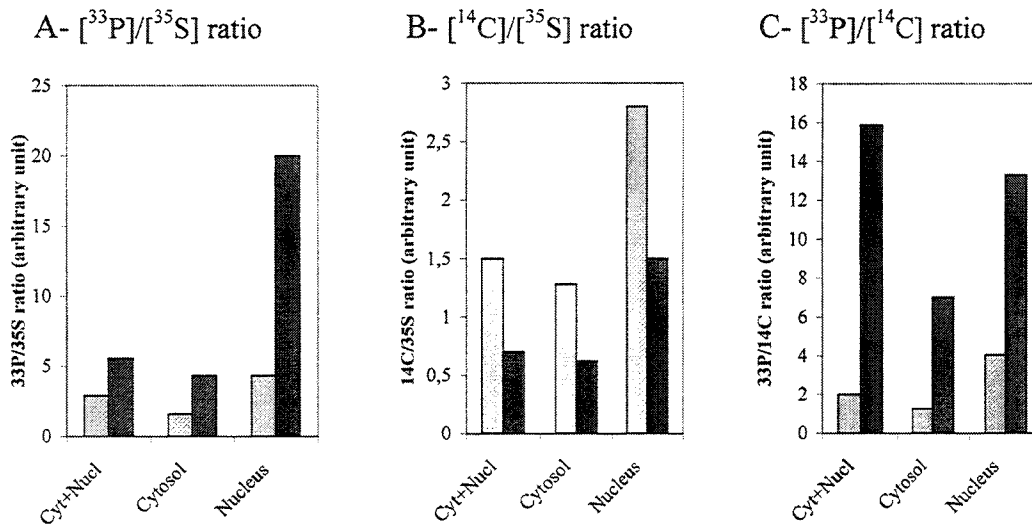


Figure 6- [³³P]/[³⁵S], [¹⁴C]/[³⁵S] and [³³P]/[¹⁴C] ratios (arbitrary units)

For some individual proteins (arrowed on the Fig. 5) we can observe a decrease in the [^{14}C]GlcNH₂ incorporation after OA treatment, matched by an opposite increase in the [^{33}P]orthophosphate labeling, reinforcing the idea of the balance between O-N-Acetylglucosamylation and phosphorylation. The difference in [^{14}C]GlcNH₂ incorporation after OA treatment is confirmed, this phenomenon is particularly intense for nucleus proteins. Moreover the difference in [^{14}C]GlcNH₂ incorporation is restricted to high molecular weight proteins, no difference is observed for proteins with apparent molecular weight under 50kDa.

An increase on [^{35}S]Cys/Met incorporation is observed after OA treatment in the cytosolic compartment, which confirms the absence of protein synthesis level modification during the treatment.

To consider changes in the protein level in Fig. 4C, the labelling experiment values were reexpressed as $^{33}\text{P} / ^{35}\text{S}$, $^{14}\text{C} / ^{35}\text{S}$ and $^{33}\text{P} / ^{14}\text{C}$ ratios in Fig. 6 respectively. This presentation of the data confirmed the increase of phosphorylation level and the decrease of O-GlcNAc content in both cytosolic and nuclear compartments. The ratio of $^{33}\text{P}/^{35}\text{S}$ (fig. 6A) to $^{14}\text{C}/^{35}\text{S}$ (Fig. 6B) is in accordance with the ratio $^{33}\text{P}/^{14}\text{C}$ (Fig 6C) for a determinate amount of proteins. In this way, we showed a clear increase of phosphorylated proteins when compared to O-GlcNAc content in both cytosol and nucleus. We could also add that for newly synthesized proteins we have approximately the same decrease in the O-GlcNAc content for the cytosolic proteins (62% decrease) that for the nuclear protein (47%) after okadaic acid treatment.

The decrease in GlcNAc content is a reflect of the decrease in acceptor sites for O-GlcNAc glycosylation. Both results are in favour of a “balance” between phosphorylation and glycosylation, the same serine/threonine residues being alternatively substituted either by phosphate or GlcNAc. Alternatively the presence of phosphate may impair the glycosylation of Ser/Thr nearby. Moreover, the decrease of GlcNAc content in the nucleus after okadaic acid treatment could suggests that O-GlcNAc addition in cytosol may serve as a signal for nuclear translocation of specific proteins.

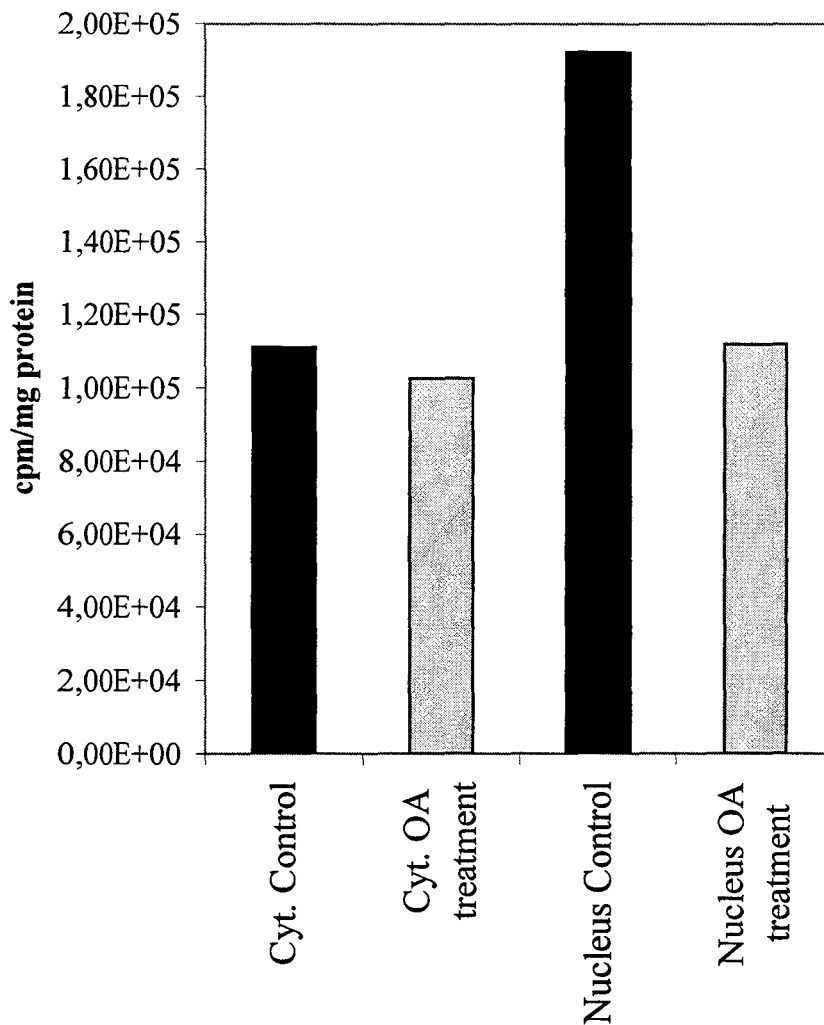


Figure 7- Labelling with galactosyl transferase Okadaic acid was introduced in the culture medium and Kelly cells were cultivated for 4 hours. Then they were fractionated into cytosolic and nuclear compartments, proteins were labelled with galactosyl transferase and treated with PNGase F. Proteins were precipitated with Trichloroacetic acid 10% and filtrate under vacuum. Grey, control and black, OA treatment

iv- [³H]Galactose labelling with Galactosyltransferase

In order to verify that the decrease of [¹⁴C]Glucosamine incorporation after treatment with okadaic acid corresponds to a decrease of GlcNAc content and not of GalNAc or sialic acid, we realise a galactose transfer on the cytosolic and the nuclear fractions using galactosyltransferase as described under materials and methods according to Kearse and Hart [1].

This experiment confirms the results of the first and the second experiments (Fig. 7). [³H]Galactose labelling decrease both in the cytosolic and the nuclear compartments upon OA treatment. These results corroborate the prelabeling experiment : we saw a decrease of about 10% for the cytosol and a greater decrease for the nuclear compartment, 47% and a total decrease of about 25% after okadaic acid treatment.

v- UDP-GlcNAc level assay

In order to verify that the decrease of the O-GlcNAc level after treatment with okadaic acid is not a consequence of a decrease in the cytosolic UDP-GlcNAc precursor pool, the soluble UDP-GlcNAc level was measured before and after OA treatment as described under Materials and Methods. Fig. 8 illustrates the HPLC diagrams obtained. UDP-GlcNAc concentrations were estimated to 4.94µg per flask for control cells (B) and 6.06µg per flask after okadaic acid treatment (C). As a consequence the difference in the UDP-GlcNAc pool level is not significant enough to explain a modification in the glucosaminyltransferase activity. Nevertheless a modification in glucosaminyltransferase catalytic parameters induced by OA and independent from phosphorylation cannot be completely excluded.

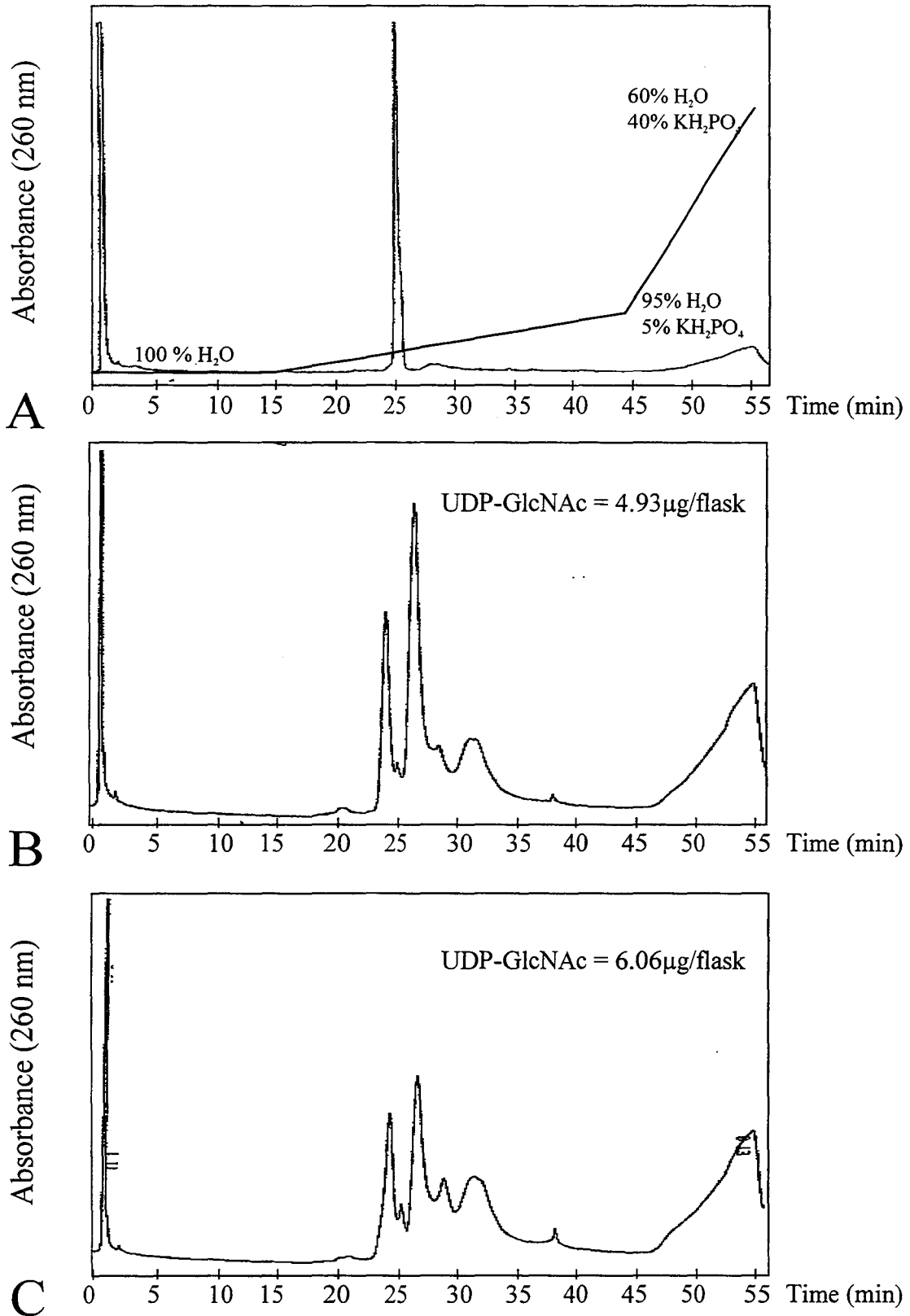


Figure 8- UDP-GlcNAc precursor pool measurement Cytosolic fractions of Kelly cells were previously passed over a 1 ml Dowex AG 1-X2 (HCOO⁻ form) column, washed with 5 ml H₂O, and then UDP-GlcNAc was eluted with 600mM ammonium-formiate pH4.0. The acidic fraction was evaporate under vacuum and then analyzed for their UDP-GlcNAc content using a SAX analytical anion-exchange column on a Spectra Physics HPLC system. A- UDP-GlcNAc ; B- control cells ; C- treated cells with OA

5- Discussion

The best characterized example of nuclear and cytoplasmic glycosylation to date is that of O-linked N-Acetylglucosamine (O-GlcNAc) [25]. Since both GlcNAc and phosphate modify the hydroxyl of serine and threonine, it has been suggested that a competition occurs between these two post-translational modifications, as supported by the observation that most O-GlcNAc modified proteins are also phosphoproteins [26]. Both phenomena are dynamic and controlled by the relative activity of the enzymes responsible for addition (kinases and N-Acetylglucosaminyltransferase) and removal (phosphatases and N-Acetylglucosaminidase) of the phosphate and GlcNAc residues respectively. In the present report in order to assess the hypothesis that protein modifications by O-GlcNAc and phosphate are reciprocally related, we investigate the effect of a broad phosphatase inhibitor (OA) on the O-GlcNAc content of cellular glycoproteins.

The first observation was changes in the electrophoretic pattern of proteins induced by okadaic acid treatment in the neuroblastoma cell line (Kelly). These migration shifts may certainly be related with changes in the phosphorylation content of those proteins after phosphatases inhibition by okadaic acid [15, 16, 21]. Then we could observe that OA induces a severe decrease in O-GlcNAc content of both cytosolic and nuclear proteins in neuronal cells supporting the hypothesis according to which O-GlcNAc and phosphate are reciprocally related to one another. However the relationship of these two types of modifications very likely depends on the biologic context and the nature of the protein. In a previous report, Chou and Omary [27] describe a reciprocal increase of terminal GlcNAc and phosphorylation of intermediate filament after treatment of cells with okadaic acid at a concentration which induces mitotic arrest. However no appreciable effect on the overall O-linked terminal-GlcNAc pattern in HeLa and COS cells was observed except for a 90 kDa protein in COS cells. This protein could correspond to the Large T-antigen previously described as containing O-GlcNAc in a region known to be phosphorylated [7]. These results suggest that the major proteins in HeLa and COS cells lines are not affected by changes in O-GlcNAc levels. Similar results were previously obtained by Haltiwanger *et al.* using a β -N-Acetylglucosaminidase inhibitor (PUGNAc) [13], indicating that PUGNAc effects were minimal on HeLa cells. Other studies using streptozotocin, another analogue of N-Acetylglucosamine, demonstrated a blockage of the removal of O-GlcNAc from intracellular proteins in an early pancreatic beta cell [28].

When we looked specifically at the individual protein level, we observed that O-N-Acetylglucosaminylation of some proteins remained unchanged after OA treatment both in total homogenate and subcellular fractions. For that reason it is likely that there is not complete overlap between the glycosylation and phosphorylation sites.

The phenomenon was further quantified using pulse/chase labelling experiments with [¹⁴C]GlcNH₂, [³³P]Phosphate and [³⁵S]Cysteine/Methionine precursors. The major finding was in the decrease of the GlcNAc labelling in the nucleus. This observation reinforces previous work [22-24] demonstrating that GlcNAc acts as a signal for nuclear translocation of cytosolic glycoproteins independent of the NLS peptidic signal. As a consequence the nuclear translocation or at least the cytosolic retention of specific glycoprotein could be directly related to the O-GlcNAc /Phosphate balance.

In opposition to OA which presents a broad inhibition spectrum towards phosphatases, kinases are rather specific and their inhibition requires also specific inhibitors. Nevertheless we speculate that pharmacological manipulation of cells with kinases inhibitors may provide opposite effects and mainly an increase in nuclear routing of cytosolic glycoproteins. In this respect in a number of cases such as for the transcription factor c-myc [29] the site modified by O-GlcNAc, threonine-58, was found to closely resemble those of glycogen synthase kinases (GSK3). For that reason it has been suggested that O-linked-GlcNAc addition and phosphorylation by kinases such as GSK-3, may have a common denominator : their involvement in transcriptional regulation of glucose metabolism [30]. Curiously additively to its inhibition towards phosphatases 1 and 2A, OA was demonstrated to act as an inducer of the 78 kDa glucose-regulated protein in brain tumor cells [31]. For that reason in addition to the phosphatases inhibition, modification of glucose metabolism in neuronal cells may contribute to the protein modification observed. The type of alteration induced by OA in brain cells may contribute to three different O-GlcNAc patterns observed in neuronal cells : some protein (1) just present a migration shift in the higher molecular weight and more interestingly other proteins are under stained (2) or not stained (3) by the WGA after okadaic acid treatment.

It should be also mentioned that brain proteins such as Tau proteins [10], neurofilaments [8] or neurons proteins [11] have been demonstrated to be extensively modified by O-GlcNAc. An effect similar to that of OA has previously been described after mitotic arrest with microtubule destabilizing agents such as nocodazole [32].

6- References

- [1] Kearsse, K.P. & Hart, G. W. (1991) Lymphocyte activation induces rapid changes in nuclear and cytoplasmic glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 1701-1705
- [2] Chou C. F., Smith A.J. & Omary M.B. (1992) Characterization and dynamics of O-linked glycosylation of human cytokeratin 8 and 18. *J. Biol. Chem.* 267, 3901-3906
- [3] Torres, C.-R., and Hart, G.W. (1984) Topography and Polypeptide Distribution of terminal N-Acetylglucosamine Residues on the Surface of Intact Lymphocytes, Evidence for O-linked GlcNAc. *J. Biol. Chem.* 259, 3308-3317
- [4] Hart, G. W., Haltiwanger, R. S. , Holt, G. D., & Kelly, W. G. (1989) Nucleoplasmic and cytoplasmic glycoproteins. *Ciba. Found. Symp.* 145, 102-112
- [5] Hart, G. W., Haltiwanger, R. S. , Holt, G. D., & Kelly, W. G. (1989) Glycosylation in the nucleus and cytoplasm. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 841-874
- [6] Kelly, W.G., Dahmus, M.E. & Hart, G.W. (1993) RNA Polymerase II Is a Glycoprotein, Modification of the COOH-Terminal Domain by O-GlcNAc. *J. Biol. Chem.* 268, 10416-10424
- [7] Medina, L., Grove, K. & Haltiwanger, R. S. (1998) SV40 large T antigen is modified with O-linked N-acetylglucosamine but not with other forms of glycosylation. *Glycobiology* 8(4), 383-391
- [8] Dong, D. L.-Y, Xu, Z.-S., Chevrier, M. R., Cotter, R. J., Cleveland, D. W., & Hart, G. W. (1993) Glycosylation of Mammalian Neurofilaments. Localization of multiple O-linked N-Acetylglucosamine moieties on neurofilament polypeptides L and M. *J. Biol. Chem.* 268, 16679-16687
- [9] Chou, T.-Y., Hart G.W. & Dang, C.-V.(1995) c-Myc is glycosylated at threonine 58, a known phosphorylation site and a mutational hot spot in lymphomas. *J. Biol. Chem.* 270, 18961-18965
- [10] Shane Arnold, C., Johnson, G. V. W., Cole, R. N., Dong, D. L.-Y., Lee, M. & Hart, G. W. (1996) The Microtubule-associated Protein Tau Is Extensively Modified with O-linked N-acetylglucosamine. *J. Biol. Chem.* 271, 28741-28744
- [11] Griffith, L. S., Mathes, M. & Schmitz, B. (1995) Beta-amyloid precursor protein is modified with O-linked N-Acetylglucosamine *J. Neurosci. Res.* 41(2), 270-278
- [12] Cohen, P. (1989) The Structure and Regulation of Protein Phosphatases. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 453-508

- [13] Haltiwanger, R. S., Grove, K. & Philipsberg, G. A. (1998) Modulation of O-Linked N Acetylglucosamine Levels on Nuclear and Cytoplasmic Proteins in Vivo Using the Peptide O-GlcNAc- β -N-acetylglucosaminidase Inhibitor O-(2-Acetamido-2-deoxy-D-glucosaminopyranosylidene)amino-N-phenylcarbamate. *J. Biol. Chem.* 273(6), 3611-3617
- [14] Cohen, P., Holmes C. F. B. & Tsukitani, Y. (1990) Okadaic acid : a new probe for the study of cellular regulation. *Trends Biochem. Science* 15, 98-102
- [15] Sautière, P.-S., Caillet-Boudin M.-L., Watzet, A. & Delacourte, A. (1994) Detection of Alzheimer-type Tau Proteins in Okadaic Acid-Treated SKNSH-SY 5Y Neuroblastoma Cells. *Neurodegeneration* 3, 53-60
- [16] Dupont-Wallois, L., Sautière, P. E., Cocquerelle, C., Bailleul, B., Delacourte, A. & Caillet-Boudin, M.-L. (1995) Shift from fetal-type to Alzheimer-type phosphorylated Tau proteins in SKNSH-SY 5Y cells treated with okadaic acid. *FEBS lett.* 357, 197-201
- [17] Bronfman, M., Loyola, G. & Koenig, C. S. (1998) Isolation of Intact organelles by Differential Centrifugation of Digitonin-Treated Hepatocytes Using a Table Eppendorf Centrifuge. *Anal. Biochem.* 255, 252-256
- [18] Whiteheart, S., W., Passaniti, A., Reichner, J. S., Holt, G. D., Haltiwanger, R. S. & Hart, G. W.) Glycosyltransferase probes. (1989) *Methods in Enzymology* 179, 82-95
- [19] Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. (1970) *Nature* 227, 680-685
- [20] Datta, B., Ray, M. K., Chakrabarti, D., Wylie, D. E. & Gupta, N. K. Glycosylation of Eukaryotic Peptide Chain Initiation Factor 2 (eIF2)-associated 67-kDa Polypeptide (p⁶⁷) and its possible Role in the Inhibition of eIF-2 Kinase-catalysed Phosphorylation of the eIF-2 α -Subunit. (1989) *J. Biol. Chem.* 34, 20620-20624
- [21] Furiya, Y., Sahara, N. & Mori, H. (1993) Okadaic acid enhances abnormal phosphorylation on Tau proteins. *Neurosciences Lett.* 156(1-2), 67-69
- [22] Duverger E., Carpentier, V., Roche A.-C. & Monsigny M. (1993) Sugar-Dependent Nuclear Import of Glycoconjugates from the cytosol. *Experimental Cell Research* 207, 197-201
- [23] Duverger E., Pellerin-Mendes, C., Mayer, R., Roche A.-C. & Monsigny M. (1995) Nuclear import of glycoconjugates is distinct from the classical NLS pathway. *J. Cell Sci.* 108, 1325-1332

- [24] Duverger E., Roche A.-C. & Monsigny M. (1996) N-Acetylglucosamine-dependent nuclear import of neoglycoproteins. *Glycobiology* 6(4), 381-386
- [25] Haltiwanger, R. S., Kelly, W. G., Roquemore, E. P. , Blomberg, M. A., Dennis Dong, L.-Y., Kreppel, L., Chou, T.-Y. & Hart, G. W. (1992) Glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins is ubiquitous and dynamic. *Biochemical Society Transactions* 20, 264-269
- [26] Haltiwanger, R. S., Busby, S., Grove, K., Li, S., Mason, D., Medina, L., Moloney, D., Philipsberg, G. & Scartozzi, R. (1997) O-Glycosylation of Nuclear and Cytoplasmic Proteins : Regulation Analogous to Phosphorylation ? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 231, 237-242
- [27] Chou C. F. & Omary M.B. (1994) Mitotic arrest with anti-microtubule agents or okadaic acid is associated with increased glycoprotein terminal GlcNA's. *Journal of Cell Science* 107(7), 1833-1843
- [28] Ross, M. D., Xie, W., Su, K., Clark, J. A., Yang, X., Chin, E., Paterson, A. J. & Kudlow, J. E. (1998) Streptozotocin, an analog of N-acetylglucosamine, blocks the removal of O-GlcNAc from intracellular proteins. *Proc. Assoc. Am. Physicians* 110(5), 422-432.
- [29] Chou, T.-Y., Dang, C.-V. & Hart, G.W. (1995) Glycosylation of the c-Myc transactivation domain. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 92, 4417-4421
- [30] Yki-Jarvinen, H., Virkamaki, A., Daniels, M.-C., McClain, D. & Gottschalk, W.-K. (1998) Insulin and glucosamine infusions increase O-linked N-acetylglucosamine in skeletal muscle proteins in vivo. *Metabolism* 47(4), 449-455
- [31] Hou, M.-C., Shen, C.-H., Lee, W.-C. & Lai, Y.-K. (1993) Okadaic Acid as an Inducer of the 78-kDa Glucose-Regulated Protein in 9L Rat Brain Tumor Cells. *J. Cell. Biochem.* 51, 91-101
- [32] Haltiwanger, R. S. & Philipsberg, G. A. (1997) Mitotic Arrest with Nocodazole Induces Selective Changes In the Level of O-Linked N-Acetylglucosamine and Accumulation of Incompletely Processed N-Glycans on Proteins from HT29 Cells. *J. Biol. Chem.* 272, 8752-8758

7- Abbreviations

BSA, bovine serum albumin ; GlcNAc, *N*-Acetylglucosamine ; GalNAc, *N*-Acetylgalactosamine ; PBS, Phosphate-buffered saline ; TBS, Tris-buffered saline ; PNGase F, Peptide-*N*-glycosidase F ; WGA, Wheat germ agglutinin ; PNA, Pea nut agglutinin ; SDS-PAGE, Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis ; AMP, Adenosine 5'-monophosphate ; UDP-GlcNAc, Uridine diphospho *N*-Acetylglucosamine

8- Acknowledgement

We are indebted to Professor Michel MONSIGNY for helpful criticisms during the preparation of this manuscript. We also appreciate the help of Professor René CACAN and Doctor Joël MAZURIER in the experiments preparation.

This work was supported in part by CNRS (Unité Mixte de Recherches CNRS n°8576, director Prof. André VERBERT), The Université de Lille I, and INSERM (Unité de Recherche n°422, Director J. C. BEAUVILLAIN).

III- Arguments supplémentaires à l'étude de la balance phosphorylation/O-N-Acétyleglucosaminylation

1- Utilisation d'un inhibiteur de Protéine Kinase C : la chélérythrine

Après avoir utilisé l'AO, un inhibiteur de phosphatases, il était intéressant de faire l'expérience inverse, c'est à dire d'utiliser un inhibiteur de kinase. C'est ce que nous avons fait en utilisant un inhibiteur de protéine Kinase C, la chélérythrine (Che). Cet inhibiteur a été incubé avec les neuroblastomes pendant 2 heures à une concentration de 50 μ M et les cellules ont été ensuite fractionnées en un compartiment cytosolique et un compartiment nucléaire.

Les protéines séparées par électrophorèse en SDS-PAGE 10 %, électrotransférées, et traitées par la PNGase F toute la nuit, ont été incubées avec la WGA-péroxydase. Après révélation par réaction de chémiluminescence on peut observer, et exclusivement dans le cytosol, des bandes révélées par la WGA de masses moléculaires plus basses. Ceci traduit en fait une hypophosphorylation des protéines. Ceci renforce les expériences utilisant l'acide okadaïque, où le shift de masse se faisait vers les masses de plus haut poids (hyperphosphorylation).

Cette expérience confirme donc l'existence d'une balance entre la phosphorylation et la O-N-Acétyleglucosaminylation : avec l'AO, on a un shift vers les plus hauts poids moléculaires et une diminution de la fixation de la WGA ; avec la Che, on a un shift vers les bas poids moléculaires et une augmentation de la fixation de la WGA (Figure 9).

2- Incorporation d'UDP-[¹⁴C]GlcNAc après traitement par la phosphatase alcaline

Cette expérience met en jeu des matériels biologiques et expérimentaux différents de ceux utilisés ci-dessus. Une préparation de 400 μ l de cytosol de foie de rat, connue comme contenant la O-N-Acétyleglucosaminyltransférase a été traitée pendant 4 heures par la phosphatase alcaline dans 100 μ l de tampon (5X) Tris/HCl pH9.5, 10 mM d'AMP et un cocktail d'inhibiteurs de protéases. Le contrôle correspond exactement aux mêmes

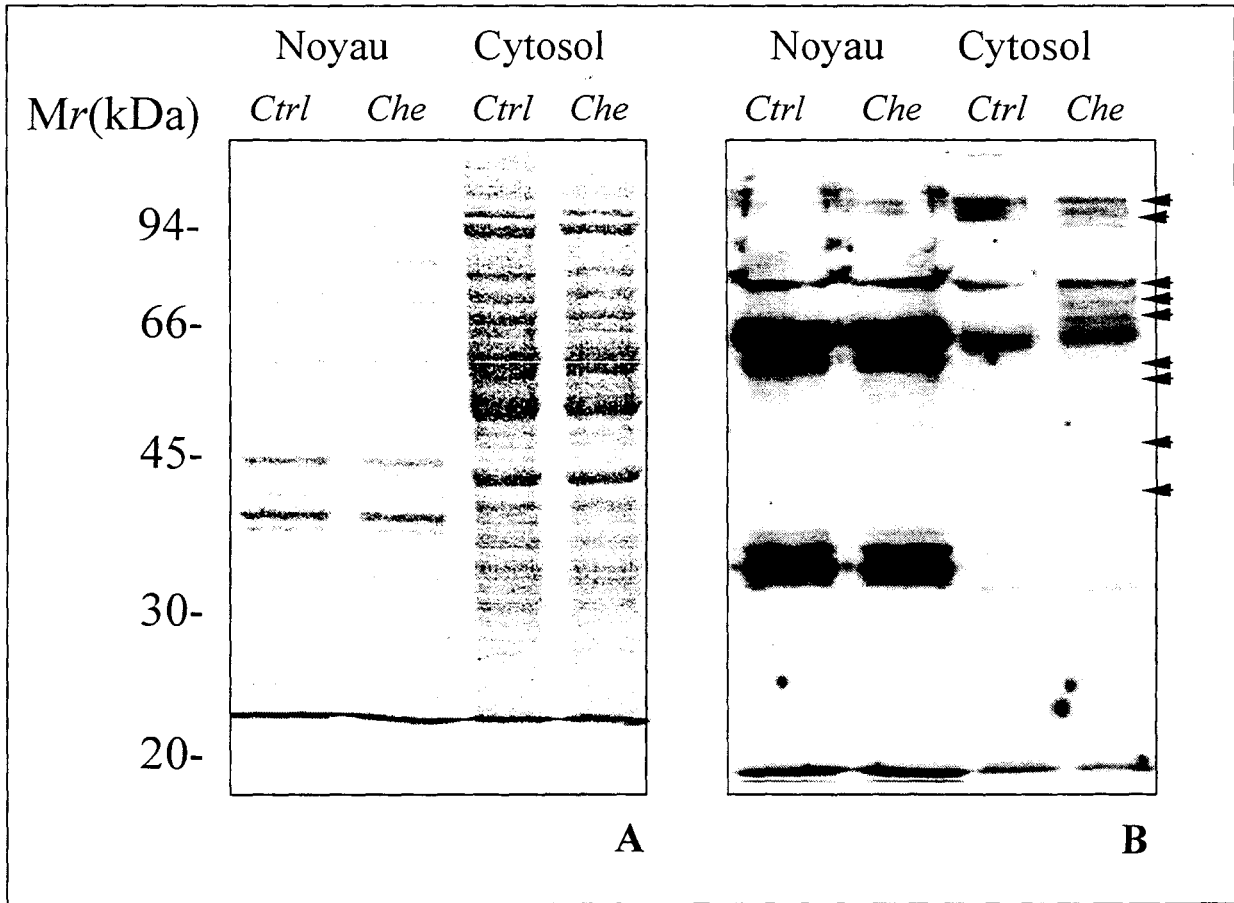


Figure 9 – Utilisation de la chélérythrine sur les cellules Kelly. A, coloration des protéines au rouge Ponceau et B, révélation par la WGA

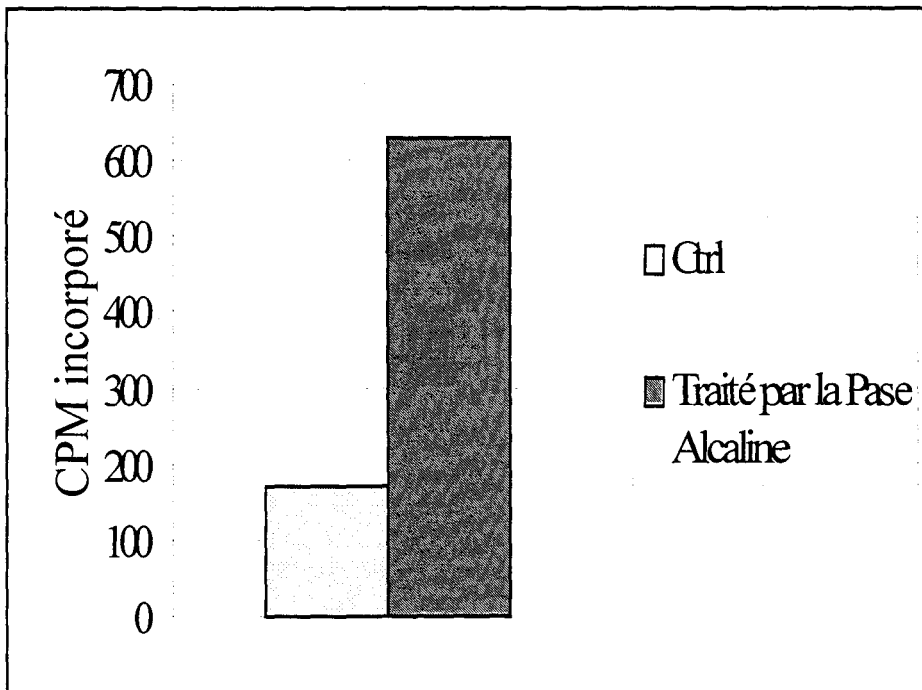


Figure 10 - Incorporation d'UDP-[¹⁴C]GlcNAc sur des protéines cytosoliques du foie de rat après traitement par la phosphatase alcaline

incubations mais en omettant la phosphatase alcaline. Les préparations ont été ensuite dialysées contre un tampon Tris/HCl pH 6.0, puis 0.25 μ Ci d'UDP-[14 C]GlcNAc a été incubé avec chacune des préparations. Au bout de 4 heures les protéines ont été précipitées à l'ATCA 10%, filtrées et comptées sur filtre GF/C. La radioactivité mesurée est représentée sur l'histogramme de la Figure 10.

Ainsi on peut observer qu'après traitement par la phosphatase alcaline, on a une augmentation d'environ 3.5 fois de l'incorporation d'UDP-[14 C]GlcNAc, ceci signifie qu'en hydrolysant les résidus de phosphate, on libère des sites disponibles pour la O-GlcNAc.

3- Influence de l'acide okadaïque sur la glycosylation de l'antigène grand T

Dans l'article précédent, nous avons observé que l'AO avait un effet sur la fixation de la WGA sur une protéine de 90 kDa environ dans les cellules COS. La masse moléculaire de cette bande nous a laissé penser qu'il pouvait s'agir de l'antigène grand T. En effet, Medina *et al*, 1997 avaient démontré que l'antigène grand T était (i) modifié par la O-GlcNAc et de plus (ii) que cette glycosylation se faisait sur des sites connus de phosphorylation. Pour cela un anticorps dirigé contre cette protéine a été utilisé sur le blot précédemment incubé avec la WGA. On observe, après traitement par l'AO une diminution de la O-N-Acétylglucosaminylation sur l'antigène grand T (Figure 11).

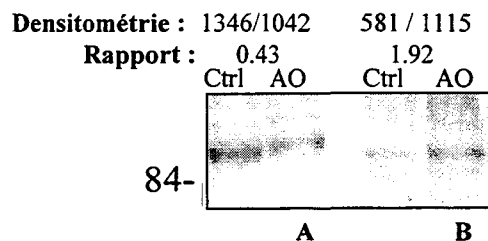


Figure 11- Effet de l'AO sur la glycosylation de l'antigène grand T (A, révélation par la WGA et B, révélation par un anticorps anti-grand T).

2^{ème} Partie :

Mise en évidence de la balance

phosphorylation/O-N-

acétylglucosaminylation sur les protéines

Tau. Rôle dans la localisation nucléaire

I- Généralités sur les protéines Tau

1- Définition

Les protéines Tau (*Tubulin associated unit*) appartiennent à la famille des protéines associées aux microtubules (*Microtubules Associated Proteins* ; MAPs). Ce sont des phosphoprotéines de masse moléculaire variant de 45 à 70 kDa. Elles permettent la régulation de différentes propriétés des microtubules neuronaux telle que leur stabilité et leur orientation et c'est la raison pour laquelle on les considère comme des protéines accessoires aux microtubules (les microtubules sont un assemblage de dimères de tubulines) (Brand, 1996, Delacourte *et* Buée, 1997).

Les microtubules sont nombreux dans les axones. Leur rôle est de véhiculer les vésicules et les macromolécules dans les axones par un transport antérograde et rétrograde (Figure 10). Il existe deux types de MAPs (Mandelkow *et* Mandelkow, 1994):

i. Le premier est celui des *force-producing* MAPs avec la kinésine (transport axonal antérograde) et la dynéine (transport axonal rétrograde).

Ces moteurs moléculaires produisent l'énergie pour le transport par l'hydrolyse de l'ATP.

ii. Le second type concerne les MAPs fibreuses avec **Tau** et MAP-2 par exemple.

L'intérêt porté aux protéines Tau a considérablement progressé lorsqu'on a découvert qu'elles pourraient être impliquées dans l'apparition de la maladie d'Alzheimer et dans d'autres désordres neurodégénératifs (Buée *et* Delacourte, 1999 ; Buée *et al*, 2000).

Remarque : Certaines études rapportent l'existence de protéines Tau dans des cellules non-neuronales (Sygowsky *et al*, 1993 ; Thurston *et al*, 1996).

2- Le gène codant pour les protéines Tau

Les protéines Tau sont toutes issues d'un même gène de 100 kb situé chez l'homme sur le bras long du chromosome 17 sur le locus 17q21 (Neve *et al*, 1986). Le transcrit primaire contient 16 exons dont 3 ne sont pas présents dans le cerveau humain. En outre, trois

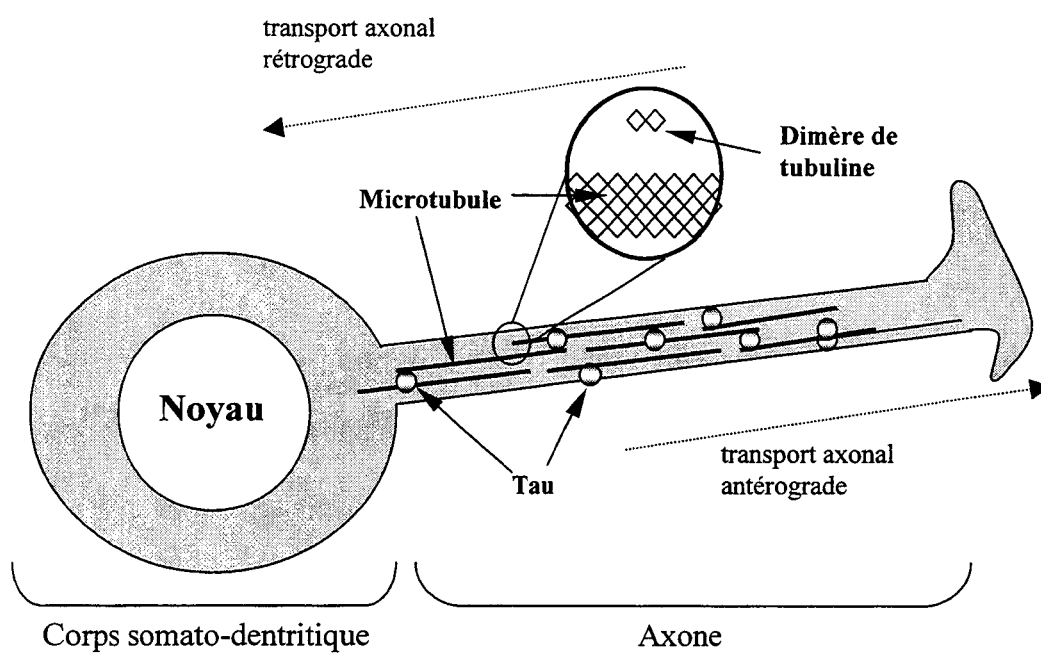


Figure 10 - Les protéines Tau dans le neurone

exons de l'ARNm subissent un épissage alternatif (les exons 2, 3 et 10) ce qui permet la synthèse de 6 isoformes dans le cerveau humain : 2- 3- 10-, 2+ 3-10-, 2+ 3+ 10-, 2- 3- 10+, 2+ 3- 10+, 2+ 3+ 10+ (Goedert *et al.*, 1989) (c'est ce qu'on appelle communément la règle du jamais 3 sans 2).

Dans le système nerveux périphérique il existe une protéine Tau de masse moléculaire élevée appelée Big Tau (Couchie *et al.*, 1992) et qui contient un insert supplémentaire : l'exon 4A.

3- Les isoformes de Tau

Les six isoformes de Tau ont une séquence primaire qui s'échelonne de 352 à 441 acides aminés et ont une masse moléculaire apparente de 45 à 65 kDa lorsqu'elles sont dans un état non phosphorylé. L'isoforme du système nerveux périphérique, Big Tau a une masse moléculaire plus élevée de 130 kDa et contient une séquence supplémentaire de 253 acides aminés (Figure 11).

La région N-terminale, acide, des protéines Tau contient le domaine de projection vers d'autres éléments cytosquelettiques. La région centrale est riche en résidus de proline et est la cible de nombreuses protéines kinases. Enfin la région C-terminale, basique, constitue le domaine d'assemblage (ou de liaison) aux microtubules. Elle contient 3 (3R) ou 4 (4R) domaines répétés, les *tubulin-binding repeats*. Cette interaction Tau/tubuline est régulée par l'état de phosphorylation des protéines Tau : lorsqu'elles sont dans un état élevé de phosphorylation, les protéines Tau se détachent des microtubules et libèrent les dimères de tubuline, permettant la dépolymérisation des microtubules (Buée *et Delacourte*, 1997).

4- Les pathologies liées aux protéines Tau (Tauopathies)

i- La maladie d'Alzheimer

La pathologie liée aux protéines Tau la plus connue est la maladie d'Alzheimer. Les symptômes de cette maladie sont une absence de plainte mnésique, un désintérêt, des troubles de l'humeur, une négligence physique, des troubles du comportement du soi, la perte du mot, une désorientation, des problèmes d'habillement. La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative caractérisée par la présence de plaques séniles, accumulation intraneuronale de filaments en hélice appelés *paired helicoïdal filaments* (PHF). Les

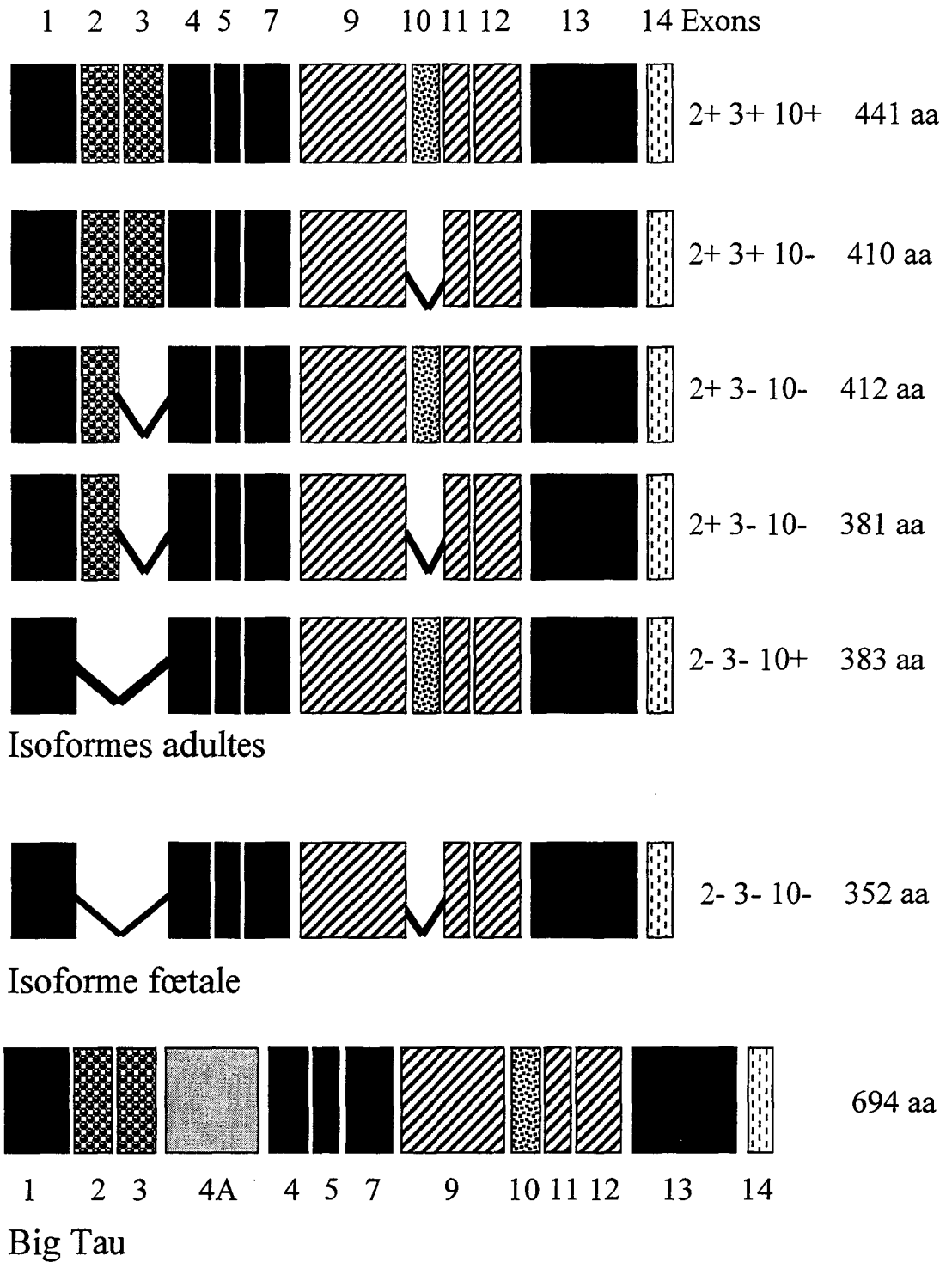


Figure 11 - Les différentes isoformes de Tau

protéines Tau sont les constituants principaux de ces PHF et sont alors appelées Tau-PHF (Flament *et al*, 1990 ; Buée *et al*, 2000).

Ces protéines Tau-PHF sont insolubles, ont une masse moléculaire apparente plus élevée, un pI plus acide que les protéines Tau normales, qui est la conséquence d'une phosphorylation anormale. En fait, une phosphorylation « normale » des protéines Tau régule la polymérisation des microtubules alors qu'une hyperphosphorylation des sites normalement phosphorylés et une phosphorylation en des sites spécifiques aux Tau-PHF induit une dépolymérisation irréversible des microtubules et une accumulation de Tau dans le compartiment somato-dendritique, la rupture du cytosquelette axonal, un arrêt du transport axonal et la mort neuronale.

Les six isoformes de Tau d'un cerveau autopsié d'un sujet Alzheimer sont anormalement phosphorylées et agrégées. Elles sont détectées par immunoblotting sous la forme d'un triplet de 55, 64 et 69 kDa (Tau hyperphosphorylées) alors que les protéines Tau d'un cerveau autopsié chez un sujet sain migrent sous la forme d'un doublet de 45 et 52 kDa (les protéines Tau sont déphosphorylées) et que les protéines Tau d'un cerveau biopsié chez un sujet sain migrent sous la forme d'un triplet de 55, 64 et 69 kDa (les protéines Tau sont phosphorylées).

ii- Autres pathologies liées aux protéines Tau

D'autres désordres neurodégénératifs impliquent les protéines Tau (pour revue lire Buée *et Delacourte*, 1999). Il s'agit de la dégénération corticobasale et de la paralysie supranucléaire progressive (*progressive supranuclear palsy* ; PSP). Dans ces deux pathologies seules les isoformes 4R s'agrègent sous forme de filaments en hélice torsadés ou de filaments droits. En électrophorèse ces protéines Tau se retrouvent sous la forme d'un doublet de protéines Tau de 64 et 69 kDa.

Dans la maladie de Pick seules les isoformes 3R s'agrègent de manière désordonnée sous la forme de filaments enroulés. Elles se présentent sous la forme d'un doublet de 55 et 64 kDa.

Des études récentes montrent qu'il existe un lien direct entre une anomalie génétique pour Tau et une agrégation anormale des filaments dans la démence fronto-temporale avec des symptômes parkinsoniens liés au chromosome 17.

5- La phosphorylation des protéines Tau

La phosphorylation des protéines Tau est bien connue notamment grâce à l'étude de l'enchevêtrement des neurofibrilles dans la maladie d'Alzheimer. Il faut bien comprendre qu'il existe une phosphorylation normale des protéines Tau qui régule leur activité fonctionnelle, visible notamment sur des biopsies de cerveau, et une phosphorylation anormale pouvant déboucher sur différentes pathologies. En effet comme nous l'avons indiqué ci-dessus, les protéines Tau sont anormalement hyperphosphorylées dans la maladie d'Alzheimer et elles se dissocient des microtubules pour s'autoagréger et former les PHF qui contribuent à la mort cellulaire.

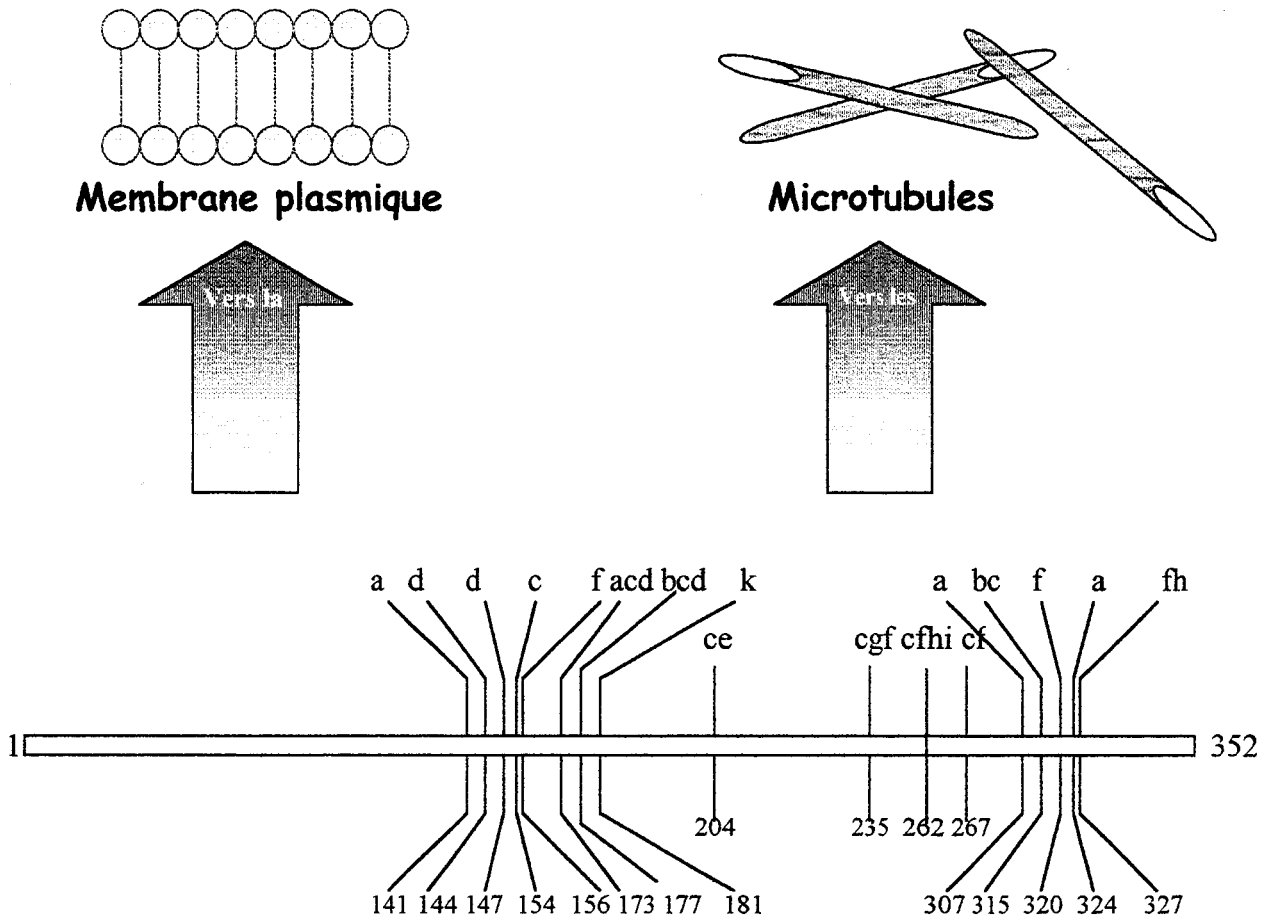
Il existe au moins 20 sites de phosphorylation sur les protéines Tau, tous ces sites étant situés en dehors des domaines de liaison aux microtubules sauf un site qui se retrouve sur la Ser 262 du premier domaine de liaison aux microtubules (Figure 12).

La plupart des kinases impliquées dans la phosphorylation de Tau sont du type proline-kinases, incluant la MAP kinase, la glycogène synthase kinase 3 (GSK3) et les kinases dépendantes des cyclines (cdc2 et cdk5). Ces kinases phosphorylent *in vitro* principalement des sites du type Ser-Pro et Thr-Pro. En outre d'autres kinases comme la *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II*, la *cAMP dependent kinase* et la caséine kinase II phosphorylent des sites non Ser/Thr-Pro.

L'état de phosphorylation des protéines Tau est régulé par un éventail de protéines kinases. Il est bien sûr évident que ces kinases entrent en compétition directe avec des sérine/thréonine phosphatases sans lesquelles les processus de phosphorylation/déphosphorylation seraient impossibles. Les principales protéines sérine/thréonine phosphatases catalysant la déphosphorylation des protéines Tau sont les PP1, PP2A et PP2B. Les kinases et phosphatases sont des enzymes qui sont elles-mêmes contrôlées par l'état physiologique de la cellule. Ainsi dans le tissu cérébral, après autopsie ou dans des homogénats de neuroblastomes, les protéines Tau sont rapidement déphosphorylées par des activités phosphatasiques résiduelles qui ne nécessitent pas d'énergie métabolique.

6- Autres modifications post-traductionnelles des protéines Tau

La phosphorylation est la forme majeure de modification post-traductionnelle retrouvée sur Tau, mais il existe d'autres modifications post-traductionnelles.



a : Tau protéine kinase I / glycogène synthase kinase 3 β

b : glycogène synthase kinase 3 α / protéine kinase FA

c : glycogène synthase kinase 3 α / protéine kinase FA après activation avec l'héparine

d : cyclin-dependent kinases (p34^{cdc2}/p58^{cyclin A})

e : 35/41 kDa kinase

f : protéine kinase A (AMPc dépendante)

g : protéine kinase C

h : Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II

i : p110-MARK (*Microtubule-Affinity Regulating kinase*)

k : SAP K (*Stress-Activated Protein kinases*)

Figure 12 – Quelques sites de phosphorylation des protéines Tau par différentes kinases.

i- La glycosylation non-enzymatique, ou glycation (Ledesma *et al*, 1994 ; Ko *et al*, 1999). La glycation a fait l'objet de nombreuses études. C'est un processus long, qui peut se produire à des concentrations normales en glucose, et qui résulte en la production d'« *Advanced Glycation End products* » (AGEs). Elle serait localisée exclusivement sur les Tau-PHF dans la maladie d'Alzheimer. Ces AGEs pourraient être une cause du dysfonctionnement neuronal par l'intermédiaire du stress oxydant (production de radicaux oxygénés libres). La glycation a été localisée sur des résidus de lysine au niveau du domaine s'associant aux tubulines, et il a été rapporté, à l'instar de la phosphorylation, qu'elle diminuerait l'association aux tubulines, et augmenterait l'agrégation des Tau-PHF. Ces études restent encore très controversées.

ii- L'ubiquitination (Mori *et al*, 1987). L'ubiquitination fait partie des Tau-PHF. L'ubiquitine est une petite protéine de stress impliquée dans la dégradation des protéines Tau.

iii-La O-N-Acétyleglucosaminylation (O-GlcNAc). La O-GlcNAc a été retrouvée sur les protéines Tau bovines (Shane Arnorld *et al*, 1996). Griffith *et Schmitz*, 1995 ont démontré qu'il y avait une augmentation de la O-GlcNAc dans la fraction protéique associée au cytosquelette insoluble dans les détergents mais pas dans la fraction soluble dans les détergents pour les cerveaux Alzheimer comparés aux cerveaux sains. Ils ont suggéré ainsi une implication de la O-GlcNAc dans l'apparition de la maladie d'Alzheimer. Ces études sont contredites par celles de Yao *et Coleman*, 1998 qui démontrent qu'il n'existe aucune différence de O-GlcNAc entre des cerveaux sains et des cerveaux Alzheimer hormis sur la protéine d'assemblage à la clathrine AP-3, qui voit son taux de O-GlcNAc diminuer dans la maladie d'Alzheimer. Il semble d'ailleurs qu'il y ait une corrélation négative entre la O-GlcNAc et la densité des neurofibrilles.

iv-N- et O- glycanes. Certaines études, quoique controversées, suggèrent la présence de N- et de O- glycanes (Wang *et al*, 1996) sur les Tau-PHF et non sur les Tau normales. La déglycosylation par la PNGase F rétablit l'association Tau-tubuline, comme pour les protéines Tau normales,

v- Modifications post-traductionnelles diverses. On va retrouver aussi en modifications post-traductionnelles sur les protéines Tau : l'hydrolyse de la première

méthionine, la N-acétylation du N- terminal, la dé-amidation de deux résidus asparaginy, la protéolyse (Buée *et al*, 2000).

7- Localisation cellulaire des protéines Tau

Bien que les protéines Tau soient considérées comme des protéines exclusivement cytoplasmiques, des études montrent l'existence de deux populations de protéines Tau, les unes cytoplasmiques et les autres nucléaires (Loomis *et al*, 1990). Dans le noyau, Tau est spécifique du nucléole alors que dans le cytoplasme elle est distribuée de manière « diffuse » (Greenwood *et Johnson*, 1995). 16 % des protéines Tau seraient nucléaires et seraient associées à la chromatine contenant l'ADN et des protéines associées.

Récemment, Uberti *et al*, 1997 ont démontré que Tau était localisée dans le noyau des cellules non différenciées, alors qu'après différenciation, Tau est principalement cytoplasmique.

Enfin, il a été mis en évidence dans les cellules SH-SY-5Y, une nouvelle isoforme de Tau de petite taille (26-30 kDa) qui est majoritairement nucléaire (Shea *et Cressman*, 1998). Cette petite isoforme, appelée « *small Tau* » ne semble pas être un fragment de dégradation protéolytique.

8- Utilisation de l'acide okadaïque

i- Définition et structure de l'acide okadaïque

L'acide okadaïque est un polyéther gras, de masse moléculaire de 805 Da. Il trouve sa source chez les dinoflagellés (plancton marin) et s'accumule dans les glandes digestives des éponges marines (*Halichondria okadaei* ou *melanodocia*). C'est un composant toxique associé à des diarrhées à la suite d'une intoxication alimentaire aux fruits de mer. Sa structure est proche de celle de l'acanthifolicine, premier polyéther carboxylique connu des sources marines (Figure 13).

ii- Propriétés

L'acide okadaïque est un inhibiteur de sérine/thréonine phosphatases, et plus particulièrement de PP1, PP2A et PP2B. Par contre les PP2C, la pyruvate déshydrogénase

phosphatase, les tyrosine phosphatases et la phosphatase alcaline, ne sont pas inhibées par l'acide okadaïque (Cohen, 1989, Cohen *et* Cohen, 1989 et Cohen *et al*, 1990).

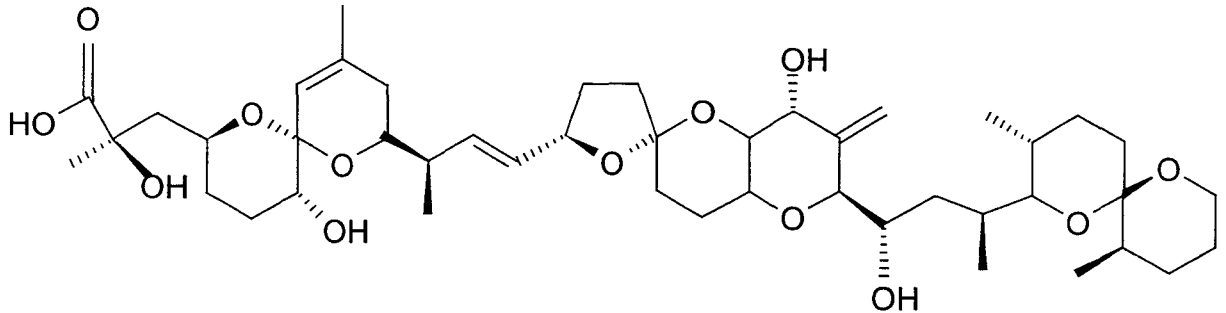


Figure 13- Structure de l'acide okadaïque

L'acide okadaïque n'agit pas de manière identique sur les différentes Ser/Thr phosphatases et les concentrations inhibitrices varient en fonction de la phosphatase. Ainsi on peut inhiber sélectivement ces sérine/thréonine phosphatases :

Tableau IV – IC_{50} de l'acide okadaïque sur les différentes Sérine / Thréonine phosphatases.

Sérine/Thréonine phosphatases	IC_{50}
PP1	10-60 nM
PP2A	0.1-1 nM
PP2B	5-10 μ M (peu sensible)
PP2C	>60 μ M (non touché)

PP1/PP2A et PP2C ont un large spectre de déphosphorylation et se recoupent entre-elles vis-à-vis des substrats (Girault, 1994). Ces IC_{50} ne sont valables que pour des études *in vitro*. En culture cellulaire il est très important de connaître la capacité de perméabilité des cellules vis à vis de l'acide okadaïque. Malgré cela, l'acide okadaïque est facilement utilisable en culture cellulaire car sa structure hydrophobe lui confère une capacité de pénétration aisée des cellules.

L'acide okadaïque n'a pas d'effet sur le niveau d'ATP mais par contre des études ont montré qu'à certaines concentrations il pouvait y avoir rupture de l'appareil de Golgi (Lucocq *et al*, 1995) et inhibition de la synthèse et de la sécrétion protéique (Waschulewski *et al*, 1996). Cette inhibition de la synthèse protéique est retrouvée pour une concentration en acide okadaïque de 1 μ M, c'est à dire supérieure à celle utilisée pour l'inhibition des sérine/thréonine phosphatases. Cette inhibition protéique pourrait être due à la phosphorylation de eIF2 qui, à un certain degré de phosphorylation, inhibe cette synthèse protéique.

Les mécanismes menant à une hyperphosphorylation sont encore inconnus. Toutefois on sait que la plupart des sites phosphorylés sont du type Ser-Pro et Thr-Pro, caractéristiques des *proline-directed kinases* (MAP-kinase, cdc2 kinase et GSK3 kinase).

iii-Intérêt de l'acide okadaïque dans l'étude de la maladie d'Alzheimer

L'acide okadaïque a été largement utilisé pour l'étude de la maladie d'Alzheimer. En effet il contribue au développement de modèles cellulaires du type Alzheimer en augmentant la phosphorylation sur les protéines Tau (figure 14) (Arias *et al*, 1993 ; Caillet-Boudin *et Delacourte*, 1996). Après traitement, il a été démontré qu'il y a une hyperphosphorylation effective des épitopes spécifiques d'Alzheimer (Sautière *et al*, 1993 et 1994, Furiya *et al*, 1993 et Dupont-Wallois *et al*, 1995).

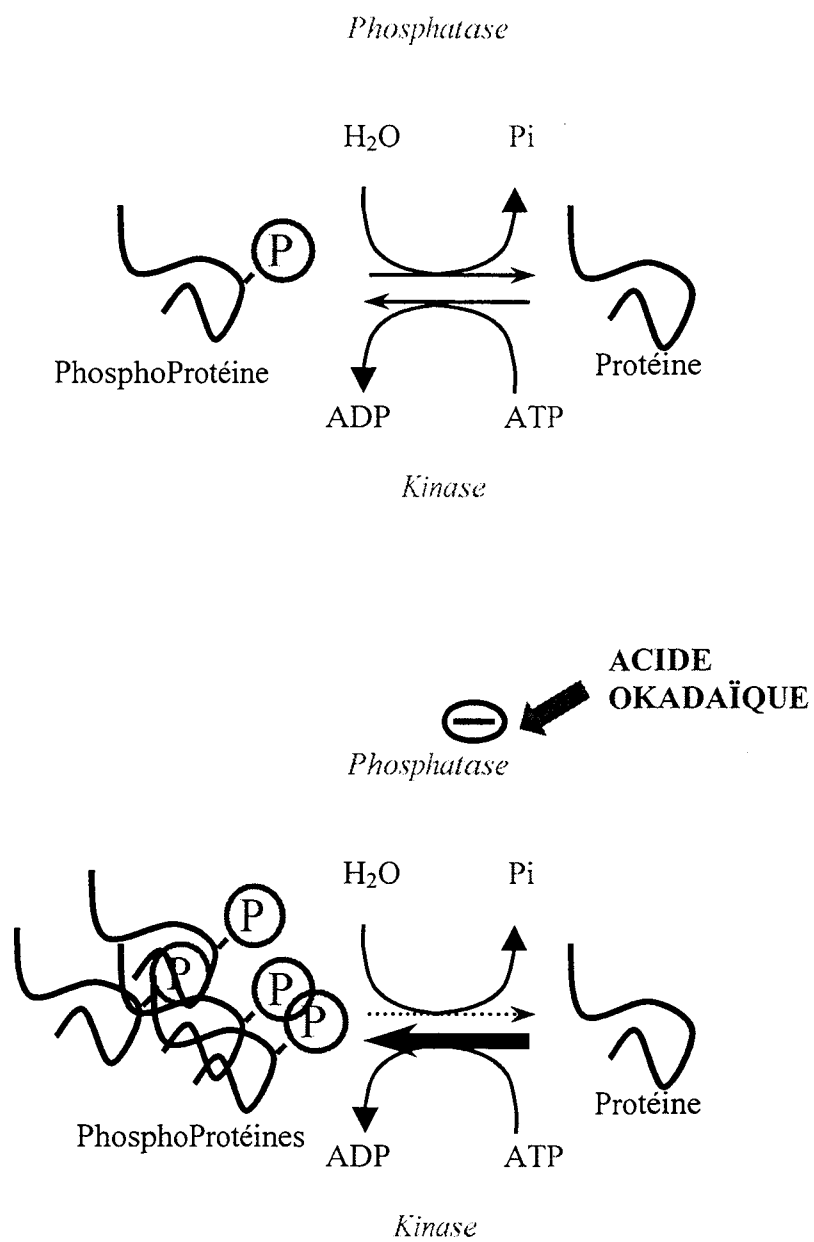


Figure 14 – Effet de l'acide okadaïque sur la phosphorylation des protéines

II-Résultats

Le travail que nous allons présenter se situe dans la continuité de celui décrit dans la première partie des résultats, à savoir l'étude de l'effet de l'AO sur les niveaux de O-GlcNAc dans une lignée de neuroblastome. Après avoir étudié la balance phosphorylation/O-N-Acétylglucosaminylation sur l'ensemble des protéines des cellules de neuroblastome Kelly, nous avons fait cette étude sur une protéine particulière : la protéine Tau. Cette protéine est un bon modèle d'étude de la O-GlcNAc puisqu'elle est connue comme étant phosphorylée en de nombreux sites (au moins une vingtaine) et l'on sait aujourd'hui qu'elle est glycosylée par la O-GlcNAc (démonstration sur les protéines Tau bovines). La collaboration entamée lors de la première partie avec Marie-Laure Caillet-Boudin s'est poursuivie lors de celui-ci.

Ce travail a été soumis à : *the Journal of Neurochemistry*.

Pour cette étude nous avons utilisé les cellules Kelly Clone 16 (K. Cl16), une souche de cellules Kelly transfectée avec la plus longue isoforme des protéines Tau, Tau441 (Figure 1). Cette lignée a été obtenue par Laetitia Dupont-Wallois. Cette isoforme transfectée (i) est reconnue par différents anticorps dirigés contre les protéines Tau (Figure 1A) et (ii) est fonctionnelle dans les cellules K. Cl16 (Figure 1B).

Le travail a d'abord consisté à démontrer que la protéine Tau441 était glycosylée : pour cela nous avons utilisé un double marquage WGA/M19G. Le M19G est un anticorps qui reconnaît les 19 premiers acides aminés des protéines Tau. Cette réaction s'est révélée positive pour la WGA et le M19G dans les compartiments cytosolique et nucléaire. Une co-incubation de la WGA avec de la GlcNAc libre a également été effectuée (Figure 2A) confirmant la spécificité de cette lectine. En plus des isoformes des protéines Tau classiquement retrouvées chez l'homme, une isoforme de bas poids moléculaire a été révélée dans le noyau avec la WGA et l'anticorps M19G. Cette isoforme de masse moléculaire 26-30 kDa avait déjà été décrite dans la littérature par Shea *et* Cressman, 1998, et ces auteurs avaient démontré qu'elle n'était pas retrouvée dans le cytosol. La figure 2B montre la révélation de l'isoforme Tau441 par le M19G après enrichissement sur WGA-sépharose. Cela prouve sans ambiguïté que, dans les cellules K. Cl 16, Tau441 est glycosylée (les autres isoformes sont difficilement détectables).

L'acide okadaïque (AO) a été utilisé sur les cellules K.C116 (Figure 3) dans les mêmes conditions que celles décrites dans la première partie de nos résultats. Après double marquage avec la WGA et le M19G, nous avons remarqué qu'après traitement par l'AO, on a (i) une diminution de la fixation de la WGA sur certaines protéines des compartiments cytosolique et nucléaire et (ii) un « shift » de masse de ces protéines Tau, révélées par l'anticorps M19G, avec une diminution d'intensité pour les protéines nucléaires (les isoformes cytosoliques se retrouvent exclusivement en une seule bande de plus haute masse moléculaire consécutive à l'hyperphosphorylation). Ainsi il semble donc exister une corrélation entre la quantité de protéines Tau nucléaires et leur glycosylation et phosphorylation.

Les densitométries de ces différentes bandes sont représentées en figure 4 sous forme d'histogrammes. La Figure 4C montre le rapport fixation de la WGA (glycosylation) sur fixation de l'anticorps M19G (quantité de protéines Tau). Après traitement par l'AO, il y a une diminution de 75% de la glycosylation de ces protéines Tau dans le cytosol, alors que dans le noyau la diminution est similaire pour le M19G et la WGA (baisse de 50%) (Figure 4A et 4B). De même les rapports de la figure 4C montre une diminution de 3.5 fois pour le rapport WGA/M19G dans le cytosol et un rapport inchangé pour le noyau. Il semblerait donc que la localisation nucléaire de Tau441 soit directement liée à la balance phosphorylation/O-GlcNAc. Il est intéressant de noter que la petite isoforme de Tau exclusivement nucléaire n'a pas sa glycosylation perturbée par l'AO, et que sa localisation cellulaire reste inchangée (figure 4D). Nous rappelons toutefois que les protéines de masse inférieure à 40 kDa peuvent pénétrer par simple diffusion dans le noyau.

Nous avons alors effectué, sur les Tau441 cytosoliques, des électrophorèses bidimensionnelles et testé sur ces protéines Tau l'anticorps M19G (qui reconnaît toutes les isoformes de Tau), un anticorps dirigé contre un épitope phosphorylé de Tau, l'ADI294, un anticorps dirigé contre un épitope non phosphorylé, le Tau-1 et la WGA pour la mise en évidence de la glycosylation. Ces différentes détections ont été effectuées sur les cellules contrôle et les cellules traitées par l'AO. Ainsi la Figure 5 montre clairement que la WGA se fixe de manière spécifique au niveau des isoformes Tau441 les moins phosphorylées (Tau-1) c'est à dire les plus basiques. Cette fixation est presque complètement absente des isoformes les plus phosphorylées (ADI294). Ces différences sont particulièrement évidentes pour les protéines Tau des cellules traitées par l'AO.

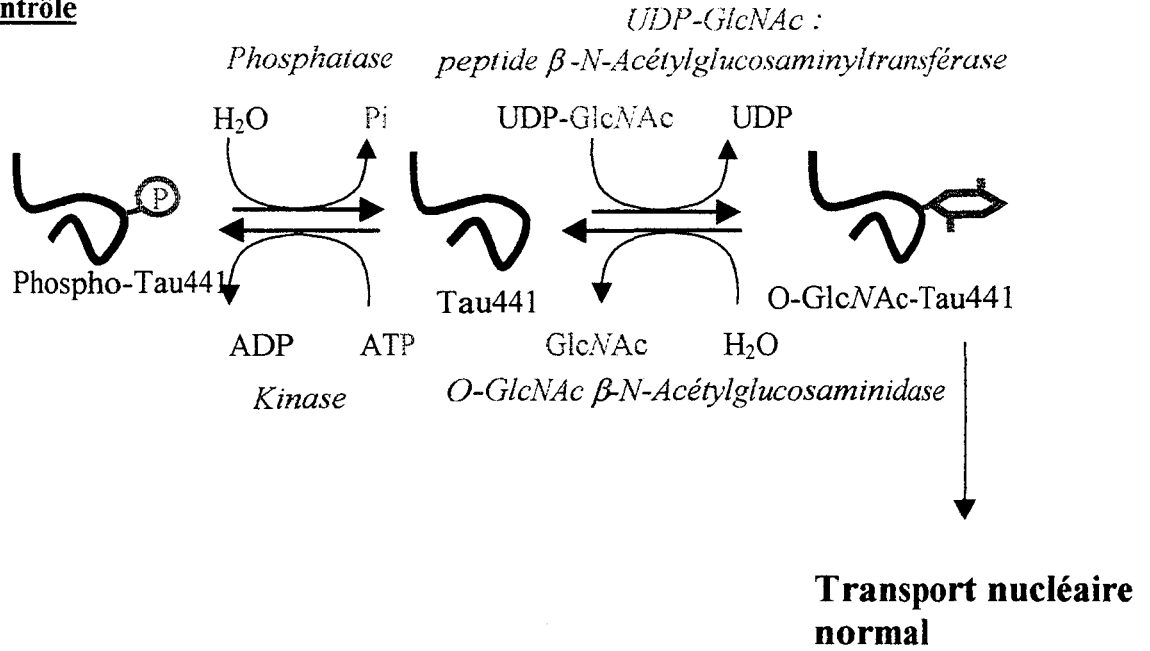
Afin de démontrer que le type de glycosylation qui entre en compétition avec la phosphorylation est bien la O-GlcNAc, les extraits cytosoliques des cellules contrôle, et traitées par l'AO ont été soumis à un marquage par le [³H]galactose, spécifique des résidus de GlcNAc terminaux. Ce marquage a été suivi d'une bêta-élimination. Les glycanes libérés ont été dessalés sur papier et caractérisés par HPAEC (Figure 6A). Cette expérience montre que la O-N-Acétyleglucosaminylation est la forme majeure de glycosylation dans le cytosol. De plus on voit clairement que la O-GlcNAc diminue après traitement par l'AO, ce qui prouve une fois de plus qu'elle est en compétition avec la phosphorylation. L'encadré montre la zone des protéines Tau441 (elles-mêmes glycosylées par la O-GlcNAc) en électrophorèse bidimensionnelle (Figure 6B). Après traitement par l'AO la révélation de ces Tau441, marquées par le galactose tritié, est moins forte.

Enfin des électrophorèses bidimensionnelles ont été effectuées sur les extraits nucléaires des cellules contrôle, et traitées par l'AO (Figure 7). Le M19G et la WGA ont été utilisés sur les blots contrôle et AO. Il est intéressant de voir qu'après traitement par l'AO on a moins d'isoformes de Tau441 dans le noyau et que la WGA fixe spécifiquement toutes les isoformes marquées par le M19G dans les cellules contrôle, et dans les cellules traitées par l'AO. Cela signifie que toutes les isoformes de Tau441 nucléaires sont glycosylées contrairement aux isoformes de Tau441 cytosoliques où seules les plus basiques fixent la WGA. Ainsi la O-GlcNAc de ces Tau441 semble être nécessaire à leur localisation nucléaire. Cette remarque est en accord avec les résultats des figures 3 et 4.

En conclusion, dans ce travail nous avons démontré l'existence d'une balance entre la phosphorylation et la O-N-Acétyleglucosaminylation sur les protéines Tau441 et que la localisation cellulaire de ces protéines semble être dépendante de cette balance phosphorylation/O-N-Acétyleglucosaminylation.

De cette étude nous pouvons essayer de tirer un schéma général de la relation phosphorylation/O-N-Acétyleglucosaminylation des protéines Tau441 et de leur localisation nucléaire et/ou rétention cytosolique (Figure 8) :

Cellules contrôle



Cellules traitées par l'AO

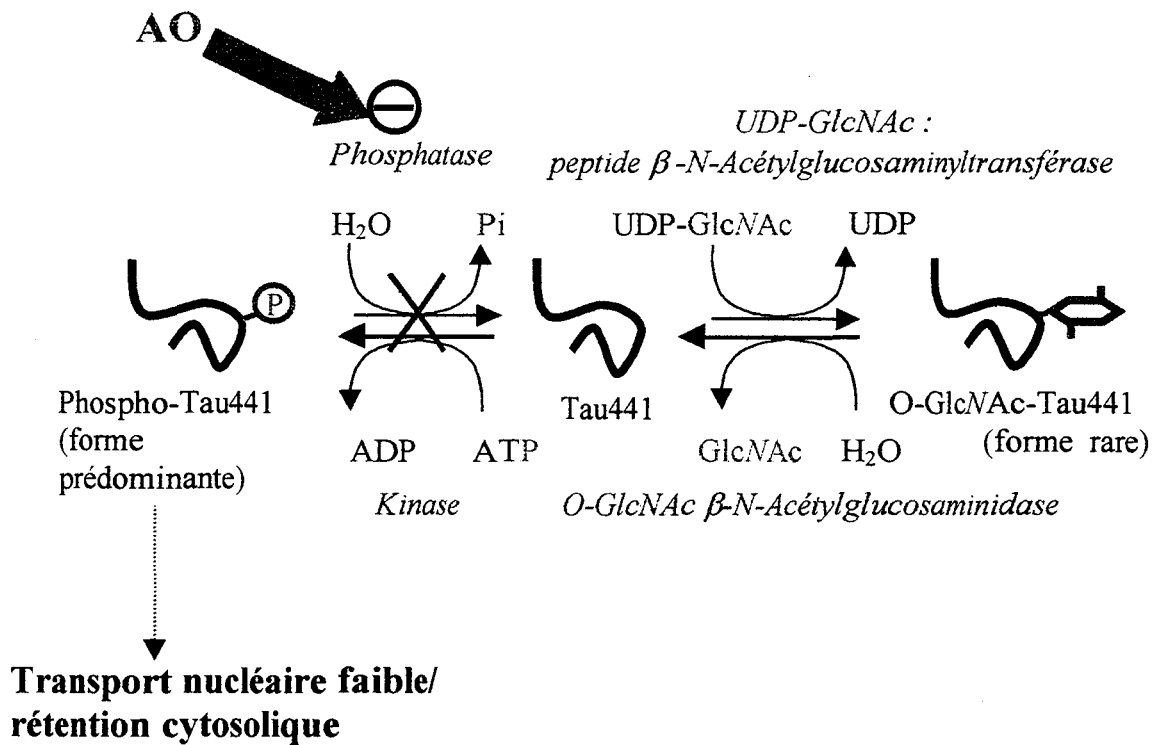


Figure 8- Schéma hypothétique de la relation entre la phosphorylation, la O-GlcNAc et le transport nucléaire des protéines cytosoliques.

**III- EVIDENCE OF A BALANCE BETWEEN O-GLCNAc
GLYCOSYLATION AND PHOSPHORYLATION ON TAU
PROTEINS-
ROLE IN THE NUCLEAR LOCALIZATION**

**Tony LEFEBVRE^a, Stéphanie FERREIRA^b, Laetitia DUPONT-WALLOIS^b, Marie-
Joëlle DUPIRE^b, André DELACOURTE^b, Jean-Claude MICHALSKI^a and Marie-Laure
CAILLET-BOUDIN^{b*}**

^a*Unité Mixte de Recherches 8576 du CNRS, Université des Sciences et Technologies de Lille I,
Laboratoire de Chimie Biologique, 59655 Villeneuve d'Ascq, France*

^b*INSERM U422, Place de Verdun, F-59045 Lille cedex, France*

**To whom correspondence should be addressed :*

INSERM U422, Place de Verdun, F-59045 Lille cedex, France,

Tel 33-3-20-62-20-73 ; Fax 33-3-20-62-20-79

E-mail Marie-Laure.Caillet@lille.inserm.fr

Running title : Phosphorylation and Glycosylation of human Tau proteins

Key Words : O-GlcNAc, phosphorylation, Tau proteins, nuclear transport, Alzheimer disease

1- Abstract

Tau proteins, one of the microtubules associated proteins (MAP), are post-transcriptionally modified by both phosphorylation and O-GlcNAc glycosylation. Tau phosphorylation is involved in the regulation of microtubules polymerization and is dysregulated during neurodegenerative diseases whereas the role of O-GlcNAc residues is not yet elucidated. In the present study, we clearly demonstrate that a balance between phosphorylation and O-GlcNAc glycosylation occurs on Tau proteins and that a dysregulation of this balance was correlated with a decrease in the nuclear transport.

To characterize the O-GlcNAc glycosylated forms of Tau proteins, and then, to investigate the glycosylation/phosphorylation balance, we stably transfected neuroblastoma Kelly cells and selected a stable clone expressing a high level of the long Tau isoform (Tau 441) one of the six adult isoforms. Surprisingly, two isoforms of Tau were modified by O-GlcNAc glycosylation : Tau 441 isoform, mainly located in cytoplasm as compared to nucleus fraction, and a small Tau protein, exclusively found in nucleus. The balance between phosphorylation and O-GlcNAc glycosylation was demonstrated on Tau 441 using bi-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and by treating cells with okadaic acid, a phosphatase inhibitor. O-GlcNAc residues were mainly located on Tau 441 variants the less phosphorylated whereas the most hyperphosphorylated forms were devoid of O-GlcNAc residues. When cells were treated by okadaic acid, Tau proteins were hyperphosphorylated, less modified by O-GlcNAc glycosylation and quite no more translocated to the nucleus. This result suggests a direct relationship between glycosylation, phosphorylation and nuclear localization of Tau proteins. Contrary to Tau 441, okadaic acid had no effect on the nuclear localization of the small nuclear Tau isoform. In conclusion, the glycosylation/phosphorylation balance could be crucial for the biological function of normal Tau proteins, in ensuring the retention of adult Tau isoform in the cytoplasm whereas small Tau could be transferred into the nucleus.

2- Introduction

Tau proteins constitute a family of brain microtubule-associated proteins involved in polymerization and stability of neuronal microtubules. In adult brain, six different Tau isoforms are present arising by alternative splicing of a primary transcript from a single gene [1] whereas a big Tau, containing an additional insert in the medium part of the protein, is found only in the adult peripheral nervous system [2]. A 26-30 kDa small nuclear Tau, not yet characterized, was only described in neuroblastoma cells nuclei [3]. In opposite, the other adult Tau isoforms were predominantly found in the cytoplasmic compartment although some studies also documented the localization of Tau within the nucleus [4].

Tau proteins can be post-transcriptionally modified by phosphorylation, O-GlcNAc glycosylation, ubiquitination, glycation, proteolysis ... (review in Delacourte & Buée [5]). A normal phosphorylation of Tau proteins controls the microtubule polymerization whereas an abnormal phosphorylation of Tau proteins occurs during degenerative diseases such as Alzheimer's disease, progressive supranuclear palsy (PSP), corticobasal degenerescence disease (CBD) (review in Delacourte & Buée [5]). These abnormally phosphorylated Tau proteins are the main components of filaments (paired helical filaments - PHF - or straight filaments) which are accumulated in degenerative neurones. Phosphorylation of Tau proteins reduces their ability to polymerize tubulin. A cellular model of Alzheimer-type Tau protein phosphorylation can be obtained by treating human neuroblastoma cells with okadaic acid (OA) an inhibitor of the proteins phosphatases 1 and 2A [6-8].

In addition to the phosphorylation, normal Tau proteins have been demonstrated to be O-GlcNAc modified [9]. O-GlcNAc glycosylation occurs on numerous cytoplasmic and nuclear proteins such as cytoskeletal proteins (keratins [10], neurofilaments [11]), nuclear pore proteins [12, 13], transcription factors (Sp1 [14], c-Myc [15]), viral proteins (adenovirus fiber [16], SV40 Large-T antigen [17]). It has been speculated that this type of glycosylation shares similar features with protein phosphorylation [18] and mainly that it could occupy the same sites or neighbouring sites on the peptidic backbone. In a precedent report, we have demonstrated that a decrease in the O-GlcNAc level of a neuroblastoma cell line (Kelly cells) proteins was consecutive to an experimentally induced hyperphosphorylation after OA treatment [19]. Haltiwanger *et al*, [20] have demonstrated that the potent peptide O-GlcNAc- β -N-acetylglucosaminidase inhibitor increases the O-GlcNAc level and decreases the phosphate incorporation on the Sp1 transcription factor. Griffith *et Schmitz* [21] show an increase in the staining with an O-GlcNAc antibody after treatment of neuroblastoma cells with different

kinases inhibitors. These different experiments were in favour of the existence of a direct competition between O-GlcNAc and phosphate for the occupancy of the same sites on proteins. The occurrence of a O-GlcNAc / phosphorylation balance opens the question of its biological significance. If the role of phosphorylation is well documented and generally contributes in protein activity regulation, the particular role of O-GlcNAc glycosylation is still poorly understood. Several authors report a role in the nuclear transport of cytosolic proteins [22-24]. In this idea, we recently showed in Kelly cells that the balance between phosphorylation and O-GlcNAc glycosylation took part in the control of protein transfer to the nucleus [19]. For that reason, we decide to use this model to investigate the phosphorylation/O-GlcNAc glycosylation balance on Tau proteins as well as its effect on Tau proteins transfer to the nucleus. To ensure, a high expression level of Tau proteins, the long Tau isoform (Tau441) was surexpressed in neuroblastoma Kelly cells. A stable clone, Kelly clone 16, was selected and used to study the effect of phosphorylation and O-GlcNAc levels on the cellular localization of Tau proteins.

3- Materials and Methods

i- Construction of the expression vector

Tau441 cDNA (hTau40) was cloned into the Nde I/EcoR I sites of the pRK 172 plasmid [25]. For direct subcloning of Tau441 cDNA into the eukaryotic expression pcDNA3 vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), a BamH I site was introduced above its initiator site, eliminating the initial Nde I site. Sequencing performed on the obtained pcDNA-Tau441 showed identical sequences between the subcloned cDNA and that published by Goedert *et al.* [26]. Therefore, CsCl-purified plasmid was used for the transfection experiments.

ii- Cell Culture and transfection

Human neuroblastoma Kelly cells, were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum (Life Technology, France), 50 IU/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin (Sigma-Aldrich Chimie, St. Quentin-Fallavier, France), 2 mM glutamine (Life Technology, Cergy Pontoise, France). Transfection experiments were performed by adding 5 µg of pcDNA3-Tau40 and 39.4 µg of TfxTM-50 Reagent (Promega France, Charbonnières, France) on 80% confluency Kelly cells grown in 60 mm dishes in serum-free medium. Additional medium supplemented with serum was added one hour after this step. After 48 h, cells were replaced on four Petri dishes. Stable clones were selected by growing in medium containing geneticin. Kelly Clone 16 was chosen for its high expression level of Tau 441, determined by western blotting of cell lysates.

To induce protein hyperphosphorylation, cells were grown to 80% confluence and treated with 0.25 µM OA (Sigma-Aldrich Chimie, St. Quentin-Fallavier, France) for 4 hours as described by Dupont-Wallois *et al.* [8].

iii-Cell fractionation

Cell pellet was washed in phosphate buffered saline (20 mM phosphate, 150 mM NaCl pH 7.5) and then resuspended in PBS containing 500 µg/ml digitonin and proteases inhibitors (1mM PMSF and 5µg/ml of leupeptine and pepstatine - Sigma) and incubated for 10 min at room temperature as described by Kearse and Hart [27]. After centrifugation at 1000 g for 10 min at 4°C, the supernatant corresponding to the cytosoluble material and the pellet containing

nucleus and membranous fraction were separated. According to Bronfman *et al.*, [28] at the digitonin concentration used in this study (0.4 mM final concentration) the cytosoluble fraction is free of membrane fragments. The pellet was washed twice in PBS and membranes were solubilized by incubation in 0.5 % [v/v] Triton X100 diluted in PBS. Nucleus were collected by centrifugation at 2000 rpm for 10 min, washed twice in PBS and solubilized in buffer H (50 mM Hepes, 500 mM NaCl, 2% (v/v) Triton X100 and proteases inhibitors).

iv-Immunofluorescence method

The cells were first washed with PEM buffer (80mM PIPES, 5mM EGTA, 1mM MgCl₂, pH 6.8) and then permeabilized by incubating them for 30 s with PEM buffer containing 0.1% Triton X-100, 1mM GTP and 30% glycerol. Then, the cells were fixed at room temperature for 10 min with PEM buffer containing 0.3% glutaraldehyde and 0.5 % Nonidet P40, washed with phosphate buffer (PB) (10 mM NaH₂PO₄, 50 mM Na₂HPO₄, pH 7.4), successively treated by borohydric acid (10 mg/ml) for 15 min and by 0.1 M glycine for 20 min in PB containing 0.25% Triton and, at last, saturated by donkey serum (5% in PB containing 0.25% Triton) (Interchim, Asnières, France) to decrease the background. Tau 441 proteins were detected by using a polyclonal serum directed against insert corresponding to Tau exon 3 (Tau- E3) (1/10 000) for 90 min. After 3 PB washes, cells were incubated for 60 min with TRITC-conjugated donkey anti-rabbit IgG (1/400) (Interchim, France). After 3 PB washes, samples were mounted in Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, USA) and examined under a Leica DM RB microscope. The specificity of the immunoreactivity was controlled by omitting the primary antibody.

v- Isoelectric focusing and polyacrylamide gel electrophoresis

For 2-D electrophoresis, samples were diluted in 20% (v/v) IsoA (0.34 M Sodium Dodecyl Sulfate, 0.15 M DTT) and 80% (v/v) IsoE (0.108 M DTT, 0.108 M CHAPS, 15 M urea, 8.33% (v/v) ampholytes 3-10 range). The samples were runned on a 4% gel (9.5 M urea, 1% (v/v) ampholytes 5-7 range, 4% (v/v) ampholytes 3-10 range, 5% (v/v) detergent solution – 0.3 g CHAPS, 100 µl Nonidet P40 to 900 µl ddH₂O-) at 200 V for 1 h, 500 v for 1 h and finally at 800 V for 16 h. Lower buffer was 20 mM phosphoric acid and upper buffer was 20 mM NaOH. After isoelectrofocusing, gels were extracted from their capillary, placed in the transfer

solution (0.5 M Tris/HCl, 10% SDS, 0.05% bromophenol blue, pH 8.8) for 10 min, and proteins resolved on 10 % SDS/PAGE as described by Laemmli [29].

vi- Western blotting, PNGase F treatment, densitometric analysis

The proteins were electrophoretically transferred onto nitrocellulose membrane. Blots were saturated in 3% BSA in TBS-Tween (15 mM Tris, 140 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween) for 45 min and washed three times for 15 min with TBS-Tween [30]. Proteins were analyzed by western blotting using Wheat Germ Agglutinin (WGA) for O-GlcNAc detection and different Tau antibodies for Tau proteins detection.

Before WGA staining, samples were systematically digested with PNGase F (Ozyme, Montigny Le Bretonneux, France) in order to remove N-linked oligosaccharides by direct incubation of the nitrocellulose sheets in 5 to 20 ml Phosphate Buffer (pH 7.5 – 50 mM) containing 2500 to 10000 units PNGase F overnight. Horseradish peroxidase labelled WGA (Sigma) was incubated in TBS-Tween (1/10.000) for 1 h. To assess WGA detection specificity, control chase experiments were performed in which 0.2 M free N-Acetylglucosamine was added together with WGA for 1 hour.

Tau proteins were detected by both phospho-independent and dependent antibodies : M19G is a polyclonal antibody, which is specifically, directed against the first 19 amino acids of Tau whatever its phosphorylation state [8]. It was used at a dilution of 1/2500 for 1 h in TBS-Tween. The antibodies specific of the amino- (304, Tau-E3) and carboxy- (Tau-E10) terminal inserts, respectively specific of the inserts corresponding to the alternatively spliced exons 2, 3 and 10, were used to identify Tau 441 protein. ADI 294 and Tau-1 are two phospho-dependent monoclonal antibodies. Tau-1 (1/2000), purchased from Roche Molecular Biochemicals, recognizes Tau proteins at the unphosphorylated sequence 192-204. ADI 294 (1/1000) recognized Tau proteins in their phosphorylated form and was obtained from Immunotec (Marseille, France). After incubation with the different antibodies, blots were washed 3 times in TBS-Tween for 15 min, and secondary antibody were incubated at a dilution of 1/3000 for the polyclonal antibody and at a dilution of 1/2000 for the monoclonal antibody.

Blots were washed 3 times in TBS-Tween for 15 min and detection was done with the ECL Western blotting detection reagents (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK).

Densitometric analysis were performed on the WGA and M19G staining, and normalized to an equal transfer protein according to the Ponceau red staining. For such analysis we used a Hewlett Packard ScanJet 4C scanner and with Quantiscan 1.5.

vii- Labeled galactose transfer on GlcNAc residues with galactosyl transferase. β - elimination and saccharide analysis

Galactosyltransferase is a specific and sensitive probe frequently used for the detection of O-GlcNAc on cytosolic and nuclear proteins [27]. Cytosolic fractions (control and OA treated) were added to an equal volume of sample buffer (56.25 mM Hepes, 11.25 mM MnCl₂, 250 mM galactose and 12.5 mM AMP) with proteases inhibitor (1mM PMSF and 5 μ g/ml of leupeptine and pepstatine - Sigma) 0.025 U of bovine milk GlcNAc β -1, 4-galactosyltransferase (Sigma) and 5 μ Ci of UDP-[6-³H]Gal (Amersham Pharmacia Biotech) were finally added to initiate the reaction. The samples were incubated at 37°C for 2 h. After labeling with 5 μ Ci of UDP-[6-³H]Gal, β -elimination was performed on the samples with 1M sodium borohydride and 0.1M NaOH at 37°C for 72 h. The reaction was stopped with dropwise addition of ice-cold acetic acid under vigorous stirring until pH 5.0. The β -eliminated material was dried several times under vacuum with anhydrous methanol in order to remove borate as its methyl ester and then were desalted by descending paper chromatography on Whatman 3 MM paper in a n-butanol/ethanol/water (4/1/1) v/v/v as a solvent. Radioactivity was detected after cutting the lanes into 1-cm pieces and counting. Radioactive fractions to be further processed were eluted from corresponding regions with water, and then the β -eliminated products were finally analyzed on High pH Anion Exchange Chromatography (HPAEC) [31] on a Dionex HPLC system equipped with a model PAD2 pulsed amperometric detector (Dionex Corp., Sunnyvale, CA, USA). The column was a Carbopac -PA-1 (4 X 250 mm) pellicular anion exchange column with a PA-1 guard column (4 X 50 mm). The column was eluted at a flow rate of 1ml/min with 15 mM NaOH. Fractions were collected, and assay for radioactivity.

4. Results

i- Transfection of human Kelly neuroblastoma cells by the longest human Tau isoform cDNA, Tau441

Kelly cells were stably transfected with Tau441 cDNA, as described in Material and Methods. Transfected and endogenous Tau proteins were analyzed by immunoblotting and compared with Tau proteins in AD brain homogenate.

Endogenous Tau proteins in Kelly cells migrated as a large band with an apparent molecular weight of 52-53 kDa, as detected by pAb M19G serum. The antibodies specific of the amino- and carboxy-terminal inserts (304, Tau-E3 and Tau-E10) failed to detect any bands of higher molecular weight (Fig. 1A). After transfection with Tau441 cDNA, one diffuse band with an apparent molecular weight of 67-70 kDa was revealed by pAb M19G antiserum in transfected-Kelly cells extract. This band was also recognized by the three Tau antibodies raised against the amino- and carboxy-terminal inserts. Then, this additional band actually corresponded to the transfected Tau441 proteins.

Tau 441 proteins were functional as shown by immunochemistry observation (Fig. 1B).

ii- WGA staining of cytosolic and nuclear Tau proteins

The first step of this work was to check the presence of O-GlcNAc residues on Tau proteins and to determine if the glycosylated Tau proteins were present both in the cytosolic and nuclear compartments. Transfected Kelly cells, clone K. Cl 16, were fractionated in cytosolic and nuclear compartments as described under Materials and Methods. Cytosolic and nuclear proteins were resolved on a 10% SDS-PAGE, electrotransferred on a nitrocellulose membrane. After PNGase F treatment, blots were tested for their affinity to M19G pAb or WGA (Fig. 2A). In the cytosolic fraction, bands migrating at 50 kDa and 67-70 kDa were stained by Tau antibodies and corresponded to endogenous and transfected isoforms respectively (Fig. 2A). Only the 67-70 kDa band could be detected by the lectin in the cytosolic fraction. This probably resulted of the poor quantity of the 50 kDa band as compared to 67-70 kDa one. Indeed, a faint detection of the 50 kDa Tau band by WGA-binding was possible by analysis an un transfected Kelly cell lysate (not shown). The specificity of WGA binding was checked by chase experiment in presence of 0.2 M GlcNAc (fig. 2A). In the nuclear fraction, the 67-70 kDa band (Tau 441) and a small Tau isoform (26-30 kDa) were detected by both Tau antibodies and lectin.

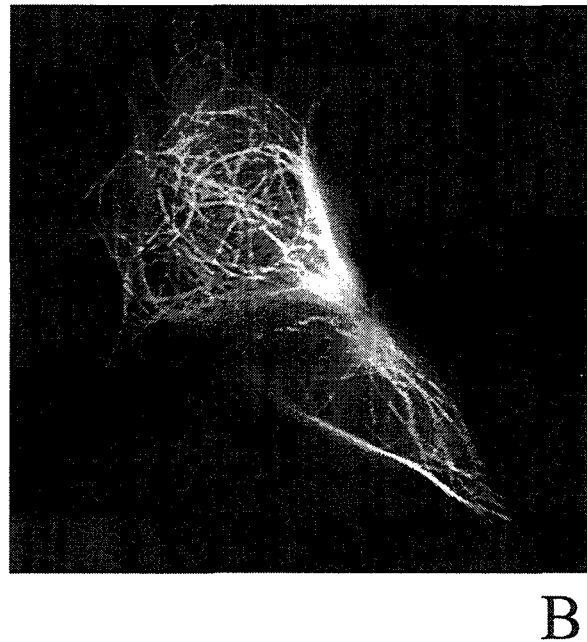
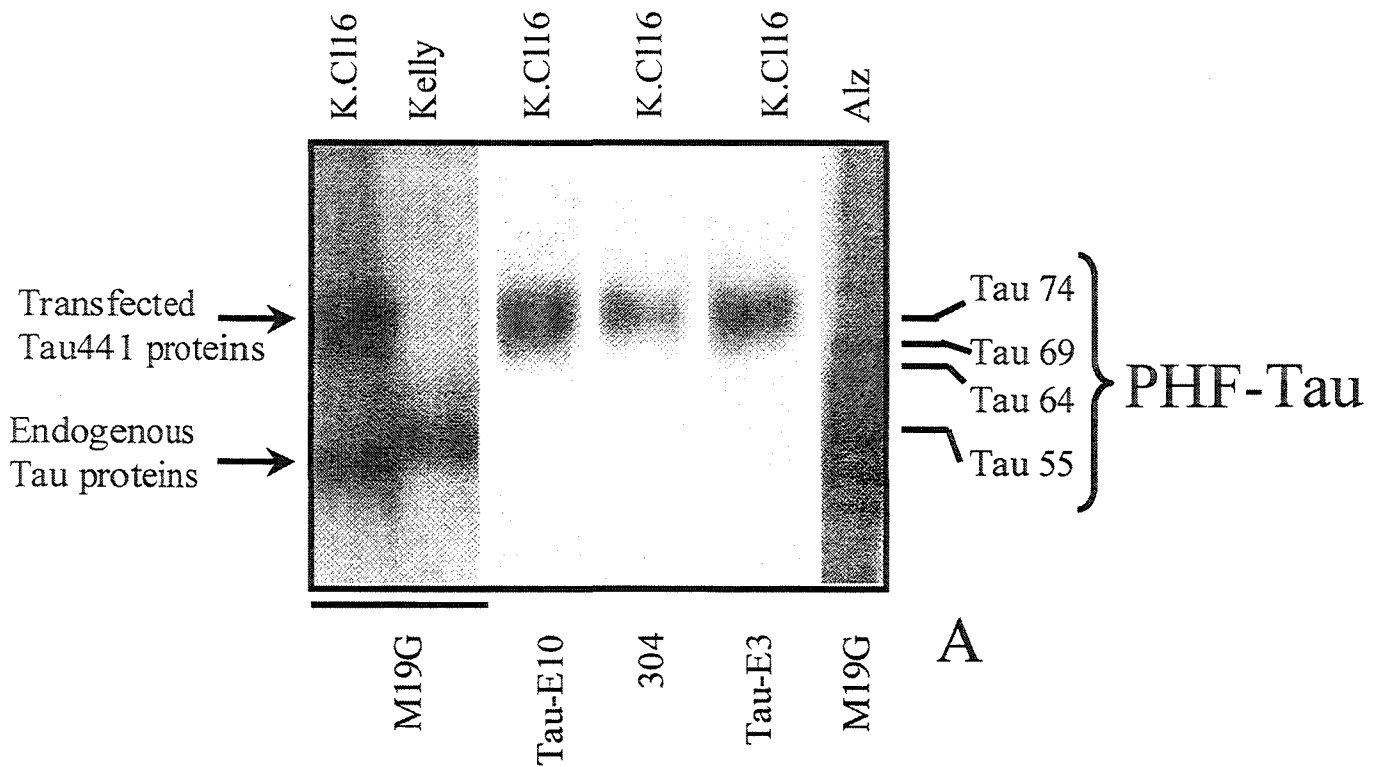


Figure 1- Transfection of human Kelly neuroblastoma cells by the longest human Tau isoform cDNA, Tau441

- A- Expression of Tau 441 proteins in transfected Kelly cells. Kelly were stably transfected with Tau441 cDNA, as described in Material and Methods. Transfected and endogenous Tau proteins (indicated by arrows) were analyzed by immunoblotting and compared with Tau proteins in AD brain homogenate (Alz). The different antibodies used were : pAb M19G serum (specific to the 19 first amino acids), antibodies specific of the amino- and carboxy-terminal inserts (304, Tau-E3 and Tau-E10). The different Tau isoforms are indicated (K.Cl 16, Kelly Clone 16 ; Alz, Alzheimer).
- B- Immunofluorescence. Tau 441 was actually incorporated in microtubule network. Tau 441 was specifically identified by using anti-E3 serum. Objective : X100 with Leica microscope and Camera.

To ensure that the bands revealed with WGA-peroxidase really corresponded to Tau proteins, WGA-sepharose was directly incubated with the cytosolic extract. The WGA-precipitated proteins were resolved on a 10% SDS-PAGE and stained with M19G pAb. Fig. 2B shows that the 67-70 kDa band precipitated with WGA-sepharose was specifically recognized by an antibody specific of Tau proteins. According to this experiment, we can assert that we have a predominant Tau glycosylated form.

iii-Okadaic acid effect on the glycosylation of Tau proteins

To determine if phosphorylation and O-GlcNAc incorporation on Tau proteins are linked or independent phenomena, Tau hyperphosphorylation was induced by treating cells with OA, a phosphatase inhibitor, as yet reported in [8]. OA treatment resulted in variations of electrophoretic pattern of O-GlcNAc proteins in both cytosolic and nuclear fractions (Fig. 3C). This phenomenon confirmed our previous report [19]. More precisely a decrease in the WGA binding on the 67-70 kDa Tau isoforms was observed after OA treatment in both compartments (Fig. 3C), while M19G staining was rather stable in the cytosol but highly decreased in the nucleus (Fig. 3B). Controls experiments were realized by incubating the secondary antibody in absence of primary antibody (Fig. 3A) or by chase experiment in presence of 0.2 M GlcNAc with WGA on nitrocellulose (Fig.3D). Results presented in Fig. 3 were quantified using Quantiscan computer program and are illustrated in the form of histograms (Fig. 4). The different densitometric values were normalized to an equal transferred protein amount (using ponceau red staining). This figure is representative of three different experiments. The M19G staining is shown on Fig. 4A and the WGA staining on the Fig. 4B. After OA treatment, the ratio of WGA/M19G- binding highly decreased onto cytosolic Tau when compared to control cytosol extract whereas WGA/M19G- binding ratio was similar onto nuclear Tau proteins from treated or untreated cells (Fig. 4.C). These results suggest that there was a relationship between the glycosylation, phosphorylation and nuclear transport of the Tau cytosolic isoforms. The effect of OA on the small nuclear Tau isoform was different to that on Tau 441. After treatment with OA we have seen an increase in the M19G staining (this small nuclear Tau isoform was present in nuclei from both untreated or OA treated cells), reflecting an increase on the nuclear Tau isoforms, whereas the WGA staining remained unchanged (Fig. 4. D).

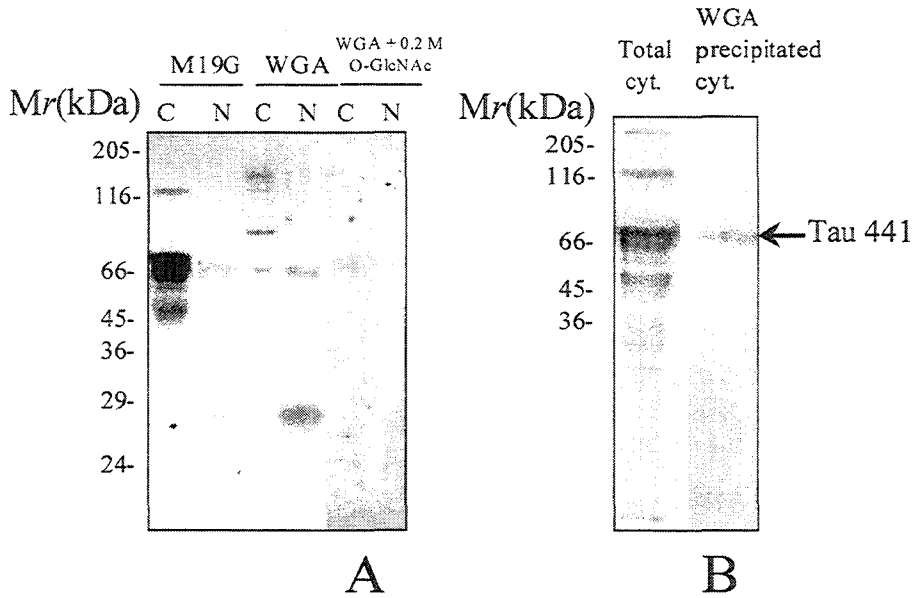


Figure 2- WGA staining of cytosolic and nuclear Tau proteins

- A- Analysis of cytosolic and nuclear proteins by western blotting. Neuroblastoma K.CI 16 cells were fractionated in cytosolic and nuclear extracts as described in Materials and Methods. Cytosolic (C) and nuclear (N) proteins from cells were analyzed with M19G pAb or to WGA-peroxidase. To avoid a fixation of WGA onto glycosidic complex containing sialic acid, the nitrocellulose membrane was pretreated by PNGase F before incubation with WGA. The specificity of WGA binding was checked by co-incubation of WGA and free 0.2 M GlcNAc (Fig. 2A).
- B- Analysis of WGA precipitated proteins. Tau was investigated among the WGA-precipitated proteins using M19G pAb. Tau 441 was detected among them.

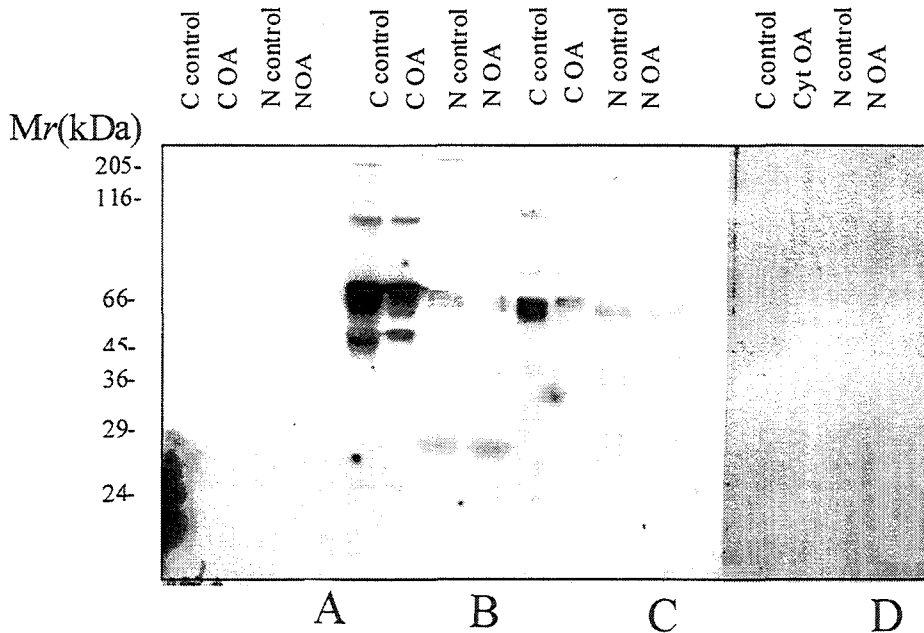


Figure 3- Okadaic acid effect on the glycosylation of Tau proteins

Cells were treated (OA) or untreated (Ctrl) with OA for 4 h. Cytosolic (C) and nuclear (N) proteins were analyzed for their content in Tau proteins (detected by pAb M19G in B) and O-GlcNAc bearing Tau proteins (detected by WGA peroxidase in Fig. 3C). WGA affinity decreased for 72 kDa Tau isoform in both compartments (Fig. 3C), while M19G staining was quite stable in the cytosol but highly decreased in the nucleus (Fig. 3B). Controls were performed by incubating the secondary antibody in absence of primary antibody (Fig. 3A) or by incorporating 0.2 M free GlcNAc with WGA on nitrocellulose (Fig.3D).

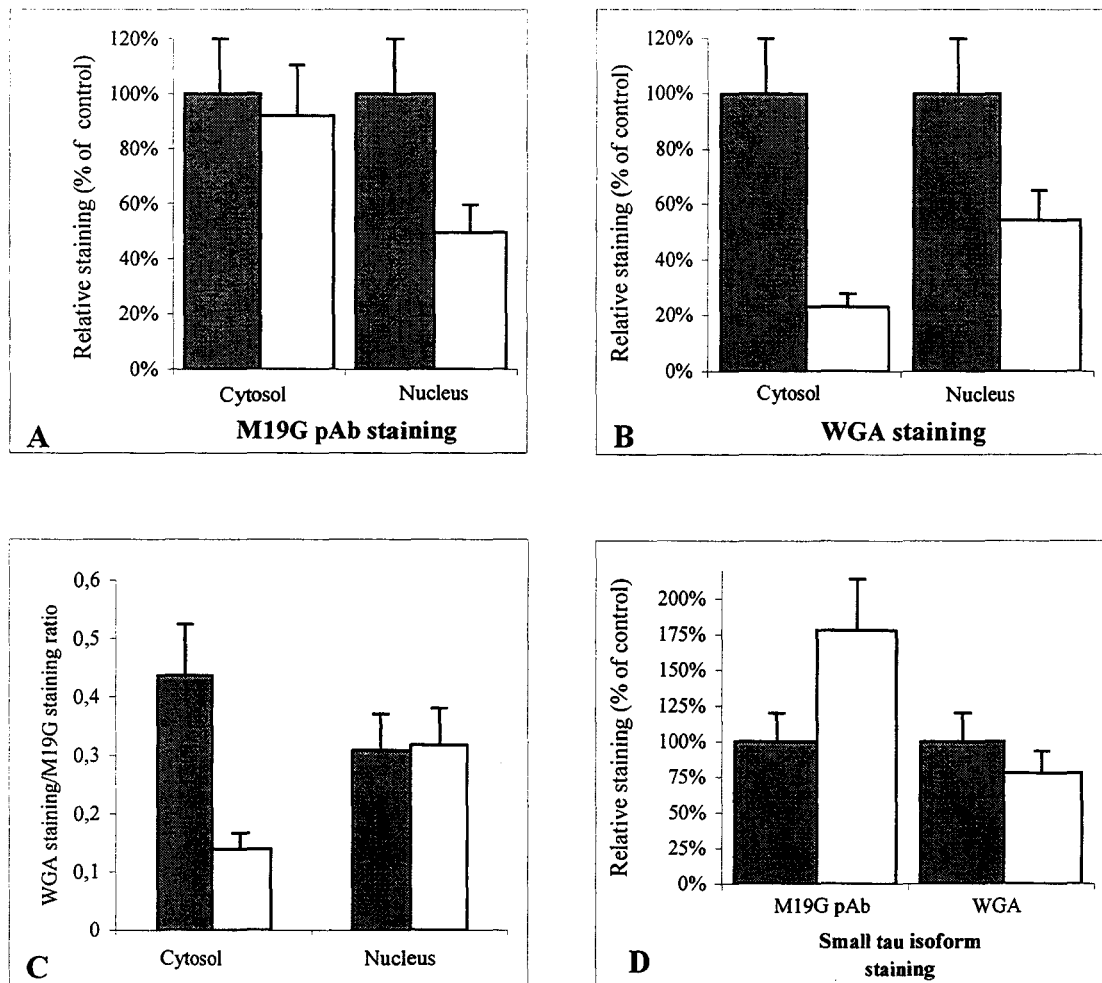


Figure 4- Quantification of O-GlcNAc Tau in different cellular compartments

The results shown in figure 3 were quantified and represented as histograms. The different densitometric values were normalised to an equal transferred protein amount (according to the Ponceau red staining). Tau was quantified by pAb M19G in A), by WGA in B). The ratio between WGA staining and pAb M19G staining was illustrated for Tau 441 in C). The staining with pAb M19G and WGA for the 26-30 kDa small Tau isoform were represented in D). The results suggest that there was a direct relationship between glycosylation, phosphorylation and nuclear transport of the Tau 441 cytosolic isoforms. Grey, control cells and white, OA treated cells.

**iv-Two-dimensional electrophoresis analysis of cytosolic Tau proteins :
evidence for a balance between phosphorylation and O-GlcNAc glycosylation**

To further evidence the balance between phosphorylation and glycosylation, cytosolic extracts were analyzed by two-dimensional electrophoresis as described under « Materials and Methods » section. Tau proteins of the control and OA treated cells were analyzed for their recognition by M19G pAb, that recognises all the isoforms of the Tau proteins, ADI 294 mAb that specifically recognises an epitope in its phosphorylated form, and Tau-1 that specifically bound an epitope in its non-phosphorylated form. Variant bearing O-GlcNAc residues were detected for their affinity for WGA.

M19G antibodies staining demonstrated an acidification of Tau variants after OA treatment as compared to control cells, as shown in Fig. 5. This is in favour of an increase in the phosphorylation state after OA treatment, as confirmed with ADI 294 antibodies. In control cells, ADI 294 only bound the more acidic isoforms. After OA treatment, the number of Tau variants detected by ADI 294 antibody increased. This result confirms that the more acidic isoforms corresponded to the more phosphorylated isoforms. In contrary to the ADI 294 mAb staining, Tau-1 mAb recognized a higher number of isoforms in the control cell samples as compared to the OA treated cells samples. These antibodies detected the variants with the more basic pI. In fact, superposition of Tau variants recognized by both Tau-1 and ADI 294 reproduced the pattern observed with M19G.

Interestingly, WGA staining was exclusively localised in the Tau-1 mAb recognition region, i. e. the less phosphorylated isoforms. This result reinforces the previously demonstration of the balance between O-GlcNAc glycosylation and phosphorylation.

To ensure that the decrease in WGA staining after OA treatment actually corresponded to a decrease in O-GlcNAc glycosylation, and to exactly confirm the nature of Tau glycosylation, radioactive galactose was transferred by the galactosyltransferase reaction onto O-GlcNAc bearing proteins of cytosolic extracts both from control and OA treated cells. Analysis of beta-elimination released saccharide confirmed that O-GlcNAc addition was the unique glycosylation pattern for cytosolic proteins. In addition, we demonstrate that OA treatment induces a decrease in the O-GlcNAc level : by analysis (i) with HPAEC of the beta-eliminated products released from the tritiated galactose labelling on the cytosolic extracts and (ii) with 2D-electrophoresis of the two cytosolic extracts labelled by galactose transfer were performed. Incorporation of Gal was weaker on OA-modified Tau proteins as compared to

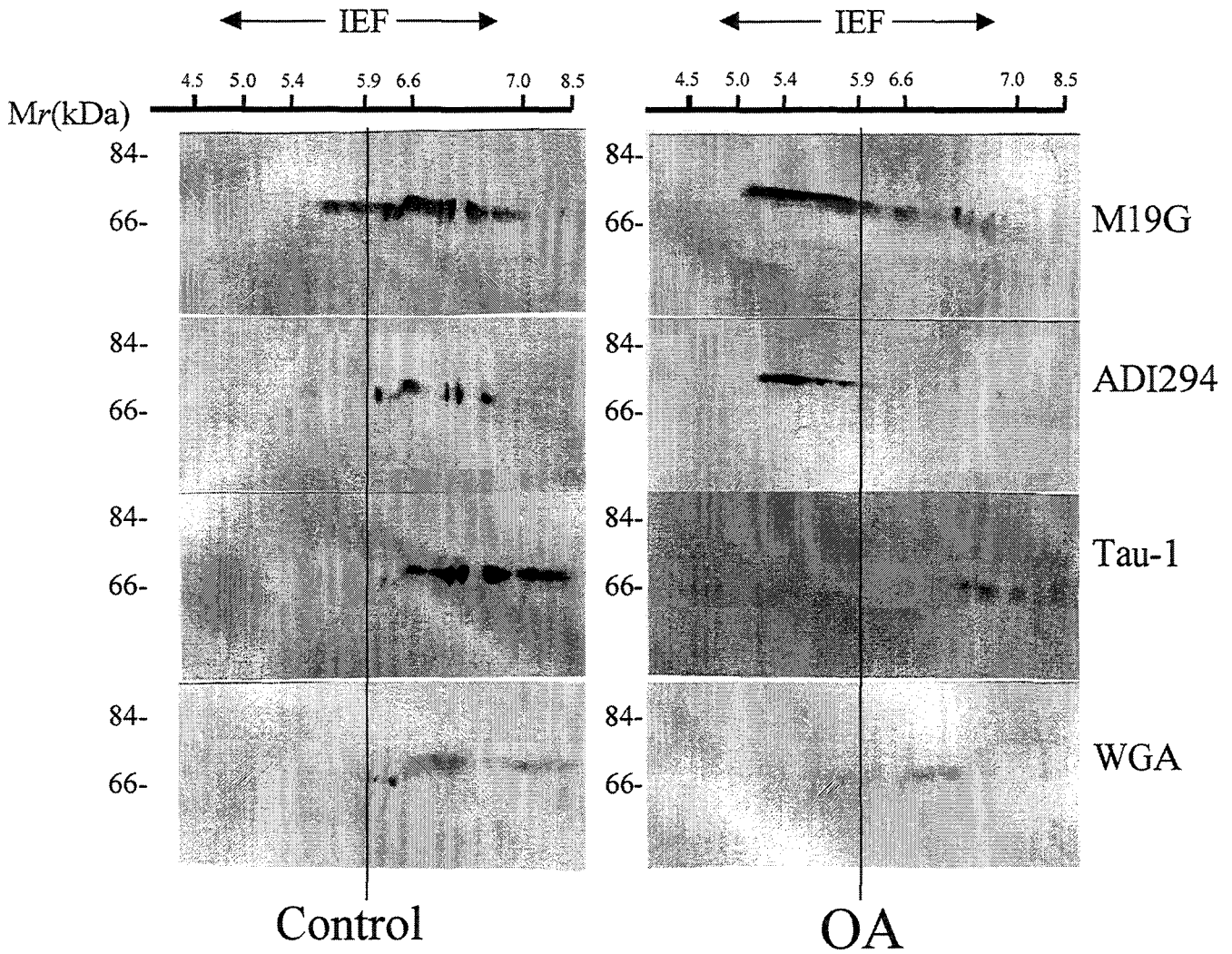


Figure 5- Two-dimensional electrophoresis analysis of Tau 441 variants

To investigate the balance between phosphorylation and glycosylation, cytosolic extracts were analyzed by two-dimensional electrophoresis as described under Materials and Methods. Tau proteins of the control and the OA treated cells were specifically detected with M19G pAb, which recognizes all the isoforms of the Tau family, with ADI 294 mAb that specifically recognized an epitope in its phosphorylated form, and with Tau-1 that specifically bound an epitope in its non-phosphorylated form. WGA was also used to detect the O-GlcNAc. (OA, treatment with OA for 4 hours). Note that WGA and Tau-1 antibodies bound to the less phosphorylated tau isoforms, whereas ADI294 recognized the most acidic Tau isoforms.

control Tau. This observation confirms the decrease in the O-GlcNAc content previously observed with WGA staining.

v- 2-D analysis of the nuclear Tau 441 proteins : influence of phosphorylation level on nuclear localization

The nuclear Tau isoforms were analyzed by 2-D electrophoresis. M19G pAb and WGA were used in order to follow the becoming of the nuclear Tau isoforms after OA treatment.

M19G pAb revealed different Tau isoforms with basic pI and apparent molecular weight of 67-70 kDa (Fig. 7 A and B). These isoforms were less numerous in the nucleus after okadaic acid treatment. In the same way, WGA staining (Fig. 7C and D) shows that the same isoforms are revealed with WGA and M19G from treated cells or untreated cells. By opposition to previous results concerning the cytosolic Tau isoforms, all these nuclear Tau forms were also reactive with WGA.

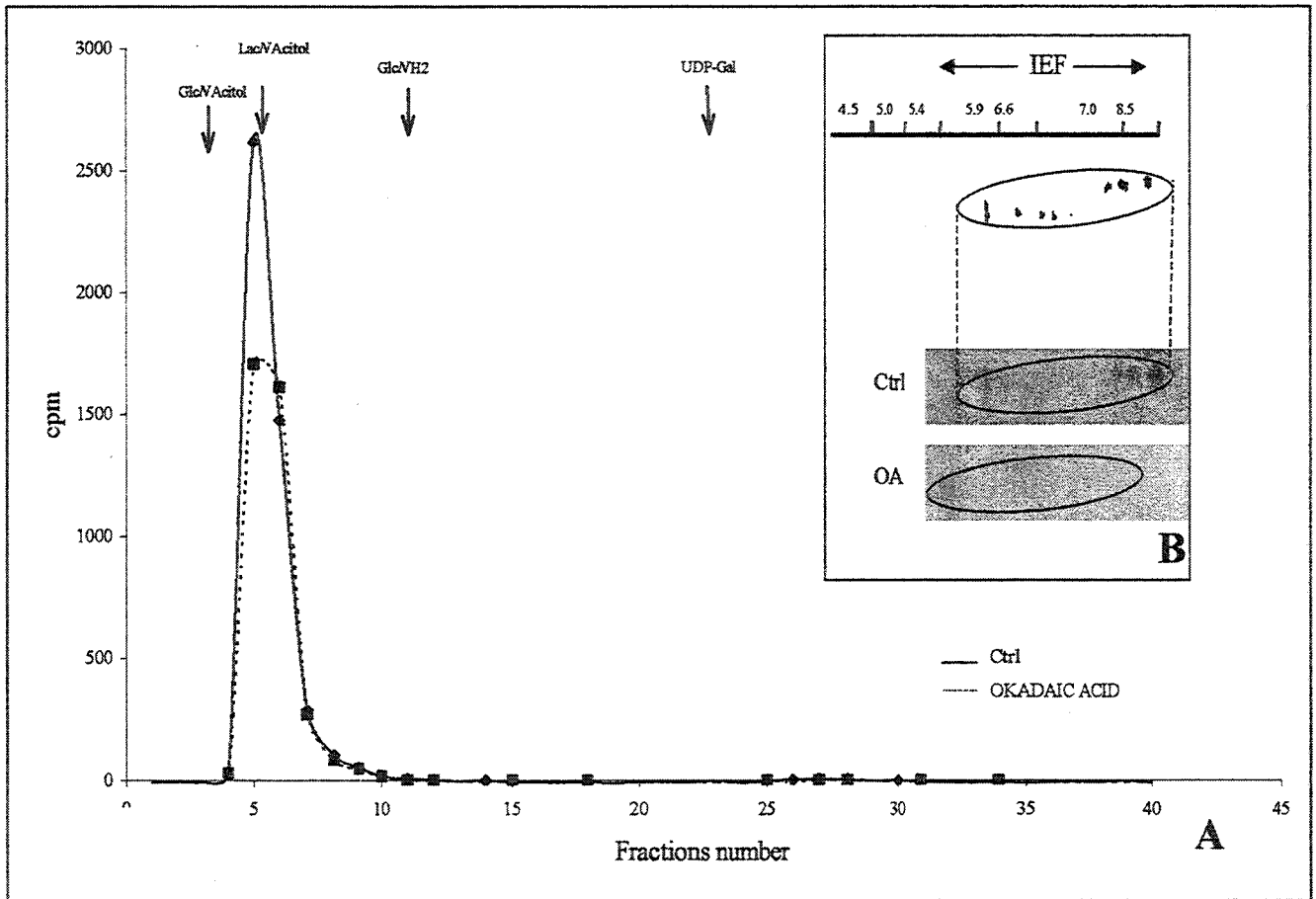


Figure 6- Radiolabeled Galactose transfer onto Tau proteins.

- A- Radioactive [³H]-galactose was transferred by galactosyltransferase reaction onto the O-GlcNAc bearing cytosolic proteins of both control and OA treated cells. Release of the glycans by beta-elimination and measure of the released radioactivity.
- B- Two-dimensional electrophoresis analysis of the two cytosolic extracts : detection of O-GlcNAc Tau proteins. The galactose transfer experiment confirmed the presence of O-GlcNAc residues on tau proteins.

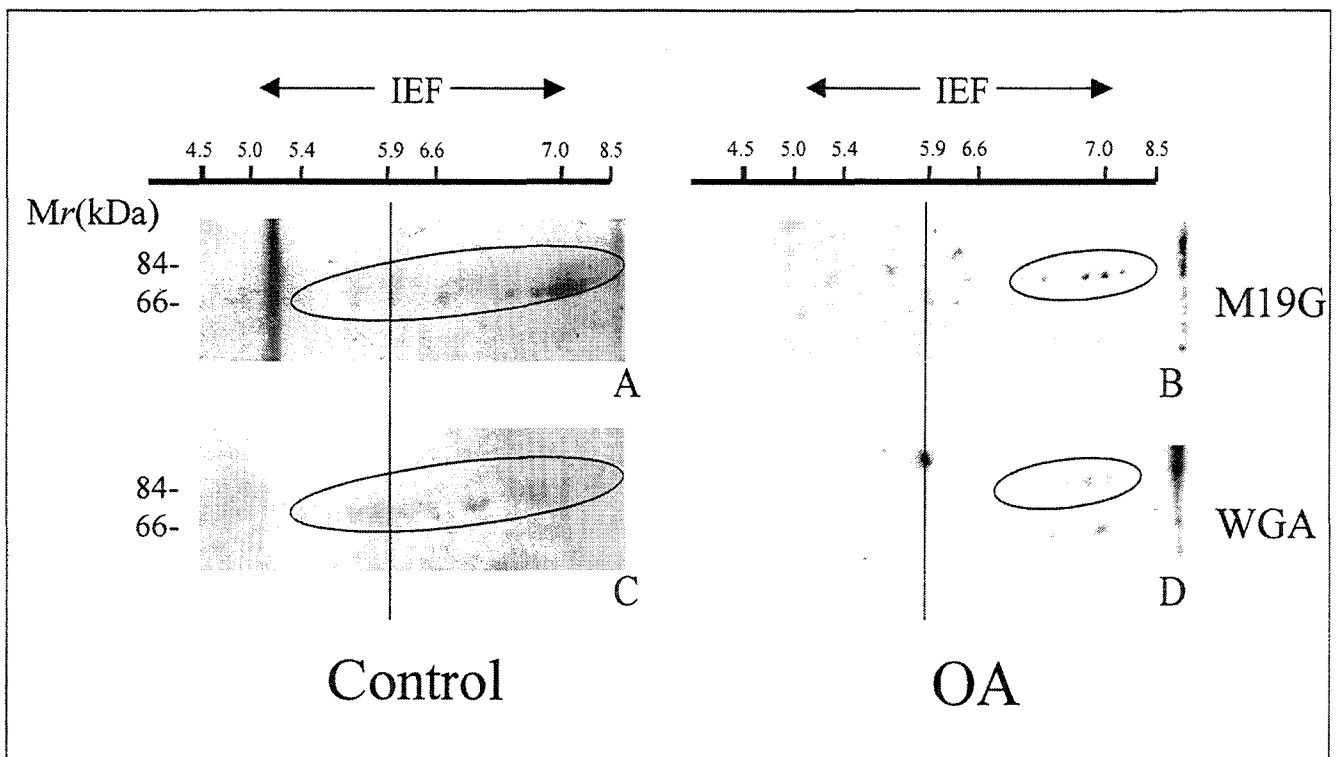


Figure 7- 2D analysis of the nuclear Tau proteins

The nuclear Tau isoforms were detected by both M19G pAb (Fig. 7A and B) and WGA (Fig. 7C and D) in nucleus fraction from control or OA treated cells. Note that after okadaic acid treatment, M19G and WGA decrease in the same degree.

5- Discussion

Our work focused on the relationship between glycosylation and phosphorylation of Tau proteins, a well-known phosphoprotein family implicated in the polymerization and stability of neuronal microtubules. Since the last ten years, phosphorylation of Tau proteins has intensively been studied by numerous laboratories. The phosphorylated sites were identified and the kinases involved in Tau phosphorylation were actively searched (Reviewed in Buée and Delacourte, 1999 [32]). A dysregulation of Tau proteins (hyperphosphorylation and phosphorylation specific to pathologies) occurs in numerous degenerative diseases and is now well documented [32]. On the contrary, O-GlcNAcylation of Tau has been only reported on bovine Tau Protein [9]. Despite of an high homology sequence, bovine Tau proteins differ from the human ones by the number of major Tau isoforms (4 and 6 respectively) [33], by the possible insert of the sequence corresponding to the exon 8 due to the alternative splicing [34], by their immunoreactivity [35], and by their conformation [36]. As Tau proteins are involved in neurodegenerative diseases, and such diseases as Alzheimer's disease are specific to humans, it appears to us as important to verify that O-GlcNAcylation also takes place on human Tau proteins. For that reason, we have chosen to study O-GlcNAcylation and its relationship to phosphorylation in human neuroblastoma cells, namely Kelly cells, which could be efficiently transfected. Indeed, the surexpression of Tau by transfection improved the O-GlcNAc residues detection. The O-GlcNAcylation of Tau proteins was demonstrated by its affinity to WGA lectin, by both co-migration of M19G and WGA immunoreactive bands and by trapping Tau proteins with WGA-sepharose beads. This lectin is known to recognise O-GlcNAc residues. Since GlcNAc could also be associated with possible contaminant N-glycans, we confirmed that the Tau recognition by WGA was specifically directed to the O-GlcNAc residues by demonstrating that i) the staining was persistent after PNGase F treatment and ii) it was abolished in presence of free GlcNAc in the incubation buffer. These two controls are largely used in the literature as specific tests. Furthermore, neuroblastoma cytosolic proteins could be specifically labeled by incorporation of [³H]Galactose using the UDP-galactosyl transferase as described by Kearse *et* Hart, 1991 [27]. Beta-elimination and HPAEC confirmed that human Tau proteins bore O-GlcNAc residues, and no other form of glycosylation, as numerous others proteins of cytoskeletal such as neurofilaments [11], MAP1, 2 and 4 [37] and bovine Tau [9]. O-GlcNAc glycosylation is a dynamic process and

the most abundant form of glycosylation of proteins located within the nucleus and the cytosol. All proteins bearing O-GlcNAc residues undergo reversible phosphorylation/dephosphorylation, form heteromeric complexes with other proteins. It has been speculated that this type of glycosylation shares similar features with protein phosphorylation [18] and mainly that it can reciprocally occupy the same or neighboring peptidic sites leading to the concept of a balance between phosphorylation and O-GlcNAc glycosylation. In the Kelly neuroblastoma cell model, we demonstrated such a balance for Tau proteins by two types of experiments.

A decrease in the WGA binding to Tau proteins was observed after treatment of the cells with okadaic acid. Okadaic acid is known to induce hyperphosphorylation of Tau proteins in different cellular model : neuroblastoma cells such as SY 5Y cells [8, 38], and LA-N-5 [39], rat cultured neurones [40], Cos [41], human brain slices [42]. Here we showed that hyperphosphorylation of Tau proteins also occurred in neuroblastoma Kelly cells, mainly by acidification of their pI, by an increase of their immunoreactivity with phospho-positive dependent antibodies (ADI294) and by a decrease of their immunoreactivity with unphosphorylated epitope dependent antibody such as Tau-1. Interestingly, hyperphosphorylation occurred on the cytosolic Tau 441 forms, whereas the content of these forms in O-GlcNAc residues decreased as seen by a lower detection with WGA. In contrast, the ratio WGA/M19G was not changed for the nuclear Tau 441 forms by the OA treatment compared to control cells. Hyperphosphorylated Tau 441 proteins were less detected by WGA in comparison to untreated Tau proteins. This decrease was more pronounced in cytosolic fraction where a 75% decrease in WGA binding capacity was observed while the M19G recognition remained slightly modified. By opposition, in the nucleus M19G and WGA recognition decrease simultaneously (50%) and then the ratio WGA/M19G was the same for both the control and the okadaic acid treated cells. The balance between phosphorylation and O-GlcNAc glycosylation was also obvious by 2-D western blots experiments. Indeed, WGA only bound the more basic Tau variants. These variants corresponded to the less phosphorylated forms as displayed by their binding to Tau-1 and not to ADI 294 antibodies, in both untreated and OA treated Tau. In nucleus, Tau level decreased in the same way as WGA reactivity. This probably means that Tau proteins were less efficiently translocated to the nucleus after hyperphosphorylation. Since mainly WGA binding decreased in the cytosol when compared to M19G pAb, we hypothesised that hyperphosphorylation blocked at least partially the O-GlcNAc incorporation on Tau protein

and this resulted in a poor transfer of the protein into the nucleus. Both phosphorylation and O-GlcNAc glycosylation seemed to be involved in protein nuclear transport. Indeed, a relationship between phosphorylation level and nuclear localization was previously reported for numerous proteins as reviewed in [43], nevertheless the relationship between phosphorylation and O-GlcNAc glycosylation in this phenomenon has so far not been established. As an example yeast Pho 4 phosphorylation (on five serine residues) determines its localization in the cytosol whereas a dephosphorylation is accompanied by a nuclear localization. In the same way NF-AT (nuclear factor of activated T-cells) is dephosphorylated by calcineurin after calcium activation, inducing its nuclear translocation. A role for O-GlcNAc glycosylation in the nuclear import comes from experiments demonstrating the nuclear internalisation of serum albumin substituted with β -di-*N*-acetylchitobioside (GlcNAc β -1, 4 GlcNAc) or α -glucosyl motif [22-24]. We recently demonstrated that experimentally induced hyperphosphorylation of proteins interferes with their O-GlcNAc glycosylation and simultaneously on their nuclear transfer [19]. This work constitutes the first demonstration that the phosphorylation / O-GlcNAc balance influences the nuclear localization of well identified proteins, namely Tau proteins.

Several papers reported the nuclear presence of Tau either in neuroblastoma cells [44, 45], either in non-neuronal cell-type [46, 47]. Tau has been located in nucleoli and more precisely in nucleolar organizer region of the acrocentric chromosomes. The biological significance of Tau isoforms in the nucleus has not yet been elucidated. Our results agreed with those of Tanaka *et al.* [48] who reported a preferential accumulation of Tau-1 immunopositive variants of Tau in nuclei.

Contrary to the 72 kDa Tau isoform, no significant difference was shown in both pAb M19G and WGA staining for the small nuclear Tau isoform between control cells and OA treated cells. According to its apparent molecular weight, this small Tau variant probably corresponded to that detected by Shea and Cressman [3]. This small variant, as the variant described by Shea and Cressman, was only located in nuclei. It is detected by N-terminal antibody (M19G) but also by C-terminal one (not shown). The fact that the OA treatment did not inhibit the cellular localization of this small Tau (Fig. 4D) and that the OA treatment did not disturb the nuclear localization of the majority of nuclear proteins as indicated by Ponceau red staining (not shown) suggests that the OA effect on Tau 441 localization is directly dependent from the phosphorylation/glycosylation balance. This let us to suggest that the small and adult Tau isoforms access to the nucleus in two different

pathways : the O-GlcNAc glycosylation and phosphorylation balance could contribute to maintain adult Tau isoforms (the 6 Tau isoforms from brain described in the literature) mainly in cytoplasm when allowing the passage of small Tau into the nucleus. Thus, phosphorylation of the cytoplasmic isoforms could act as a regulation factor for both their function and localization. The nuclear transfer of the small Tau, despite of its glycosylation and phosphorylation, could be attribute to its small molecular weight. Indeed it is known that proteins with a molecular weight lower than 40 kDa could reach the nucleus by direct passive diffusion. In this way, they did not need to through away the nuclear pore complex, known to be constituted by O-linked *N*-Acetylglucosaminylated proteins [12, 13]. The nuclear transport seems to be dependent of the O-GlcNAc residues on these proteins [49, 50]. Then, it was hypothesised that lectins, for the first time characterized by Felin et al, [51], could act as shuttle between cytosol and nucleus. The second hypothesis concerning the transfer of small Tau was that another type of phosphorylation, not sensitive to OA, was involved in the control of the small Tau transfer.

In conclusion, this paper clearly demonstrated that human adult Tau was O-GlcNAc modified and that a balance occurred between phosphorylation and O-GlcNAc glycosylation. This article is the first report of a direct relationship between phosphorylation, O-GlcNAc glycosylation and nuclear localization. We reconfirmed the existence of a small nuclear form of Tau protein. This small nuclear Tau was also GlcNAc modified but the glycosylation appeared insensitive to okadaic acid treatment. We may suggested that nuclear transport of Tau proteins was governed by two different processes : the first one concerned the adult Tau isoforms, whose transport depend from the phosphorylation/glycosylation balance, the second concerned the small Tau whose nuclear transport appeared independent of the phosphorylation process. The biological significance of these two mechanisms and the specific function of the different Tau variants remain to be clarified.

6- References

- [1] Goedert, M., Spillantini, M. G., Potier, M. C., Ulrich, J. & Crowther, R. A. (1989) Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing 4 tandem repeats – Differential expression of tau protein messenger RNAs in human brain. *EMBO J.* 8, 393-399
- [2] Couchie, D., Mavillia, C., Georgieff, I. S., Liem, R. K., Shelanski, M. L. & Nunez, J. (1992) Primary structure of high molecular weight tau present in the peripheral nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89(10), 4378-4381
- [3] Shea, T. B. & Cressman, M. (1998) A 26-30 kDa developmentally-regulated tau isoform localized within nuclei of mitotic human neuroblastoma cells. *Int. J. Devl Neuroscience* 16(1), 41-48
- [4] Greenwood, J. A. & Johnson, G. V. (1995) Localization and in situ phosphorylation state of nuclear tau. *Exp. Cell. Res.* 220(2), 332-337
- [5] Delacourte, A. & Buée, L. (1997) Normal and Pathological tau proteins as factors for microtubule assembly. *Int. Rev. Cyt.* 171, 167-224
- [6] Sautière, P. -S., Caillet-Boudin M. -L., Watez, A. & Delacourte, A. (1994) Detection of Alzheimer-type Tau Proteins in Okadaic Acid-Treated SKNSH-SY 5Y Neuroblastoma Cells. *Neurodegeneration* 3, 53-60
- [7] Furiya, Y., Sahara, N. & Mori, H. (1993) Okadaic acid enhances abnormal phosphorylation on tau proteins. *Neurosci. Lett.* 156(1-2), 67-69
- [8] Dupont-Wallois, L., Sautière, P. E., Cocquerelle, C., Bailleul, B., Delacourte, A. & Caillet-Boudin, M. -L. (1995) Shift from fetal-type to Alzheimer-type phosphorylated Tau proteins in SKNSH-SY 5Y cells treated with okadaic acid. *FEBS Lett.* 357, 197-201
- [9] Shane Arnold, C., Johnson, G. V. W., Cole, R. N., Dong, D. L.-Y., Lee, M. & Hart, G. W. (1996) The Microtubule-associated Protein Tau Is Extensively Modified with O-linked *N*-acetylglucosamine. *J. Biol. Chem.* 271, 28741-28744
- [10] Chou C. F., Smith A.J. & Omary M.B. (1992) Characterization and dynamics of O-linked glycosylation of human cytokeratin 8 and 18. *J. Biol. Chem.* 267, 3901-3906
- [11] Dong, D. L.-Y, Xu, Z. -S., Chevrier, M. R., Cotter, R. J., Cleveland, D. W., & Hart, G. W. (1993) Glycosylation of Mammalian Neurofilaments. Localization of multiple O-linked *N*-Acetylglucosamine moieties on neurofilament polypeptides L and M. *J. Biol. Chem.* 268, 16679-16687

- [12] Holt, G. W., Snow, C. M., Senior, A., Haltiwanger, R. S., Gerace, L. & Hart, G. W. (1987) Nuclear Pore Complex Glycoproteins Contain Cytoplasmically Disposed O-linked *N*-Acetylglucosamine. *J. Cell Biol.* 104, 1157-1164
- [13] Lubas, W. A., Smith, M., Starr, C. M. & Hanover J. A. (1995) Analysis of Nuclear Pore Protein p62 Glycosylation. *Biochemistry* 34, 1686-1694
- [14] Jackson, S. P. & Tjian, R. (1988) O-Glycosylation of Eukaryotic Transcription Factors : Implications for Mechanism of Transcriptional Regulation. *Cell* 55, 125-133
- [15] Chou, T. -Y., Dang, C. -V. & Hart, G.W. (1995) Glycosylation of the c-Myc transactivation domain. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 92, 4417-4421
- [16] Caillet-Boudin, M. -L., Strecker, G. & Michalski, J. -C. (1989) O-Linked GlcNAc in serotype-2 adenovirus fibre. *Eur. J. Biochem.* 184, 205-211
- [17] Medina, L., Grove, K. & Haltiwanger, R. S. (1998) SV40 large T antigen is modified with O-linked *N*-Acetylglucosamine but not with other forms of glycosylation. *Glycobiology* 8(4), 383-391
- [18] Haltiwanger, R. S., Busby, S., Grove, K., Li, S., Mason, D., Medina, L., Moloney, D., Philipsberg, G. & Scartozzi, R. (1997) O-Glycosylation of Nuclear and Cytoplasmic Proteins : Regulation Analogous to Phosphorylation? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 231, 237-242
- [19] Lefebvre, T., Alonso, C., Mahboub, S., Dupire, M. -J., Zanetta, J. -P., Caillet-Boudin, M. -L. & Michalski, J. -C. (1999) Effect of okadaic acid on O-linked *N*-Acetylglucosamine levels in a neuroblastoma cell line. *Bioch. Biophys. Acta.* 1472(1, 2), 71-81
- [20] Haltiwanger, R. S., Grove, K. & Philipsberg, G. A. (1998) Modulation of O-Linked *N* Acetylglucosamine Levels on Nuclear and Cytoplasmic Proteins *in Vivo* Using the Peptide *O*-GlcNAc- β -*N*-acetylglucosaminidase Inhibitor *O*- (2-Acetamido-2-deoxy-D-glucosaminopyranosylidene)amino-*N*-phenylcarbamate. *J. Biol. Chem.* 273(6), 3611-3617
- [21] Griffith, L. S. & Schmitz, B. (1999) *O*-linked *N*-Acetylglucosamine levels in cerebellar neurons respond reciprocally to perturbation of phosphorylation. *Eur. J. Biochem.* 262, 824-831
- [22] Duverger E., Carpentier, V., Roche A. -C. & Monsigny M. (1993) Sugar-Dependent Nuclear Import of Glycoconjugates from the cytosol. *Exp. Cell Res.* 207, 197-201

- [23] Duverger E., Pellerin-Mendes, C., Mayer, R., Roche A. -C. & Monsigny M. (1995) Nuclear import of glycoconjugates is distinct from the classical NLS pathway. *J. Cell Sci.* 108, 1325-1332
- [24] Duverger E., Roche A. -C. & Monsigny M. (1996) *N*-Acetylglucosamine-dependent nuclear import of neoglycoproteins. *Glycobiology* 6(4), 381-386
- [25] Goedert M. & Spillantini M. G. (1990) Molecular neuropathology of Alzheimer's disease: in situ hybridization studies. *Cell. Mol. Neurobiol.* 1990 10(1), 159-74
- [26] Goedert M., Spillantini, M. G., Potier, M. C., Ulrich J. & Crowther RA (1989) Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *EMBO J.* 8(2), 393-9
- [27] Kears, K.P. & Hart, G. W. (1991) Lymphocyte activation induces rapid changes in nuclear and cytoplasmic glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 1701-1705
- [28] Bronfman, M., Loyola, G. & Koenig, C. S. (1998) Isolation of Intact organelles by Differential Centrifugation of Digitonin-Treated Hepatocytes Using a Table Eppendorf Centrifuge. *Anal. Biochem.* 255, 252-256
- [29] Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. (1970) *Nature* 270, 680-685
- [30] Datta, B., Ray, M. K., Chakrabarti, D., Wylie, D. E. & Gupta, N. K. Glycosylation of Eukaryotic Peptide Chain Initiation Factor 2 (eIF2)-associated 67-kDa Polypeptide (p⁶⁷) and its possible Role in the Inhibition of eIF-2 Kinase-catalyzed Phosphorylation of the eIF-2 α -Subunit. (1989) *J. Biol. Chem.* 34, 20620-20624
- [31] Diekmann-Schuppert, A., Bause, E. & Schwarz, R., T. (1993) Studies on O-glycans of *Plasmodium-falciparum*-infected human erythrocytes. Evidence for O-GlcNAc – transferase in malaria parasites. *Eur. J. Biochem.* 216, 779-788
- [32] Buée, L. & Delacourte, A. (1999) Tau phosphorylation in Functional Neurobiol. Of Aging, Hof & Mobbs eds. *Academic Press, San Diego, CA. In press.*
- [33] Himmler, A. (1989a) Structure of the bovine tau gene : alternatively spliced transcripts generate a protein family. *Mol. Cell Biol.* 9, 1389-1396.
- [34] Chen, W.T., Liu, W.K. & Yen, S. H. (1994) Expression of Tau exon 8 in different species. *Neurosc. Lett.* 172, 167-170.

- [35] Alonso, A. D., Grundke-Iqbal, I. & Iqbal, K. (1995) Bovine and human Tau, highly homologous but less crossreactive : implications for Alzheimer disease. *Brain Res.* 31, 194-200.
- [36] Watanabe, N., Takio, K., Hasegawa, M., Arai, T., Titani, K., Ihara, Y. (1992) Tau-2: a probe for a ser conformation in the amino terminus of tau. *J. Neurochem.* 58, 960-966.
- [37] Ding, M. & Vandre, D. D. (1996) High molecular weight microtubule-associated proteins contain O-linked-N-acetylglucosamine. *J. Biol. Chem.* 271(21), 12555-12561
- [38] Caillet-Boudin, M.-L. & Delacourte, A. (1996) Induction of a specific tau Alzheimer epitope in SY-5Y neuroblastoma cells. *Neuroreport.* 8(1), 307-310
- [39] Vandermeeren, M., Lubke, U., Six, J., & Cras, P (1993) The phosphatase inhibitor okadaic acid induces a phosphorylated paired helical filament tau epitope in human LA-N-5 neuroblastoma cells. *Neurosci. Lett.* 153(1):57-60
- [40] Kim, D., Su, J., & Cotman, C. W. (1999) Sequence of neurodegeneration and accumulation of phosphorylated tau in cultured neurons after okadaic acid treatment *Brain Res.* 839(2):253-62
- [41] Mailliot, C., Bussiere, T., Caillet-Boudin, M. -L., Delacourte, A. & Buee, L. (1998) Alzheimer-specific epitope of AT100 in transfected cell lines with tau: toward an efficient cell model of tau abnormal phosphorylation. *Neurosci. Lett.* 255(1), 13-6
- [42] Harris, K., A, Oyler, G., A., Doolittle, G., M., Vincent, I., Lehman, R., A, Kincaid, R., L., & Billingsley, M., L. (1993) Okadaic acid induces hyperphosphorylated forms of tau protein in human brain slices. *Ann Neurol* 33(1), 77-87
- [43] Kaffman, A. & O'Shea, E. K. (1999) Regulation of nuclear localization : a key to a door. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15, 291-339
- [44] Loomis, P., A., Howard, T., H., Castleberry R., P., & Binder, L. I. (1990) Identification of nuclear tau isoforms in human neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci* 87(21), 8422-8426
- [45] Greenwood, J. ,A. & Johnson G. V. (1995) Localization and in situ phosphorylation state of nuclear tau. *Exp. Cell Res.* 220(2), 332-7
- [46] Thurston, V., C., Zinkowski, R., P. & Binder, L., I. (1996) Tau as a nucleolar protein in human nonneural cells in vitro and in vivo. *Chromosoma* 105(1), 20-30
- [47] Sygowski, L. A., Fieles, A. W., Lo, M. M., Scott, C. W. & Caputo, C. B. (1993) Phosphorylation of Tau protein in tau-transfected 3T3 cells. *Brain Res.* 20(3), 221-8
- [48] Tanaka, T., Iqbal, K., Trenkner, E., Liu, D. J. & Grundke-Iqbal, I. (1995) Abnormally phosphorylated tau in SY5Y human neuroblastoma cells. *FEBS Lett* 360(1), 5-9

- [49] Finlay, D. R., Newmeyer, D. D., Price, T. M., & Forbes D. J. (1987) Inhibition of In Vitro Nuclear Transport by a Lectin that Binds to Nuclear Pores. *J. Cell Biol.* 104, 189-200
- [50] Miller, M. W. & Hanover, J. A. (1994) Functional Nuclear Pores Reconstituted With β 1-4 Galactose-modified O-linked N-acetylglucosamine Glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 269, 9289-9297
- [51] Felin, M., Doyenne-Moyne, M.-A., Hadj-Sahraoui, Y., Aubery, M., Hubert, J. & Sève, A.-P. (1994) Identification of Two Nuclear N-Acetylglucosamine-Binding Proteins. *J. Cell. Biochem.* 56, 527-535

7- Abbreviations

K.Cl 16, Kelly Clone 16 ; PMSF, Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride ; PBS, Phosphate-buffered saline ; DTT, Dithiothreitol ; CHAPS, 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propane-sulfonate ; Hepes, N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid] ; AD, Alzheimer disease ; BSA, bovine serum albumin ; GlcNAc, N-Acetylglucosamine ; TBS, Tris-buffered saline ; PNGase F, Peptide-N-glycosidase F ; WGA, Wheat germ agglutinin ; SDS-PAGE, Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis ; PB, Phosphate buffer ; OA, Okadaic acid ; GTP, Guanosine 5'-Triphosphate ; PIPES, Piperazine-N, N' bis [2-ethanesulfonic acid] ; 1, 4-piperazine diethanesulfonic acid ; EGTA, Ethylene Glycol-bis (β -aminoethyl ether) N, N, N', N'-tetracetic acid.

8- Acknowledgement

This work was supported in part by CNRS (Unité Mixte de Recherches CNRS n°8576, director Prof. André VERBERT), The Université de Lille I, INSERM (Unité de Recherche n°422, Director J. C. BEAUVILLAIN) and the Génopole of Lille. We are very grateful to Doctor Michel GOEDERT for the generous gift of pRK 172 plasmid (hTau40) and Immunotech for ADI240.

3^{ème} Partie :

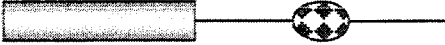

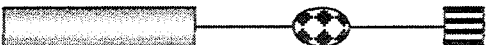
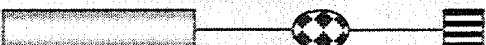
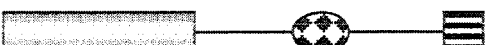


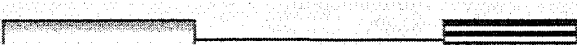

***O-N-Acétylglucosaminylation des formes
nucléaires des produits du gène Pax-6***

I- Généralités sur Pax-6 : un gène impliqué dans le développement de l'œil

1- Introduction : la famille des gènes Pax

Les gènes Pax font parties d'une superfamille de gènes du contrôle du développement. La famille Pax est composée de plusieurs membres qui se caractérisent tous par la présence d'un domaine paired (PD) capable de se lier à l'ADN. Les membres de cette superfamille ont une origine très ancienne (retrouver chez les Cnidaires) et sont monophyliques (Miller *et al*, 2000). En outre certains de ces membres possèdent un deuxième domaine de liaison à l'ADN : l'homéodomaine (HD). Certains autres membres peuvent aussi contenir ou pas un octapeptide de fonction encore inconnue (Tableau V).

Tableau V- Les gènes de la famille Pax

	<i>Domaine paired</i>	<i>octapeptide</i>	<i>homéobox</i>	<i>localisation chromosomique</i>	
				souris	homme
Pax-1				2	20p11
Pax-9				12	14q12-q13
Pax-2				19	10q25
Pax-5				4	9p13
Pax-8				2	2q12-q14
Pax-3				1	2q35
Pax-7				4	1p36
Pax-4				6	7
Pax-6				2	11p13

A ce jour, neuf gènes portant la séquence paired ont été caractérisés. Ce motif paired est retrouvé seul dans les gènes Pax-1, Pax-5 et Pax-8 ou en association avec l'homéobox dans les gènes Pax-3, Pax-4, Pax-6 et Pax-7 (Mansouri *et al.*, 1996). Il a été démontré que des mutations dans trois des neuf gènes de la souris (Pax-1, Pax-3 et Pax-6) et deux des neuf gènes humains (PAX-3 et PAX-6) sont à l'origine de défaillances lors du développement (Strachan *et Read*, 1994).

Les gènes qui contiennent les domaines de liaison à l'ADN, PD et HD, ont des fonctions comparables entre la drosophile et les vertébrés. Il est d'ailleurs probable que la famille des protéines qui contiennent PD/HD a évolué à partir de molécules ne contenant qu'un HD et qui ont acquis un PD ou *vice versa*.

2- Pax-6 : un gène impliqué dans le développement de l'œil

i- Définition

Pax-6 est un gène qui code pour des facteurs de transcription fortement exprimés dans l'œil, et dont la fonction est requise pour le développement de cet organe (Chow *et al.*, 1999). Il est conservé d'une manière extraordinaire au sein du règne animal (Salvini-Plawen *et al.*, 1977), à tel point qu'on retrouve le gène orthologue du Pax-6 humain chez la souris. Les protéines Pax-6 contiennent à la fois les domaines de liaison à l'ADN, PD et HD, et peuvent ainsi s'y lier par PD, par HD ou par une interaction PD/HD (Desplan, 1997). Chez les vertébrés, Pax-6 s'exprime dans le système nerveux central (Walther *et Gruss*, 1991), la neurorétine (Martin *et al.*, 1992) (Figure 15) et le pancréas endocrine (Turque *et al.*, 1994). Il a d'ailleurs été démontré que Pax-6 est requis pour le développement des cellules alpha (St Onge *et al.*, 1997). Ce gène s'exprime fortement dans la neurorétine d'embryon d'oiseau, notamment chez la caille (Carrière *et al.*, 1993) où le gène homologue de Pax-6 est appelé Pax-QNR (*Quail NeuroRetina*). Des analogues de Pax-6 ont également été identifiés chez certains invertébrés (Halder *et al.*, 1995) comme la drosophile, les vers nématodes et l'oursin.

ii- Les produits du gène Pax-6

Le gène homologue de Pax-6 a été caractérisé chez la caille : il s'agit de Pax-QNR. Ce gène code pour quatre protéines issues d'épissages alternatifs et d'initiations internes. Ces quatre isoformes sont appelées : p48, p46, p43 et p33/32 (Carrière *et al.*, 1993).

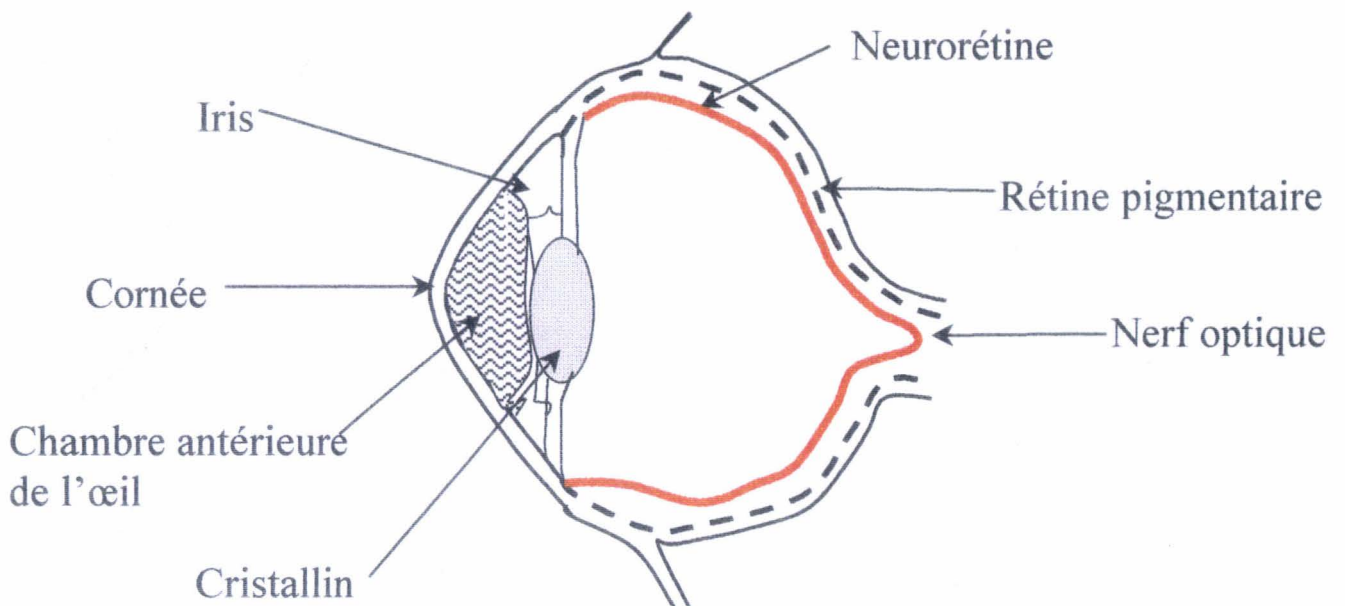


Figure 15 – **Représentation schématique de l'œil**
(la neurorétine est représentée en rouge)

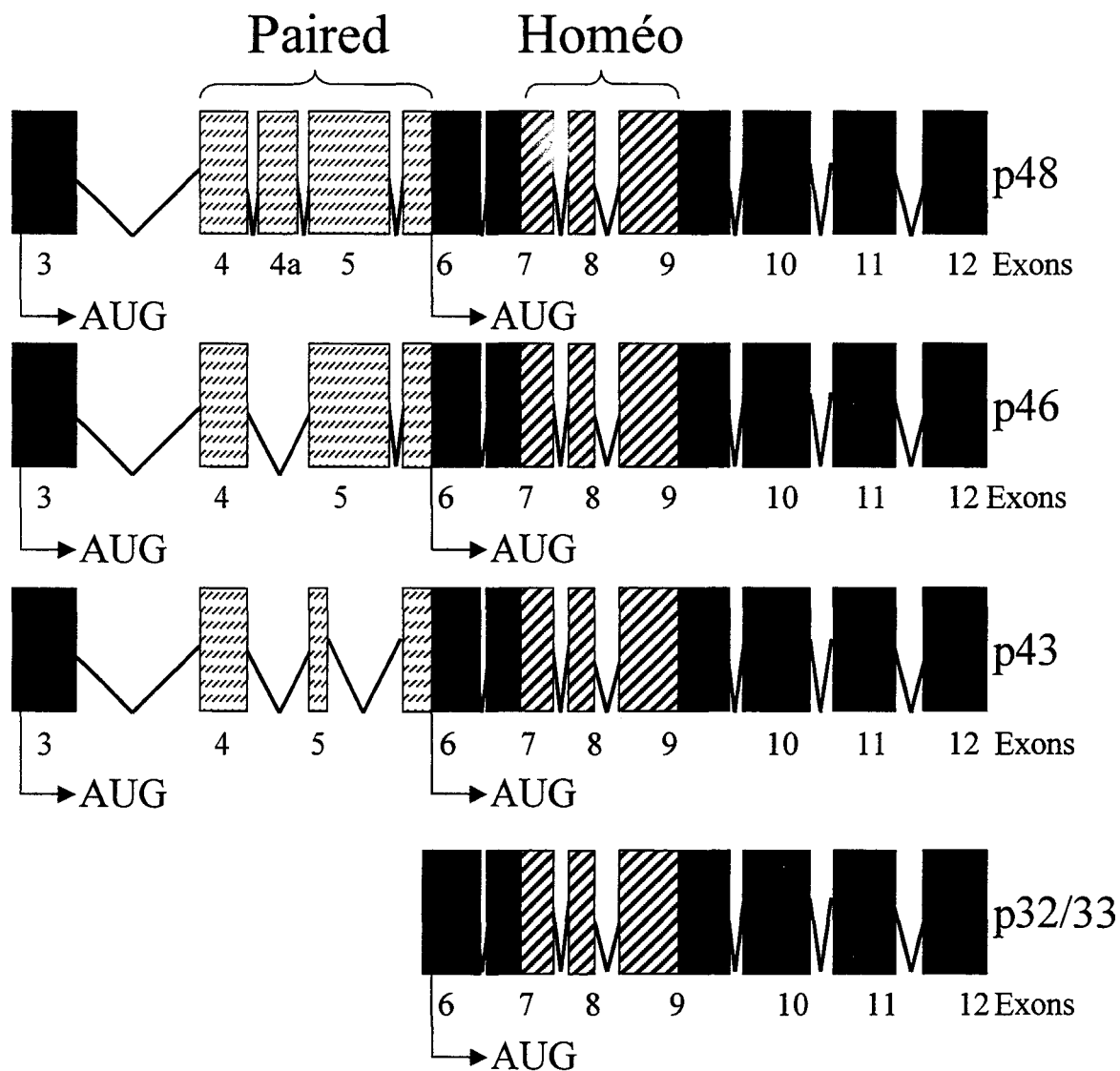


Figure 16 -ARN messagers des différentes isoformes de Pax-6

Ces épissages ont tous lieu dans le domaine paired. Ainsi p48 conserve un exon 4a dans ce domaine, alors qu'il est épissé dans les autres isoformes ; p43 perd lui une bonne partie de l'exon 5 et p32/33 est dépourvue du domaine paired (Figure 16). Les produits du gène Pax-6 contiennent 2 sites de localisation nucléaire (NLS) : l'un dans le domaine paired, l'autre dans la portion amino-terminale de l'homéodomaine (Carrière *et al*, 1995).

Des anticorps dirigés contre différents domaines des protéines issues du gène Pax-6 de la neurorétine de caille ont pu être obtenus (Carrière *et al*, 1993). Les domaines reconnus et les protéines cibles sont indiqués dans le tableau VI ci-dessous :

Tableau VI- Domaines des protéines issues du gène Pax-6 reconnus par différents anticorps

Numéro du serum	Domaine reconnu	Protéines reconnues
11	Paired	p48, p46 et p43 p48, p46, p43 et p32/33
12	Entre paired et homéo	
13	Homéo	
14	C- terminal	

iii-Localisation cellulaire des produits du gène Pax-6

Les protéines p48 et p46 sont exclusivement localisées dans le noyau (100%) alors que les protéines p43 et p32/33 sont également retrouvées dans le cytoplasme (Carrière *et al*, 1995).

iv-Les domaines de liaison à l'ADN des produits du gène Pax-6

Comme nous l'avons indiqué plus haut, les produits du gène Pax-6 contiennent deux domaines de liaison à l'ADN : le domaine paired (PD) de 128 acides aminés dans la portion amino-terminale, et l'homéodomaine de 60 acides aminés dans la portion centrale. Ces deux domaines (paired, homéo ou l'association des deux) reconnaissent des séquences différentes.

Le domaine de transactivation de la transcription est porté par la partie carboxy-terminale (Desplan, 1997).

Le domaine paired est très conservé dans l'évolution, car on le retrouve chez la drosophile, l'homme, le rat, la souris, le poulet, la caille et le poisson zèbre. Dans Pax-6, il est structuré en deux sous-domaines amino- (PAI) et carboxy-terminal (RED) organisés en hélices- α . Ces deux sous-domaines sont chacun capables de reconnaître des sites distincts. Dans p48, le petit exon 4a introduit une séquence de 14 acides aminés entre les hélices 2 et 3 du sous-domaine amino-terminal et annule la liaison à l'ADN (seul le sous-domaine carboxy-terminal peut encore se lier à l'ADN). Dans p43, l'absence de l'exon 5 supprime les hélices 3, 4 et 5, mais place par contre les hélices 1 et 2 en continuité avec 6 (hélice du sous-domaine C-terminal), ce qui a pour effet la création d'un nouveau domaine de liaison à l'ADN, qui reconnaît alors une autre séquence (Plaza *et al*, 1996). De ces observations il ressort que les différentes protéines issues du gène Pax-6 ne reconnaissent pas la même séquence et n'ont pas la même fonction. Il a été démontré que les facteurs de transcription Pax-6 ne sont pas interchangeables. En effet, p48 ne peut pas remplacer p46 (anomalies oculaires), ce qui indique que les produits du gène Pax-6 ont des gènes cibles distincts (Plaza *et al*, 1996 ; Desplan, 1997).

L'homéodomaine (HD) a été, depuis sa découverte en 1984, l'un des mieux étudiés. L'homéobox code l'homéodomaine, qui est aussi un domaine de liaison à l'ADN conservé avec un motif du type hélice/coude/hélice. C'est aussi l'un des motifs de liaison à l'ADN les plus archaïques puisqu'on le trouve dans certains bactériophages. Les gènes contenant l'homéobox codent pour des facteurs de transcription régulés par le développement.

3- Anomalies associées à des mutations du gène Pax-6

Différentes mutations dans le gène Pax-6 ont été répertoriées (Strachan *et* Read, 1994 ; Plaza *et al*, 1996). Chez la souris ces mutations sont associées au mutant *Small eye* (*Sey*) (Hill *et al*, 1991). Le phénotype *Sey/+* est associé à des malformations oculaires telles que la cataracte, la dislocation lenticulaire ou la lentille vacuolée, les petits yeux. Le phénotype *Sey/Sey* est, lui, associé à une mort néonatale, une absence totale d'yeux, une migration neuronale défectueuse.

Chez l'homme, le gène peut lui aussi muter en AN2 (Glaser *et al*, 1994) pour mener à l'absence totale ou partielle d'iris (aniridie), à la cataracte, à une dislocation lenticulaire, à une dysplasie fovéale ou au glaucome.

Chez la drosophile le phénotype *Eyeless* est dû aussi à une mutation de Pax-6.

Des défauts de développement du pancréas endocrine, dus à des mutations dans Pax-6, ne sont observés que pour les homozygotes mutants.

4- La régulation transcriptionnelle de Pax-6

Pax-6 est sous le contrôle de deux promoteurs : P0 et P1 (Plaza *et al*, 1995). Ces deux promoteurs sont inductibles : P0 est inductible au moment de la différenciation neuronale. Le produit du gène *c-myb* (proto-oncogène) exprimé dans la neurorétine, est capable d'activer ces deux promoteurs, mais p46 est aussi capable de maintenir l'activité de Pax-6 alors qu'aucun autre produit de Pax-6 n'en est capable (Plaza *et al*, 1993). Ceci pourrait constituer un élément de restriction tissulaire dans le maintien de l'expression de ce gène, p46 n'étant présent que dans les tissus dans lesquels le gène s'exprime.

5- Les rôles de Pax-6

Le gène Pax-6 s'exprime durant toutes les périodes qui vont couvrir la formation de la rétine et cette expression persiste une fois celle-ci différenciée, c'est la raison pour laquelle il est possible que les produits du gène Pax-6 remplissent des fonctions distinctes selon l'âge de la neurorétine. Il est probable aussi que les différentes isoformes issues du gène Pax-6 sont des facteurs de transcription qui ont des gènes cibles différents (Plaza *et al*, 1996).

Pax-6 intervient aussi dans la prolifération cellulaire : p46 peut se fixer sur le promoteur du gène codant pour la protéine d'adhésion cellulaire L1-CAM (CAM : *Cell Adhesion Molecule*) qui est présente dans la neurorétine et est impliquée dans les contacts intercellulaires (Chalepakis *et al*, 1994). Pax-6 est aussi requis pour l'expression du gène *Msx-1* codant pour un facteur à homéodomaine répresseur de la différenciation cellulaire (Grindley *et al*, 1995). Enfin Pax-6 peut réguler le promoteur de gènes codant les cristallines, protéines s'accumulant en grande quantité dans le cristallin et responsables des propriétés optiques de celui-ci (Cvelkl *et al*, 1994).

II-Résultats

Le travail que nous avons effectué sur les produits du gène Pax-6, gène impliqué dans le développement de l'œil, se démarque un peu des travaux précédemment présentés dans les deux premières parties.

Les résultats de ces travaux sont le fruit d'une étroite collaboration entre notre équipe et l'équipe du Dr Simon Saule, et plus particulièrement avec Manuella Bailly et Nathalie Planque, de l'Institut de Biologie de Lille (actuellement à l'UMR 146, Institut Curie Section Recherche d'Orsay).

Ce travail est actuellement en version révisée dans : *European Journal of Biochemistry*.

Nous avons démontré dans ce travail, en utilisant différentes approches expérimentales, que certains produits du gène Pax-6 peuvent être modifiés par la O-N-Acétyleglucosaminylation. Les produits du gène Pax-6 ont été préparés par immunoprécipitation sur des extraits totaux de rétine de caille avec trois immunséras : l'immunsérum 11, dirigé contre le domaine paired, l'immunsérum 13, dirigé contre l'homéodomaine et p13 représentant le sérum préimmun.

La figure 1B montre la révélation de certaines isoformes des produits du gène Pax-6 par la WGA, après traitement par la PNGase F. La chasse de la fixation de la WGA par 0.2 M de GlcNAc est représentée en figure 1C, et le marquage des isoformes en [³⁵S]Met/Cys est représenté en figure 1A. On voit que seules les isoformes de 48/46 kDa sont révélées par la WGA en absence de sucre inhibiteur, démontrant ainsi leur glycosylation par la GlcNAc en position terminale sur des glycanes O- liés. Aucune glycosylation n'est détectée sur les isoformes de 43 kDa et de 32/33 kDa.

Un marquage par le [³H]galactose a été effectué en utilisant la galactosyltransférase bovine sur les différents immunoprécipités (Figure 2). Cette expérience confirme la présence de GlcNAc terminale sur les isoformes p48/p46. De même, comme pour l'expérience avec la WGA de la figure 1, les isoformes de 43 kDa et de 32/33 kDa n'ont pas été détectées.

Afin de démontrer la présence de O-GlcNAc sur les isoformes des produits du gène Pax-6, les rétines ont été incubées avec de la [¹⁴C]GlcNH₂ pendant 24 heures dans un milieu appauvri en glucose. La figure 3 montre l'autoradiographie des gels SDS-PAGE 12.5% après immunoprécipitation des extraits totaux de rétines avec l'immunsérum 11 et le préimmunsérum p13. On retrouve la bande de 46/48 kDa, mais rien n'est détecté pour la bande de 43 kDa. Sur ces mêmes échantillons une bêta-élimination en milieu réducteur a été effectuée (on obtient ainsi la forme -itol, c'est à dire la forme réduite des sucres). Les produits ont ensuite été dessalés sur papier et la nature des sucres bêta-éliminés a été déterminée par HPAEC. La comparaison des chromatogrammes par rapport à des -itols standards nous indique la présence unique de O-GlcNAc sur les formes 48/46 kDa des produits du gène Pax-6 (Figure 4).

Des extraits nucléaires de rétine ont été enrichis sur WGA immobilisée sur des billes de sépharose. Après lavage, les précipités ont été repris dans du tampon de Laemmli et soumis à une électrophorèse en SDS-PAGE à 12.5% puis à un électrotransfert. Les protéines retenues sur WGA-sépharose ont été révélées par un anticorps dirigé contre le domaine carboxyterminal des produits du gène Pax-6. Un témoin négatif a été fait sur des cellules NIH3T3 qui n'expriment pas les produits du gène Pax-6. Des contrôles ont été également faits sur des extraits totaux de rétine et de cellules NIH3T3 (Figure 5).

Il n'y a aucune révélation des pistes NIH3T3. Par contre sur la piste 3 toutes les isoformes des produits du gène Pax-6 sont visibles : c'est à dire les isoformes de 48, 46, 43 et 32/33 kDa. Cette expérience indique que toutes ces isoformes sont présentes dans le noyau des rétines. Par contre la première piste montre clairement que seules deux isoformes sont retenues sur WGA-sépharose : les isoformes de 48 et 46 kDa (celle de 43 kDa n'apparaissant que très faiblement). Il faut noter que seules les deux isoformes de 48 et 46 kDa sont localisées à 100% dans le noyau, les autres ont une co-localisation cytosolique et nucléaire. On peut déduire de cette manière que la glycosylation des produits du gène Pax-6 est localisée principalement dans le domaine paired. Les isoformes de 32/33 kDa sont dépourvues de domaine paired et ne sont pas retenues sur WGA-sépharose : on peut penser que la glycosylation des produits du gène Pax-6 se localise principalement dans ce domaine.

La figure 6A présente la fluorographie des extraits totaux de cellules de réticulocyte, marquées à la L-[³⁵S]methionine, n'exprimant chacune qu'une seule des isoformes des produits du gène Pax-6 : elles sont notées p30, p43, p46 et p48 (pSG5 n'exprime aucune de ces isoformes). La figure 6B représente la même expérience mais après incubation des extraits avec de la WGA-sépharose.

On remarque que contrairement aux expériences précédentes on retrouve toutes les isoformes des produits du gène Pax-6 retenues plus ou moins sur WGA-sépharose : elles sont donc toutes glycosylées. Malgré cela des mesures de densitométries montrent que seules 3% des isoformes de 48, 46 et 43 kDa existent sous la forme glycosylée, et seules 1% des isoformes de 32/33 kDa sont glycosylées. Le fait de retrouver toutes les isoformes glycosylées dans le réticulocyte et pas dans la rétine peut s'expliquer par le fait que dans les deux types cellulaires, l'un étant la cellule d'origine (la rétine), l'autre, une cellule transfectée (le réticulocyte), la glycosylation peut se faire de manières différentes : soit parce que le matériel enzymatique n'est pas le même ou parce que le repliement ou la structure tridimensionnelle des produits du gène Pax-6 n'est pas la même dans les deux types cellulaires. Malgré tout il semble bien que là aussi, la glycosylation se fasse bien de manière préférentielle dans le domaine paired (1% des formes tronquées, dépourvues du domaine paired, contre 3% des autres formes).

Des extraits de réticulocyte exprimant l'isoforme p46 et des extraits de réticulocyte n'exprimant aucune isoforme, pSG5, ont été incubés avec une sonde ADN spécifique de p46 : [³²P]-P6CON. Ces extraits ont ensuite été incubés avec de la WGA-sépharose (Figure 6C). On démontre ainsi que les formes glycosylées de Pax-6 sont capables de fixer une sonde d'ADN spécifique et que les résidus de O-GlcNAc sont toujours accessibles à la WGA ce qui suggère que ces résidus de O-GlcNAc n'interviennent pas directement dans l'interaction ADN-p46. On peut imaginer que ces résidus de O-GlcNAc serviront à la fixation d'autres facteurs intervenant dans le mécanisme transcriptionnel. Il a été en effet démontré que des isoformes de Pax-6 exprimées chez E. coli (donc non glycosylées) se fixent aussi sur une sonde spécifique d'ADN.

Nous avons tenté d'identifier les sites de glycosylation sur les produits du gène Pax-6 à partir de la séquence primaire de p46 (Table 1) en nous appuyant de séquences connues d'addition de O-GlcNAc. Nous remarquons que c'est le domaine carboxyterminal (domaine à l'origine de la transactivation transcriptionnelle) qui offre le plus de sites de O-N-

Acétylglucosaminylation. Or nous avons montré plus haut que les sites de glycosylation se retrouvaient plutôt sur le domaine Paired (2 sites probables ici). Ces différences entre la théorie et la pratique peuvent s'expliquer par le fait que (i) le domaine carboxyterminal n'est pas glycosylable en réalité par le biais de son inaccessibilité à la O-GlcNAc transférase ou bien (ii) que ce domaine carboxyterminal n'est seulement accessible que dans les formes tronquées (pour les réticulocytes).

En conclusion, dans cette étude nous avons démontré que certains produits du gène Pax-6, exclusivement nucléaires étaient modifiés par la O-GlcNAc. Cette glycosylation, probablement située dans le domaine paired majoritairement, ne semble pas indispensable à la liaison des facteurs de transcription à l'ADN. Il faudrait maintenant décrire la fonction de la O-GlcNAc dans les produits du gène Pax-6. Malheureusement nous sommes pour l'instant très limités dans les exercices de transcription avec Pax-6 puisque des modèles de transcription *in vitro* n'existent pas pour ce gène.

III- O-GLYCOSYLATION OF THE NUCLEAR FORMS OF PAX-6 PRODUCTS IN QUAIL NEURORETINA CELLS

Tony LEFEBVRE^{*}, Nathalie PLANQUE^{†‡}, Denis LELEU^{*}, Manuella BAILLY[†], Marie-Laure CAILLET-BOUDIN[¶], Simon SAULE^{†‡} and Jean-Claude MICHALSKI^{*1}

**Unité Mixte de Recherche 8576 du CNRS, Laboratoire de Chimie Biologique, 59655 Villeneuve d'Ascq, France*

† CNRS EP560/Institut Pasteur, Institut de Biologie, 1 Rue Calmette, BP447, 59021 Lille cedex, France

‡ present address: UMR 146 Institut Curie Section Recherche, Bât 110 91405 Orsay cedex France

¶INSERM U422, Place de Verdun, F-59045 Lille cedex, France

¹To whom correspondence should be addressed : Unité Mixte de Recherche 8576 du CNRS, Laboratoire de Chimie Biologique, 59655 Villeneuve d'Ascq, France.

Tel 33-3-20-43-41-46; Fax 33-3-20-43-65-55

E-mail Jean-Claude.Michalski@univ-lille1.fr.

Running title : O-Glycosylation of the quail Pax-6 products

Key words : O-GlcNAc, nucleus, transcription factors, Pax-6 products, Quail neuroretina.

1- Abstract

O-linked GlcNAc is the major glycan structure of cytosolic and nuclear proteins. While the physiological roles of O-GlcNAc have not been yet established, many authors postulate that this glycosylation function as an antagonist to phosphorylation by competing for the same sites and that it modulates the nucleo-cytoplasmic transport and the assembly of multimeric protein-protein complexes. Many transcription factors have been shown to be O-GlcNAc modified in transfected insect cell lines but rarely demonstrated in the original cells. In this work for the first time, we demonstrate the O-GlcNAc modification of the p48/p46 Pax-6 gene (a developmental control gene involved in the eye morphogenesis) products in the quail neuroretina. In conjunction with a systematic PNGase F treatment, we used wheat germ agglutinin binding, *in vitro* labeling with bovine galactosyltransferase, and labeling of cultured quail neuroretina with [¹⁴C]GlcNH₂. Glycosylated forms of Pax-6 proteins were found in the nucleus of the neuroretina cells. WGA-selected Pax-6 proteins produced in the reticulocyte lysate were able to bind a DNA target, similar to the unglycosylated form. The O-GlcNAc may however modulate protein interactions, mainly with other factors involved in the transcription process. Characterization of β-eliminated products clearly demonstrates that *N*-Acetylglucosamine is directly linked to serine or threonine residues. Examination of Pax-6 primary sequence allowed us to determine potential O-GlcNAc attachment sites. Most of these expected glycosylation sites appear to be linked to the two DNA binding domains and to the carboxyterminal transactivation domain, while experimental evidence taken from WGA-selected proteins experiment points in favor of a major localization sites on the paired-box domain.

2- Introduction

For a long time glycosylation was thought to be restricted to proteins confined to the cell surface or within the lumen of intracellular organelles. This view was governed by our understanding on the biosynthetic pathways of N- or O-Glycans. But since fifteen years, the existence of a major form of glycosylation found within the cytosol and the nucleus has been established : the O-linked *N*-Acetylglucosaminylation (O-GlcNAc) [1, 2]. O-GlcNAc is formed by the addition of a single *N*-Acetylglucosamine onto serine or threonine residues. More than hundred nuclear and cytoplasmic proteins are modified with O-GlcNAc, but only a few have yet been identified, including cytoskeletal proteins (keratins [3], neurofilaments [4]), nuclear pore proteins [5, 6], adenovirus fiber [7], several transcription factors including Sp1 [8], c-myc [9], SV40 Large-T antigen [10]. Interestingly all of the O-GlcNAc modified proteins that undergo reversible phosphorylation/dephosphorylation, form heteromeric complexes with other proteins, and most translocate between the cytosol and the nucleus. Particularly, it has been speculated that this type of glycosylation shares common features with protein phosphorylation [11]. For example, it has been demonstrated that c-Myc, a helix-loop leucine zipper phosphoprotein that heterodimerizes with Max and regulates gene transcription, is modified with O-GlcNAc on a known *in vivo* glycogen synthase kinase 3 phosphorylated site (Thr 58) [12]. In a previous report we demonstrated that okadaic acid, an inhibitor of serine/threonine phosphatases (PP1, PP2A and 2B), induces a decrease of the protein O-GlcNAc level [13]. In addition, using the potent peptide O-GlcNAc- β -*N*-acetylglucosaminidase inhibitor, *O*- (2-Acetamido-2-deoxy-D-glucosaminopyranosylidene)-amino-*N*-phenylcarbamate (PUGNAc), Haltiwanger *et al*, [14] have demonstrated a 2-fold increase of the O-GlcNAc level and a reciprocal decrease in the phosphate incorporation concomitant to an increase on GlcNAc on the Sp1 transcription factor. These results could be interpreted by a competition between O-GlcNAc and phosphate for the same attachment sites on proteins. Using a metabolic pulse-chase labeling of U373-MG astroglioma cells, Roquemore *et al*, [15] indicated that the turnover of the O-GlcNAc carbohydrate is dynamic and proceeds much more rapidly than turnover of the protein backbone itself, consistent with a regulatory role for O-GlcNAc on $\alpha\beta$ -Crystallin a newly recognized member of the small heat shock protein family. Other authors make the hypothesis that O-GlcNAc may play a role in the nuclear transport of cytosolic proteins : Duverger *et al*, [16, 17, 18] have demonstrated a sugar-

dependant transport of proteins, and Finlay *et al.*, [19] have shown a specific inhibition of the nuclear transport by WGA and not by other lectins. O-*N*-Acetylglucosaminylation has also an effect on transcriptional regulation by RNA polymerase II, which is itself modified with this type of glycosylation on the carboxyterminal tandem repeats [20]. This post-translational modification similarly to phosphorylation, could modulate protein-protein interactions. The hypothesis was made that removal of O-GlcNAc from an interaction domain could be a signal for protein association. Roos *et al.*, [21] have demonstrated that O-GlcNAc inhibits interactions between Sp1 and *Drosophila* TAF110 or holo-Sp1.

The enzymes which add and remove O-GlcNAc are known. The first one, the uridine diphospho-*N*-Acetylglucosamine : Polypeptide β -*N*-Acetylglucosaminyltransferase (O-GlcNAc transferase), is a soluble and very large (340 kDa) enzyme [22]. It was purified from rat liver cytosol. The second one, the O-*N*-Acetyl- β -D-glucosaminidase was purified from the rat spleen cytosol [23]. There is no strict consensus sequence for O-GlcNAc addition but the O-GlcNAc transferase needs a Ser/Thr rich sequence or the PV(S/T) type sequence.

The paired-class transcription factor Pax-6 is a master control gene for eye morphogenesis in both invertebrates [24] and vertebrates [25]. Mutations in the Pax-6 gene are associated with the mouse mutant small eye [26] and the corresponding human gene (AN) has been found deleted or mutated in aniridia [27]. Pax-6 is reported to be expressed in the developing central nervous system [28], in the endocrine pancreas and to be critical for α -cell development [29]. The quail homologue of Pax-6 termed Pax-QNR [30], encodes five proteins through alternative splicing and internal initiations [31]. Three proteins of 48, 46 and 43 kDa contain the paired domain, while two proteins of 33 and 32 kDa are devoid of this DNA-binding domain. All these proteins contain another DNA-binding motif, the homeodomain. The homeobox encodes the homeodomain, a conserved DNA-binding domain with a helix-turn-helix motif [32]. The p46 encodes a transcription factor able to positively regulate the Pax-6 promoters [33, 34] and glucagon gene [35]. Pax-6 encodes serine and threonine phospho-proteins [31].

In this study, using a combination of different techniques, we demonstrate that the Pax-6 gene products are modified with O-GlcNAc, more probably in the paired box domain, and that the modified protein are present in neuroretina nuclear extract. After *in vitro* binding experiment with a target DNA, the O-GlcNAc motifs remain available for interaction with other transcription factors.

3- Materials and Methods

i- Cells

Neuroretinas were dissected from quail embryos from day 4 to hatching. Quail embryos cells cultures were maintained and passed in Dulbecco Modified Eagle's Medium supplemented with 10% fetal calf serum.

For [³⁵S]Cys/Met labeling, 10⁷ cells were incubated in a medium depleted for Cys/Met for 10 min and then incubated for 1h at 37°C with 250μCi of Mix [³⁵S]Cys/Met. For [¹⁴C]Glucosamine labeling cells are incubated in a glucose poor medium (1/3) with 25μCi [¹⁴C]Glucosamine overnight at 37°C.

ii- Antibodies used

The different rabbit anti-Pax-6 sera used were the following : the serum 11, directed against the paired domain, the serum 13 against the homeodomain, the serum 14 against the carboxyl terminus and preimmune serum 13.

iii- Lysate and Immunoprecipitation

Cells were washed with Phosphate buffered saline (20 mM phosphate, 150 mM NaCl pH 7.5) and then incubated in the lysate buffer (10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, EDTA 1mM, 1% v/v Triton X100, 0.5% sodium desoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 0.5% aprotinin pH 7.4) for 5 min. The extract was centrifuged at 100000g for 30 min at 4°C.

The lysate was incubated overnight at 4°C with the different rabbit anti-Pax-6 sera described above. Then protein A sepharose was added at a 50% v/v for 30 min at 4°C and the complex was washed successively with lysate buffer (RIPA), RIPA/NaCl (lysed buffer with 350mM NaCl), RIPA/TNE and TNE (10mM Tris/HCl, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 0.5% Aprotinin pH7.4).

iv-PNGase F digestion

Samples were systematically digested with PNGase F (BioLabs) as describe by the manufacturer's recommendations. SDS was added at a final concentration of 0.5% and samples were boiled 5 min at 100°C. Nonidet P40 was added at a final concentration of 10% (v/v) in order to neutralize SDS. Buffer G7 (Phosphate buffer pH7.5) was finally added to a final concentration of 0.05M and PNGase F was added overnight at 37°C.

v- Labeled galactose transfer on GlcNAc residues with galactosyl transferase

Galactosyltransferase is a specific and sensitive probe frequently used in the detection of O-GlcNAc on cytosolic and nuclear proteins [36, 37]. Samples were added to an equal volume of sample buffer (56.25 mM Hepes, 11.25 mM MnCl₂, 250 mM galactose and 12.5 mM AMP, pH 7) with proteases inhibitors (1mM PMSF and 5µg/ml of leupeptin and pepstatin - Sigma). 0.025 U of bovine milk GlcNAc β-1,4-galactosyltransferase (Sigma) and 5 µCi of UDP-[6-³H]Gal (Amersham) were finally added to initiate the reaction. The samples were incubated at 37°C for 2 hours.

vi-Nuclear extracts preparation

Neuroretina cells pellet was recovered in ice in ten volumes of buffer (300 mM sucrose, 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 0.15 mM spermine, 0.5 mM spermidine, 14 mM 2-mercaptoethanol, 0.5 mM EGTA, 2 mM EDTA and 15 mM Hepes, pH 7.9). After 5 min incubation, 0.3 % NP40 is added and incubated 5 min in ice. The cells were centrifuged at 10000 g for 1 min. After a careful elimination of the supernatant, the pellet is dissolved in 9 volumes of buffer (1.1 M urea, 330 mM NaCl, 1.1 % NP40, 27.5 mM Hepes, pH 7.6) and incubated 15 min in ice. The nuclei are centrifuged 15 min at 1000 g and the supernatant is dialysed 4 hours against 20 mM Hepes, pH 7.9, 60 mM KCl, 20 % glycerol, 0.25 mM EDTA and 0.125 mM EGTA. All the buffers are supplemented with proteases inhibitors.

vii- Polyacrylamide gel electrophoresis, western blotting

The immunoprecipitated proteins were separated on 12.5 % SDS/PAGE [38] without 2-mercaptoethanol, coomassie blue stained, dried under vacuum and then exposed on Biomax film^R for the radiolabeled proteins, or electrophoretically transferred on nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell) and analyzed by western blot for the non-radiolabeled proteins. Western blots were performed with nuclear extracts or WGA-selected nuclear extract proteins boiled in loading buffer, subjected to SDS-PAGE and electrophoretically transferred to Immobilon membranes (Millipore). Filters were incubated for 60 min in blocking buffer (5% non-fat dry milk in PBS). Filters were then placed overnight in blocking buffer containing rabbit serum diluted 1: 200 (v/v) in TBS-Tween, followed by 30 min washing in blocking buffer, 0.1% Tween 20. Bound antibodies were revealed with an ECL kit (Amersham).

Western Blots with Wheat Germ Agglutinin were saturated in 3% BSA in TBS-Tween (15 mM Tris, 140 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween) for 45 min and washed three times for 15 min with TBS-Tween [39]. Horseradish peroxidase labeled Wheat Germ Agglutinin was incubated in TBS-Tween (1/10000) for 1 hour. Blots were washed 3 times with TBS-Tween for 15 minutes and detection was done with the ECL Western blotting detection reagent (Amersham).

In order to control Wheat Germ Agglutinin specificity and avoid non-specific lectin binding, control chase experiments were performed, where 0.2M free N-Acetylglucosamine was added together with WGA for 1 hour.

viii- β -elimination and saccharide analysis of the Pax-6 products

After labeling with 50 μ Ci [¹⁴C]Glucosamine and immunoprecipitation of the Pax-6 products, β -elimination was performed on the samples with 1M sodium borohydride and 0.1M NaOH at 37°C for 72 hours. The reaction was stopped by dropwise addition of ice-cold acetic acid, under stirring, until pH 5.0. The β -eliminated product was dried several times under vacuum with anhydrous methanol in order to remove borate as its methyl ester and then was desalted by descending paper chromatography on Whatman 3 MM paper in a n-butanol/ethanol/water (4/1/1) (v/v/v) solvent. Radioactivity was detected after cutting the lanes into 1-cm pieces and counting. Radioactive fractions were eluted from corresponding regions with water, lyophilised and then

the β -eliminated products were finally analyzed on High pH Anion Exchange Chromatography (HPAEC) [40] on a Dionex HPLC system equipped with a model PAD2 pulsed amperometric detector (Dionex Corp., Sunnyvale, CA). The column was a CarboPac –PA-1 (4 X 250 mm) pellicular anion exchange column with a PA-1 guard column (4 X 50 mm). The column was eluted at a flow rate of 1ml/min with 15 mM NaOH. Fractions were collected, and radioactivity was measured by liquid scintillation counting.

ix- In vitro transcription

The different Pax-6 coding sequences cloned in pSG5 [33] were transcribed *in vitro* using T7 polymerase according to the manufacturer's specifications (Promega). Proteins were translated *in vitro* using a rabbit reticulocyte lysate in the presence of L-[³⁵S]methionine (1000Ci/mmol, Amersham). Ten microliters of extracts containing labeled proteins were incubated for 1 hour at 4°C in 0.5 ml of 25mM HEPES pH 7.5, 12.5 mM MgCl₂, 150 mM KCl, 0.1% Nonidet P40, 20% glycerol with WGA sepharose beads. The beads were washed four times with NETN buffer (100 mM NaCl, 1mM EDTA, 20mM Tris/HCl pH 8, 0.5% Nonidet P40) and bound proteins were released by heat denaturation, analysed on a 10% SDS gel incubated in 16% sodium salicylate, dried and subjected to autoradiography. The percentage of bound radioactivity was calculated using PhosphorImager (Molecular Dynamics).

x- Pax-6-DNA binding assays

The DNA-binding procedure was carried out as previously described [41] using the P6CON probe, a specific DNA sequence known to be recognized by p46 [42] and WGA-selected p46 protein produced in reticulocyte lysates.

To prepare the DNA probes, an oligonucleotide containing the P6CON binding site 5'-GGATGCAATTCACGCATGAGTGCCTCGAGGGATC-3' and its complementary strand were synthesized, annealed and used as DNA probe after 5' end labelling. 10 μ l of reticulocyte lysate expressing the expected Pax-6 isoforms were incubated 1 hour at 4°C with 40 μ l of WGA beads in 500 μ l of buffer A (25 mM Hepes pH 7.5, 12.5 mM MgCl₂, 150 mM KCl, 0.1 % NP40 and 20 % glycerol) [43] followed by 3 washes in buffer B (20 mM Tris/HCl pH 8, 100 mM KCl, 0.5

mM EDTA, 0.1 mM EGTA and 20 % glycerol). The beads were then incubated in 10 μ l of buffer C, 1 μ l poly dIdC at 1 mg/ml and 5 ng of 32 P labeled P6Con probe for 10 min at room temperature. Beads were then washed 4 times in buffer D (10 mM Tris/HCl pH 8, 50 mM NaCl, 0.5 mM EDTA and 0.1 % NP40) and recovered with 30 μ l of the same buffer and the labeled DNA was recovered by phenol/chloroform extraction and loaded on a polyacrylamide gel in Tris/borate/EDTA buffer.

4- Results

i- Pax-6 products are specifically bound by WGA

In order to detect the Pax-6 products, QNRs were isolated and labeled with [³⁵S]Cys/Met for 1 hour. SDS-PAGE analysis of Pax-6 products immunoprecipitated with serum 11 (directed against the paired domain) revealed a predominant doublet with an apparent molecular weight of 48 and 46 kDa respectively and a minor protein of 43 kDa (Fig. 1A). The same proteins were recognized with immune sera 13 (directed against the homeodomain) but not the pre-immune sera p13. Sera 13 also revealed a band of approximately 32/33 kDa. These immunoprecipitated were electro-transferred onto a nitrocellulose sheet and checked for the presence of GlcNAc by western blotting with peroxidase labeled Wheat Germ Agglutinin (WGA). Since GlcNAc residues recognized by WGA may be either N- or O- Glycans linkages, the samples were PNGase F digested before electrophoresis.

The 48/46 kDa double band was stained by WGA but no staining of the 43 nor 32/33 kDa minor bands (Fig. 1B) could be observed. The WGA binding was inhibited by co-incubation with 0.2 M free GlcNAc, a competitive inhibitor of WGA (Fig. 1C). These experiments demonstrate that the 48/46 kDa sized Pax-6 products express O-linked terminal GlcNAc.

ii- In vitro labeling of Pax-6 products with galactosyltransferase

In order to confirm the O-*N*-Acetylglucosaminylation of Pax-6 products, an in vitro labeling approach was used. Bovine galactosyl transferase specifically transfers a [³H]galactose residue from UDP-[³H]galactose on terminal GlcNAc with a β-1,4 linkage. After PNGase F treatment the different immuno-precipitates (sera 11 and 13, and pre-immune serum 13) were incubated with galactosyltransferase for 4 hours. These immunoprecipitates were further analyzed by a 12.5% SDS-PAGE followed by fluorography (Fig. 2). Galactose incorporation was observed for the 46/48 kDa band, but not for the 43 and 33/32 kDa isoforms.

This experiment confirms the previous WGA staining results, and strongly asserts the occurrence of covalently attached terminal GlcNAc on QNR-Pax products O-Glycans.

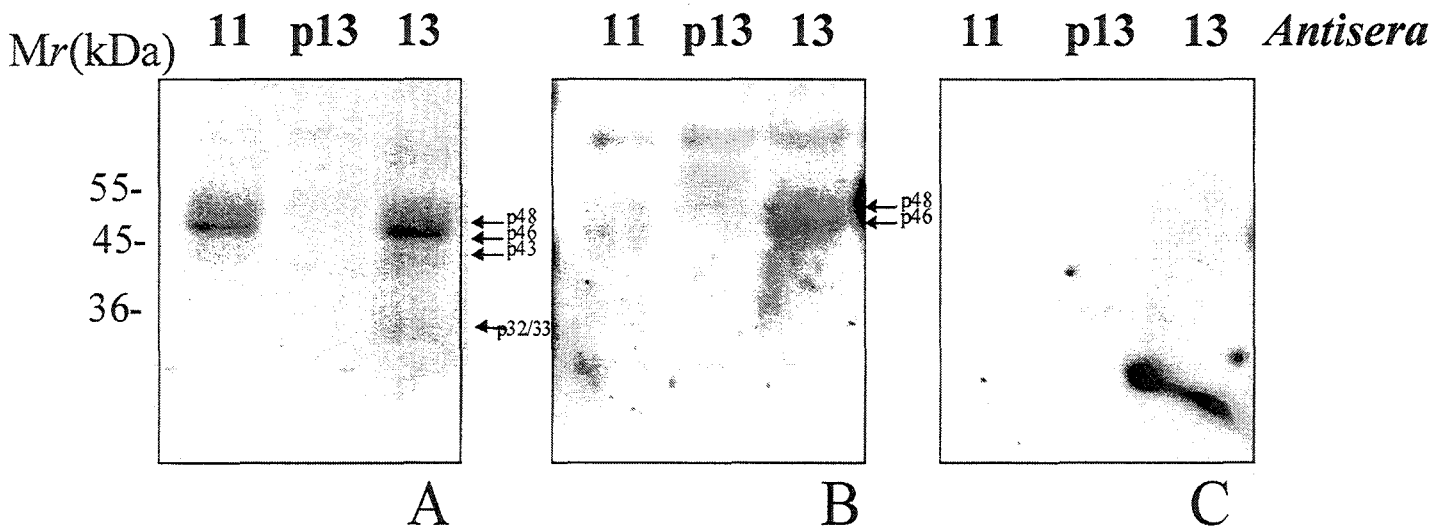


Figure 1- Pax-6 products are specifically bound by WGA

Pax-6 products were immunoprecipitated with serum 11 (directed against the paired domain), immune sera 13 (directed against the homeodomain) and a control was done with pre-immune sera p13. These immunoprecipitated were submitted to a 12.5% SDS-PAGE followed by electro-transferred onto a nitrocellulose sheet and study by autoradiography (Fig. 1A) for [³⁵S]Cys/Met-labeled QNRs or by western blotting with peroxidase labeled-Wheat Germ Agglutinin (WGA) according to their terminal GlcNAc content (Fig. 1B). To avoid terminal N-linked GlcNAc recognition, samples were treated with PNGase F which specifically released N-Glycans. To ensure that recognition by WGA is specific, WGA was co-incubated with 0.2 M GlcNAc (Fig.1C).

iii- [¹⁴C]GlcNH₂ incorporation on the cell culture

QNR were specifically radiolabeled with [¹⁴C]GlcNH₂ overnight. After immunoprecipitation with serum 11 and pre-immune serum 13, and PNGase F treatment, QNR-Pax products were analyzed on a 12.5 % SDS-PAGE gel and visualized by fluorography (Fig. 3). A staining was observed for the 48/46 kDa band but the p43 band remained undetectable confirming the previous experiments.

iv-Determination of the nature of the terminal O-linked GlcNAc

To clearly establish the nature of the saccharide attach to Pax-6 products, the [¹⁴C] glucosamine-labeled Pax-6 products were subjected to alkaline treatment in the presence of an excess of sodium borohydride in order to release the O-linked glycans from the proteins. The released saccharides were analyzed by HPAEC. Figure 4 (A= pre-immune serum 13, and B= immune serum 11) shows that when compared to the different standards a single peak corresponding to [¹⁴C]-*N*-Acetylglucosaminitol was detected. This clearly indicates that this glycosylation consists of single *N*-Acetylglucosamine residue directly O-linked on serine or threonine of the QNR Pax-6 products peptidic backbone. No longer oligosaccharides were observed.

v- Pax-6 products are specifically recognized by WGA in the neuroretina nuclear extracts

We previously reported that the different Pax-6 proteins exhibit distinct nuclear localization signals and distinct subcellular localization and that p48 and p46 were exclusively found into the nucleus whereas the p43 and paired-less p32/33 proteins were localized both into the nucleus and the cytoplasm [31, 33]. We thus address the question whether the glycosylated form of this transcription factor could be found into the nucleus. As shown in Figure 5, neuroretina nuclear extract incubated with WGA-sepharose retain the p48 and p46 Pax-6

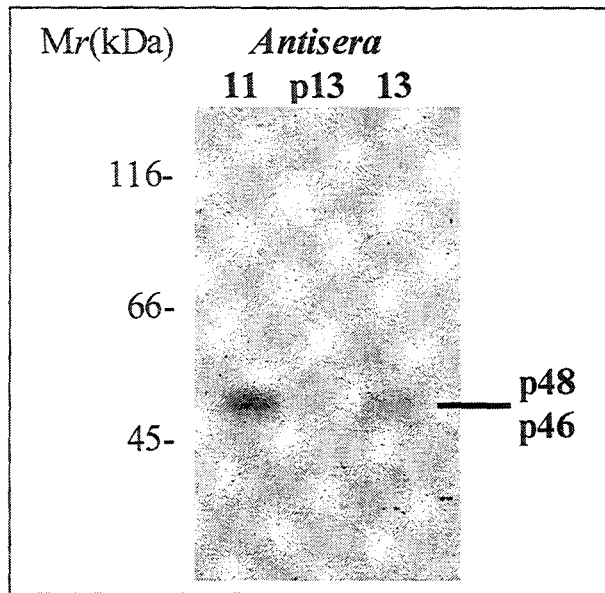


Figure 2- In vitro labeling of Pax-6 products with galactosyltransferase

To confirm that Pax-6 products are glycosylated with terminal GlcNAc on O-linked glycans, we used the bovine galactosyl transferase which specifically transfer a [³H]galactose residue from UDP-[³H]galactose on terminal GlcNAc with a β-1,4 linkage. After treatment with PNGase F the different immuno-precipitates (with sera 11 and 13, and pre-immune serum 13) were incubated with galactosyltransferase for 4 hours and these immunoprecipitates were analyzed by a 12.5% SDS-PAGE followed by fluorography.

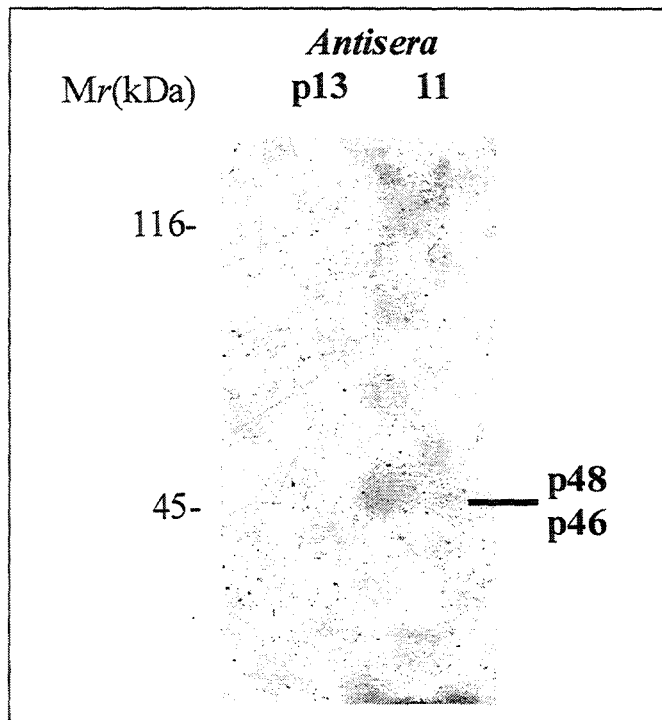


Figure 3- Incorporation of [¹⁴C]GlcNH₂ in the culture cells

QNRs were specifically radiolabeled with [¹⁴C]GlcNH₂ overnight in a glucose poor medium. After immunoprecipitation with serum 11 and pre-immune serum 13, treatment with PNGase F, QNR-Pax products were analyzed on a 12.5% SDS-PAGE gel and visualized by fluorography.

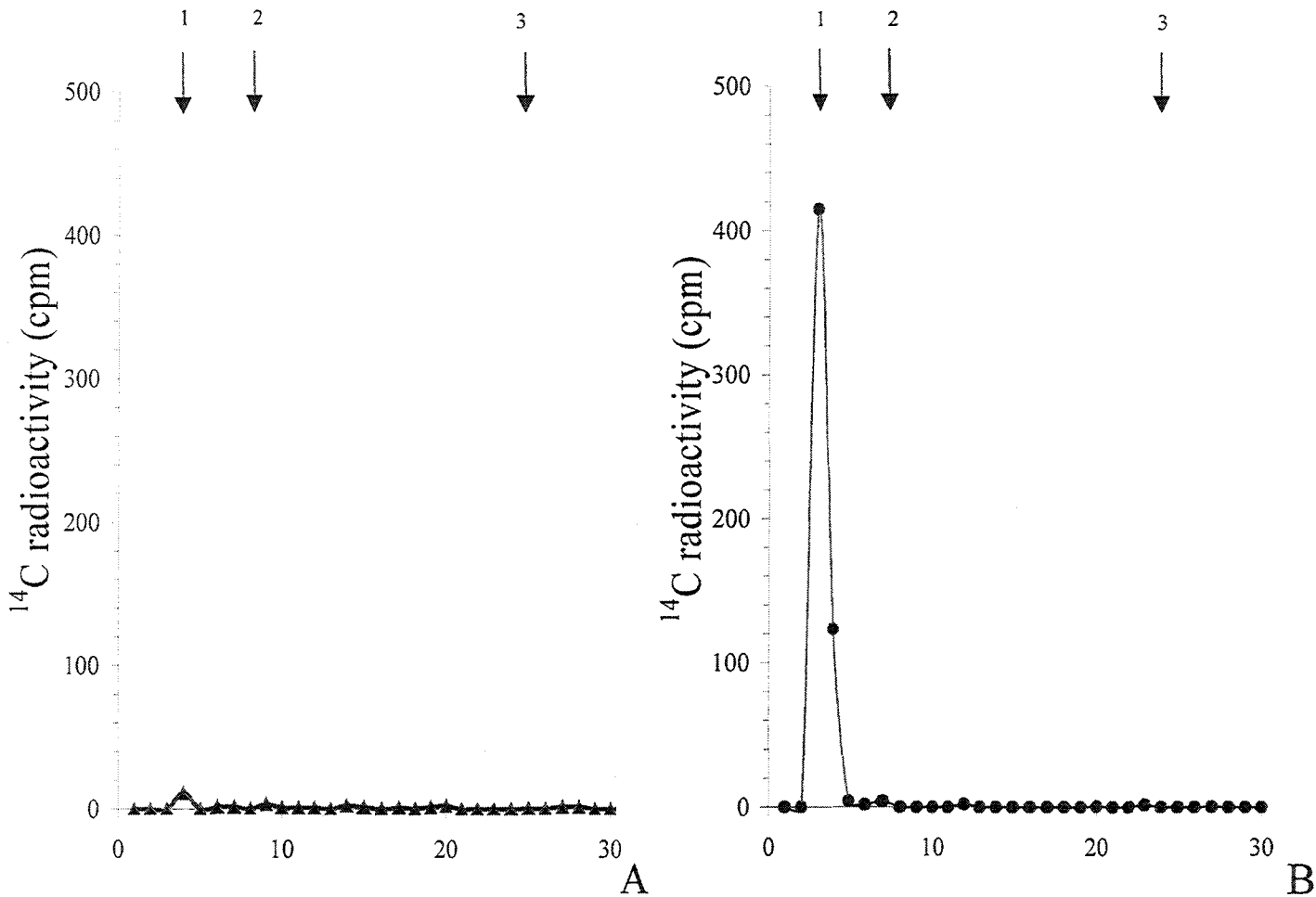


Figure 4- Determination of the nature of the terminal O-linked GlcNAc

To determine the type of saccharide bound on Pax-6 products, the [^{14}C]glucosamine-labeled Pax-6 products were subjected to alkali-induced β -elimination in the presence of excess sodium borohydride to release O-linked sugars to the proteins. The released saccharides were analyzed by HPAEC. (1; Glucosaminitol, 2 ; lactosaminitol, 3 ; Glucosamine). A= pre-immune serum 13, and B= immune serum 11.

isoforms. In contrast, the p43 is only very faintly detected and the paired-less proteins observed in the total nuclear extract are undetected after WGA-enrichment suggesting that in the nucleus the Pax-6 proteins were essentially glycosylated in the paired domain. NIH3T3 nuclear extracts were used as negative controls. According to Xu and Saunders, NIH3T3 cells did not contain Pax-6 products [44].

vi-WGA-selected Pax-6 proteins bind DNA efficiently in vitro.

p53 specific DNA binding has been reported to be modulated by O-glycosylation at the carboxy-terminus [45]. Therefore, we tested whether the WGA-selected Pax-6 isoforms were still able to bind their target DNA *in vitro*. Reticulocyte lysates programmed with Pax-6 RNA encoding each a distinct isoform (Figure 6A) were incubated with the WGA-sepharose in order to recover the glycosylated proteins (Figure 6B). 3% of the paired-containing proteins were recovered after incubation with the WGA beads and only 1% of the paired-less proteins. In contrast to the previous experiments, and especially the results presented in Fig. 5 where the p43 and p32/33 bands are easily detectable, all the QNR Pax isoforms were glycosylated. This may be explained by the difference between the two cellular systems : only p48 and p46 are effectively glycosylated in the original cell (Quail Neuroretina) while all of the isoforms are glycosylated in the reticulocyte. This observation could reflect a difference in the enzymatic content of the different cells, or more probably may be related to a difference in the protein conformation in both cell types.

The WGA-selected p46 proteins or, as control, reticulocytes programmed with an empty pSG5, were incubated with ³²P-labeled P6CON, a specific DNA sequence known to be recognized by p46 [42]. As shown in Figure 6C, the WGA-bound p46 protein is able to bind the P6CON DNA probe. In addition, a non-related DNA sequence was tested and no signal above the background was detected (data not shown).

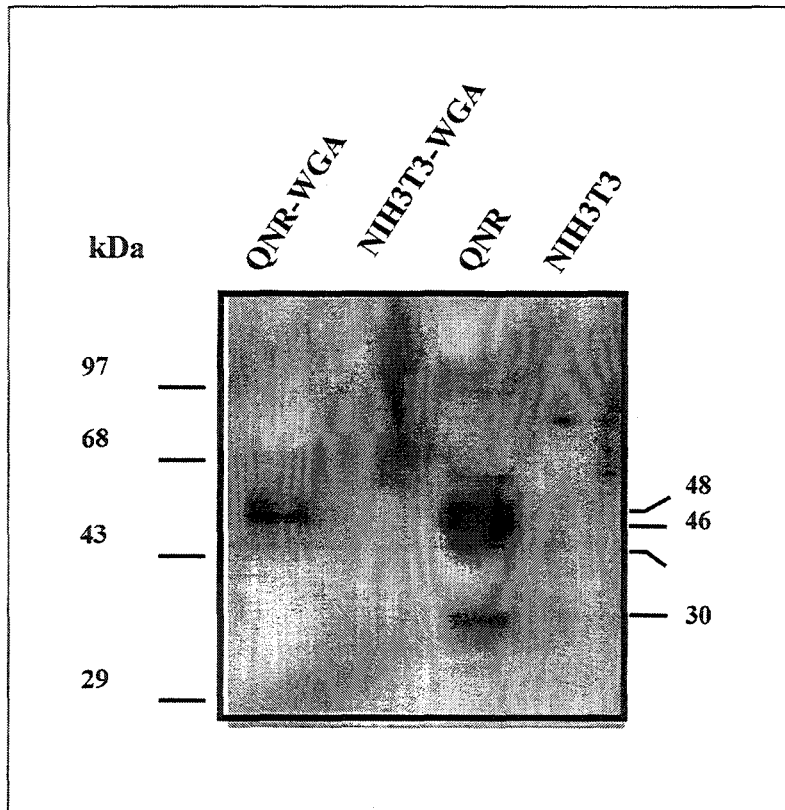


Figure 5- Pax-6 products bound by WGA into neuroretina nuclear extracts

A western blot was performed on neuroretina nuclear extracts (lane QNR), neuroretina cell extracts purified on WGA-agarose beads (lane QNR-WGA) or as a control, with NIH 3T3 nuclear extract (lane NIH3T3) or nuclear extracts purified on WGA-agarose beads (lane NIH3T3-WGA) with rabbit serum 14 directed against the Pax-6 carboxyl terminus. Bound antibodies were detected with an ECL detection kit.

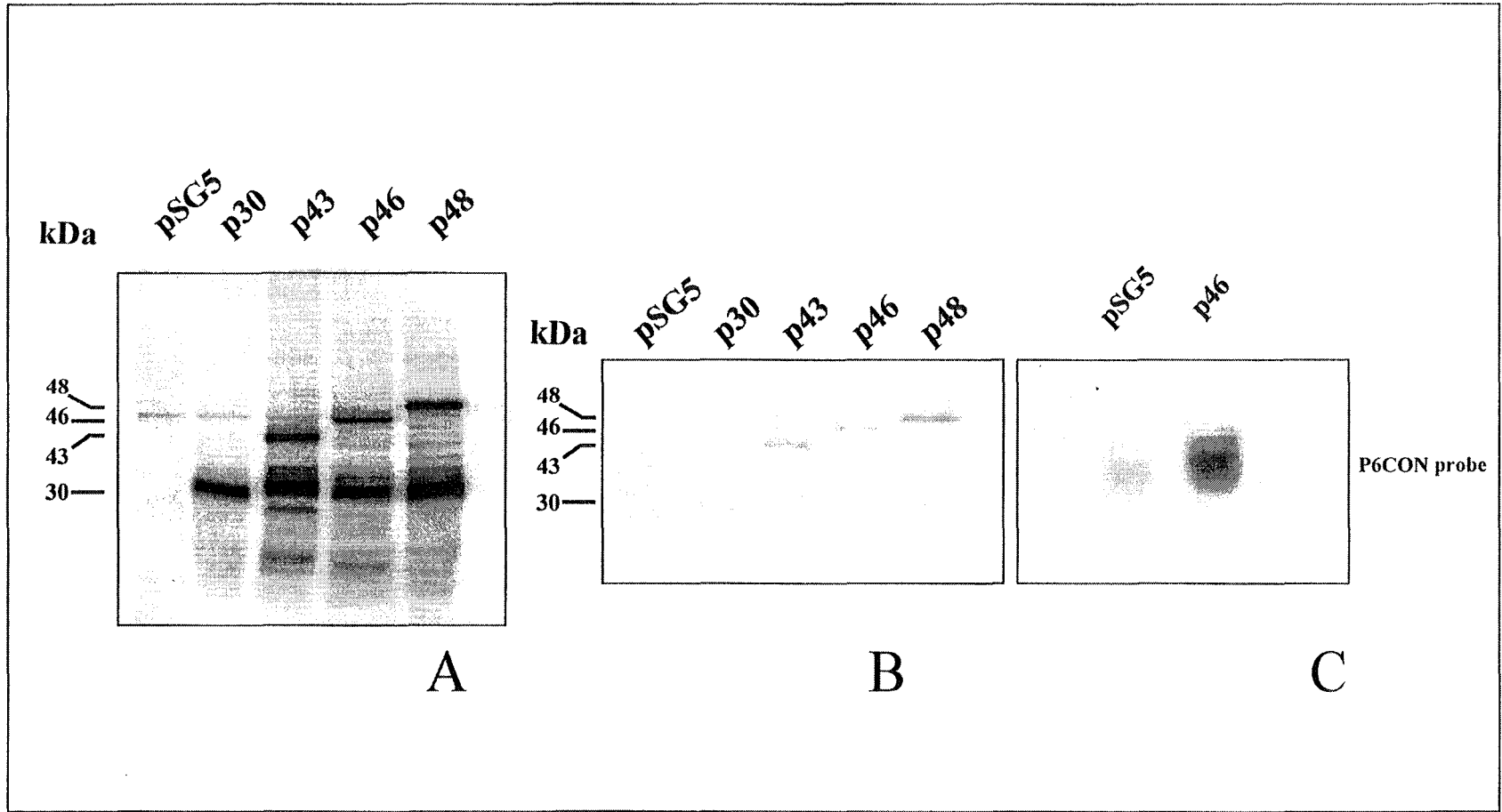


Figure 6- Pax-6 products bound by WGA exhibit a DNA-binding activity in vitro

(A) The Pax-6 cDNAs encoding the p48, p46, p43 and p32/33 proteins were translated in rabbit reticulocyte lysates in the presence of L-^[35S]methionine. (B) Equal amounts of translated proteins were incubated with WGA-agarose beads. The percentage of bound proteins was calculated using a PhosphorImager. (C) The DNA-protein complexes formed between the labeled p6CON probe and the WGA-bound p46 protein were recovered. The probe was extracted and subjected to electrophoresis.

5- Discussion

The limited amount of Pax-6 products, the poor efficiency of tritium and 14 carbon labeling, makes the detection of O-linked glycans on Pax-6 very difficult. In our study we clearly demonstrate using different experimental approaches that the Pax-6 products contain O-linked GlcNAc residues. O-GlcNAc is the most abundant glycosylation type in the cytosolic and the nuclear compartments. Different potential functions have been speculated for O-linked GlcNAc, including a role in the assembly of multimeric protein complexes, a role as phosphorylation antagonist, its involvement in nuclear transport of cytosolic proteins with intervention of the nuclear pore complex O-GlcNAc proteins. According to previous reports of peptide requirements for O-GlcNAc transferase we attempted to predict the potential O-GlcNAc attachment sites for the p46 isoform as indicated in Table 1.

The peptidic sequence analysis indicates at least 12 potential regions for O-N-Acetylglucosamylation (bold type). These regions include Ser/Thr-rich sequences or sequences containing a serine or a threonine residue near (2 or 3 residues) a proline residue. Potential sites for O-GlcNAc are located in the two DNA-binding domains (Paired box ; Black box, Homeodomain ; Stirred box and the L-domain is between these two DNA-binding domains). The highest concentration of putative sites is found in the carboxyterminal portion which contains the transactivator domain. Nevertheless, the WGA selected-proteins of nuclear Pax-6 products suggest that the major O-GlcNAc sites are rather localized in the paired box domain than in the homeo and carboxyterminal domains. The differences observed between the presumed sites from the primary sequence and the effective sites could be explained by the 3-D structure of the different Pax-6 products domains. In this idea, we can assure that O-GlcNAc transferase requirements are both written in the primary peptidic sequence and the three-dimensional conformation of the protein.

In this paper we demonstrated that in QNR O-GlcNAc glycosylation preferentially occurs on the p48 and p46 isoforms, which are only localized in the nucleus, whereas we did not detect O-GlcNAc on the p43 and p32/33 isoforms. These two last isoforms are distributed both in the cytosolic and in the nuclear compartments. In view of this finding, O-GlcNAc could be a resident signal for nuclear proteins. In this idea, a possible role for O-GlcNAcylation in the

1 MQNSHSGVNLGGVFVNGRPL**PDSTR**QKIVELAHSGARPCDISRILOVSN 50
51 GCVSKILGRYYETGSIRPRAIGGSKPRVATPEVVSKIAOYKRECPSIFAW 100
101 EIRDRLLESEGVCTNDNI**PSVSS**INRVLENLASEKQQMGADGMYDKLRMLN 150
151 GQTGTWGTRPGWY**PGTS**VPGQPAQDGCPCQEGGENT**NSISS**NGEDSDEA 200
201 QMRLQLKRRK**LQRNRTSFT**QEQIEALEKEFERTHYPDVFAERERLAAKIDLP 250
251 EARIQVWESNRRRAK**WRREE**KLRNQRRQAS**NTPSHIP**ISSSFSTSVYQPIP 300
301 **QPTTPGS**MLGRDTDALNTYSALPP**PSFT**MANNLPMQPP**PSQTSS**YSC 350
351 ML**PTSPS**VNNGRSYDITYTPPHMQTHMNSQPMG**TSGTTST**GLISPGVSVPVQ 400
401 VPGSEPDMSQYWPRQLQ 416

Table 1- Primary sequence of the QNR Pax-6 p46 isoform

The peptidic sequence analysis indicates at least 12 potential regions for O-N-Acetylglucosaminylation (bold type). Potential sites for O-GlcNAc are located in the two DNA-binding domains (Paired box ; Black box, Homeodomain ; Stirred box and the L-domain is between these two DNA-binding domains).

nucleo-cytoplasmic transport has been recently presumed by Duverger *et al*, [16-18]. They have demonstrated that serum albumin substituted with β -di-*N*-acetylchitobioside (GlcNAc β -1, 4 GlcNAc) or α -glucosyl is transported in the nucleus in a time-and ATP-dependent manner.

Gene transcription is under the control of cis-acting sequences that are recognized by DNA binding proteins, which activate or repress the transcription, via interactions with other components of the transcriptional machinery. O-GlcNAc residues expected to be present in the paired box and in the homeodomain could play a role in the DNA binding and/or in protein-protein interaction. WGA-enriched proteins are able to precipitate p46 together with a specific DNA sequence : P6CON [42]. Additionally non-glycosylated p46 expressed by *Escherichia coli* is able to bind the same DNA target (not shown). This observation indicates that O-GlcNAc residues in p46 isoform of Pax-6 do not directly interact with DNA. Indeed these residues remain accessible to WGA after binding with the DNA specific sequence. Possibly these O-GlcNAc residues could interact with other cellular components for activation or repression of the transcriptional mechanism. Numerous transcription factors were demonstrated to be O-GlcNAc modified. Jackson *et Tjian* [8] have tested eight RNA polymerase II transcription factors : Sp1, AP-1, AP-2, AP-4, CTF, Zeste, GAGA and ADF-1, that are all O-GlcNAc glycosylated. These authors demonstrated that the glycosylated Sp1 isoform was 3-5 fold more efficient in activating transcription than the unglycosylated recombinant protein produced in *Escherichia coli*. According to this, it is interesting to mention that the cDNA for many transcription factors are available, and that many groups now use *E. coli* recombinant transcription factors for functional studies. Such *in vitro* transcription system is not available for Pax-6. The results obtained for Sp1 showed that WGA specifically represses the transcriptional activity of Sp1, suggesting that the glycosylation directly contribute to the transcriptional activation function of Sp1. Roos *et al*, [21] have shown that Sp1 O-GlcNAc transactivation domain fails to bind to Sp1 partners whereas non-glycosylated Sp1 transactivation domain binds efficiently to the same protein (the glycosylation block Sp1 dimerization and association with TAFII110). Studies also demonstrated that O-GlcNAc residue may ensure a protective role towards proteolysis in the case of Sp1 and ER [46, 47]. The role of O-GlcNAc glycosylation in other transcription factors is still poorly understood. As a conclusion, O-GlcNAc plays different roles in the regulation of the activity of transcription factors. If the glycosylation do not directly affect the DNA binding of many transcription factors, it may modulate their interaction with other proteins. This may be the case

for Pax-6 that binds a specific DNA sequence in its glycosylated or unglycosylated forms, the O-GlcNAc residues remaining accessible for other components. In this respect, inhibitory interactions involving the paired domain have been described between Pax-6 and Engrailed-1 [48] and the Pax-6 homeodomain is found to interact with both the TATA-box-binding protein TBP and the antioncogene Rb [49]. Since the Pax-6 transcription factor could act as an activator [33, 34, 50] or a repressor of targets promoters transcription [51], the O-GlcNAc modification, that could functions to inhibit the interactions between proteins [21], may be an essential determinant to define the positive or the negative activity of Pax-6. Pax-6 proteins exhibit potential O-GlcNAc sites in the carboxyterminal activation domain. Starting from the different Pax-6 products, a higher recovery of paired-containing protein with WGA was constantly obtained. Since the carboxyterminal domain is also present in the p32/33 paired-less protein, this suggests that either the paired domain contains more O-GlcNAc than the carboxyterminal domain or that conformational constraint, specific to the paired-less proteins avoid the O-GlcNAcylation of the carboxyterminus. O-GlcNAc modification has been found to undergo dynamic changes often in a signal-dependent manner [36] and this modification have been compared to phosphorylation [52]. We have already observed a balance between O-GlcNAc modification and phosphorylation [13] suggesting that these modifications could be coupled and may affect the activity of the Pax-6 proteins in a cell-specific manner.

6- Acknowledgments :

This work was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique (UMR CNRS 8576, Director Prof. André VERBERT), the Institut Pasteur de Lille, the Association Francaise Retinitis Pigmentosa, the Association pour la Recherche contre le Cancer. We thank Dr J. LEMOINE for helpful discussions during the preparation of this manuscript and we also thank Pr O. K. TOLLERSRUD for English criticisms.

7- Abbreviations

QNR, quail neuroretina ; BSA, bovine serum albumin ; GlcNAc, *N*-Acetylglucosamine ; GalNAc, *N*-Acetylgalactosamine; PBS, Phosphate-buffered saline ; TBS, Tris-buffered saline ; PNGase F, Peptide-*N*-glycosidase F ; WGA, Wheat germ agglutinin ; SDS-PAGE, Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis ; UDP-GlcNAc, Uridine diphospho *N*-Acetylglucosamine ; GST, Glutathione S-transferase

8- References

- [1] Torres, C.-R. & Hart, G.W. (1984) Topography and Polypeptide Distribution of terminal N-Acetylglucosamine Residues on the Surface of Intact Lymphocytes, Evidence for O-linked GlcNAc. *J. Biol. Chem.* 259, 3308-3317
- [2] Hart, G. W., Haltiwanger, R. S., Holt, G. D., & Kelly, W. G. (1989) Glycosylation in the nucleus and cytoplasm. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 841-874
- [3] Chou C. F., Smith A.J. & Omary M.B. (1992) Characterization and dynamics of O-linked glycosylation of human cytokeratin 8 and 18. *J. Biol. Chem.* 267, 3901-3906
- [4] Dong, D. L.-Y, Xu, Z. -S., Chevrier, M. R., Cotter, R. J., Cleveland, D. W., & Hart, G. W. (1993) Glycosylation of Mammalian Neurofilaments. Localization of multiple O-linked N-Acetylglucosamine moieties on neurofilament polypeptides L and M. *J. Biol. Chem.* 268, 16679-16687
- [5] Holt, G. W., Snow, C. M., Senior, A., Haltiwanger, R. S., Gerace, L. & Hart, G. W. (1987) Nuclear Pore Complex Glycoproteins Contain Cytoplasmically Disposed O-linked N-Acetylglucosamine. *J. Cell. Biol.* 104, 1157-1164
- [6] Lubas, W. A., Smith, M., Starr, C. M. & Hanover J. A. (1995) Analysis of Nuclear Pore Protein p62 Glycosylation. *Biochemistry* 34, 1686-1694
- [7] Caillet-Boudin, M.-L., Strecker, G. & Michalski, J.-C. (1989) O-Linked GlcNAc in serotype-2 adenovirus fibre. *Eur. J. Biochem.* 184, 205-211
- [8] Jackson, S. P. & Tjian, R. (1988) O-Glycosylation of Eukaryotic Transcription Factors : Implications for Mechanism of Transcriptional Regulation. *Cell* 55, 125-133
- [9] Chou, T. -Y., Dang, C. -V. & Hart, G.W. (1995) Glycosylation of the c-Myc transactivation domain. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* 92, 4417-4421
- [10] Medina, L., Grove, K. & Haltiwanger, R. S. (1998) SV40 large T antigen is modified with O-linked N-Acetylglucosamine but not with other forms of glycosylation. *Glycobiology* 8, 383-391
- [11] Haltiwanger, R. S., Busby, S., Grove, K., Li, S., Mason, D., Medina, L., Moloney, D., Philipsberg, G. & Scartozzi, R. (1997) O-Glycosylation of Nuclear and Cytoplasmic Proteins : Regulation Analogous to Phosphorylation ? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 231, 237-242

- [12] Chou, T. -Y., Hart G.W. & Dang, C. -V. (1995) c-Myc is glycosylated at threonine 58, a known phosphorylation site and a mutational hot spot in lymphomas. *J. Biol. Chem.* 270, 18961-18965
- [13] Lefebvre, T., Alonso, C., Mahboub, S., Dupire, M. -J., Zanetta, J. -P., Caillet-Boudin, M. -L. & Michalski, J. -C. (1999) Effect of okadaic acid on O-linked N-Acetylglucosamine levels in a neuroblastoma cell line. *Bioch. Bioph. Acta.* 1471, 71-81
- [14] Haltiwanger, R. S., Grove, K. & Philipsberg, G. A. (1998) Modulation of O-Linked N Acetylglucosamine Levels on Nuclear and Cytoplasmic Proteins in Vivo Using the Peptide O-GlcNAc- β -N-acetylglucosaminidase Inhibitor O-(2-Acetamido-2-deoxy-D-glucosaminopyranosylidene)amino-N-phenylcarbamate. *J. Biol. Chem.* 273(6), 3611-3617
- [15] Roquemore, E. P., Chevrier, M. R., Cotter, R. J. & Hart, G. W. (1996) Dynamic O-GlcNAcylation of the Small Heat Shock Protein α B-Crystallin. *Biochemistry* 35, 3578-3586
- [16] Duverger E., Carpentier, V., Roche A. -C. & Monsigny M. (1993) Sugar-Dependent Nuclear Import of Glycoconjugates from the cytosol. *Exp. Cell Res.* 207, 197-201
- [17] Duverger E., Pellerin-Mendes, C., Mayer, R., Roche A. -C. & Monsigny M. (1995) Nuclear import of glycoconjugates is distinct from the classical NLS pathway. *J. Cell. Sci.* 108, 1325-1332
- [18] Duverger E., Roche A. -C. & Monsigny M. (1996) N-Acetylglucosamine-dependent nuclear import of neoglycoproteins. *Glycobiology* 6, 381-386
- [19] Finlay, D. R., Newmeyer, D. D., Price, T. M. & Forbes D. J. (1987) Inhibition of in vitro nuclear transport by a lectin that binds to nuclear pores. *J. Cell. Biol.* 104, 189-200
- [20] Kelly, W.G., Dahmus, M.E. & Hart, G.W. (1991) The C-Terminal Domain of RNA polymerase II is modified by O-Linked GlcNAc. *Glycoconjugate J.* 8, 212
- [21] Ross, M. D., Su, K., Baker, J. R. & Kudlow, J. E. (1997) O-glycosylation of an Sp1-derived peptide blocks known Sp1 protein interactions. *Mol. Cell. Biol.* 17, 6472-6480
- [22] Haltiwanger, R. S., Blomberg, M. A. & Hart, G. W. (1992) Glycosylation of Nuclear and Cytoplasmic Proteins: purification and characterization of a uridine diphospho-N-Acetylglucosamine : Polypeptide β -N-Acetylglucosaminyltransferase. *J. Biol. Chem.* 267, 9005-9013. Dong, D. L.-Y. & Hart, G. W. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 19321-19330

- [23] Dong, D. L.-Y., & Hart, G. W. (1994) Purification and Characterization of an O-GlcNAc Selective N-Acetyl- β -D-glucosaminidase from rat cytosol. *J. Biol. Chem.* 269, 19321-19330
- [24] Halder, G., Callaerts, P. and Gerhing, W. J. (1995). Induction of ectopic eyes by targeted expression of the *eyeless* gene in *Drosophila*. *Science* 267,1788-1792.
- [25] Chow, L.R., Altmann, R.C., Lang, A.R. and Hemmati-Brivanlou, A. (1999). Pax6 induces ectopic eyes in vertebrate. *Development* 126, 4213-4222.
- [26] Hill, R.E., Favor, J., Hogan, B., Ton, C.C., Saunders, G., Hanson, I., Prosser, J., Jordan, T., Hastie, N and Heyningen, V.V (1991) Mouse small eye results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene. *Nature* 354, 522-525.
- [27] Glaser, T., Jepeal, L., Edwards, J.G., Young, R., Favor, J and Maas, R.L (1994) Pax-6 gene dosage effect in a family with congenital cataracts, aniridia, anophthalmia and central nervous system defects. *Nature genet.* 7, 463-471.
- [28] Gruss, P. & Walther, C. (1991) Pax-6 a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* 113, 1435-1449
- [29] St-Onge, L., Sosa-Pineda, B., Chowdhury, K., Mansouri, A. and Gruss, P. (1997). Pax6 is required for differentiation of glucagon-producing α -cells in mouse pancreas. *Nature* 387, 406-409.
- [30] Martin, P., Carrière, C., Dozier, C., Quatannens, B., Mirabel, M., Vandenbunder, B., Stéhelin, D and Saule, S (1992) Characterization of a pairedbox- and homeobox-containing quail gene (Pax-6) expressed in the neuroretina. *Oncogene* 7, 1721-1728.
- [31] Carriere, C., Plaza, S., Martin, P., Quatannens, B., Bailly, M., Stehelin, D., & Saule, S. (1993) Characterization of Quail Pax-6 (Pax-6) Proteins Expressed in the Neurotina. *Mol. Cell. Biol.* 13, 7257-7266
- [32] Kissinger C. R. , Liu B. S., Martin-Blanco E., Kornberg T. B. & Pabo C. O. (1990) Crystal structure of an engrailed homeodomain-DNA complex at 2.8 Å resolution: a framework for understanding homeodomain-DNA interactions. *Cell* 63, 579-90
- [33] Carrière, C., Plaza, S., Caboche, J., Dozier, C., Bailly, M., Martin, P., & Saule, S. (1995) Nuclear Localization Signals, DNA Binding, and Transactivation Properties of Quail Pax-6 (Pax-QNR) Isoforms. *Cell Growth Differ.* 6,1531-1540

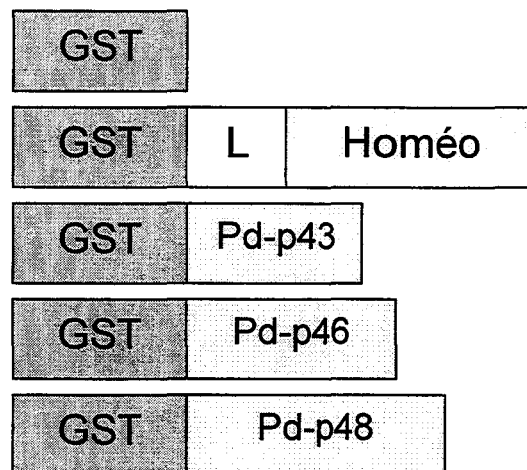
- [34] Plaza S., Dozier C. & Saule S. (1993) Quail Pax-6 (Pax-QNR) encodes a transcription factor able to bind and trans-activate its own promoter. *Cell Growth Differ.* 4, 1041-50
- [35] Ritz-Laser, B., Estreicher, A., Klages, N., Saule, S. and Philippe, J. (1999). Pax-6 and Cdx-2/3 interact to activate glucagon gene expression on the G1 control element. *J. Biol. Chem.* 274, 4124-4132.
- [36] Kears, K.P. & Hart, G. W. (1991) Topology of O-linked N-Acetylglucosamine in murine Lymphocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 290, 543-548
- [37] Whiteheart, S., W., Passaniti, A., Reichner, J. S., Holt, G. D., Haltiwanger, R. S. & Hart, G. W. (1989) Glycosyltransferase probes. *Methods in Enzymology* 179, 82-95
- [38] Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- [39] Datta, B., Ray, M. K., Chakrabarti, D., Wylie, D. E. & Gupta, N. K. (1989) Glycosylation of Eukaryotic Peptide Chain Initiation Factor 2 (eIF2)-associated 67-kDa Polypeptide (p⁶⁷) and its possible Role in the Inhibition of eIF-2 Kinase-catalysed Phosphorylation of the eIF-2 α -Subunit. *J. Biol. Chem.* 34, 20620-20624
- [40] Diekmann-Schuppert, A., Bause, E. & Schwarz, R., T. (1993) Studies on O-glycans of Plasmodium-falciparum-infected human erythrocytes. Evidence for O-GlcNAc – transferase in malaria parasites. *Eur. J. Biochem.* 216, 779-788
- [41] Hay, N., Takimoto, M., and Bishop, J.M. (1989) A FOS protein is present in a complex that binds a negative regulator of MYC. *Genes Dev.* 3, 293-303.
- [42] Epstein, J.A., Glaser, T., Cai, J., Jepeal, L., Walton, D.S. and Maas, R.L. (1994) Two independent and interactive DNA-binding subdomains of the Pax6 paired domain are regulated by alternative splicing. *Genes & Development* 8, 2022-2034.
- [43] Dignam, J.D., Lebovitz, R.M., and Roeder, R.G. (1983) Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res.*, 11, 1475-1489.
- [44] Xu, Z. P. and Saunders, G. F. (1997) Transcriptional regulation of the human PAX6 gene promoter. *J. Biol. Chem.* 272, 3430-3436
- [45] Shaw, P., Freeman, J., Bovey, R and Iggo, R. (1996) Regulation of specific DNA binding by p53: evidence for a role for O-glycosylation and charged residues at the carboxy-terminus. *Oncogene* 12, 921-930.

- [46] Han, I. & Kudlow, J., E. (1997) Reduced O-glycosylation of Sp1 is associated with increased proteasome susceptibility. *Mol. Cell. Biol.* 17, 2550-2558
- [47] Jiang, M., -S. & Hart, G., W. (1997) A subpopulation of estrogen receptors are modified by O-linked N-acetylglucosamine. *J. Biol. Chem.* 272, 2421-2428
- [48] Plaza, S., Langlois, M.C., Turque, N., LeCornet, S., Bailly, M., Bègue, A., Quatannens, B., Dozier, C. and Saule, S. (1997) The homeobox-containing Engrailed (En-1) product down-regulates the expression of Pax-6 through a DNA binding-independent mechanism. *Cell Growth Differ.* 8, 1115-1125.
- [49] Cvekl, A., Kashanchi, F., Brady, J.N. and Piatigorsky, J. (1999) Pax-6 interactions with TATA-Box-binding protein and retinoblastoma protein. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 40, 1343-1350.
- [50] Plaza, S., Dozier, C., Langlois, M.C. & Saule, S. (1995) Quail Pax-6 (Pax-QNR) mRNAs are expressed from two promoters used differentially during retina development and neuronal differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 15(2), 892-903
- [51] Duncan, M.K., Haynes, J.I., Cvekl, A. and Piatigorsky, J. (1998) Dual roles of Pax-6: a transcriptional repressor of lens cell-specific β -crystallin genes. *Mol. Cell. Biol.* 18, 5579-5586.
- [52] Hart, G.W. (1997) Dynamic O-GlcNAcylation of nuclear and cytoskeletal proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 315-335.

IV- Glycosylation *in vitro* des différents domaines des produits du gène Pax-6 exprimés chez *E. coli*

Cette manipulation consiste en la glycosylation à partir d'UDP-[¹⁴C]GlcNAc des différents domaines des produits du gène Pax-6. Ces domaines sont exprimés chez *E. coli*, ce qui implique qu'ils ne sont pas glycosylés. Pour cela les différents domaines ont été produits de sorte que la glutathion-S-transférase (GST) se retrouve en position N- terminale, ce qui permet de fixer les différents domaines sur des billes couplées au glutathion et donc de les insolubiliser (Pd, paired).

De cette manière, il a été préparé les constructions suivantes:



Après insolubilisation ces différentes constructions sont incubées avec 0.5 μ Ci d'UDP-[¹⁴C]GlcNAc, dans 50 mM de tampon cacodylate de sodium pH 6.0, 5 mM de MnCl₂, et 2.5 mM de 5'-AMP (Haltiwanger *et al*, 1992). Un extrait de cytosol de foie de rat a ensuite été ajouté (v/v) : cet extrait contient l'enzyme greffant les résidus de O-GlcNAc (la O-GlcNAc transférase). La réaction de glycosylation *in vitro* a été faite à différentes températures : 4, 28 et 40°C pendant 4 heures sous agitation. Enfin les protéines couplées sont centrifugées et lavées plusieurs fois. Les résultats de comptage sont indiqués sur la figure 7 (le contrôle correspond à une incubation sans billes). Il y a une incorporation de [¹⁴C]GlcNAc sur les différents domaines de liaison à l'ADN des produits du gène Pax-6, produits chez *E. coli*. Cette glycosylation est d'autant plus efficace, que la température est élevée. Il y a très peu ou pas d'incorporation de [¹⁴C]GlcNAc sur les billes GST, par contre tous les domaines de liaison à l'ADN de Pax-6 sont accepteurs de

l'UDP-[¹⁴C]GlcNAc. En fait on voit que le domaine paired semble plus glycosylable que le domaine homéo, et plus le le domaine paired est long plus il est glycosylable. Malheureusement on ne peut pas faire de comparatif de capacité de glycosylation entre ces domaines car il est difficile de quantifier la quantité de chacune constructions incubées. Par cette technique on peut seulement définir la capacité d'une protéine à être glycosylable.

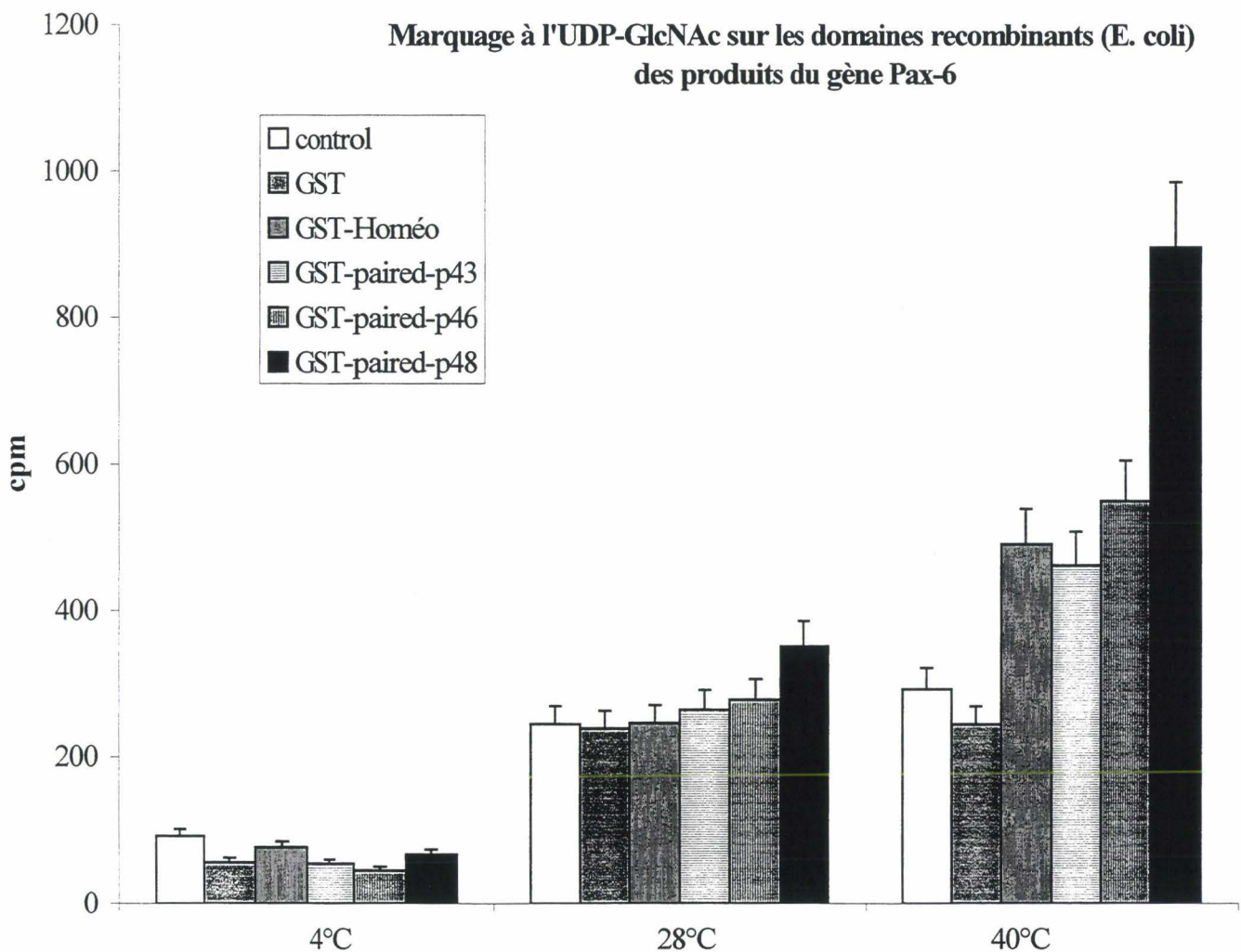


Figure 7- Marquage des domaines de liaison à l'ADN des produits du gène Pax-6 synthétisés chez E. coli à l'UDP-[¹⁴C]GlcNAc ;

4^{ème} Partie :

Etude des lectines cytosoliques et nucléaires à

GlcNAc du foie de rat et de leurs ligands

endogènes, implication possible de ces

lectines dans le transport des protéines

cytosoliques vers le noyau

I- Généralités sur les lectines animales

1- Définition des lectines

Les lectines, du latin *legere* qui signifie sélectionner, aussi appelées en anglais *Carbohydrate-binding proteins*, sont des protéines ou des glycoprotéines d'origine non-immunes capables de reconnaître de manière non-covalente et spécifique une structure glycanique libre ou conjuguée (lipide ou protéine). Les lectines sont répandues à travers tout le monde vivant, des procaryotes aux eucaryotes.

Nous ne nous étendrons pas sur les lectines végétales (100 ont été isolées, 50 séquencées et 20 ont leur structure 3D connue), malgré tout nous pouvons mentionner que ces lectines se répartissent en deux grandes familles : les lectines des céréales comme la *Wheat Germ Agglutinin* (WGA) et les lectines des légumes comme la *Concanavaline A* (ConA) ou la *Soybean Agglutinin* (SBA) (Sharon, 1993). Elles sont composées de 2 à 4 sous-unités de 25-30 kDa, et nécessitent souvent du Ca^{2+} et du Mn^{2+} . Ces lectines de plantes sont très largement utilisées comme lectine-outil, soit sous la forme libre, soit sous la forme conjuguée (phosphatase alcaline, peroxydase, dérivé fluorescent, biotine, digoxigénine, sépharose ...) dans la détection et l'isolement de glycoprotéines et dans l'identification partielle de structures glycaniques.

2- Historique

Quelques dates intéressantes sur la découverte et la compréhension du rôle des lectines sont répertoriées ci-dessous (pour revue Sharon *et* Lis, 1998).

La ricine a été la première lectine mise en évidence (*Ricinus communis*) par Rudolf Kober en 1888. P. H. Stillmark remarque que celle-ci possède la particularité d'agglutiner les érythrocytes. En 1919, James B. Summer cristallise la concanavaline A (lectine de *Canavalia ensiformis*) et isole ainsi pour la première fois une lectine. Le même auteur démontre la spécificité glycanique de cette lectine en 1936. La spécificité des lectines pour les groupes sanguins sera découverte dans les années 1948-49. La première lectine isolée d'un microorganisme a été l'hémagglutinine du virus de l'influenzae (1950) et la première lectine de mammifère a été décrite par Gilbert Ashwell et Anatol G. Morell en 1974. C'est une lectine hépatique (récepteur) impliquée dans l'élimination des asialoglycoprotéines. P. C. Nowell démontre en 1960 que la phytoagglutinine est capable de stimuler l'activité

mitogène des lymphocytes. En 1976, N. Sharon *et al*, découvriront que les lectines bactériennes jouent un rôle dans l'inflammation. Reuben Lotan et Abraham Raz démontreront en 1981 qu'une lectine de surface (sur des tumeurs murines et humaines) est impliquée dans le développement de métastases. Cette lectine est présente seulement au niveau des cellules tumorales et pas sur les cellules normales. En 1983, le rôle des lectines dans la domiciliation des lymphocytes sera découvert et en 1990 la fonction des sélectines dans l'inflammation est démontrée.

3- Rôle des lectines animales

Les lectines animales jouent un rôle dans de nombreux processus biologiques (Gabiuss, 1997) tels que le repliement protéique (folding), le trafic des protéines (lectines cytoplasmiques, nucléaires ou membranaires) ou dans les interactions cellule-cellule (homotypique pour des cellules identiques et hétérotypique pour des cellules différentes). Ces interactions cellule-cellule peuvent intervenir dans divers processus répertoriés dans le tableau VII ci-dessous :

Tableau VII – Les principaux types d'interactions cellule-cellule dans lesquels interviennent les lectines

PROCESSUS	Localisation des	
	motifs glycaniques	lectines
<i>Infection</i>	cellule infectée	microorganismes
<i>Défense</i>	cellules phagocytaires microorganismes	microorganismes cellules phagocytaires
<i>Fertilisation</i>	ovocyte	spermatozoïde
<i>Trafic leucocytaire</i>	leucocytes cellules endothéliales	cellules endothéliales leucocytes
<i>Métastase</i>	organes cibles cellules malignes	cellules malignes organes cibles
<i>Symbiose</i>	plante (légumineuses)	rhizobiacées

Dans ces interactions cellule-cellule on peut retrouver (dans les interactions suivantes, nous désignerons par cellule, une cellule animale, ou végétale si spécifiée) :

- des interactions cellule-virus : c'est le cas par exemple du virus de la grippe qui possède une hémagglutinine capable de reconnaître les acides sialiques sur la glycophorine des cellules humaines. Après adsorption du virus sur la cellule, une neuraminidase virale désialyle ces points d'attachement ce qui a pour effet d'éviter la surinfection par un nouveau virus,

- des interactions cellule-bactérie : ceci concerne principalement les bactéries pathogènes à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa* dans la mucoviscidose. On peut citer comme exemple bien connu aussi l'adhésion d'*Helicobacter pylori* sur les cellules gastroépithéliales, agent impliqué dans la formation des ulcères gastriques. Dans ce cas il n'y a pas de pénétration de la cellule hôte mais adsorption seulement aux tissus (muqueuses, endothéliums, épithéliums...). Chez les bactéries on va avoir trois types de support pour ces lectines : le flagelle, les pilis et la membrane externe),

Dans ces interactions cellule-bactérie, on ne peut oublier les interactions entre légumineuses et le rhizobium (bactérie fixant l'azote) dans les phénomènes de symbiose (processus important dans le cycle de l'azote),

- des interactions cellule-protozoaire comme pour les amibes dans la dysenterie (colonisation de la muqueuse colique),

- des interactions cellule-champignon, c'est le cas de *Candida albicans* au niveau de la peau et des muqueuses,

- des interactions cellule-cellule : au niveau des métazoaires comme par exemple pour l'adhésion des leucocytes sur les cellules endothéliales (intervention des sélectines), par l'intermédiaire des sélectines, pour la défense de l'organisme. Ce phénomène est appelé domiciliation (*homing* en anglais) et permet aux lymphocytes de migrer vers les sites de l'infection. Ces interactions cellule-cellule jouent également un rôle au niveau métastatique (intervention des galectines) et au niveau des interactions des cellules embryonnaires avec par exemple le SSEA-1 (*Stage-Specific Embryonic Antigen 1*), qui apparaît spécifiquement au niveau de la transition 8-16 cellules, ou le sialyl Lewis^x.

Certaines lectines animales jouent un rôle dans le trafic intracellulaire : c'est le cas des récepteurs à Man-6-P dans le transport d'enzymes lysosomales (nous en reparlerons dans le paragraphe sur les lectines du type-P). D'autres lectines jouent un rôle de transporteur du réticulum endoplasmique vers le Golgi comme ERGIC-53 (*Endoplasmic Reticulum-Golgi Intermediate Compartment*), ou du Golgi vers la membrane plasmique comme VIP36 (*Vesicular Integral Protein*) (Yamashita *et al*, 1999).

L'exemple le mieux connu de lectines jouant un rôle dans le repliement protéique est celui joué par la calcineurine et la calréticuline dans le réticulum endoplasmique. Nous avons aussi consacré un petit paragraphe à ces lectines.

4- Les différentes familles de lectines animales

Dans les lectines animales on va retrouver différentes familles regroupées dans le tableau ci-dessous (Powell *et Varki*, 1995) avec leur dépendance vis-à-vis du calcium et le motif saccharidique reconnu (*terminal elaboration*) : on y retrouve principalement des lectines du type-C, les galectines (dénommées il y a encore quelques années lectines du type-S) et les lectines du type-I (sialoadhésines) (Schématisées sur la figure 17). Ces différentes lectines peuvent être regroupées aussi par leurs homologies de séquences. Une centaine de lectines animales a pu être caractérisée à ce jour.

Tableau VIII – Les principales familles de lectines animales

FAMILLES	Dépendance vis-à-vis du calcium	Motif saccharidique reconnu (<i>terminal elaboration</i>)
Type-C	Oui	Variable : Glc, GlcNAc, Gal et Fuc
Galectines (Type-S)	Non	β -Galactosides
Type-P	Variable	Man-6-P
Type-I	Non	Acides sialiques
Pentraxines	Oui	Variable
Calnexine et calciréticuline	Oui	Oligosaccharides glucosylés

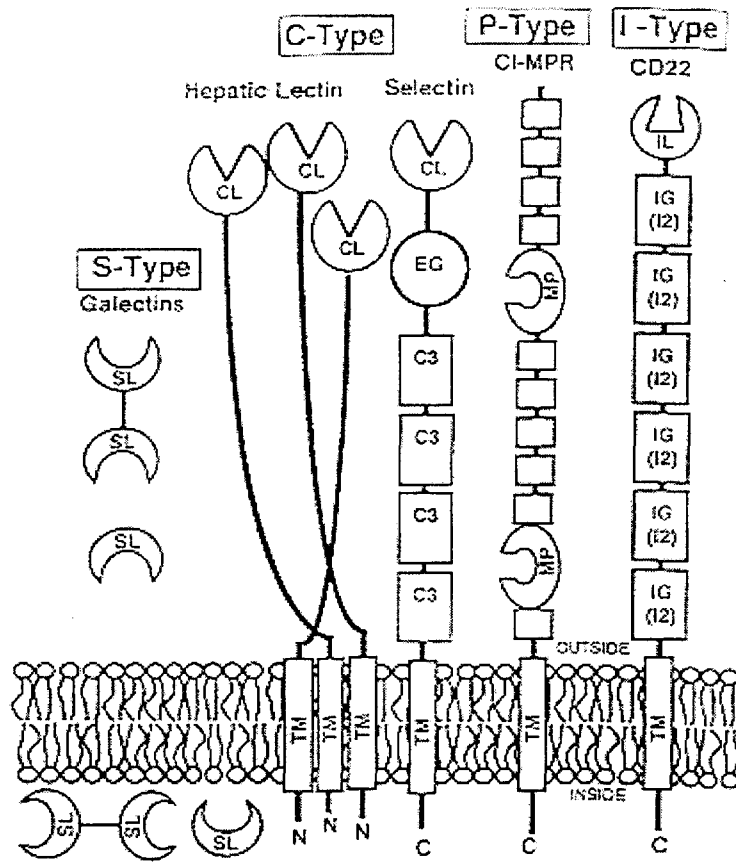


Figure 17 – Représentation schématique des principales familles de lectines animales (Extrait de Varki, 1999 ; Essentials of Glycobiology)

i- Les lectines du type-C

a- Caractéristiques et rôles des lectines du type-C

Les lectines animales du type-C sont caractérisées par le fait que le Ca^{2+} est strictement indispensable à la fixation des sucres. Structuellement, les lectines du type-C contiennent un ou plusieurs CRD, *Carbohydrate Recognition Domain*, de 120 acides aminés associés à d'autres domaines responsables des autres fonctions de la molécule. Ce sont aussi des glycoprotéines transmembranaires.

Ces lectines prennent part à un important mécanisme de reconnaissance de structures glycaniques sur les surfaces cellulaires, des protéines circulantes et de la matrice extracellulaire. La fixation des lectines sur ces glycannes sont à l'origine d'événements

biologiques tels que l'adhésion cellule-cellule, turnover des protéines sériques, réponse immune vis-à-vis de pathogènes (Weis *et al*, 1998 ; Drickamer, 1999).

b- Les différentes lectines du type-C

Dans ce groupe on retrouve :

α - Les **récepteurs hépatiques**, lectines trimériques, impliqués dans l'élimination (*clearance* en anglais) des asialo-glycoprotéines circulantes (comme la céruloplasmine) tel que le récepteur d'Ashwell-Morell, première lectine mammalienne identifiée (sur les résidus de GalNAc) (Ashwell, 1994 et Ozaki *et al*, 1995),

β - Les **sélectines** (Symon *et Wardlaw*, 1996) : il en existe trois catégories (L, P et E) et elles reconnaissent des ligands sialylés et fucosylés. Ce sont des protéines transmembranaires dont la partie N- terminale est impliquée dans la reconnaissance des ligands. Elles possèdent un domaine *epidermal growth factor-like* et plusieurs petites unités répétées pouvant fixer le complément. Les sélectines L sont impliquées dans l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales et les dirigent ainsi vers les tissus lymphoïdes et les sites de l'inflammation (domiciliation ou *homing*), les sélectines P se trouvent sur les plaquettes sanguines et les sélectines E sur les cellules endothéliales. Les sélectines E et P sont inductibles (par le TNF- α , IL-1 β et les lipopolysaccharides) alors que la sélectine L est constitutive.

χ - Les **collectines** solubles du sérum sont des lectines humorales (Hansen *et Holmskov*, 1998) : ce sont des molécules trimériques avec trois domaines lectiniques en C- terminal, se fixant aux microorganismes, assemblées par une queue collagénique en N- terminal (triplets Gly-X-Y répétés) se fixant aux récepteurs des phagocytes et qui déclenchent l'activation du complément C1q ou provoquent l'opsonisation. On retrouve dans cette famille les *mannose binding proteins* (MBP), appelées aussi *mannan binding lectins* ou *mannan binding proteins* sériques dans la défense immunoglobuline-indépendante contre l'agression de divers pathogènes comme les levures et les champignons (Taylor *et al*, 1992 ; Reading *et al*, 1995), la conglutinine et la collectine-43 (toutes celles-ci sont d'origine sérique et synthétisées par le foie), la protéine A et la protéine D surfactants pulmonaires retrouvées à la surface des alvéoles pulmonaires.

ii- Les galectines

a- Caractéristiques des galectines

Les galectines sont appelées ainsi en raison de leur affinité pour le β -galactose (ce sont des *galactoside-binding lectins*). Elles étaient appelées autrefois les lectines S-Lac ou les lectines du type-S. Cette dernière dénomination était due au fait que les lectines de cette famille possédaient des fonctions SH libres. Depuis de nouveaux membres ont été découverts sans cette particularité, c'est la raison pour laquelle ce nom a été abandonné (Barondes *et al*, 1994). Les membres de la famille des galectines ont tous une séquence caractéristique de 130 acides aminés très conservés. Contrairement aux lectines du type-C, qui sont généralement des grosses glycoprotéines transmembranaires, les galectines sont de petites molécules solubles et non glycosylées.

Les galectines sont dénommées par un nombre consécutif à leur découverte : Galectine-1, Galectine-2...jusque Galectine-10 pour la dernière (Cooper *et al*, 1999). Cette numérotation facilite largement leur étude puisqu'une même galectine pouvait être retrouvée dans différentes espèces sous des noms différents : par exemple la Galectine-1 était appelée L-14-I chez l'homme, L-14 chez le bœuf, galaptine chez le rat et enfin BHL chez la souris ; la Galectine-3 était appelée Mac-2 chez l'homme, ϵ BP chez le chien, CBP-35 chez le rat et L-29 chez la souris.

b- Localisation tissulaire et cellulaire

Les galectines s'expriment dans de nombreux tissus des mammifères. Le tableau IX répertorie la localisation des différentes galectines (Hughes, 1999).

Les Galectines sont retrouvées principalement dans le cytoplasme et dans le milieu extracellulaire bien qu'elles n'aient pas de peptide signal de sécrétion.

c- Les ligands des galectines

Certains ligands des galectines sont bien connus : c'est le cas par exemple de la laminine qui est un ligand des Galectines-1 et 3. C'est une glycoprotéine de la matrice extracellulaire riche en chaînes polylactosaminiques. La Galectine-1 a aussi pour ligands les protéines membranaires associées aux lysosomes et riches en résidus polylactosaminiques

(LAMPs), un glycolipide lactosaminylé des neurones olfactifs et l'intégrine $\alpha_1\beta_1$ des cellules du muscle squelettique. La Galectine-3 reconnaît aussi les immunoglobulines E et leur récepteur (Hughes, 1999).

Tableau IX- **Distribution tissulaire des galectines**

GALECTINES	<i>Distribution tissulaire</i>
1	muscles squelettiques et lisses, neurones, reins, placenta et thymus
2	tractus gastro-intestinal et plus spécialement l'iléon
3	macrophages activés, éosinophiles, neutrophiles, tractus gastro-intestinal et respiratoire, neurones
4	épithélium intestinal et oral
5	érythrocytes et réticulocytes
6	épithélium intestinal
7	kératinocytes
8	poumon, foie, reins, cœur, cerveau
9	foie, intestin grêle, reins, tissu lymphoïde, poumons, muscles squelettiques et cardiaque
10	éosinophiles, basophiles

d- Quelques rôles biologiques des galectines (Leffler, 1997 ; Cooper *et al*, 1999)

Le fait que les galectines 1, 2 et 4 soient divalentes et que la galectine 3 puisse former des agrégats multivalents suggèrent qu'elles agissent par pontage des chaînes glycosidiques des surfaces cellulaires et de la matrice extracellulaire. Comme pour les lectines du type-C, notamment les sélectines, les galectines pourraient avoir un rôle dans l'adhésion cellule-cellule et cellule-matrice c'est à dire dans la modulation de l'adhésion cellulaire. Elles influencent aussi la migration, le chimiotactisme (la galectine-9 est un chémoattracteur potentiel des éosinophiles), la prolifération, l'apoptose (galectines-1 et 9 peuvent induire l'apoptose des cellules T activées) et l'élongation neuronale. Une même galectine peut jouer différents rôles sur une cellule : ainsi la galectine-1 peut provoquer ou inhiber l'adhésion cellulaire. Dans le muscle squelettique, où la galectine-1 est sécrétée pendant la

différenciation cellulaire et se fixe à la laminine, elle inhibe l'interaction cellule-matrice. Ceci est le résultat de la fixation de la galectine-1 à la laminine, qui interfère avec son récepteur, l'intégrine $\alpha_7\beta_1$, ce qui aurait pour conséquence le développement musculaire (la galectine-3 joue à ce niveau un rôle similaire). Dans un autre sens la galectine-1 peut promouvoir l'adhésion cellule-matrice pour d'autres types cellulaires mais aussi réguler (inhiber ou stimuler) la prolifération cellulaire et les fonctions immunes.

La galectine-3 peut déclencher une activation des mastocytes et des basophiles en se fixant sur les IgE et le récepteur des IgE, jouant ainsi un rôle dans l'inflammation. La galectine-3 peut jouer aussi un rôle dans les fonctions intracellulaires : il a été identifié comme un composant des particules ribonucléoprotéiques (implication dans l'épissage des ARNm) et il est concentré dans le noyau (voir les lectines nucléaires). Enfin une augmentation de la concentration de la galectine-3 dans les tumeurs a été proposée comme jouant un rôle dans la métastase.

iii- Les lectines du type-I (Siglecs)

a- Caractéristiques des lectines du type-I

Ces lectines appartiennent à la superfamille des immunoglobulines (IgSF). Plusieurs d'entre elles contiennent un domaine structural du type : V1-C2_n (Rini *et* Lobsanov, 1999). Ce sont toutes des protéines transmembranaires, localisées principalement dans la membrane plasmique, et certaines contiennent un large domaine cytoplasmique avec de nombreux sites potentiels de phosphorylation (Ser, Thr et Tyr). Elles reconnaissent principalement les acides sialiques connus comme jouant un rôle de répulsion dans les interactions cellule-cellule (Powell *et* Varki, 1995). A ce jour 11 siglecs ont été caractérisés.

b- Principales lectines du type-I

La famille des lectines du type-I comprend (Rini & Lobsanov, 1999) :

α - La **CD22**, ou siglec-2 (Hanasaki *et al*, 1995) que l'on retrouve principalement sur la surface cellulaire des lymphocytes B matures. Elle pourrait moduler leur interaction avec des cellules T, d'autres cellules B, des cellules endothéliales activées ou des cellules accessoires. Elle facilite le déclenchement de la réponse à l'antigène

par association au récepteur des cellules B et induit l'adhésion intercellulaire et la reconnaissance des ligands sur les lymphocytes activés, les monocytes et les cellules endothéliales,

β - Les **sialoadhésines**, ou siglec-1 sont retrouvées dans la moelle osseuse et les macrophages. Elles modulent l'adhésion de ces derniers à différentes cellules lympho-hématopoïétiques (Crocker *et al*, 1998),

χ - Le **CD33**, ou siglec-3 est un marqueur des cellules myéloïdes et de certaines populations de monocytes mais sa fonction reste inconnue,

δ - La **Myelin Associated Glycoprotein (MAG)**, ou siglec-4 est impliquée dans la formation de la gaine de myéline. La *Schwann cell Myelin Protein* est une protéine aviaire homologue à la MAG.

Le fait que CD22 et CD33 aient des domaines cytosoliques avec une potentialité de phosphorylation laisse supposer que le rôle de ces molécules ne doit pas se limiter à l'adhésion, mais que ce rôle doit s'étendre au déclenchement d'événements secondaires dans la cellule.

ε - **Autres lectines du type-I** : il existerait d'autres lectines de la superfamille des immunoglobulines (*Immunoglobulins like*) avec des homologies plus éloignées : la N-CAM (*neural-cell adhesion molecule*), jouant un rôle dans l'association des neurones fœtaux et néofoetaux, est connue comme reconnaissant des structures du type High Mannose sur les intégrines, l'ICAM-1, un autre membre, pouvant jouer un rôle de récepteur pour l'oligosaccharide anionique, l'hyaluronane. Il faut par ailleurs signaler que la MAG et la N-CAM peuvent aussi interagir avec l'héparine.

iv- Les lectines du type-P

a- Caractéristiques des lectines du type-P

On les appelle ainsi en raison de la reconnaissance du motif mannose-6-phosphate (Man-6-P) porté par des N- glycanes des hydrolases lysosomales (Hille-Rehfeld, 1995 ; Roberts *et al*, 1998 ; Rini & Lobsanov, 1999).

Il existe deux types de lectines du type-P qui diffèrent par leur sensibilité aux cations : le premier est cation indépendant (*insulin-like growth factor II*), on l'appelle le récepteur CI (CIR) et a une masse moléculaire de 275-300 kDa. L'autre est cation dépendant, on l'appelle le récepteur CD et a une masse moléculaire de 43 kDa (CDR).

b- Localisation et rôle

Le CIR est présent dans le Golgi, la membrane plasmique de nombreuses cellules, le CDR est seulement présent dans le Golgi.

Ces lectines ont un rôle d'adressage des enzymes lysosomales vers leur compartiment, via le signal Man-6-P (trafic intracellulaire). Les hydrolases lysosomales synthétisées sont reconnues par le récepteur à Man-6-P puis sont emmenées dans un endroit particulier du Golgi et quittent celui-ci par des vésicules particulières : les lysosomes primaires. Après fusion aux lysosomes, les récepteurs sont recyclés et les enzymes intégrées aux lysosomes. La localisation possible du CIR dans la membrane plasmique, fait qu'il peut recapter des enzymes extracellulaires à Man-6-P et les réintégrer aux lysosomes.

v- La Calnexine et la calréticuline

La calnexine et la calréticuline sont des lectines jouant le rôle de protéines chaperonnes dans le repliement et le contrôle qualité des glycoprotéines du réticulum endoplasmique nouvellement synthétisées notamment par leur activité de peptide disulfide isomérase.

La calnexine est une protéine transmembranaire de type I contenant un signal de rétention dans le réticulum endoplasmique (KDEL). Elle reconnaît les N- glycannes du type $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (Andersson *et al*, 1996). Elle joue un rôle de protéine chaperonne dans la bonne conformation de glycoprotéines. La calréticuline joue un rôle analogue, mais elle est soluble et reconnaît des N-glycannes oligomannosidiques (Otteken *et Moss*, 1996).

vi- Les pentraxines

Ce sont des lectines de petite taille, environ 25 kDa, calcium-dépendantes qui s'associent en pentamères et qui reconnaissent des glycannes riches en galactose.

Dans cette famille on va retrouver les *C-reactive proteins* (CRP), qui reconnaissent les polysaccharides du type C de *Pneumococcus*, et les *serum amyloid P components* (SAP), protéines sériques solubles dont la spécificité glycanique est mal connue. Ces dernières sont particulièrement intéressantes du fait qu'on les retrouve dans les plaques amyloïdes de patients atteints de maladie d'Alzheimer (Gewurz *et al*, 1995).

Récemment plusieurs protéines plus grandes, de la même famille que les pentraxines, ont pu être mises en évidence (Goodman *et al*, 1996). Une de ces pentraxines (TSG-14/PTX3) est inducible par le TNF ou l'IL-1 et est produite lors de l'inflammation aiguë. D'autres nouvelles pentraxines sont exprimées d'une manière constitutive et sont associées à la fusion du spermatozoïde et de l'ovule (apéxine/p50), peuvent fonctionner dans la synapse neuronale (*neuronal pentraxin I*, NPI) ou ont encore une fonction inconnue (NPII et XL-PXN1).

vii- Autres lectines animales

Il existe d'autres lectines difficiles à classer dans les catégories citées ci-dessus.

On peut prendre comme exemple les CSL (pour *Cerebellar Soluble Lectins*, appelées ainsi parce qu'initialement isolées du cervelet de raton), qui sont des lectines spécifiques des mannosides du type $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2\text{Asn}$, et sont indépendantes du calcium (Zanetta *et al*, 1987). Elles s'assemblent sous la forme d'oligomères et on les retrouve dans les neurones, les lymphocytes, les astrocytes et les cellules myélinisantes.

Les CSL sont des lectines intracellulaires capables de s'externaliser pour jouer un rôle adhésif dans le guidage de contact de la migration des neurones (Lehmann *et al*, 1990), dans la myélinisation, l'agrégation des leucocytes ou des cellules malignes.

Autre famille de lectines, celles appartenant à la famille R1 (Dontenwill *et al*, 1985). Elles sont présentes dans les neurones, certaines cellules endothéliales, certains macrophages et les cellules musculaires. Elles reconnaissent des glycanes oligomannosidiques à 5 ou 8 résidus de mannose. Elles jouent un rôle dans la synaptogenèse et la fusion des myoblastes.

Enfin certaines cytokines possèdent une activité lectinique : c'est le cas de l'IL-2 (Zanetta *et al*, 1996) mais aussi de l'IL1 α et l'IL1 β , le TNF α , l'IFN γ .

5- Les lectines nucléaires

i- Les lectines nucléaires connues

Les lectines nucléaires ont pu être mises en évidence grâce à l'utilisation de néoglycoprotéines fluorescentes (Sève *et al*, 1986) ou à l'utilisation d'anticorps (Moutsatsos *et al*, 1987). Depuis leur découverte (Hubert *et al*, 1986), six lectines nucléaires ont été caractérisées. La galectine-3 (CBP-35), et la galectine-1 (CBP-14) reconnaissent le galactose, CBP-67, CBP-33 et CBP-70 reconnaissent le glucose. Néanmoins, la CBP-70 est aussi capable de reconnaître la GlcNAc, tout comme la CBP-22 (Felin *et al*, 1994).

ii- Les ligands des lectines nucléaires

Si l'existence de ces lectines ne fait aujourd'hui plus aucun doute, leurs ligands restent inconnus, alors que de nombreux ligands des lectines membranaires et extracellulaires sont connus comme nous l'avons vu plus haut. Pour l'instant un seul ligand a pu être mis en évidence pour la CBP-70 : ce ligand est une protéine de 82 kDa de nature inconnue présente dans les compartiments cytosolique et nucléaire (Felin *et al*, 1997). Malgré cette méconnaissance de ligands pour ces lectines nucléaires, les ligands potentiels des lectines à GlcNAc ne manquent pas puisque la O-GlcNAc est la forme de glycosylation majeure retrouvée dans les compartiments cytosolique et nucléaire. Par contre les ligands potentiels des lectines à galactose et à glucose restent parfaitement inconnus, d'autant plus que l'existence de O- et de N- glycosylprotéines dans le cytosol et le noyau reste très contestée, même si des études en attestent la présence (Codogno, *et al*, 1992).

iii- Localisation des lectines nucléaires

Les lectines nucléaires se retrouvent plus particulièrement dans les régions riches en ribonucléoprotéines (RNP) (Sève *et al*, 1986) : CBP-67 et CBP-35 ont d'ailleurs été isolées à partir de ces RNP et CBP-35 contient une séquence homologue à l'*heterogenous nuclear RNP* (hnRNP). Hubert *et al*, 1995 ont démontré que la Galectine-3 (CBP-35) est en concentration plus grande dans le noyau que dans le cytoplasme et qu'elle est impliquée dans la formation du spliceosome et dans le *processing* de l'ARNm. Néanmoins toutes ces lectines sont aussi retrouvées dans le cytosol : elles ont donc une co-localisation nucléaire et cytosolique.

Rousseau *et al*, 2000 ont démontrées que malgré la co-localisation de CBP-70 dans le noyau et le cytosol des cellules HL-60, celle-ci se retrouve dans le noyau, le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, et les mitochondries des cellules non-différenciées. Or CBP-70 a été démontrée comme glycosylée par les types de glycosylation classiques (Rousseau *et al*, 1997). Ainsi le fait de retrouver cette lectine dans le noyau laisse supposer que la glycosylation classique de certaines protéines nucléaires puisse se faire dans le réticulum endoplasmique.

iv- Rôles des lectines nucléaires

Le rôle de ces lectines nucléaires reste à définir. Malgré cela il a été suggéré que la CBP-14 et la CBP-67 puissent jouer un rôle dans le transport nucléocytoplasmique des ARNm (Schröder *et al*, 1992).

Le fait que la O-GlcNAc modifie de nombreuses protéines cytosoliques et nucléaires, notamment des facteurs de transcription, laisse supposer que les lectines à GlcNAc puissent jouer un rôle dans la modulation des interactions protéiques. Par exemple Jackson *et* Tjian, 1988 ont démontré que la WGA inhibait la fonction d'activation de la transcription de Sp1, et il se pourrait que ces lectines à GlcNAc puissent jouer le même rôle *in vivo*. Il a été aussi suggéré que ces lectines à GlcNAc puissent intervenir dans le transport nucléaire des protéines cytosoliques vers le noyau, puisque Finlay *et al*, 1987 ont démontré que l'injection de la WGA dans le cytosol inhibait ce transport protéique. De plus l'existence de telles lectines pourraient s'expliquer par leur rôle de navette dans le transport sucre-dépendant de certaines protéines entre le noyau et le cytosol (Duverger *et al*, 1993, 1995 et 1996).

II-Résultats

Le but de ce travail a été d'isoler des lectines spécifiques du résidu de GlcNAc dans le cytosol et le noyau de foie de rat. De telles lectines ont déjà été caractérisées par l'équipe d'Annie-Pierre Sève (Finlay *et al*, 1994) dans les cellules HL60. Les résultats de cette partie ont été rédigés sous la forme d'un manuscrit dans le but d'être publiés dans un journal scientifique.

La première étape de cette étude a été de montrer l'existence de ces lectines à GlcNAc par chromatographie d'affinité sur GlcNAc immobilisée. Des extraits nucléaire et cytosolique de foie de rat ont été préparés par différentes étapes de fractionnement cellulaire puis soumis à une chromatographie d'affinité sur GlcNAc immobilisée. Les protéines retenues sur la colonne ont été éluées avec une solution de GlcNAc à 0.2 M et soumises à une électrophorèse SDS-PAGE à 10% (C, cytosol et N, noyau). La révélation des protéines a été effectuée par coloration au nitrate d'argent.

Comme indiqué sur la figure 1A, on retrouve un triplet de protéines dans les deux compartiments : cytosolique et nucléaire. La masse moléculaire des bandes de ce triplet sont respectivement : 70, 65 et 55 kDa. Sur ces mêmes échantillons, nous avons fait une électrophorèse bidimensionnelle représentée en figure 1B pour les lectines à GlcNAc du cytosol et 1C pour celles du noyau. On remarque des différences dans le pI (point isoélectrique) et dans le nombre d'isoformes pour les protéines de 70 et 65 kDa : en effet ces isoformes sont plus acides et en nombre plus réduit dans le cytosol que dans le noyau. Cela suggère que les deux bandes de masse moléculaire plus élevée du triplet doivent exister sous la forme phosphorylée.

Cette hypothèse de la phosphorylation possible des isoformes de 70 et 65 kDa a été vérifiée par l'utilisation d'anticorps anti-phospho-thréonine (figure 2A) et anti-phospho-sérine (figure 2B). On voit ainsi que les bandes de 70 et 65 kDa sont phosphorylées et exclusivement sur des résidus de sérine. Rien n'est détecté pour la bande de 55 kDa.

De la même façon, la glycosylation de ces trois bandes a été vérifiée par l'utilisation de la WGA (figure 2C) et par incubation de WGA en présence de GlcNAc (figure 2D). Rien n'a été trouvé pour la O-N-Acétylglucosaminylation de ces lectines.

Afin d'estimer la masse moléculaire native de ces lectines à GlcNAc, nous avons effectué une électrophorèse en mode non dénaturant et non réducteur sur les lectines à GlcNAc des compartiments cytosolique et nucléaire (figure 3). Après révélation par le nitrate d'argent, on peut voir plusieurs bandes de masses moléculaires très élevées (supérieures à 1 million de Da, 1000 kDa) et trois bandes de masse respective 600, 800 et 900 kDa. Cela suggère que les bandes du triplet existent sous la forme de complexes de très haut poids moléculaire.

Ceci a pu être vérifié par séparation de ces complexes de haut poids moléculaire par FPLC (figure 4A). Chaque pic a été ensuite soumis à une électrophorèse SDS-PAGE 10% (figure 4B). On peut voir alors que chaque complexe multimoléculaire est composé d'un nombre égal de chacune des protéines du triplet (55, 65 et 70 kDa) : 3 triplets (Mr 570), 4 triplets (Mr 760), 5 triplets (Mr 950) et 6 triplets (Mr 1140).

Les hautes masses retrouvées pour les lectines natives, indiquent que ces lectines peuvent s'associer en complexe multimérique, et que ces agrégats pourraient être dus à une auto-reconnaissance de O-GlcNAc (hypothèse infirmée puisque ces lectines ne sont pas O-GlcNAc, figure 2). Elles pourraient être associées avec des ligands (mais l'ajout de GlcNAc dans le milieu infirme là encore cette hypothèse). Par contre elles pourraient être associées avec des activités enzymatiques. Cette dernière hypothèse a été testée pour ce qui concerne l'activité phosphatasique, glucosaminidasique et GlcNAc transférasique (figure 5). L'hydrolyse du PNP-phosphate par nos préparations de lectines à GlcNAc prouve que ces lectines cytosoliques et nucléaires sont associées avec une phosphatase, tandis que les deux autres mesures d'activités enzymatiques se sont avérées négatives.

L'existence de ligands endogènes des lectines à GlcNAc a été recherchée. Les extraits cytosoliques et nucléaire ont été passés sur une colonne de WGA immobilisée, puis les protéines retenues ont été éluées par 0.2 M de GlcNAc. Ces protéines éluées ont ensuite été soumises à une électrophorèse en SDS-PAGE à 10% et électrotransférées sur membrane de nitrocellulose. Les membranes ont été incubées avec les lectines cytosoliques à GlcNAc préalablement conjuguées avec de la biotine. La révélation des membranes a été effectuée après incubation avec de l'avidine couplée à la peroxidase en présence et en absence de sucre inhibiteur (figure 6B). On voit de ce fait que les lectines à GlcNAc sont capables de reconnaître des protéines de manière spécifique dans les deux compartiments cytosolique et

nucléaire. La figure 6A montre une coloration au bleu de coomassie de ces protéines retenues sur WGA immobilisée.

Afin de déterminer la nature du glycanne reconnu par nos lectines à GlcNAc, un transfert de [³H]Galactose a été effectué sur l'extrait de cytosol après passage sur WGA. Les produits de marquage ont été ensuite soumis à une bêta-élimination réductive et la structure des composés libérés caractérisée par HPAEC : il s'agit de *N*-acétyllactosaminytol, ce qui prouve que les protéines reconnues par les lectines à GlcNAc sont modifiées par la O-GlcNAc (figure 7).

Enfin la fixation de ces lectines biotinyllées a été testée sur des lymphocytes humains en présence (figures 8A et 8B) et en absence (figures 8C et 8D) de sucre inhibiteur. On remarque un fort marquage spécifique du cytosol et un marquage plus faible du noyau.

En conclusion, nous avons pu mettre en évidence l'existence de lectines à GlcNAc dans le cytosol et le noyau de foie de rat. Ces lectines existent sous la forme de complexes multi-moléculaires et semblent associées à une activité phosphatasique. Pour schématiser l'hypothèse du rôle de ces lectines à GlcNAc dans le transport des protéines cytosoliques vers le noyau, nous avons fait un schéma représenté en figure 9. L'hypothèse du rôle de lectines jouant le rôle de navette dans le transport de protéines cytosoliques vers le noyau avait déjà été suggéré par Duverger *et al*, 1996). Ce schéma représente une protéine cytosolique à transporter dans le noyau : elle existe sous la forme phosphorylée et glycosylée dans le cytosol. Or seule la forme glycosylée peut être fixée par les lectines à GlcNAc. Comme ces lectines existent sous la forme de multimères, celles-ci peuvent fixer plusieurs ligands ou venir s'ancrer par un autre site lectinique sur les protéines à O-GlcNAc du pore nucléaire. Il se produit alors une activation du complexe et une translocation nucléaire. Duverger *et al*, 1996 ont d'ailleurs démontré que ce transport était énergie dépendant. Ainsi, les protéines phosphorylées ne peuvent pas être prises en charge par les lectines à GlcNAc et sont alors en rétention dans le cytosol. L'activité phosphatase associée aux lectines peut soit déphosphoryler les protéines pour leur permettre le transport ou alors déphosphoryler les lectines (puisque nous avons démontré qu'elles étaient phosphorylées) et ainsi activer le transfert vers le noyau. Toutefois, ces mêmes lectines à GlcNAc pourraient aussi jouer un rôle dans l'inhibition des interactions protéiques qui mettent en jeu la O-GlcNAc : protéines cytosquelettiques et facteurs de transcription par exemple (Jackson *et Tjian*, 1988).

**III- CHARACTERIZATION OF RAT LIVER CYTOSOLIC AND
NUCLEAR GLCNAc-SPECIFIC LECTINS AND OF THEIR
ENDOGENOUS LIGANDS POSSIBLE IMPLICATION IN THE
NUCLEAR TRANSPORT OF CYTOSOLIC PROTEINS**

Tony LEFEBVRE, Jean-Pierre ZANETTA & Jean-Claude MICHALSKI*

*Unité Mixte de Recherches 8576 du CNRS, Laboratoire de Chimie Biologique, Université des
Sciences et Technologies de LILLE, 59655 Villeneuve d'Ascq, France*

***To whom correspondence should be addressed : Unité Mixte de Recherches 8576 du
CNRS, USTL, Laboratoire de Chimie Biologique, 59655 Villeneuve d'Ascq, France.**

Tel 33-3-20-43-41-46; Fax 33-3-20-43-65-55

E-mail Jean-Claude.Michalski@univ-lille1.fr.

Running title : *cytosolic and nuclear GlcNAc-specific lectins.*

abbreviations used in the text :

BSA, bovine serum albumin ; GlcNAc, *N*-Acetylglucosamine ; TBS, Tris-buffered saline ;
PNGase F, Peptide-*N*-glycosidase F ; WGA, Wheat germ agglutinin ; SDS-PAGE, Sodium
dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis ; AMP, Adenosine 5'-monophosphate ;
DTT, dithiothreitol ; PMSF, phenyl methyl sulfonyl fluoride ; HPAEC, high pressure anion
exchange chromatography ; FPLC, fast protein liquid chromatography ; PNP, para-nitro
phenyl; pI, isoelectric point ; ECL, enhanced chemiluminescence.

1- Abstract

Since the discovery of cytosolic and nuclear O-*N*-Acetylglucosamylation, several roles have been suggested for this glycosylation. One of them is in the nuclear transport of cytosolic proteins, mediated by O-GlcNAc-specific lectins. To investigate this idea, we have isolated nuclear and cytosolic O-GlcNAc-specific lectins from adult rat liver by affinity chromatography on immobilized GlcNAc, and their potential natural ligands, O-GlcNAc-glycoproteins, by affinity chromatography on immobilized wheat germ agglutinin. 2-D electrophoresis indicate that the lectin fraction contained three equally abundant proteins of Mr 70, 65 and 55 kDa. These proteins were phosphorylated at different degrees, the cytosolic 70 and 65 kDa protein presenting higher degrees of serine phosphorylation when compared to the nuclear ones. The proteins associated into higher Mr complexes that contained a phosphatase activity, but neither *N*-acetyl-glucosaminidase nor *N*-Acetylglucosaminyltransferase activities, dissociated in the presence of reductive and chaotropic agents. The complexes can not be due to the interaction of GlcNAc-specific lectin with glycoproteins containing GlcNAc residues or by self-interaction of GlcNAc-specific lectins since these proteins are themselves not glycosylated..

The lectin(s) present in this complex was (were) able to recognize cytosolic and nuclear ligands, that have been enriched using wheat germ agglutinin affinity chromatography. These ligands are O-GlcNAc glycosylated as demonstrated by tritiated galactose incorporation and analysis of the reaction products by reductive β -elimination. The isolated lectins specifically recognized ligands present both in the cytosol and the nucleus of human resting lymphocytes.

These results demonstrate the existence of endogenous GlcNAc-specific lectins which could act as a shuttle for the nucleo-cytoplasmic transport of O-GlcNAc-glycoproteins between cytosol and nucleus.

2- Introduction

For a long time glycosylation was thought to be restricted to proteins confined to the cell surface or within the lumen of intracellular organelles. This view was governed by our understanding on the biosynthetic pathways of N- or O-Glycan. But since fifteen years the existence of a major form of glycosylation found within the cytosol and the nucleus has been well established : the O-linked *N*-Acetylglucosaminylation (O-GlcNAc) [1, 2]. O-GlcNAc of a single monosaccharide (*N*-Acetylglucosamine) linked onto the serine or threonine residues of the peptidic backbone. To date, relatively few of the approx. hundred nuclear and cytoplasmic proteins modified with O-GlcNAc have been identified. They include neurofilaments [3], nuclear pore proteins [4, 5], several transcription factors such as Sp1 [6] and c-Myc [7, 8]. Interestingly all of the O-GlcNAc modified proteins undergo reversible phosphorylation/dephosphorylation, form heteromeric complexes with other proteins, and most of them translocate between the cytosol and the nucleus.

O-GlcNAcylation has a possible role in the nucleo-cytoplasmic transport. It is well known that cytosolic proteins with molecular weights exceeding 40 kDa migrate into the nucleus if they contain a specific nuclear localization sequence. Recently, Duverger *et al*, [9] suggested the existence of a sugar-dependent nuclear import of proteins from the cytosol. In digitonin permeabilised cells, they found that bovine serum albumin, substituted with either β -di-*N*-acetylchitobioside (GlcNAc β -1, 4 GlcNAc) or α -glucosyl residues was transported into the nucleus in a time- and ATP-dependent manner, indicating that GlcNAc could act as a nuclear localization signal. Nuclear pore proteins being themselves O-*N*-Acetylglucosaminylated, and facing both sides of the nuclear envelope, are possibly involved in this cytosol to nucleus transport. Several reports favour this possibility. Finlay *et al*, [10] reported a specific inhibition of *in vitro* nuclear transport of fluorescein-labeled phycoerythrin, by the GlcNAc specific lectin, WGA ; Miller *et Hanover* [11] demonstrated that *Xenopus* egg extracts is capable of reconstituting functional nuclei, but this transport was impaired when the nuclear pore density was depleted of wheat germ agglutinin-binding proteins. This transport was restored after addition of nuclear pore proteins from rat liver or *Xenopus* eggs. Such a transport would require lectins that mediate the transfer between cytosol and nucleus. Six nuclear lectins have been so far characterized : CBP-35 (galectin-3) and CBP-14 (galectin-1) are specific of galactose residue ; CBP-67, CBP-33 and CBP-70 are specific of glucose. CBP-70 is also specific of GlcNAc residue like CBP-22, which was co-isolated with CBP-70 from HL60 cell nuclei [12]. CBP-70 has also been localized in cytosol

(and one 82 kDa nuclear ligand was characterized for nuclear CBP-70 [13]). The nuclear lectins have mainly been found in ribonucleo-protein complexes [14]. They belong to the C-type group of Drickamer's classification. The role of the nuclear lectins remains to be determined, but data suggest that CBP-14 and CBP-67 might be involved in the nucleocytoplasmic transport of mRNA [15]. In other studies Hubert *et al.*, [16] have shown that Galectin-3 (CBP-35) is in higher concentration in the nucleus than in the cytoplasm, and that it is a required factor in the spliceosome formation and mRNA processing. Kuchler *et al.*, [17, 18] have described the existence of GlcNAc-binding sites in the nucleolus or in a specialized region of the nucleus using biotinylated neoglycoproteins during cerebellar ontogenesis. Although these studies suggest a role of lectins in nuclear transport, their precise function has yet to be determined.

The aim of this present work was to characterize GlcNAc-specific lectins in the cytosol and the nucleus of rat liver and to address on whether O-GlcNAc represents a signal for nuclear transport of cytosolic proteins.

3- Materials and Methods

i- Rat liver nuclei and cytosol preparation

Rats (Wistar) were starved overnight prior to decapitation. After perfusion, livers were removed and placed into 20 mM Tris/HCl, 0.25 M sucrose, pH 7.4 containing a proteases inhibitor mix (1mM PMSF, 1µg/ml leupeptin, 1µg/ml pepstatin) in ice-cold medium. Livers were grinded in a Fischer apparatus and homogenized in 5 volumes of the same medium in a Potter-Elvehjem homogeniser by three strokes at 600 rpm. The homogenate was centrifuged at 1500 g for 15 min. The supernatant (post-nuclear) was then centrifuged at 100000 g for 60 min. This supernatant corresponds to the cytosoluble fraction. The resulting pellet of the first centrifugation was carefully recovered and resuspended in 2.4 M sucrose, 1.0 mM MgCl₂, 10 mM potassium phosphate buffer, pH 6.8, containing the proteases inhibitor mix. The suspension was centrifuged at 100000 g for 1 hour. The pellet corresponding to the nuclear fraction was resuspended in 0.25 M sucrose, 0.5 mM MgCl₂, 20 mM Tris/HCl, pH 7.5 and centrifuged at 1000 g for 10 min. The washing was repeated twice to have a final clear and white nuclear pellet. The pellet was finally homogenised in ten volumes of 200 mM KCl, 1 mM DTT, 1mM PMSF, 1µg/ml leupeptin, 1µg/ml pepstatin, 1% Triton X-100, 0.1% sodium deoxycholate, 20 mM Tris/HCl, pH 7.8, and centrifuged at 100000 g for 1 hour. The supernatant corresponding to membrane depleted nuclei was collected.

ii- Affinity chromatography

Affinity chromatography were performed on *N*-Acetyl-D-Glucosamine immobilized on 6 % agarose beads (Sigma chemical Co., Saint Louis, Mo), and on Wheat Germ Agglutinin (WGA) immobilized on Sepharose (generously provided by Pr. H. Debray) at 4°C. The binding buffer was 20mM Tris-HCl, 200mM KCl, 1mM CaCl₂, and 1mM MgCl₂, pH 7.8 containing the protease inhibitor mix. After washing overnight, elution was performed with the same buffer containing 0.2M GlcNAc. Proteins were concentrated in a Centricon cell on a 10 kDa exclusion size filter (Filtron).

iii-Polyacrylamide gel electrophoresis, western blotting

Proteins were separated on 10 % SDS/PAGE [19], brilliant blue stained for WGA-retained proteins and silver stained or electrophoretically transferred onto a nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell) for GlcNAc-retained proteins. Nitrocellulose sheet was treated for 45 min in blocking buffer (3% BSA in TBS-Tween (- 15 mM Tris, 140 mM NaCl, 0.05% Tween (v/v) pH 8.0-)). Membranes were then incubated in TBS-Tween containing Anti-phospho-threonine or anti-phospho-serine antibodies (Sigma immunochemicals) diluted at 1:500 (v/v) or with Horseradish peroxidase labeled Wheat Germ Agglutinin (1/10.000) for 1 hour. Blots were washed 3 times with TBS-Tween for 30 minutes and detection was carried out using the ECL Western blotting detection reagents (Amersham).

In order to control Wheat Germ Agglutinin (WGA) specificity and avoid non-specific lectin binding, control chase experiments were performed in which WGA binding was blocked with 0.2M free *N*-Acetylglucosamine.

iv-Isoelectric focusing and Polyacrylamide gel electrophoresis

For 2-D electrophoresis, samples were diluted in 20% (v/v) IsoA (0.34 M SDS, 0.15 M DTT) and 80% (v/v) IsoE (0.108 M DTT, 0.108 M CHAPS, 15 M urea, 8,33% (v/v) ampholytes 3-10 range). The samples were run on a 4% gel (9.5 M urea, 1% (v/v) ampholytes 5-7 range, 4% (v/v) ampholytes 3-10 range, 5% (v/v) detergent solution – 0.3 g CHAPS, 100 µl Nonidet P40 to 900 µl H₂O- at 200 V for 1 hour, 500 V for 1 hour and finally at 800 V for 16 hours. 20 mM phosphoric acid was used as lower buffer and 20 mM NaOH as upper buffer. After isoelectrofocusing, gels were extracted from their capillary, placed in the transfer solution (0.5 M Tris/HCl, 10% SDS, 0.05% bromophenol blue, pH 8.8) for ten minutes, and then proteins were resolved on 10 % SDS/PAGE.

v- Non-denaturant electrophoresis

Samples were placed in 20mM Tris/HCl, 50% glycerol (v/v), bromophenol blue 0,005%, pH 8.8 and were run in Tris/glycine buffer pH 8.8 on a 5-15% polyacrylamide gel without SDS and 2-mercaptoethanol at 50 V overnight in ice-cold medium. Proteins were finally silver stained.

vi-Separation of GlcNAc-specific lectins on FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography)

FPLC was performed using a Superose 6 column equilibrated with 20mM Tris/HCl, 200mM KCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, pH 7.8, a P-500 pump, a LCC-500 liquid chromatography controller and a dual path monitor UV-2 (Pharmacia Fine Chemicals). The absorption was measured at 280 nm.

vii- Labeled galactose transfer on GlcNAc residues with galactosyl transferase

Galactosyltransferase is a specific and sensitive probe frequently used in the detection of O-GlcNAc residues on cytosolic and nuclear proteins [20, 21]. Samples were added an equal volume of sample buffer (56.25 mM Hepes, 11.25 mM MnCl₂, 250 mM galactose and 12.5 mM AMP) with proteases inhibitors (1mM PMSF and 5µg/ml of leupeptin and pepstatin - Sigma). 0.025 U of bovine milk GlcNAc β-1,4-galactosyltransferase (Sigma) and 5 µCi of UDP-[6-³H]Gal (Amersham) were finally added to initiate the reaction. The samples were incubated at 37°C for 2 hours.

viii-β-elimination and saccharide analysis of cytosolic proteins recognized by biotinylated nuclear GlcNAc-specific lectins

After tritiated galactose labeling, sugar chains were released by reductive-alkaline treatment β-elimination in a 0.1M NaOH solution containing 1M sodium borohydride at 37°C for 72 hours. The reaction was stopped by dropwise addition of ice-cold acetic acid under vigorous stirring, until pH reached pH 5.0. The β-eliminated material was dried several times under vacuum with anhydrous methanol in order to remove borate in its methyl ester form, and then desalted by descending paper chromatography on Whatman 3 MM paper using n-butanol/ethanol/water (4/1/1) (v/v/v) as a solvent. Radioactivity was measured after cutting the lanes into pieces of 1-cm thickness. Radioactive fractions were eluted from corresponding regions with water, lyophilised and finally analyzed by High pH Anion Exchange Chromatography (HPAEC) [22] on a Dionex HPLC system equipped with a model PAD2 pulsed amperometric detector (Dionex Corp., Sunnyvale, CA). The column was a CarboPac –

PA-1 (4 X 250 mm) pellicular anion exchange column with a PA-1 guard column (4 X 50 mm). The column was eluted at a flow rate of 1ml/min with 15 mM NaOH. Fractions were collected, and were measured for radioactivity.

ix-Preparation of the biotinylated nuclear GlcNAc-specific lectins.

Nuclear GlcNAc-specific lectins were incubated in a potassium phosphate buffer, pH 9.5, with biotin- ϵ -aminocaproic acid N-hydrosuccinimide ester (biotin-X-NHS, Calbiochem, Frankfurt/Germany) and 0.1 M free GlcNAc for 2 hours at 4°C. Excess biotin-X-NHS was dialyzed and biotinylated nuclear GlcNAc-specific lectins were precipitated with saturate ammonium-sulfate salt solution and finally centrifuged at 100000g.

x- Staining of WGA-selected proteins with biotinylated nuclear lectins

Biotinylated nuclear GlcNAc-specific lectins were incubated with the two pools of nuclear and cytoplasmic WGA-selected proteins. Revelation was performed with ECL kit reagent after incubation with avidin-peroxidase (avidin-HRP).

xi- Revelation of endogenous lymphocytes ligands, with biotinylated nuclear lectins

Blood was collected on EDTA, diluted once in saline-EDTA and loaded onto a 6% Ficoll-Paque layer in 50 ml plastic centrifuge tubes (Falcon) and centrifuged (50 min x 800 g). After three washing in PBS, the cells were fixed by addition of a mixture containing 4% paraformaldehyde and 0.1% glutaraldehyde in PBS for 4 h with intermittent gentle agitation. After elimination of the fixative and washes in PBS, the fixed cells were incubated with a 3 % solution of periodate treated BSA (this treatment [23] eliminated the interferences with oligosaccharides present in commercially available BSA) in PBS for 30 min at room temperature followed by the addition of biotinylated lectins (5 ng/ml final concentration). After incubation for 4 h at room temperature, the cultures were washed in PBS over a 4 h period, followed by addition of extravidin-HRP (1 μ g/ml in PBS) and incubated overnight at 4°C. After rinsing, as above, the bound avidin-HRP was revealed using the diaminobenzidine method [24]. Controls were made by using incubation of biotinylated lectins in the presence of 10 mM GlcNAc.

xii- Phosphatase and glucosaminidase activities assay

Phosphatase activity was assay by incubation of nuclear and cytosolic GlcNAc-specific lectins with p-nitrophenyl -phosphate as a substrate, in a 100 mM Tris/HCl buffer, 50 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, pH9.5. Glucosaminidase activity was assay with p-Nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy-beta-D-glucopyranoside in 50 mM Acetate pH 4,5. Alkaline phosphatase from bovine intestinal mucosa and β -N-Acetylglucosaminidase from *Diplococcus pneumoniae* were respectively used as positive control.

4- Results

i- Cytosolic and nuclear GlcNAc-specific lectins present identical molecular weight but differ in their pI.

Cytosolic and nuclear extracts were isolated by affinity chromatography on a GlcNAc-immobilized column. The binding of these compounds was considered as specific since the adsorbed compounds could not be eluted with GalNAc, but only with GlcNAc. As shown in Fig. 1A, the GlcNAc lectin fraction showed a relatively simple electrophoretic profile with three constituents of similar abundance of 70, 65 and 55 kDa, respectively (fig. 1A). This pattern was identical both in the cytosol and the nucleus.

In a second experiment the same samples were submitted to a 2D-electrophoresis as illustrated in fig. 1B for cytosolic GlcNAc-specific lectins, and in fig. 1C for nuclear GlcNAc-specific lectins. While the molecular weight appears similar to the previous experiment, differences in the pI, and in the number of pI isoforms were found between cytosolic and nuclear GlcNAc-specific lectins. The 70 kDa cytosolic protein showed three spots whereas the nuclear protein migrated as six spots. The same observation was made for the 65 kDa protein for which only one cytosolic form is observed whereas three nuclear forms occur. We hypothesize that these pI shifts were due to differences of the phosphorylation state of the different proteins.

ii- GlcNAc-specific lectins are phosphoproteins but are not modified with O-GlcNAc glycosylation.

The phosphorylation status of the 70 and 65 kDa proteins were investigated using anti-phospho-serine and anti-phospho-threonine antibodies. While no binding was observed using the anti-phospho-threonine antibody (fig. 2A), the 70 and 65 kDa proteins were specifically stained using the anti-phospho-serine antibody (fig. 2B) both in the cytosolic and nuclear compartments.

In another experiment these proteins were stained using the WGA-HRP technique (WGA is a lectin recognizing all terminal non reducing GlcNAc and especially O-GlcNAc), no staining was observed neither for the cytosolic nor nuclear lectins (fig. 2C). This was not due

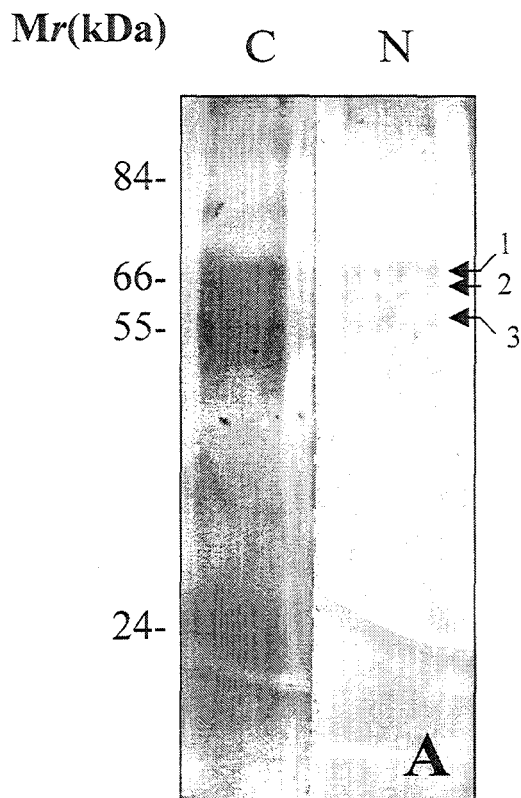
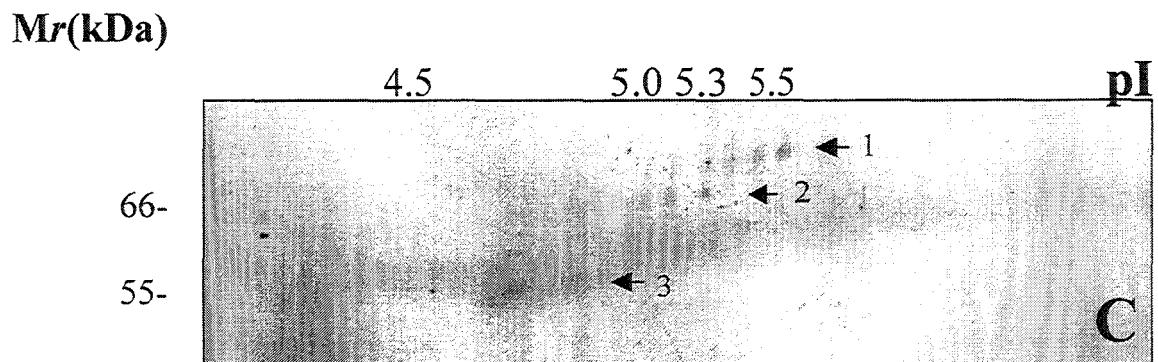
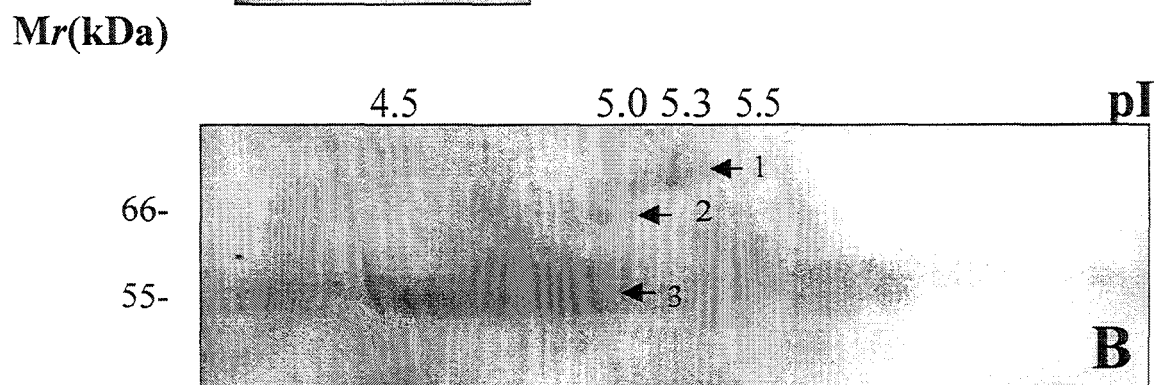


Figure 1- Cytosolic and nuclear extracts were passed over a GlcNAc-immobilized column and were then submitted to a 10 % SDS-PAGE and silver stained (fig. 1A). In a second way the same samples were submitted to a 2D-electrophoresis (fig.1B for cytosolic GlcNAc-specific lectins, and in fig.1C for nuclear GlcNAc-specific lectins). C; cytosol, N ; nucleus, 1 ; 70 kDa protein, 2 ; 65kDa protein, 3 ; 55 kDa protein.



to a technical gap since WGA-HRP revealed ovalbumin, a positive control. This demonstrated that the GlcNAc-specific nuclear and cytosolic lectins were not O-GlcNAc modified (fig. 2C).

iii-GlcNAc-specific lectins are part of high molecular weight complexes in non-denaturing conditions

In order to investigate the molecular weight of the native GlcNAc-specific lectins, non-denaturing electrophoresis was performed on the two fractions. As shown in Fig. 3, GlcNAc-specific lectins exist as very high molecular weight complexes, some of them having Mr higher than 10^6 Da. In addition to this major form, lower molecular weight bands of about 600, 800 and 900 kDa could be distinguished.

In order to determine the monomer composition of each native isoform, these high molecular weight complexes were separated by FPLC on a Superose 6 column (Fig. 4A) and each collected peak was further subjected to 10% SDS-PAGE. As shown in Fig. 4B, it could be concluded that each native complex was composed of at least one 70, one 65 and one 55 kDa protein. Since the three subunits were found in equivalent proportions in all native complexes, it was suggested that the high Mr complexes were associations of 3 (Mr 570), 4 (Mr 760), 5 (Mr 950) and 6 (Mr 1140) triplets.

iv-Cytosolic and nuclear GlcNAc-specific lectins are associated with phosphatase activity

The high molecular weight complexes found within the cytosolic and nuclear lectin fractions suggested an association of several GlcNAc-specific lectins or an association of GlcNAc-specific lectins with other proteins.

One of the hypothesis was that the complexes were made of GlcNAc-specific lectins and GlcNAc-containing glycoproteins joined by lectin/ligand interactions. This hypothesis was ruled out since the addition of GlcNAc did not modify the aggregation pattern of the protein and since WGA staining indicated the absence of proteins with terminal GlcNAc.

Another hypothesis was that the complex was made of GlcNAc-specific lectins associated with enzymes possibly functionally associated with these lectins. In order to test the phosphatase and N-acetyl-glucosaminidase activities the nuclear and cytosolic lectin fractions were incubated in proper conditions

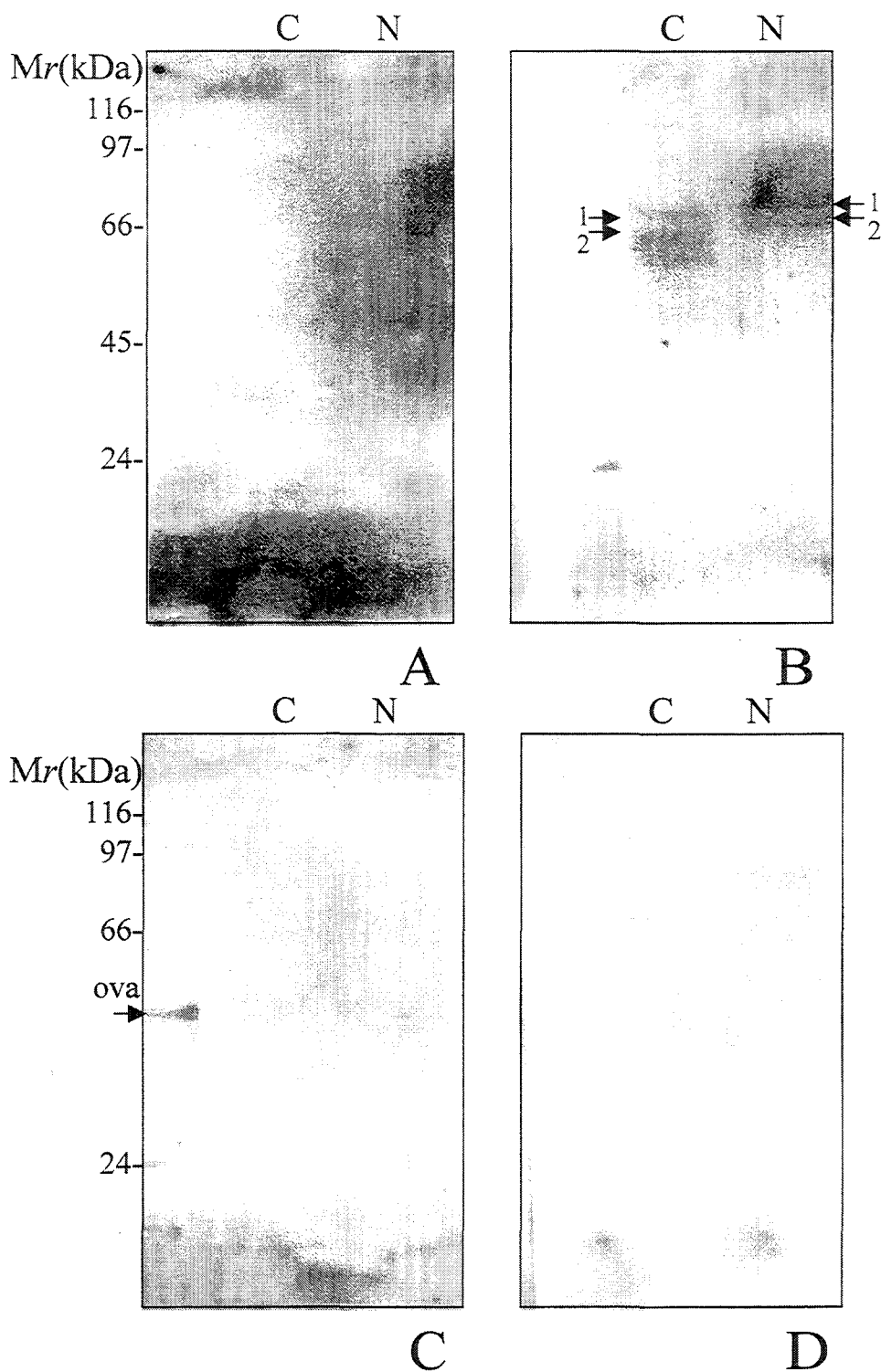


Figure 2- The hypothesis of phosphorylation of the 70 and 65 kDa proteins was checked using two anti-phospho dependent antibodies. Anti-phospho threonine (fig. 2A) and anti-phospho serine (fig. 2B) were tested on the cytosolic and nuclear GlcNAc-specific lectins. WGA was used to test the own GlcNAc glycosylation state of these proteins (fig. 2C), and specificity of WGA was checked using free GlcNAc in conjunction with WGA (fig. 2D). In figure 2C, the arrow shows ovalbumin as positive control in the molecular weight (other markers are used as negative control). 1 ; 70 kDa protein, 2 ; 65kDa protein

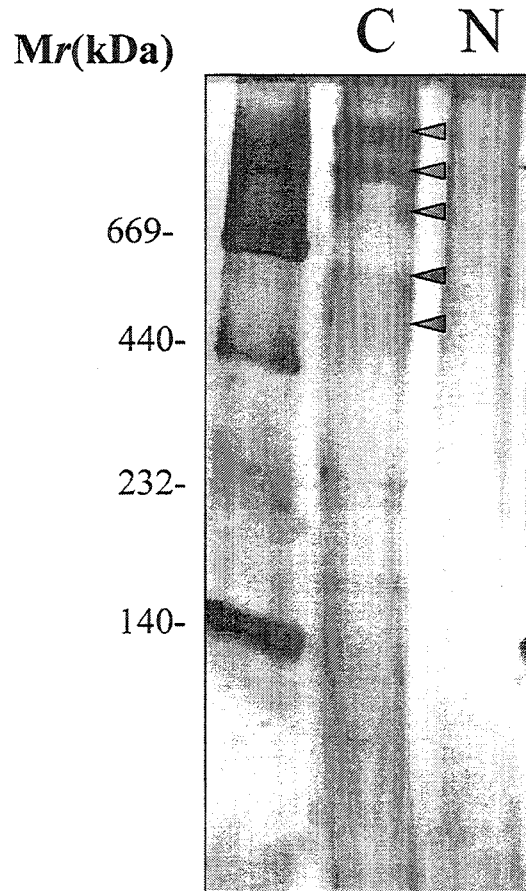


Figure 3- To investigate the native molecular weight of the GlcNAc-specific lectins, a 5-15 % native electrophoresis was performed on these proteins in the two extracts (C; cytosol, N ; nucleus)

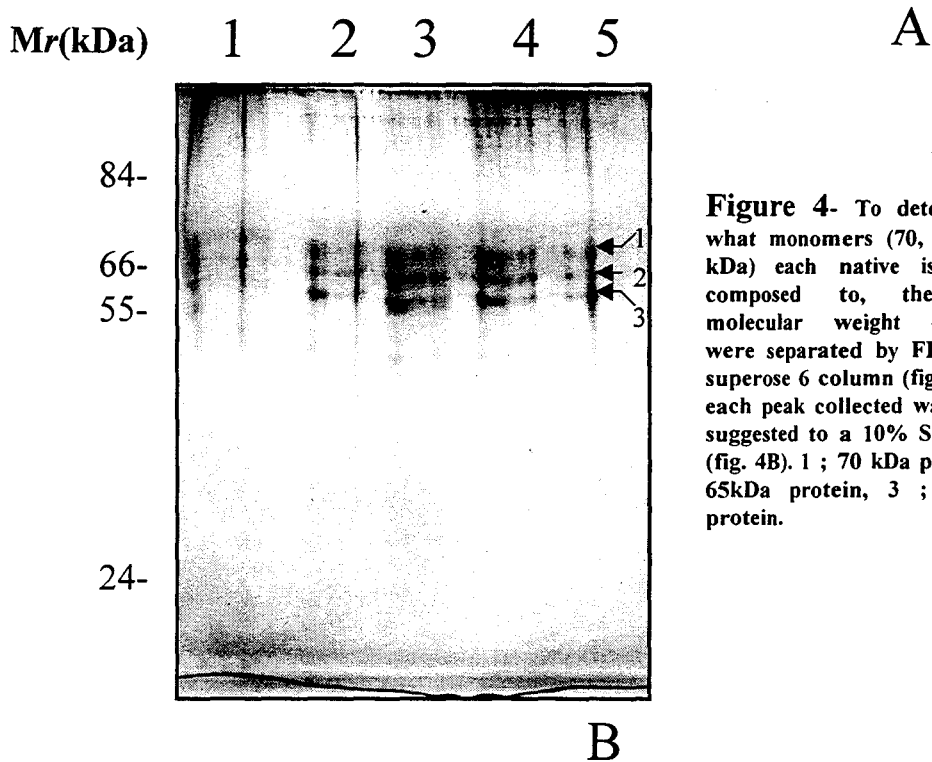
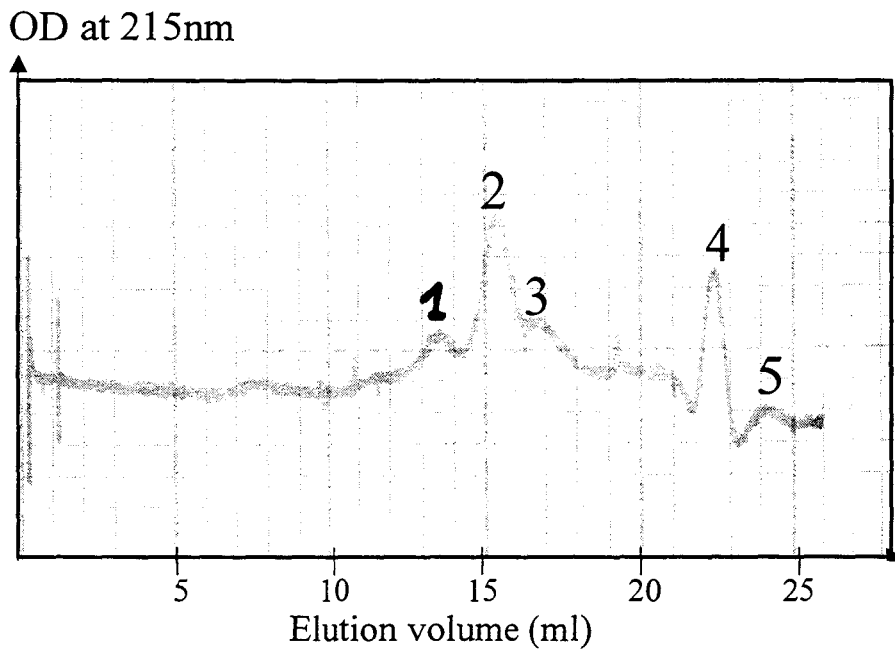


Figure 4- To determine of what monomers (70, 65 or 55 kDa) each native isoform is composed to, these high molecular weight complexes were separated by FPLC on a superose 6 column (fig. 4A) and each peak collected was further suggested to a 10% SDS-PAGE (fig. 4B). 1 ; 70 kDa protein, 2 ; 65kDa protein, 3 ; 55 kDa protein.

in the presence of PNP-phosphate and PNP-GlcNAc. No *N*-acetyl-glucosaminidase activity was detected whereas an important phosphatase activity for cytosolic and nuclear GlcNAc-specific lectins was found. Incubation of cytosolic and nuclear lectin fractions in the presence of radiolabeled UDP-GlcNAc did not result into GlcNAc incorporation, indicating the absence of *N*-Acetyl glucosaminyltransferase in the sample. Consequently, these experiments demonstrated that the cytosolic and nuclear lectins were associated with a phosphatase.

v- Biotinylated nuclear GlcNAc-specific lectins are able to recognize endogenous substrates in cytosolic and nuclear compartments

To prospect for endogenous substrates of the GlcNAc-specific lectins, cytosolic and nuclear extracts were passed over a WGA immobilised column. Proteins were run on a 10 % SDS-PAGE, brilliant blue stained (fig. 6A) or electrotransferred onto nitrocellulose sheet and tested for the affinity of the biotinylated GlcNAc-specific lectins (fig. 6B). We can establish that GlcNAc-specific lectins are able to recognize different WGA-selected proteins and that this affinity is specifically inhibited by 0.2 M free GlcNAc. The nature of the recognizing sugar was determined by beta-elimination after transfer of tritiated-galactose with bovine galactosyltransferase. The released glycans were further analyzed by HPAEC. A single peak migrating with *N*-Acetyllactosaminyltol was detected. As a consequence the endogenous lectin ligands possess a unique glycosylation pattern consisting of O-linked GlcNAc (fig. 7).

The biotinylated nuclear GlcNAc-specific lectins were also assayed on lymphocytes. Figure 8 shows that these biotinylated nuclear GlcNAc-specific lectins strongly stained cytosol and in a lower level nucleus. Specificity of the binding was verified in control cells by co-incubation with free 10 mM GlcNAc.

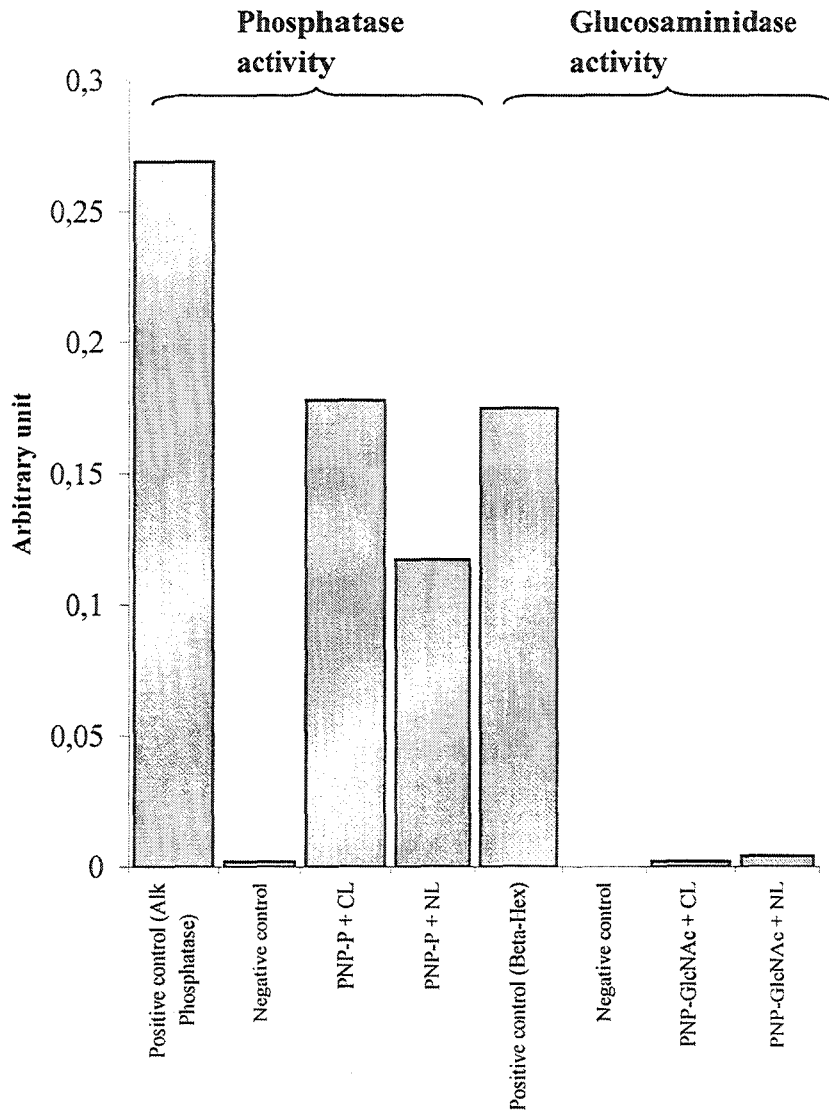


Figure 5- Figure 5 shows phosphatase and glucosaminidase activities assays in GlcNAc-specific lectins using PNP-phosphate and PNP-GlcNAc. Alkaline phosphatase and beta-hexosaminidase were used as positive control and water was used as negative control (CL, cytosolic lectins and NL, nuclear lectins).

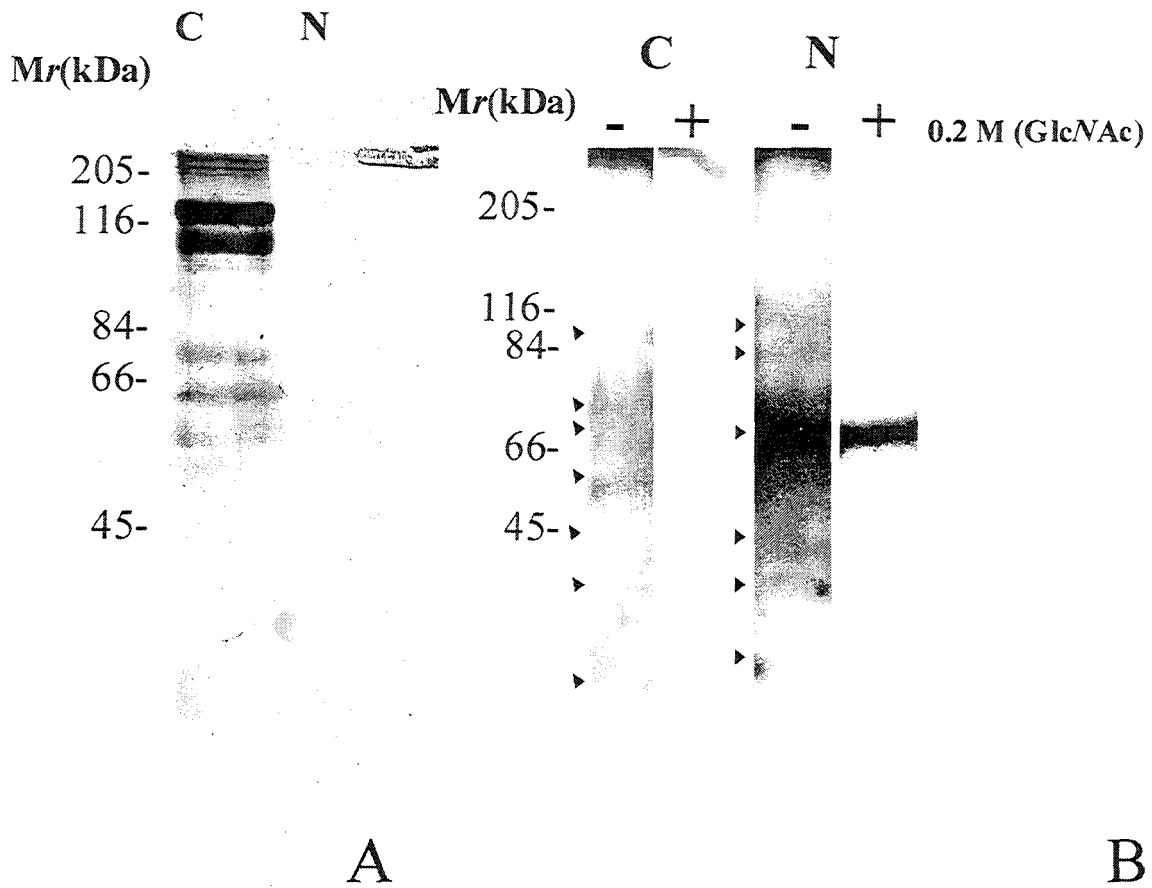


Figure 6- To investigate the putative substrates of the GlcNAc-specific lectins, cytosolic and nuclear extracts were passed over a WGA immobilized column. Proteins were run on a 10 % SDS-PAGE, brilliant blue stained (fig. 6A) or electrotransferred onto nitrocellulose sheet and tested for the affinity of the biotinylated GlcNAc-specific lectins (fig. 6B). (C; cytosol, N ; nucleus)

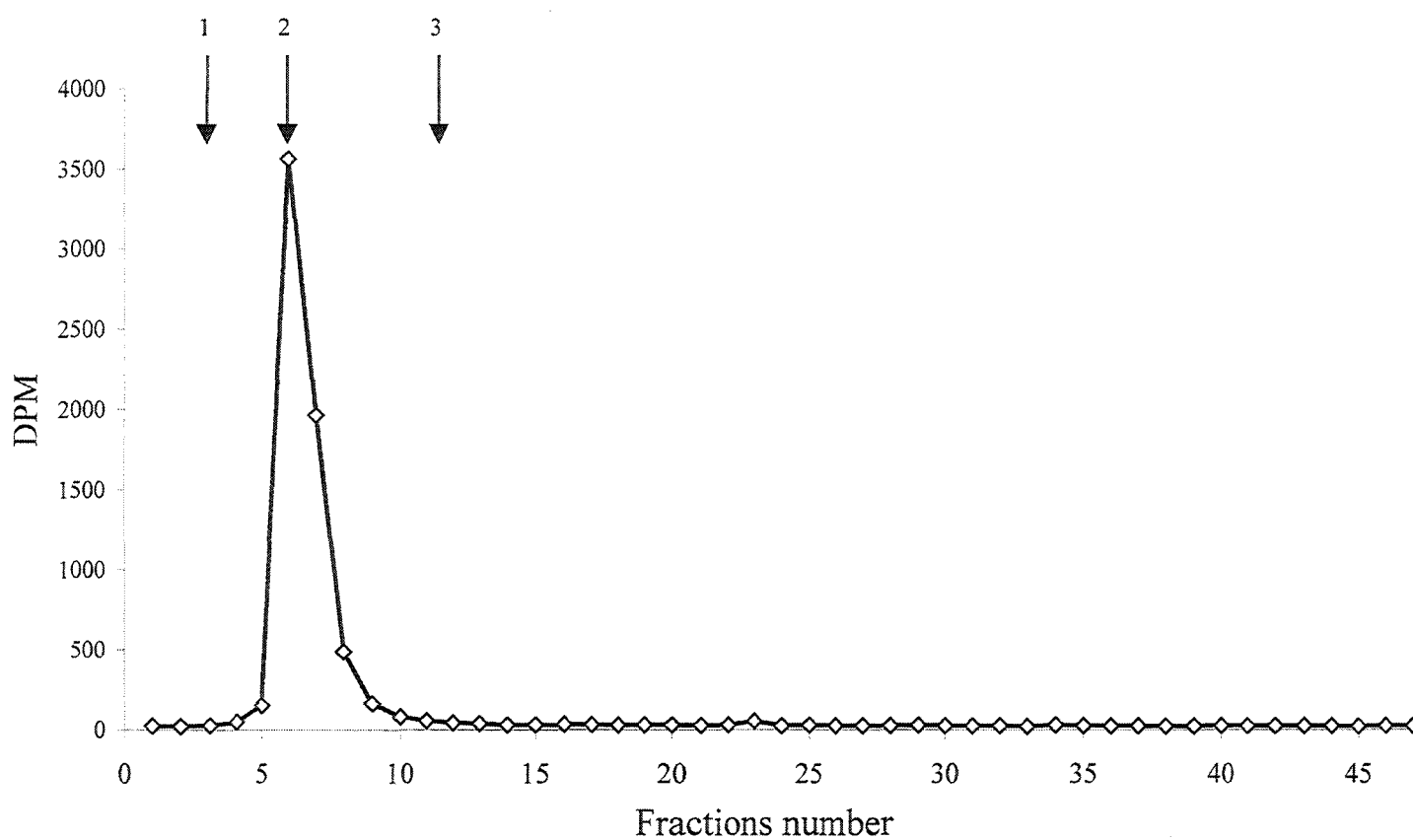


Figure 7- The nature of the recognizing sugar of nuclear GlcNAc-specific lectins was determined by beta-elimination after transfer of tritiated-galactose with bovine galactosyltransferase. The released glycans were further analyzed by HPAEC. (1 ; Glucosaminitol, 2 ; lactosaminitol, 3 ; Glucosamine).

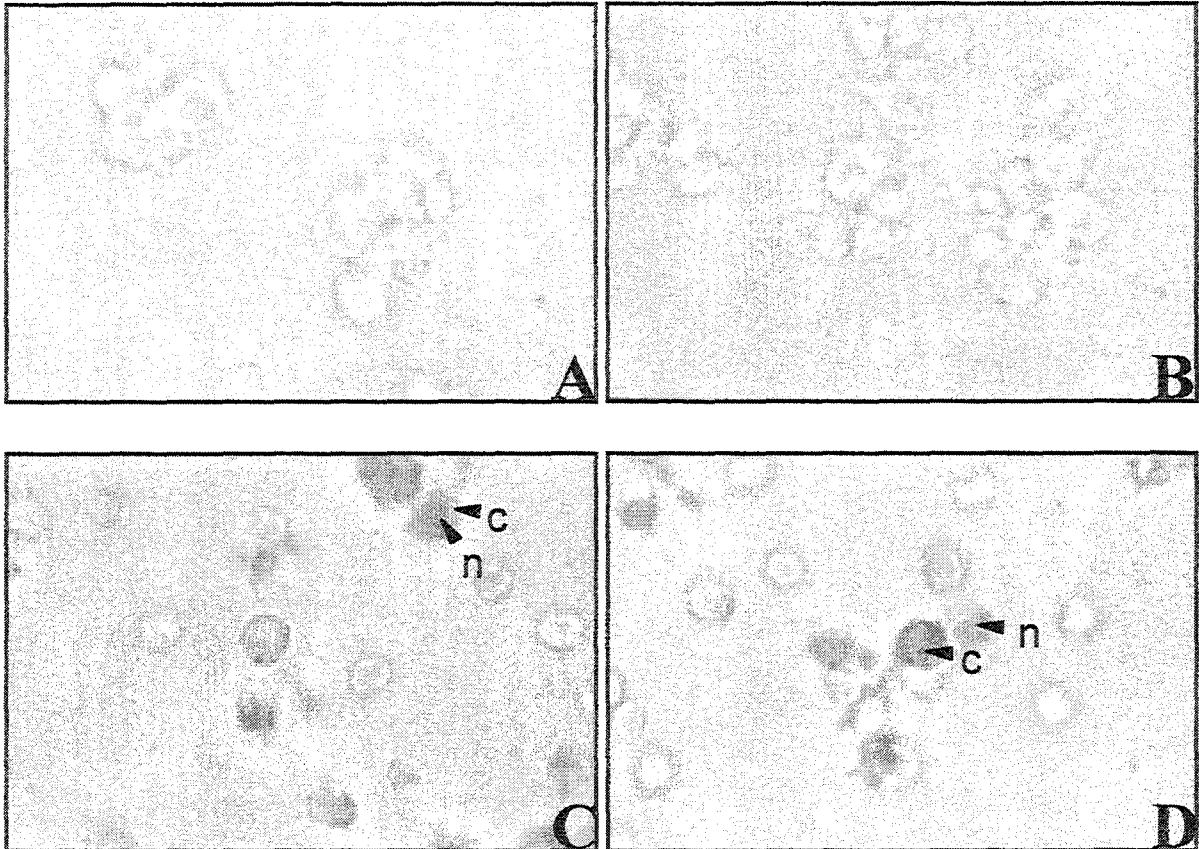


Figure 8 – The biotinylated nuclear GlcNAc-specific lectins were also tested on lymphocytes cells in presence (Fig. 8A and B) and in absence (Fig. 8 C and D) of 10 mM of free GlcNAc. c; cytosol and n; nucleus

5- Discussion

In this study we characterized GlcNAc-specific lectins in rat liver nuclei and rat liver cytosol. Since O-GlcNAc glycosylation was described in 1984 by G. W. Hart's group [1], numerous roles for this major cytosolic and nuclear glycosylation have been suggested. One of these roles was the regulation of phosphorylation by competition of O-GlcNAc glycosylation at the same sites [25]. In a previous report, we demonstrated using okadaic acid, a ser/thr phosphatase inhibitor, that protein bound O-GlcNAc levels decreased in conjunction with a hyperphosphorylation state of proteins [26]. Other roles for this glycosylation have been proposed : proteolytic degradation, enzyme activity, transcription factor activity [27]. In this study we have focused our work in the putative implication of O-GlcNAc in the nuclear transport of cytosolic proteins. The role of O-GlcNAc in the nuclear transport have been speculated by Duverger *et al.*, [19]. They demonstrate in permeabilised cells, that serum albumin substituted with β -di-*N*-acetylchitobioside (GlcNAc β -1, 4 GlcNAc) or α -glucosyl is transported into the nucleus whereas BSA did not. Finlay *et al.*, [10] have shown a specific inhibition of nuclear transport by WGA. If O-GlcNAc is a signal for nuclear transport as suggested by there reports, we postulate the existence of GlcNAc-specific lectins mediating this nuclear transport. Such lectins activities have been detected by Kuchler *et al.*, [17, 18] with neoglycoproteins and by Felin *et al.*, [12] in the nucleus of HL60 cultured cells. CBP-70 and CBP-22 (Carbohydrate Binding Protein) have been described as to be specific of the GlcNAc residue, while CBP-70 was also described as recognizing glucose. This lectin has been also characterized in the cytosolic compartment.

In Fig. 1 we show that both in the cytosolic and nuclear compartments there are three O-GlcNAc binding proteins migrating as a triplet in SDS-PAGE of molecular weight 55, 65 and 70 kDa, containing multiple isoforms as judged by 2D-electrophoresis. This probably reflects differently phosphorylated populations of the GlcNAc-specific lectins in the cytosol and nucleus. We found more pI isoforms in the nucleus than in the cytosol, suggesting that the 70 kDa and the 65 kDa proteins exist in more phosphorylated forms in the nucleus than in the cytosol, although these isoforms are more acidic in cytosol than in nucleus. As shown in figure 2, it seems that these GlcNAc-specific lectins are mainly phosphorylated on serine residues. According to this result we postulate that the localization of the GlcNAc-specific lectins could be directly linked to their phosphorylation level. This finding could appear as a contradiction in view of the putative implication of O-GlcNAc in nuclear transport. These GlcNAc-specific lectins are not themselves O-GlcNAc glycosylated (figure 2), and if we thus

hypothesise that they are involved in the transport of O-GlcNAc proteins. A possible mechanism is that in a phosphorylated form GlcNAc-specific lectins adopt a conformational structure that cause import into the nucleus, whereas another phosphorylated form results in export from the nucleus. The cytosolic GlcNAc-specific lectin complexes could accept an O-GlcNAc protein and an O-GlcNAc nuclear pore protein at two different positions thereby bridging these two elements causing the finally translocation to the nucleus. In this model phosphorylation could functions to affect the O-GlcNAc specific binding sites. In their native form, GlcNAc-specific lectins exist as very high molecular weight complexes (Figure 3). This could be induced by a multimerization of GlcNAc-specific lectins, by an association with other proteins or by auto-aggregation. The latter possibility should be rejected : GlcNAc-specific lectins are not O-GlcNAc glycosylated and thus not auto-aggregate by self-GlcNAc recognition. The first possibility was verify by FPLC separation of native GlcNAc-specific lectins. SDS-PAGE and silver stained of each peak from FPLC revealed that each native form was composed of different number of triplets of 70 kDa, 65 kDa and 55 kDa. Each complex is an association of an equal amount of each of these proteins in view of the similar intensity of each band on SDS-PAGE. The second possibility regarding the association of GlcNAc-specific lectins with enzymatic activity, was tested using PNP-phosphate and PNP-GlcNAc substrates. Both for nuclear and cytosolic GlcNAc-specific lectins an association with a phosphatase activity but not with glucosaminidase activity was found. This phosphatase activity might be necessary for a protein to be dephosphorylated prior to nuclear transport. It could be the step prior to O-GlcNAc transfer and nuclear transport. We speculate that the GlcNAc-specific lectins could also be associate with O-GlcNAc transferase.

In this report we also attempt to have an approach of the different putative substrates of these GlcNAc-specific lectins. Felin *et al.*, [13] have characterized a substrate of 82 kDa for CBP-70. The strategy we adopt here was in first step to selected GlcNAc-proteins of cytosolic and nuclear extracts on a WGA-column, and after running them on a 10% SDS-PAGE and electrotransferring on a nitrocellulose sheet. In a second step biotinylated nuclear GlcNAc-specific lectins were incubated with the two pool of released proteins. If we compare brilliant blue staining of the entire extracts with the proteins revealed with biotinylated nuclear lectins, we found : similarity in the molecular weight for the nuclear and the cytosolic proteins recognized, and that not all the proteins released by the WGA column are recognized by nuclear lectins. This suggests that if GlcNAc could be necessary for the recognition, it is not sufficient and we probably need a peptidic recognition or a conformational structure in

addition. At the moment our lab attempt to identify the putative substrates by proteomic approach.

6- References

- [1] Torres, C.-R. & Hart, G.W. (1984) Topography and Polypeptide Distribution of terminal *N*-Acetylglucosamine Residues on the Surface of Intact Lymphocytes, Evidence for O-linked GlcNAc. *J. Biol. Chem.* **259**, 3308-3317
- [2] Holt, G. W. & Hart, G. W. (1986) The Subcellular Distribution of Terminal *N*-Acetylglucosamine Moieties. *The Journal of Biological Chemistry* **261**, 8049-8057
- [3] Dong, D. L.-Y, Xu, Z. -S., Chevrier, M. R., Cotter, R. J., Cleveland, D. W., & Hart, G. W. (1993) Glycosylation of Mammalian Neurofilaments. Localization of multiple O-linked *N*-Acetylglucosamine moieties on neurofilament polypeptides L and M. *J. Biol. Chem.* **268**, 16679-16687
- [4] Holt, G. W., Snow, C. M., Senior, A., Haltiwanger, R. S., Gerace, L. & Hart, G. W. (1987) Nuclear Pore Complex Glycoproteins Contain Cytoplasmically Disposed O-linked *N*-Acetylglucosamine. *The Journal of Cell Biology* **104**, 1157-1164
- [5] Lubas, W. A., Smith, M., Starr, C. M. & Hanover J. A. (1995) Analysis of Nuclear Pore Protein p62 Glycosylation. *Biochemistry* **34**, 1686-1694
- [6] Jackson, S. P. & Tjian, R. (1988) O-Glycosylation of Eukaryotic Transcription Factors : Implications for Mechanism of Transcriptional Regulation. *Cell* **55**, 125-133
- [7] Chou, T. -Y., Dang, C. -V. & Hart, G.W. (1995) Glycosylation of the c-Myc transactivation domain. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **92**, 4417-4421
- [8] Chou, T. -Y., Hart G.W. & Dang, C. -V. (1995) c-Myc is glycosylated at threonine 58, a known phosphorylation site and a mutational hot spot in lymphomas. *J. Biol. Chem.* **270**, 18961-18965
- [9] Duverger E., Roche A.-C. & Monsigny M. (1996) *N*-Acetylglucosamine-dependent nuclear import of neoglycoproteins. *Glycobiology* **6**(4), 381-386
- [10] Finlay, D. R., Newmeyer, D. D., Price, T. M., & Forbes D. J. (1987) Inhibition of In Vitro Nuclear Transport by a Lectin that Binds to Nuclear Pores. *J. Cell Biol.* **104**, 189-200
- [11] Miller, M. W. & Hanover, J. A. (1994) Functional Nuclear Pores Reconstituted With β 1-4 Galactose-modified O-linked *N*-acetylglucosamine Glycoproteins. *The Journal of Biological Chemistry* **269**, 9289-9297
- [12] Felin, M., Doyenne-Moyne, M.-A., Hadj-Sahraoui, Y., Aubery, M., Hubert, J. & Sève, A.-P. (1994) Identification of Two Nuclear *N*-Acetylglucosamine-Binding Proteins. *Journal of Cellular Biochemistry* **56**, 527-535

- [13] Felin, M., Doyenne-Moyne, M.-A., Rousseau, C., Schröder, H., C. & Sève, A.-P. (1997) Characterization of a putative 82 kDa nuclear ligand for the N-Acetylglucosamine-Binding Protein CBP70. *Glycobiology* **7**, 23-29
- [14] Sève, A.-P., Hubert, J., Bouvier, D., Bourgeois, C. A., Midoux, P., Roche, A. C. & Monsigny, M. (1986) Analysis of sugar-binding sites in mammalian cells nuclei by quantitative flow microfluorometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 5997-6001
- [15] Schröder, H. C., Facy, P., Monsigny, M., Pfeifer, K., Bek, A. & Müller, W. E. G. (1992) Purification of a glucose-binding protein from rat liver nuclei. Evidence for a role in targetting of nuclear mRNP to nuclear pore complex. *Eur. J. Biochem.* **205**, 1017-1025
- [16] Hubert, M., Wang, S. -Y., Wang, J. L., Sève, A. -P. & Hubert, J. (1995) Intranuclear distribution of galectin-3 in mouse 3T3 fibroblasts : comparative analyses by immunofluorescence and immunoelectron microscopy. *Exp. Cell Research* **220**, 397-306.
- [17] Kuchler, S., Zanetta, J.-P., Vincendon, G. and Gabius, H.-J. (1990) Detection of binding sites for biotinylated neoglycoproteins and heparin (endogenous lectins) during cerebellar ontogenesis in the rat. *Eur. J. Cell Biol.* **52**, 87-97
- [18] Kuchler, S., Zanetta, J.-P., Vincendon, G. and Gabius, H.-J. (1992) Detection of binding sites for biotinylated neoglycoproteins and heparin (endogenous lectins) during cerebellar ontogenesis in the rat: an ultrastructural study. *Eur. J. Cell Biol.* **59**, 373-381
- [19] Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
- [20] Kears, K.P. & Hart, G. W. (1991) Lymphocyte activation induces rapid changes in nuclear and cytoplasmic glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 1701-1705
- [21] Whiteheart, S., W., Passaniti, A., Reichner, J. S., Holt, G. D., Haltiwanger, R. S. & Hart, G. W.) (1989) Glycosyltransferase probes. *Methods in Enzymology* **179**, 82-95
- [22] Diekmann-Schuppert, A., Bause, E. & Schwarz, R., T. (1993) Studies on O-glycans of Plasmodium-falciparum-infected human erythrocytes. Evidence for O-GlcNAc - transferase in malaria parasites. *Eur. J. Biochem.* **216**, 779-788
- [23] Glass II, W. F., Briggs, R. C. and Hnilica, L. S. (1981) Use of lectins for detection of electrophoretically separated glycoproteins transferred onto nitrocellulose sheets. *Anal. Biochem.*, **115**, 219-224.
- [24] Graham, R. C. and Karnovsky, M. J. (1966) The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique *J. Histochem. Cytochem.* **14**, 291-302.

- [25] Haltiwanger, R. S., Busby, S., Grove, K., Li, S., Mason, D., Medina, L., Moloney, D., Philipsberg, G. & Scartozzi, R. (1997) O-Glycosylation of Nuclear and Cytoplasmic Proteins : Regulation Analogous to Phosphorylation ? *Biochemical and Biophysical Research Communications* **231**, 237-242
- [26] Lefebvre, T., Alonso, C., Mahboub, S., Dupire, M. -J., Zanetta, J. -P., Caillet-Boudin, M. -L. & Michalski, J. -C. (1999) Effect of okadaic acid on O-linked N-Acetylglucosamine levels in a neuroblastoma cell line *Bioch. Bioph. Acta.* **1472 (1, 2)**, 71-81
- [27] Comer, F. I. & Hart G. W. (1999) O-GlcNAc and the control of gene expression. *Bioch. Bioph. Acta.* **1473**, 161-171

6- Acknowledgments

This work was supported by CNRS (Unité Mixte de Recherches CNRS n°8576, director Prof. André VERBERT) and by grants from Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC 9925). We also appreciate the help of Anne-Marie MIR in rat liver perfusion and the help from Marie-Christine SLOMIANNY for FLPC separation.

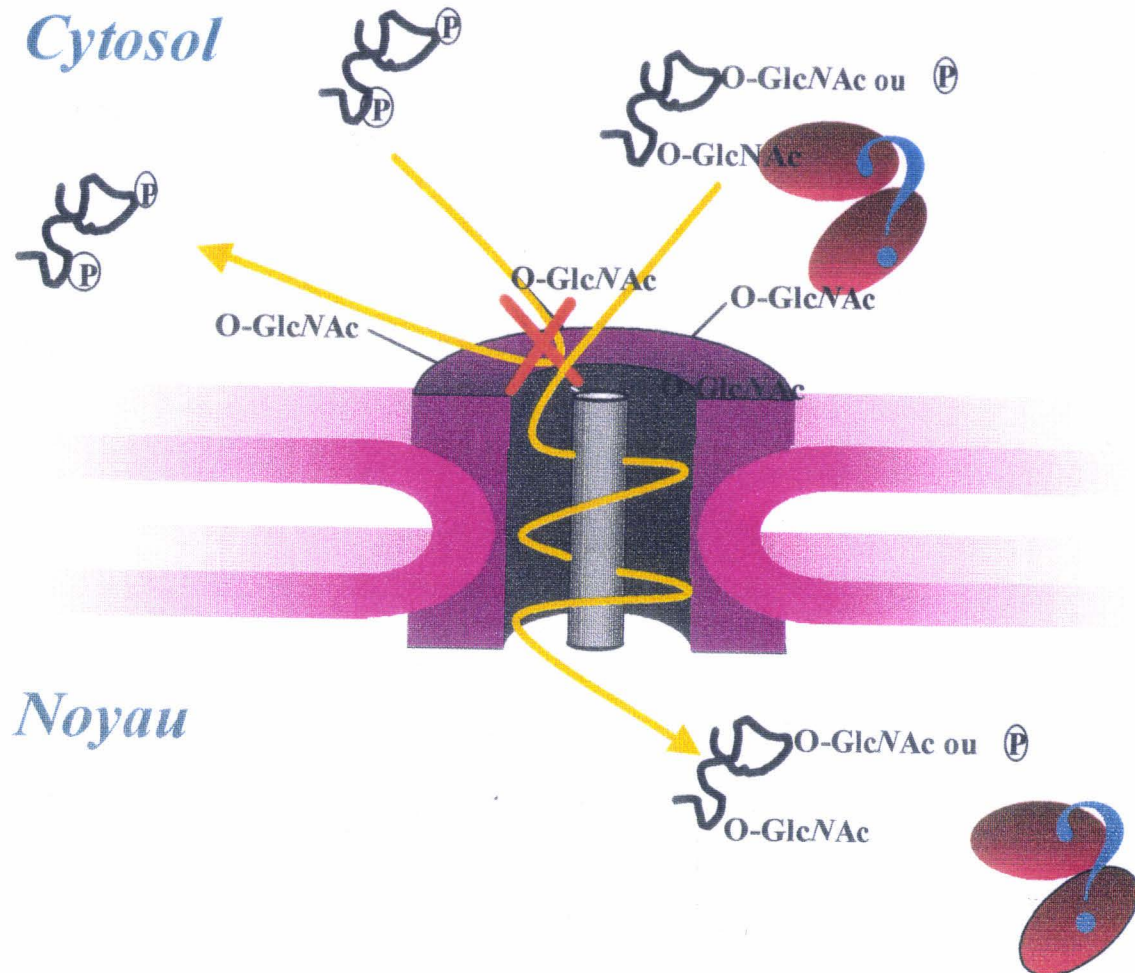


Figure 9 - Schéma hypothétique du rôle des lectines à GlcNAc dans le transport des protéines cytosoliques vers le noyau.

III- Identification des ligands des lectines à GlcNAc

A l'heure actuelle, notre laboratoire tente d'identifier les ligands putatifs des lectines à GlcNAc. Pour cela nous adoptons l'approche protéomique.

La figure 10 représente les électrophorèses bidimensionnelles des protéines cytosoliques de foie de rat : en figure 10A on a la fluorographie du marquage par la galactosyltransférase (la figure 10C représente la coloration au bleu de coomassie), la figure 10B, la révélation à la WGA (et en 10D, la coloration à l'amido-schwartz des protéines totales correspondant à la révélation à la WGA).

Ces mêmes protéines ont été enrichies par passage du cytosol de foie de rat sur WGA-sépharose, puis séparées par électrophorèse bidimensionnelle et enfin colorées au bleu de coomassie (figure 11). Les spots sont découpés, décolorés par une solution de bicarbonate d'ammonium et les protéines digérées par une solution de trypsine. Les peptides issus de la digestion sont extraits et analysés par spectrométrie de masse du type MALDI-TOF.

En compilant la masse moléculaire, le pI et la masse des peptides, on peut retrouver la nature de la protéine dans des banques de données disponibles sur Internet (Swiss-Prot, TrEMBL).

Malheureusement pour ce type d'analyse, notre laboratoire se heurte à un problème de précision au niveau de la masse des peptides : ainsi on ne peut à coup sûr, être certain de la protéine identifiée. Il faudra attendre l'arrivée d'un nouvel appareil pour mettre un nom sur nos protéines à O-GlcNAc, ligands possibles des lectines à GlcNAc.

Malgré cela quelques pistes intéressantes et possibles se sont offertes à nous : nous avons put retrouver des protéines constituant le cytosquelette, telles que des cytokératines, des protéines associées aux microtubules, mais aussi des protéines kinases. Ce travail fait partie des perspectives à court terme de nos études.

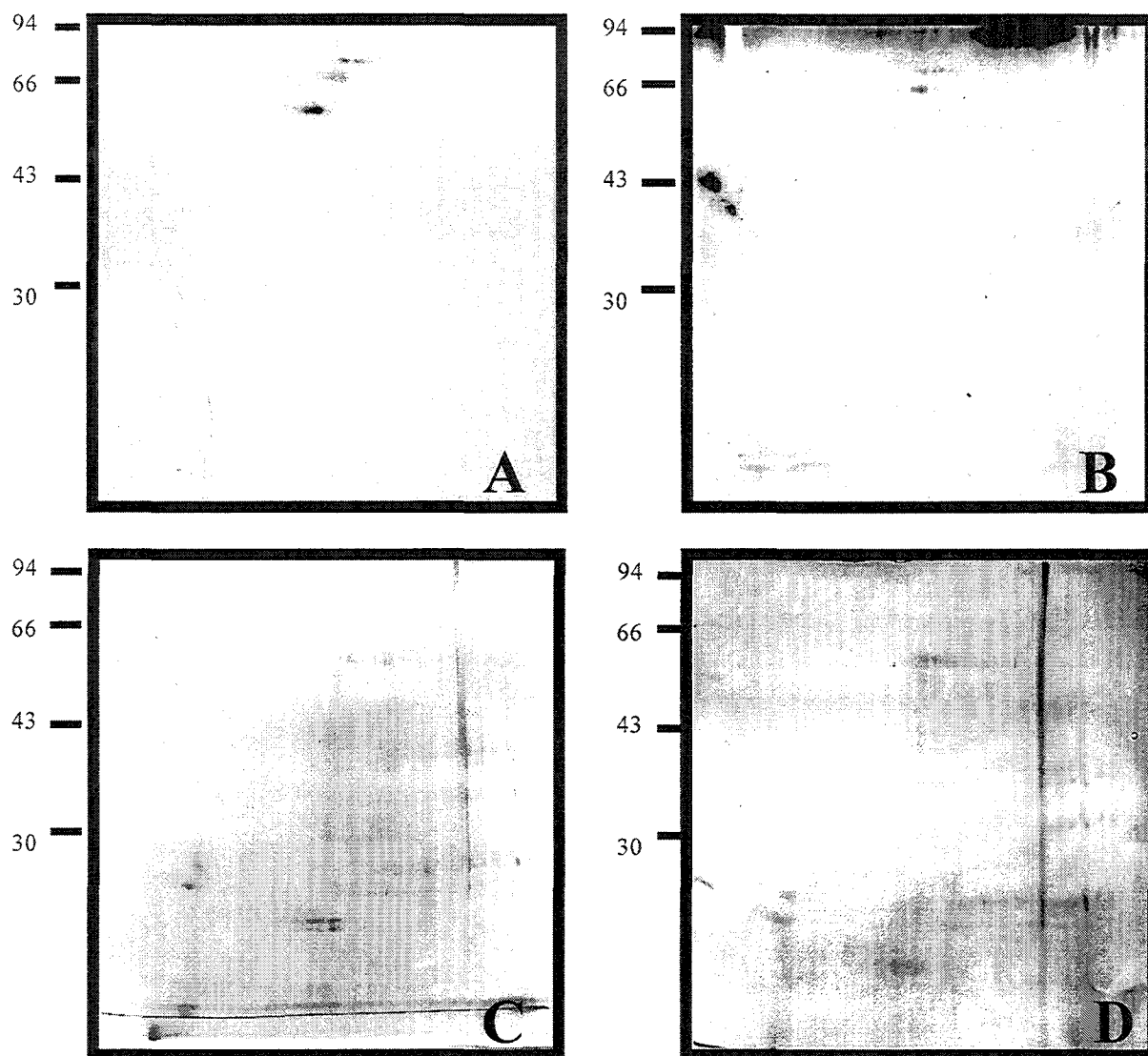


Figure 10 - Electrophorèses bidimensionnelles des protéines cytosoliques de foie de rat

A; fluorographie du marquage par la galactosyltransférase C; coloration au bleu de coomassie correspondant à la la fluorographie en A, B; révélation par la WGA et D; coloration à l'amido-schwartz des protéines totales correspondant à la révélation par la WGA.

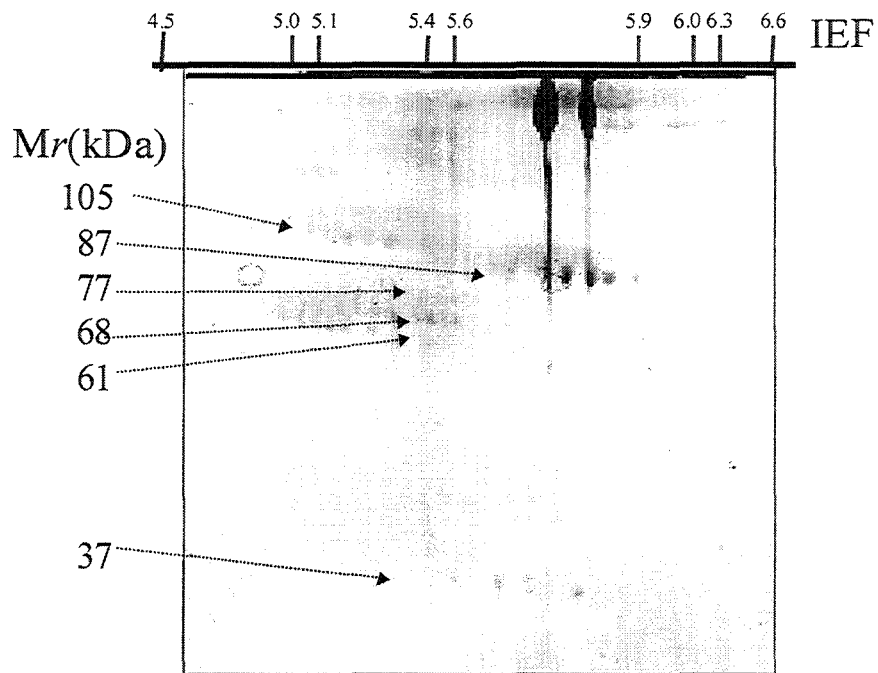


Figure 11- Électrophorèse bidimensionnelle de l'enrichissement des protéines à GlcNAc du cytosol de foie de rat par passage sur WGA-sépharose puis colorées au bleu de coomassie.

5^{ème} Partie :

***Etude de la O-GlcNAc lors de la
maturation de l'ovocyte de Xénope***

I- Généralités sur la maturation de l'ovocyte de Xénope

1- Introduction – l'ovocyte de Xénope

L'ovocyte de Xénope (*Xenopus*, Anoure aquatique) est une cellule qui peut subir tour à tour trois grands processus de développement. Le premier est l'ovogenèse au cours de laquelle l'ovocyte accumule une grande quantité de réserves. Le deuxième est la maturation qui va préparer l'ovocyte à la fécondation. Enfin celui-ci pourra être fécondé par un spermatozoïde, l'ovocyte devient alors un œuf et peut subir une série de divisions, c'est l'embryogenèse (Figure 18) (Ferrell, 1999).

Après une phase de multiplication, les cellules germinales vont arrêter leur cycle cellulaire en prophase, leur diamètre est alors voisin de 50 µm. Une phase d'accroissement débute ensuite : l'ovogenèse. Elle peut être d'une manière très simple divisée en six stades (Dumont, 1972). A la fin de l'ovogenèse l'ovocyte est bloqué en prophase de 1^{ère} division de méiose (prophase I) : c'est le stade VI de Dumont. L'ovocyte peut rester dans cet état, dit immature (appelé phase *G2-like*), pendant une période indéfinie. Il peut y rester en effet plusieurs mois avec une enveloppe nucléaire intacte, une chromatine partiellement décondensée et une transcription active.

L'ovocyte de stade VI est une cellule énorme avec un diamètre voisin de 1.3 mm et un volume de 1 µl, soit l'équivalent de 10⁶ cellules somatiques (Hausen *et* Riebesell, 1991). L'ovocyte de Xénope est rempli de vitellus qui forme un gradient du pôle animal vers le pôle végétal. Un ovocyte contient 25 µg de protéines cytoplasmiques. Le noyau, aussi appelé vésicule germinative a un diamètre de 300 à 400 nm. Il n'est pas fécondable à ce stade.

2- La maturation de l'ovocyte de Xénope

C'est à l'issue de l'ovogenèse que la maturation pourra avoir lieu. Elle est initiée par la progestérone (Pg), une hormone stéroïde qui agirait ici au niveau membranaire. La stimulation hormonale aboutit à l'activation du déclencheur universel de la phase M : le complexe cdc2(p34)/cyclineB(cdc13) appelé MPF pour « *M phase promoting factor* » (Cdc2 est inactif en phase G2). Il s'ensuit alors des changements tels que la rupture de

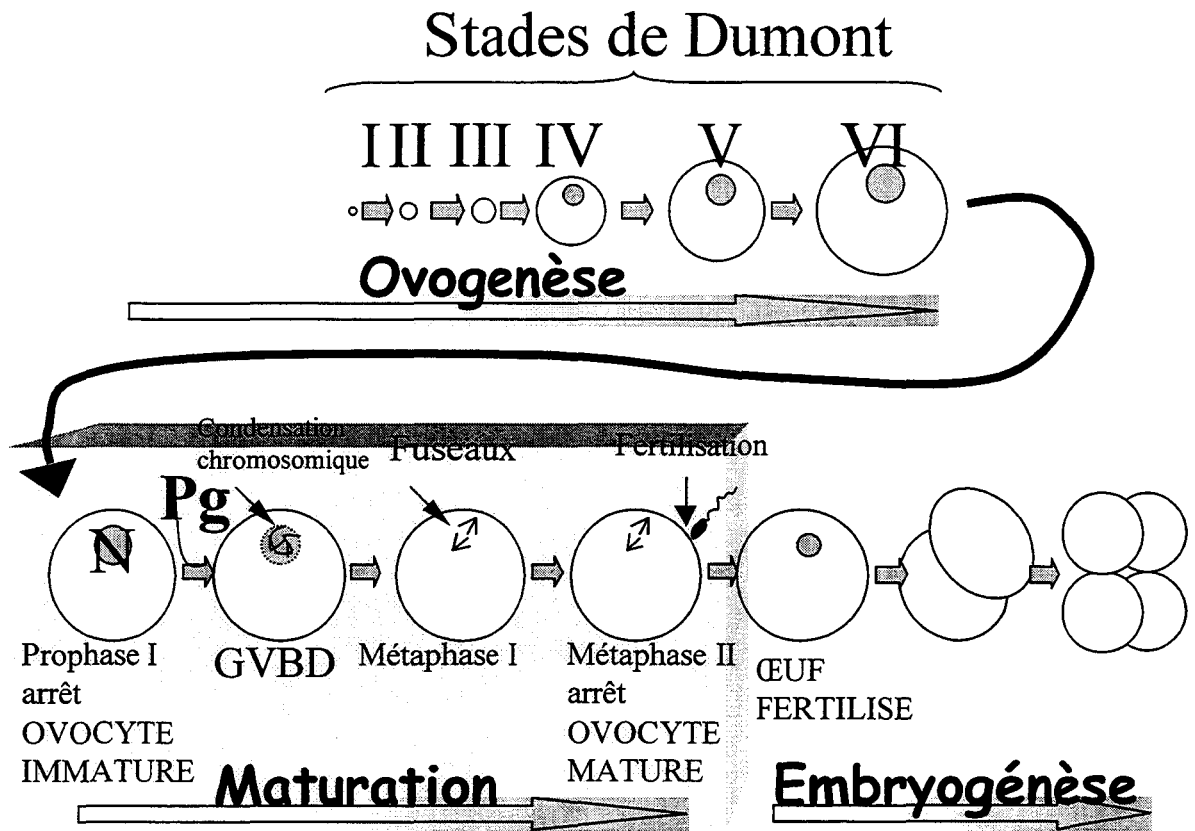


Figure 18 - La maturation de l'ovocyte de Xénope

l'enveloppe nucléaire (c'est la GVBD, *germinal vesicle breakdown*), la condensation chromosomique et la formation du fuseau. Le signe le plus frappant de la maturation est l'apparition d'une tâche blanche au pôle animal de l'ovocyte qui est appelée tâche de maturation (Figure 19). Elle due à la migration de la vésicule germinative vers le pôle animal.

i- Fixation de la progestérone à son récepteur

La maturation est induite par la fixation de la Pg (synthétisée par les cellules folliculaires) sur un récepteur ancré dans la membrane plasmique. Bien qu'il n'est pas encore été caractérisé, l'action membranaire de l'hormone est indéniable. En effet, la Pg n'induit jamais la maturation lorsqu'elle est injectée dans les ovocytes (Godeau *et al*, 1978). Elle induit la maturation même lorsqu'elle est fixée sur un polymère de haut poids moléculaire, forme non perméante. Enfin, des ovocytes énucléés voient une augmentation de l'activité MPF lorsqu'ils sont stimulés par la Pg. Il est a noté que la stimulation de la maturation peut être également induite *in vitro* par l'insuline et l'*insulin like growth factor-1* (Maller *et Koontz*, 1981).

ii- Etapes précoces de la maturation

a- Inhibition de l'adénylate cyclase

La première réponse qui suit la fixation de la Pg sur son récepteur est une inhibition de l'adénylate cyclase qui voit son activité chuter de moitié (Finidori-Lepicard *et al*, 1981). Son inhibition a pour voie de conséquence directe une diminution de l'activité de la protéine Kinase-A (pK-A) puisque l'AMPc en est un activateur. D'ailleurs l'injection d'inhibiteurs de pK-A dans les ovocytes de Xénope est capable d'activer la maturation sans stimulation préalable par la Pg. La pK-A active exerce une influence négative sur la maturation (Matten *et al*, 1994) et son inhibition débloquent alors ce frein à la maturation (Figure 20).

b- Activation de la phosphatidylinositol kinase

La fixation de la Pg sur son récepteur conduit à l'activation de la phosphatidylinositol kinase (PI3 kinase) (Deuter-Reinhard *et al*, 1997). Cette activation se fait

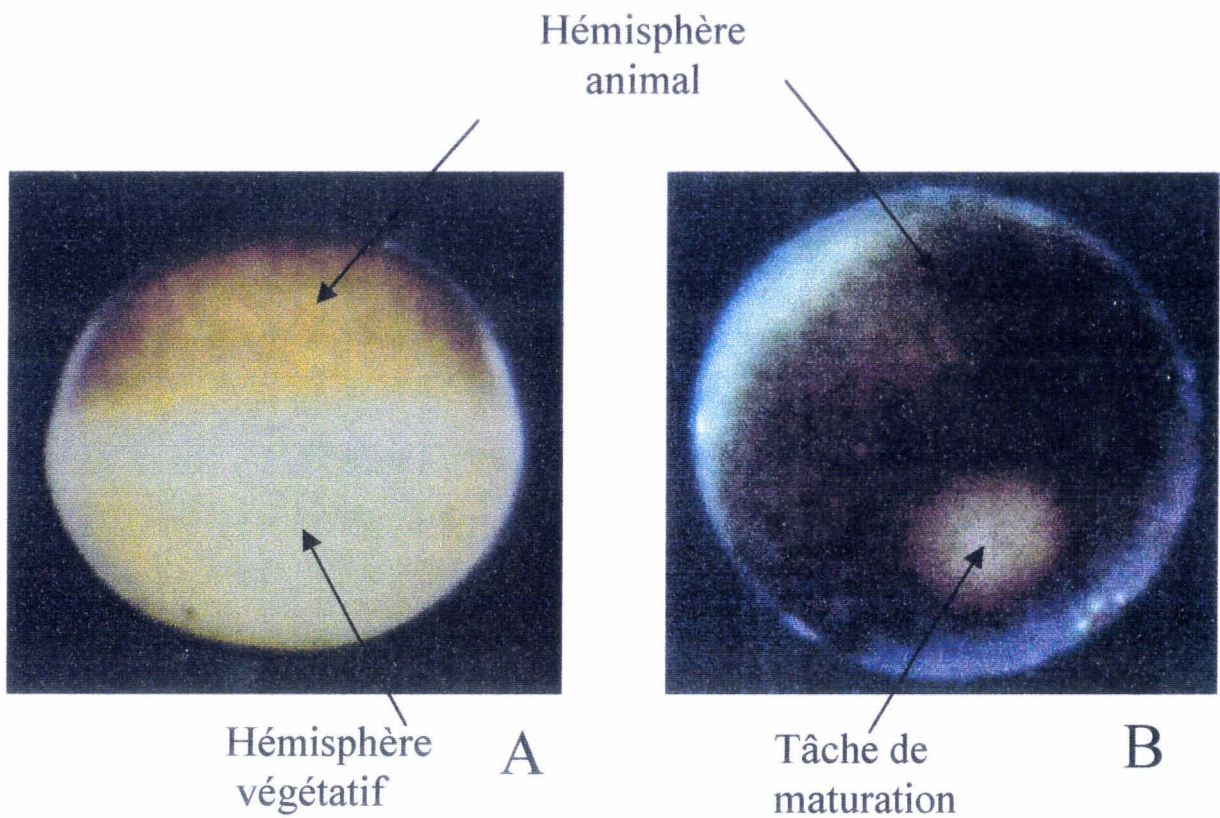


Figure 19- **Ovocyte de stade VI immature (A) et ovocyte mature (B)**
(photographies extraites de la thèse de doctorat de Jean-François BODART).

par l'intermédiaire de protéines G. La PI3-K pourra stimuler soit la protéine Ras soit l'AMPC phosphodiesterase par Akt/pK-B (protéine kinase B) (Andersen *et al*, 1998). Ainsi l'activation de la phosphodiesterase et l'inhibition de l'adénylate cyclase vont-elles de pair dans la destruction de l'AMPC et l'inhibition de la synthèse d'AMPC (Figure 20).

c- Alcalinisation

Plusieurs études ont montré une alcalinisation du milieu intracellulaire lors de la maturation. En effet dans les ovocytes, le pH intracellulaire augmente de 0.2 unité pH (Lee *et Steinhard*, 1981). Cette alcalinisation est transitoire puisque le pH revient à sa valeur initiale juste avant la GVBD. Elle est le fait de l'antiporteur Na^+/H^+ qui serait activé par phosphorylation (Rezai *et al*, 1994). Les kinases p39^{mos} puis Raf1 ont été suspectées comme activateurs de l'échangeur. Il est à noter qu'une alcalinisation artificielle stimule la migration de la vésicule germinative vers le pôle animal, alors que l'injection de MOPS pH 6.9 inhibe à 30% ce phénomène malgré l'exposition à la Pg (Flament *et al*, 1996). L'alcalinisation pourrait donc être impliquée dans la migration de la vésicule germinative vers la membrane plasmique.

En conclusion la fixation de la Pg sur son récepteur plasmatique a pour conséquence de diminuer le taux d'AMPC. Malgré cela le rôle de la PI3-kinase reste assez obscur puisque son inhibition par la wortmannine inhibe la maturation induite par l'insuline mais pas la maturation induite par la Pg (Liu *et al*, 1995).

iii-Activation de kinases

a- la voie MAPK

La baisse de la concentration en AMPC est suivie d'une période de quelques heures avant que la maturation ne s'engage : c'est la « *lag period* ». Cette *lag period* va permettre la synthèse protéique et en particulier l'accumulation de Mos (Yew *et al*, 1992) et d'une protéine s'associant à Cdc2, probablement une cycline du type B (Nebreda *et al*, 1995).

Mos constitue la MAP-KKK, c'est à dire la *Mitogen Activated Protein-Kinase Kinase Kinase* qui phosphoryle MEK1 (Resing *et al*, 1995). Mos est l'homologue de l'oncogène viral du sarcome murin de Moloney et se retrouve chez les vertébrés de manière

restreinte dans les ovocytes et les spermatozoïdes (Sagata, 1997). Des études utilisant des oligonucléotides antisens ont montré que l'accumulation de Mos était indispensable à la maturation

MEK-1 constitue la **MAP-KK** (ou MKK) qui active p42/ERK2 et p44/ERK1 par phosphorylation (Kosako *et al*, 1993).

Les vertébrés expriment ensuite deux **MAP-kinases** de la famille **ERK** qui sont p42 ou ERK2 et p44 ou ERK1, mais les ovocytes de Xénope n'expriment que p42 (Posada *et Cooper*, 1992). Les cibles de ces MAP-Kinases sont les protéines RsK-1 et RsK-2 et les régulateurs du cycle cellulaire cdc2, cdc25, Plx1 et xPIKK1. Ces protéines vont permettre le redémarrage en méiose I et vont activer la GVBD. De plus il faut ajouter que p42 MAP stimule, par rétroactivation, la polyadénylation de l'ARNm de Mos est donc sa traduction et que p42 MAPK inhibe la destruction de Mos (Matten *et al*, 1996).

b- Le MPF (M-phase Promoting Factor)

α -Activation du MPF

Durant la maturation, il y a une synthèse abondante des cyclines du type B (B1 et B2) qui pourront se coupler à cdc2 (Fang *et Newport*, 1991) afin de former le MPF. Cependant, il existe dans l'ovocyte immature un stock important de pré-MPF et la synthèse de cycline B n'est pas indispensable. Le pré-MPF est inactif et c'est la déphosphorylation sur la Thr14 et la Tyr15 de la kinase Cdc2 qui permettra l'activation du MPF (Morgan, 1995). Deux kinases inactivent ces complexes cdc2/cyclines : Wee1 en phosphorylant la Tyr 15 et Myt1 en phosphorylant la Tyr15 et la Thr14. En fait, seule Myt1 est présent dans les ovocytes immatures et Wee1 n'est synthétisée qu'à partir de la deuxième division de méiose. Une phosphatase s'oppose à l'activité de Myt1 : c'est le Cdc25C qui déphosphoryle la Thr14 et la Tyr15. En fait lors de la stimulation par la Pg, il y a hyperphosphorylation de Cdc25C (Izumi *et al*, 1992) qui sera alors actif, et hyperphosphorylation de Myt1 qui lui sera inactif (Palmer *et al*, 1998). Par la combinaison de ces deux mécanismes, la Pg induit une déphosphorylation de cdc2 et l'active. Cdc 2 peut à son tour, par rétroaction, inactiver Wee1 et Myt1 et activer Cdc25C (Solomon *et al*, 1990). De plus Cdc25C peut être activée par une autre protéine kinase qui est Plx1 (Kumagai *et Dunphy*, 1996) qui elle-même peut être phosphorylée et activée par xPlkk1, une kinase récemment identifiée (Qian *et al*, 1998).

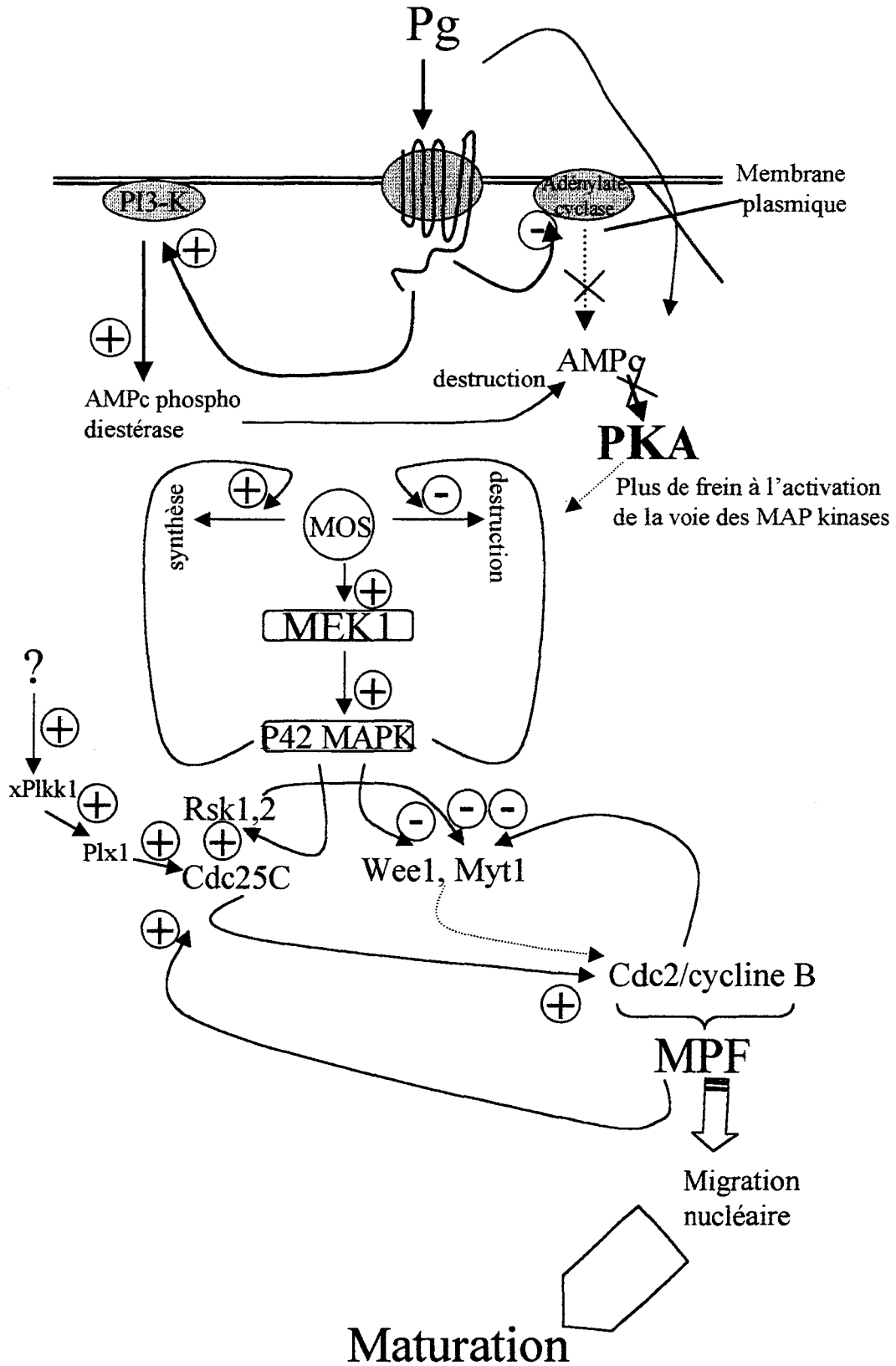


Figure 20 – Schéma récapitulatif du déclenchement de la maturation de l'ovocyte de Xénope

Un autre facteur pourrait intervenir dans le déclenchement de la maturation, c'est Rsk qui serait le lien entre p42MAPK et Myt-1 : Rsk pourrait phosphoryler Myt1, l'inactiver et activer par voie de conséquences le Cdc2 (Palmer *et al*, 1998).

β-Migration du MPF vers le noyau

Pendant le processus de la maturation de l'ovocyte, la cycline B1 est phosphorylée en cinq sites dont quatre se trouvent dans le signal de rétention au cytoplasme (Pines *et* Hunter, 1994). Le NES (*Nuclear Export Signal*) est alors inutilisable et cdc2 peut alors migrer dans le noyau par couplage à la cycline B. La kinase responsable de la phosphorylation de la cycline B n'est pas clairement identifiée. Plusieurs enzymes sont capables de réaliser cette fonction *in vitro* et bien que p34^{cdc2} soit impliquée par de nombreux auteurs, un tel rôle n'a été démontré que dans les ovocytes d'étoile de mer (Borgne *et al*, 1999). La cascade d'activation de la maturation de l'ovocyte est schématisée sur la figure 20.

iv-Événements cytologiques

Enfin, il est admis qu'une fois le MPF activé (p34^{cdc2}/cycline B), il est à l'origine des changements morphologiques caractéristiques de la méiose. La phosphorylation des lamines qui tapissent l'enveloppe nucléaire participe à la rupture de l'enveloppe nucléaire. La phosphorylation de l'histone H1 interviendrait dans la condensation des chromosomes et la phosphorylation des protéines associées aux microtubules serait une étape clef dans la formation du fuseau. Cependant l'implication d'autres kinases n'est pas à exclure.

v- Fin de la maturation

La première division de méiose s'achève par l'émission du premier globule polaire. La deuxième division s'engage aussitôt sans véritable interphase. Cependant, la méiose s'arrête en métaphase jusqu'à la fécondation. Cet arrêt du cycle cellulaire est dû au facteur cytotatique (Masui *et* Markert, 1971). Bien qu'il ait été découvert en même temps que le MPF, le facteur cytotatique n'est pas encore identifié. Plusieurs protéines semblent dotées d'une activité cytotatique : p39^{mos}, p42^{MAPK} et p90^{rsk} qui font partie de la même cascade et également p33^{cdk2} bien que des résultats contradictoires aient été publiés sur cette kinase.

L'arrêt en métaphase serait dû à une inhibition de la protéolyse de la cycline B qui est nécessaire à la sortie de phase M.

II-Introduction au travail sur la maturation des ovocytes de Xénope

Ce travail a été effectué pendant la dernière partie de notre thèse. Notre laboratoire a pu bénéficier pour cela d'une étroite collaboration avec le Docteur Stéphane Flament du laboratoire de Biologie du Développement dirigé par le Professeur Jean-Pierre Vilain (UPRES EA 1033, Université de Lille 1, bâtiment SN3, 59655 Villeneuve d'Ascq).

Dans la dernière partie de nos généralités, nous avons expliqué que l'ovocyte de Xénope pouvait suivre trois grands processus de développement dont l'un est la maturation. Cette maturation se déclenche après stimulation des ovocytes (bloqués en prophase I), par la progestérone : les ovocytes sont alors capables de mûrir. C'est au cours de ce processus de maturation que nous avons entrepris l'étude de la O-GlcNAc.

Pour ce travail, les ovocytes de Xénope (femelles *Xenopus laevis*) de stade VI (selon les stades de Dumont) sont incubés dans le milieu ND96 de composition : NaCl, 96 mM, KCl, 2 mM, CaCl₂, 1.8 mM, MgCl₂, 1 mM et HEPES, 5 mM, pH 7.5. La progestérone est ajoutée à une concentration finale de 10 μM pendant une durée de 16 heures à 20°C : ceci permet d'obtenir des ovocytes matures et bloqués en métaphase II. Les ovocytes sont ensuite homogénéisés dans un tampon contenant : 2-glycérophosphate, 60 mM, paranitrophénol, 15 mM, MOPS, 25 mM, EGTA, 15 mM, MgCl₂, 15 mM, DTT, 2 mM, orthovanadate de sodium, 1 mM, NaF, 1 mM, phénylphosphate di-sodique, 1 mM, leupeptine, aprotinine et inhibiteur trypsique à 10 μg/ml chacun et benzamidine 100 μM, pH 7.2. Les échantillons sont alors centrifugés à 10000Xg pendant 10 min à 4°C.

Les échantillons ont ensuite été repris dans du tampon de Laemmli, puis soumis à une électrophorèse en SDS-PAGE à 10%, électrotransférés sur membrane de nitrocellulose. Les membranes ont été saturées par 3% de SAB dans du TBS-Tween, pH8.0 pendant 45 min et la PNGase F a été directement incubée sur la membrane pendant toute la nuit dans un tampon Tris/HCl pH8.6 sous agitation, à température ambiante.

III- Résultats

1- Etude de la O-GlcNAc sur des ovocytes immatures (phase G2) et des ovocytes matures (phase M)

Des ovocytes matures (M) et immatures (G2) de Xénope ont été homogénéisés et séparés en SDS-PAGE 10% et électrotransférés. La figure 1 montre la révélation des membranes par deux lectines : la WGA (B), utilisée couramment pour l'étude de la O-GlcNAc et la PNA (C), spécifique des O- glycannes. La coloration des protéines totales a été effectuée au rouge ponceau (A). Nous avons déposé sur chaque piste le contenu de deux ovocytes de Xénope.

La maturation induit une augmentation de la O-GlcNAc sur plusieurs protéines de masse moléculaire apparente 97 kDa, 66 kDa et 30 kDa. La même augmentation est visible sur d'autres bandes, mais celles-ci sont plus faibles en intensité de révélation. Il faut remarquer que la bande de 97 kDa n'est pas glycosylée en G2 alors qu'elle l'est en M, et que la bande de 66 kDa est déjà glycosylée en G2 et que c'est l'intensité de révélation qui augmente pour cette bande. La révélation avec la PNA nous indique qu'il y a peu de O-glycannes dans nos préparations et que la maturation n'affecte pas ce type de glycosylation. La coloration au rouge ponceau atteste que les différences de O-GlcNAc, ne sont pas dues à une différence du taux de protéines dans les pistes.

2- Cinétique de maturation

Les ovocytes de Xénope sont stimulés par la Pg et 5 ovocytes sont prélevés à différents temps de la cinétique (Figure 2).

On remarque une évolution de la fixation de la WGA au cours de la cinétique d'incubation des ovocytes avec la Pg. Ceci est particulièrement bien visible pour des bandes de masses moléculaires apparentes de 66, 97, 100, 110 et 150 kDa (A). Pour ces bandes on a une augmentation de la fixation de la WGA jusque 16 heures, alors que le profil protéique reste inchangé (rouge Ponceau en figure 2B). Certaines bandes voient simplement leur taux de O-GlcNAc augmenter à partir d'un niveau de base existant dans les ovocytes non matures (phase G2), c'est le cas de la bande à 66 kDa (Fig. 2C). D'autres ne sont pas glycosylées et subissent une glycosylation à des temps différents de la cinétique : la bande de 97 kDa est

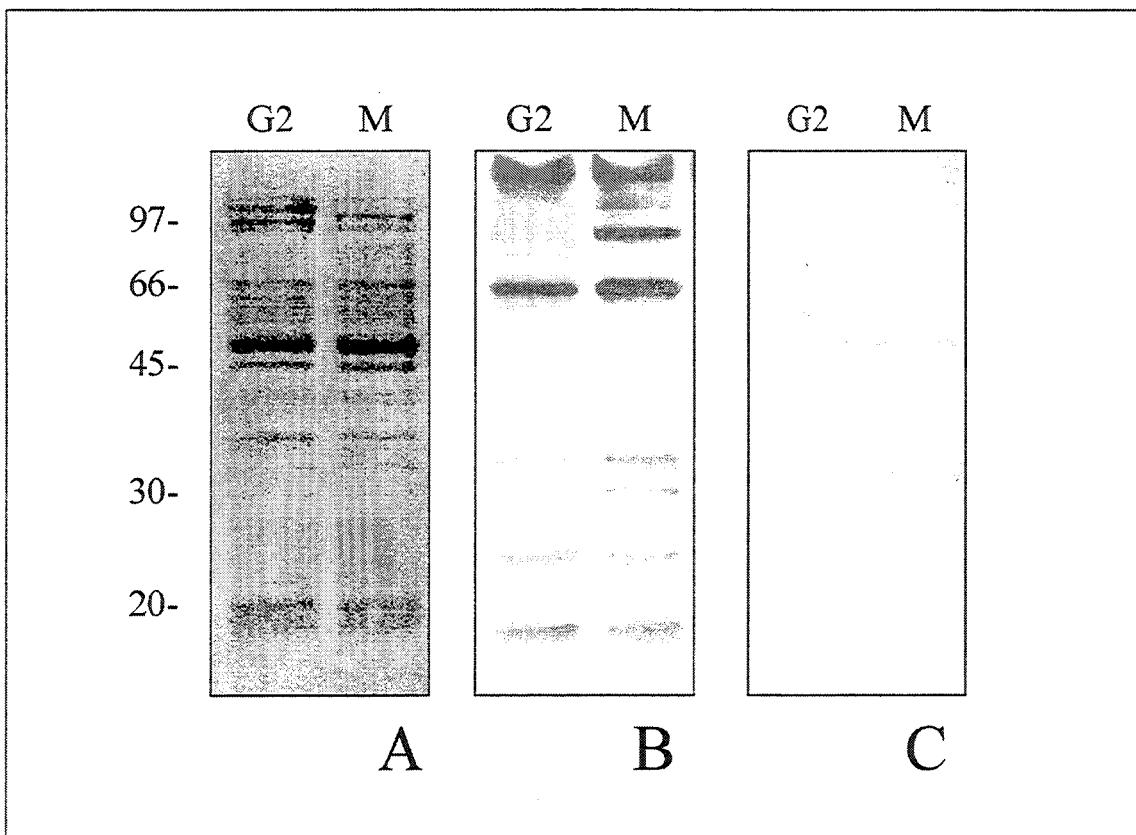


Figure 1- O-GlcNAc sur des ovocytes immatures (phase G2) et des ovocytes matures (phase M) Rouge ponceau (A), révélation par la WGA (B), et la PNA (C) après traitement par la PNGase F.

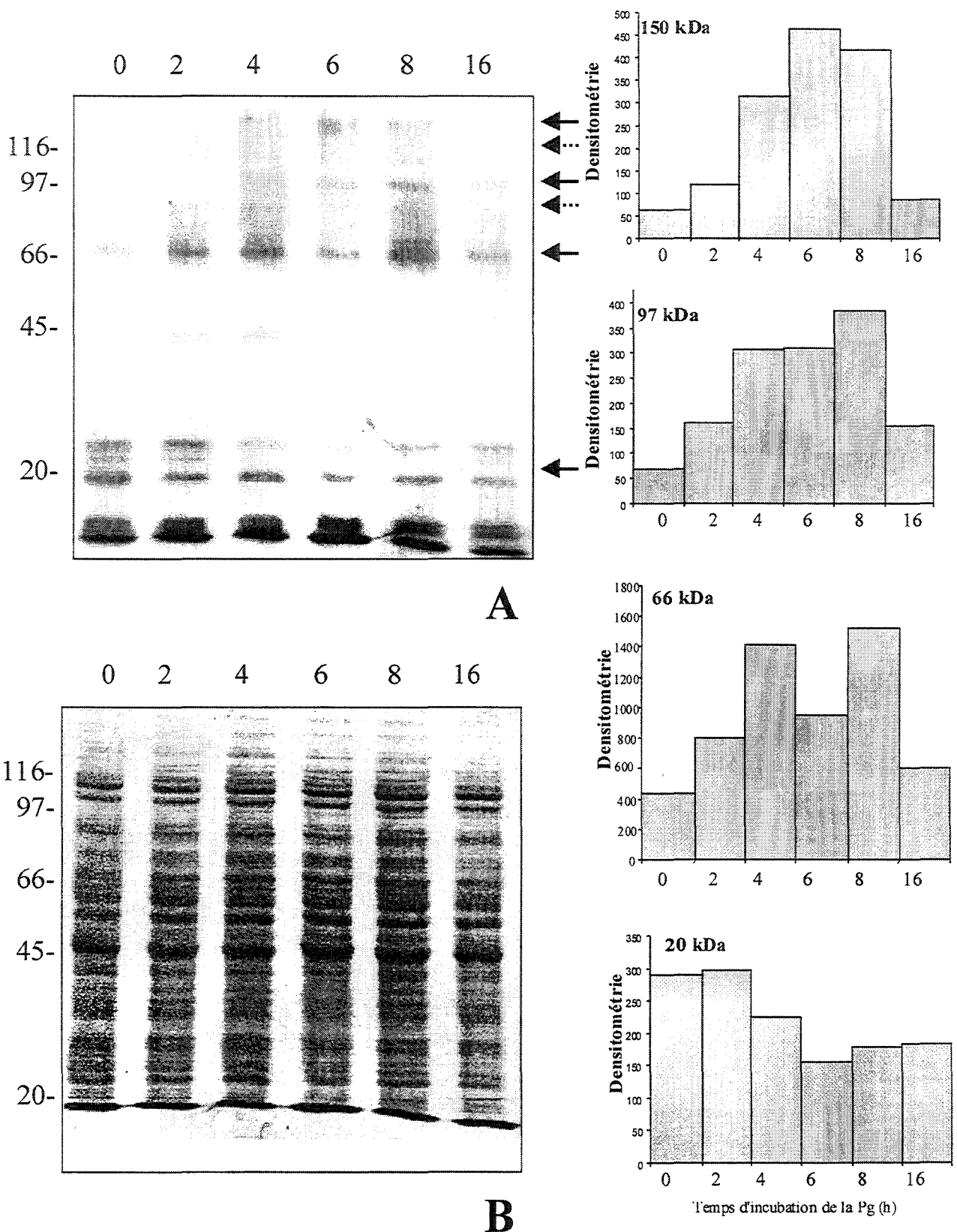


Figure 2- Cinétique de maturation des ovocytes de Xénope

A ; révélation par la WGA après traitement par la PNGase F, B ; coloration au rouge Ponceau, C ; densitométries de quelques protéines ayant leur O-GlcNAc modulée pendant la maturation

détectée à partir de 4 h, celle de 150 kDa à partir de 2 h (Fig. 2C). La glycosylation d'une bande de masse moléculaire 20 kDa a sa glycosylation qui diminue avec un minimum à 6h de cinétique, et celle-ci ré-augmente vers 8h de cinétique.

Si nous observons une augmentation générale de la O-GlcNAc lors de la maturation des ovocytes de Xénope, il nous faut : (i) démontrer que les variations se font bien sur la O-GlcNAc, (ii) démontrer si c'est une augmentation du taux de protéines ou bien une augmentation du taux de glycosylation de ces protéines (si les protéines vues par la révélation à la WGA sont invisibles au Ponceau).

3- Transfert de galactose tritié sur les O-GlcNAc terminaux

Pour vérifier que les changements de glycosylation lors de la maturation des ovocytes de Xénopes, se font bien sur la O-GlcNAc, nous avons effectué un transfert de [³H]galactose sur les résidus de GlcNAc terminaux. Pour cela nous avons utilisé la galactosyl transférase bovine qui greffe un galactose en bêta-1, 4 sur les résidus de GlcNAc à partir de l'UDP-[³H]Gal. Les protéines sont séparées en SDS-PAGE, le gel baigné dans l'Amplify^r et les protéines fluorographiées.

Comme pour la figure 1, on retrouve une augmentation de la glycosylation sur certaines protéines, après maturation des ovocytes (Figure 3A). Malgré cela il semble que (i) certaines bandes n'ont pas toujours exactement la même masse moléculaire que celle retrouvée en figure 1, (ii) l'intensité de révélation n'est pas la même, et enfin (iii) on ne retrouve pas toutes les bandes détectées par la WGA. D'abord, la masse moléculaire apparente est légèrement supérieure après transfert de galactose. Ceci peut être dû soit au fait que l'on greffe de nombreux résidus de galactose et que la masse moléculaire apparente de la protéine soit plus grande ou que la conformation de la protéine soit modifiée après transfert de galactose. De même, les intensités de révélation par rapport à celles retrouvées en WGA, sont différentes pour certaines bandes : ceci est dû au fait que le greffage de galactose se fasse sous la forme native de la protéine, et seuls les résidus de O-GlcNAc externes sont substitués. Par contre, la fixation de la WGA sur les protéines transférées s'effectue sur les résidus externes et internes, puisque la protéine est dénaturée est complètement « débobinée ». Ce phénomène est couramment rencontré pour la mise en évidence de la O-GlcNAc par transfert de galactose : une protéine peut être révélée par la WGA et pas par le galactose tritié.

La figure 3A représente la fluorographie des protéines à O-GlcNAc en phase G2 et en phase M et la figure 3B représente la coloration au bleu de coomassie.

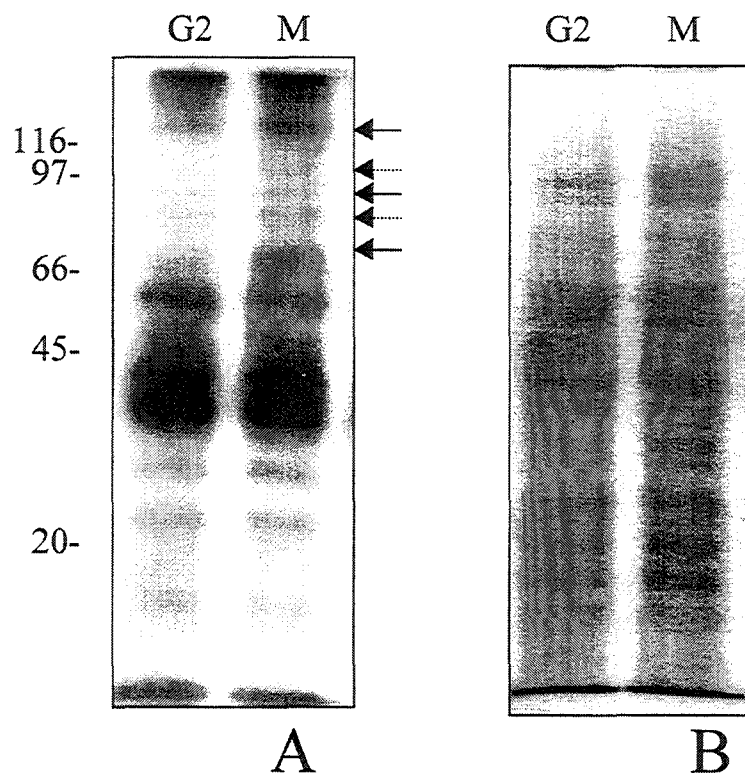


Figure 3- Marquage des protéines totales des ovocytes de Xénope immatures (G2) et matures (M)
 A; fluorographie et B, coloration au bleu de coomassie

4- Localisation cellulaire des protéines ayant leur O-GlcNAc augmenté au cours de la maturation

Des ovocytes immatures de Xénope ont été énucléés puis soumis à l'analyse biochimique. La révélation par la WGA montre clairement que toutes les protéines ayant leur niveau de O-GlcNAc augmenté lors de la maturation, ne sont pas présentes dans le noyau ou tout au moins pas de manière majoritaire. Celles-ci se retrouvent plutôt dans le compartiment cytoplasmique (figure 4A, révélation par la WGA, et figure 4B coloration des protéines totales au rouge ponceau).

5- Maturation des ovocytes de Xénope en présence d'un inhibiteur de la synthèse protéique

Afin de démontrer que l'augmentation de O-GlcNAc lors de la maturation n'est pas due à une augmentation de la synthèse protéique, le cycloheximide (CHX), un inhibiteur de la synthèse protéique, a été utilisé lors de l'étude du processus de maturation des ovocytes de Xénope. Ainsi puisque la synthèse protéique sera inhibée, la glycosylation détectée avec la WGA n'affectera alors que les protéines déjà présentes dans l'ovocyte au moment du déclenchement de la maturation. La reprise de la méiose a été obtenue cette fois en injectant directement dans les ovocytes, la protéine phosphatase cdc25 (incubation 5 et 7 h), qui en déphosphorylant cdc2, active le MPF (Figure 5). En effet lorsque la synthèse protéique est inhibée, les ovocytes sont insensibles à la progestérone mais ils entrent en méiose en réponse à l'injection de cdc25.

La figure 5A nous montre que les mêmes modifications de la glycosylation induites après incubation de la Pg sont retrouvées après injection de cdc25 que ce soit 5 ou 7 heures après l'injection. De plus ces modifications de glycosylation apparaissent de manière tout à fait normale en présence de cycloheximide. Ce résultat prouve que c'est une augmentation de la O-GlcNAc, et non une augmentation de la synthèse protéique qui est induite après activation de la maturation (pas de synthèse des substrats de la O-GlcNAc transférase) et que les enzymes à l'origine de la glycosylation sont déjà présentes dans l'ovocyte immature. La figure 5B représente la coloration au rouge ponceau de la membrane révélée par la WGA.

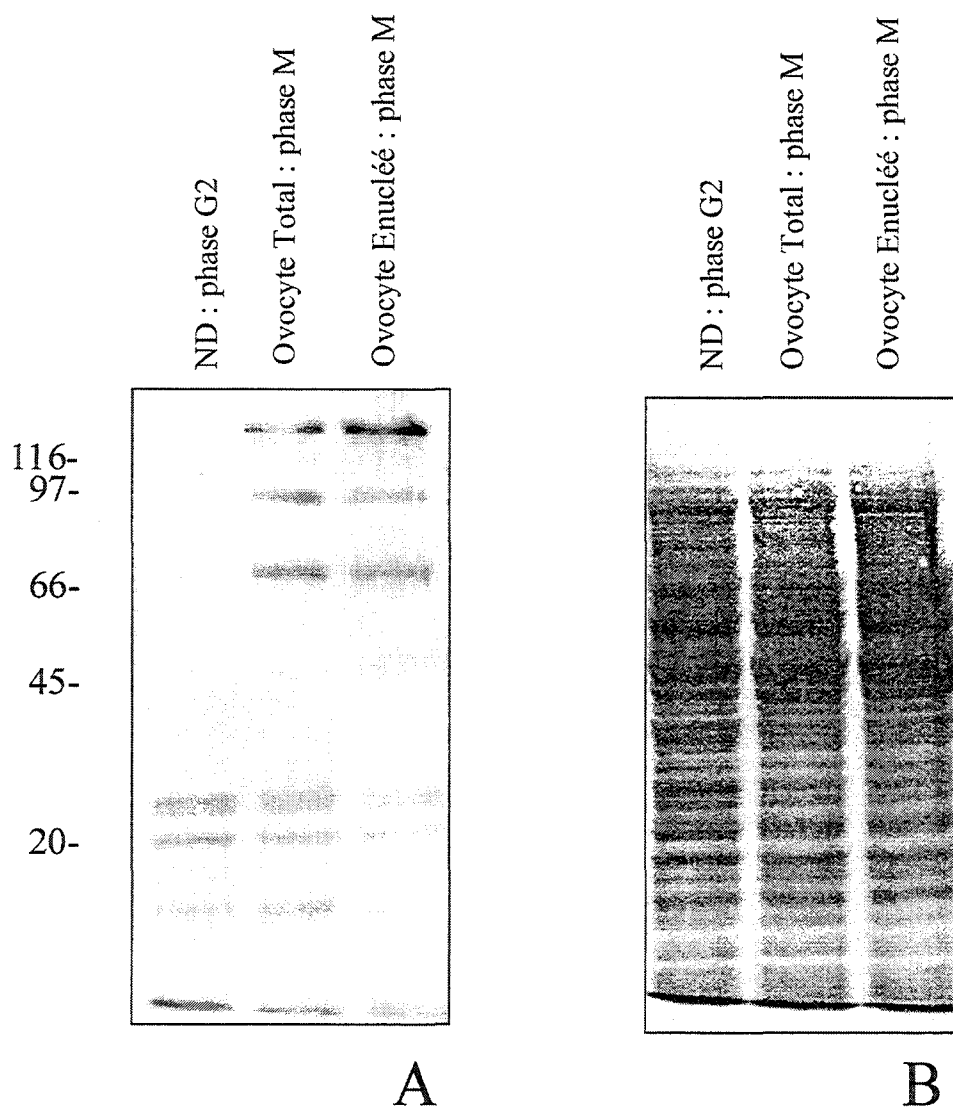


Figure 4 Localisation cellulaire des protéines ayant leur O-GlcNAc augmenté au cours de la maturation

A; Révélation par la WGA et B; coloration au rouge Ponceau

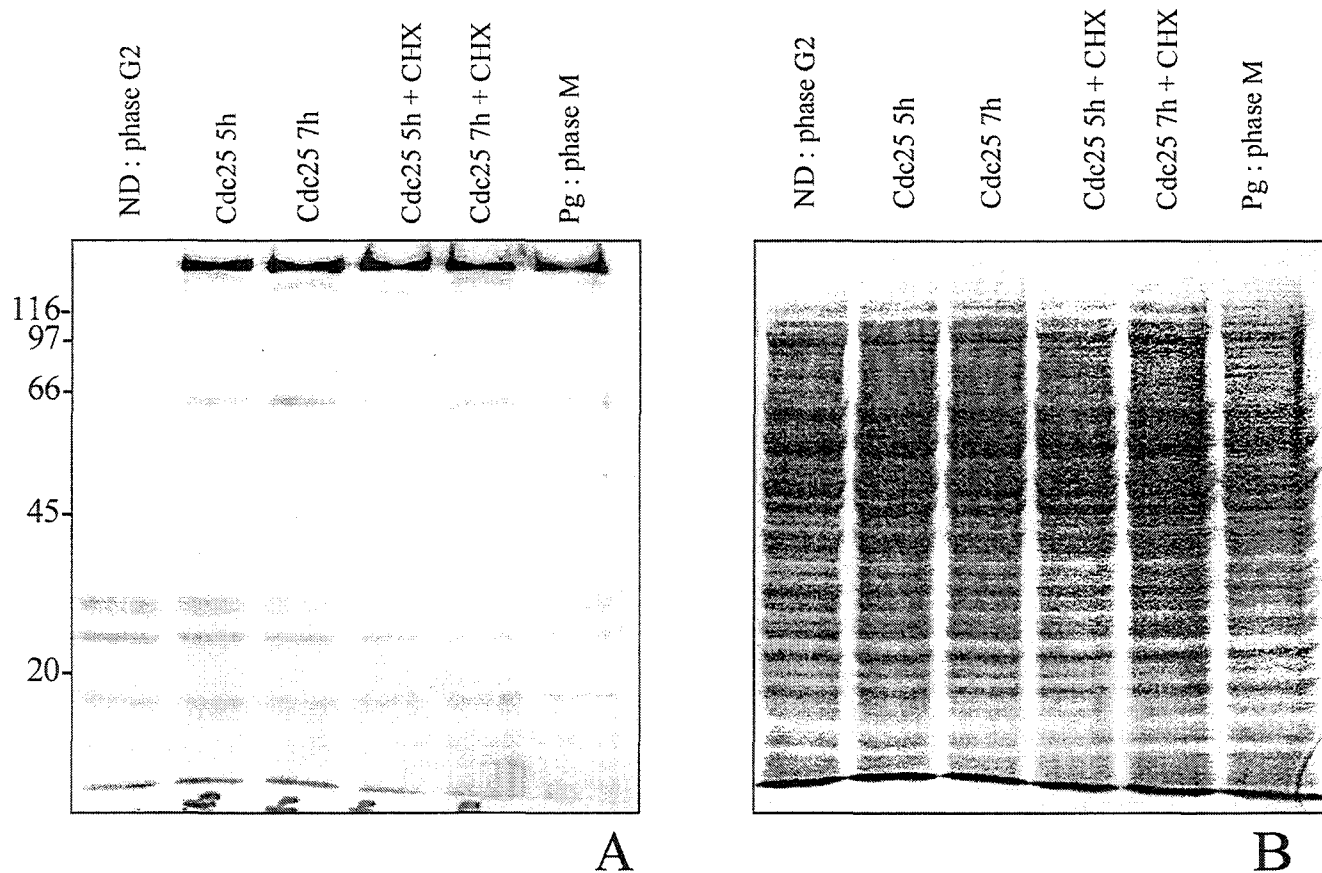


Figure 5-Maturation des ovocytes de Xénope en présence d'un inhibiteur de la synthèse protéique, le cycloheximide
 A; révélation par la WGA et B; coloration au rouge Ponceau

6- Enrichissement des protéines à O-GlcNAc par WGA-sépharose

S'il semble clair que la maturation des ovocytes de Xénope induit une augmentation de la O-N-Acétylglucosaminylation, il serait intéressant de pouvoir identifier chacune des protéines dont le taux de O-GlcNAc est augmenté. Pour cela nous avons utilisé une technique consistant à incuber les extraits d'ovocytes de Xénope en phase G2 et en phase M, en présence de WGA-sépharose et à les séparer par SDS-PAGE. Nous avons ensuite testé la WGA (Fig. 6A) et un anticorps dirigé contre la bêta-caténine (figure 6B) sur ces protéines enrichies.

La WGA nous montre un fort enrichissement en protéines à O-GlcNAc pour les bandes de masse moléculaire de 66 et 97 kDa. De même l'utilisation de l'anticorps anti- bêta-caténine montre que la bêta-caténine se retrouve dans l'enrichissement par la WGA, indiquant qu'elle est glycosylée. Par contre contrairement à ce qui est observé pour la WGA, il n'y a pas d'enrichissement en bêta-caténine mais seulement une augmentation de la glycosylation. On aurait pu s'attendre à avoir un enrichissement en bêta-caténine, ce qui n'est pas le cas. Ceci peut s'expliquer très simplement par le fait que la bêta-caténine a un niveau basal en O-GlcNAc (même très faible) dans les ovocytes non maturés (G2). Cette glycosylation est suffisante pour précipiter la bêta-caténine (G2) de manière aussi efficace que lorsque celle-ci est plus glycosylée (M). Il faut ajouter que la WGA-sépharose est d'ailleurs toujours ajoutée en excès. Malgré cette expérience, on ne peut pas être sûr que la bande de 97 kDa corresponde bien à la bêta-caténine.

7- Dosage des activités glucosaminidase et O-GlcNAc transférase au cours de la maturation

Nous avons démontré que l'augmentation de O-GlcNAc induite par la maturation n'était pas due à une augmentation de la synthèse protéique. Nous avons donc décidé de mesurer les activités de la glucosaminidase et de la O-GlcNAc transférase au cours de la maturation.

Pour cela l'activité glucosaminidasique a été mesurée en utilisant le PNP-GlcNAc-2mM dans un tampon acétate- 50mM, pH 6.5. Pour ce faire le tampon de lyse utilisé ne contenait pas de PNP-Phosphate.

L'activité O-GlcNAc transférasique a été mesurée en utilisant des peptides de synthèse contenant des séquences d'addition de O-GlcNAc en présence de 0.5 μ Ci d'UDP-

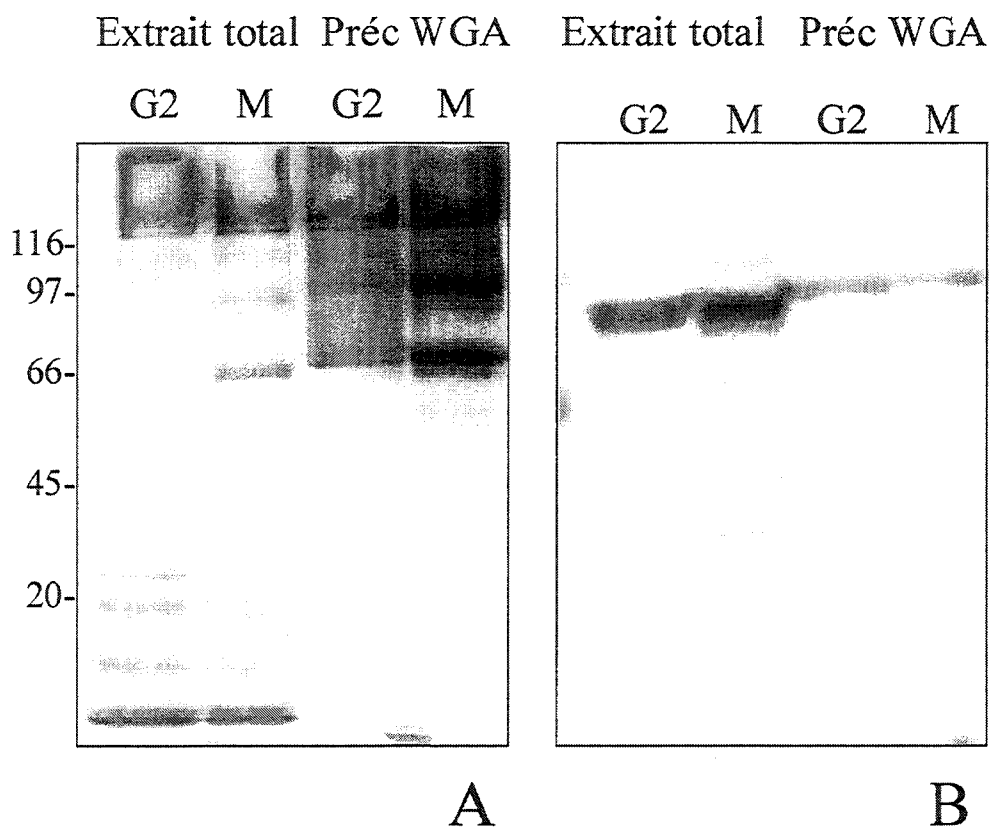


Figure 6-Enrichissement des protéines à O-GlcNAc par WGA-séparation
 A; révélation des protéines totales par la WGA et B; révélation par la WGA après enrichissement sur WGA-séparation

[¹⁴C]GlcNAc dans un tampon acétate 50mM, pH 6.5, AMP 5mM. L'incubation a duré 2 heures, à 37°C. Les échantillons ont ensuite été passés sur une colonne de 1 ml de Dowex1X8, afin de retenir l'excès d'UDP-[¹⁴C]GlcNAc n'ayant pas réagi, et les colonnes ont été lavées avec 5 volumes d'eau.

La figure 7 montre les courbes d'activité enzymatique ainsi que les tâches de maturation au cours de la cinétique. Ainsi on peut voir qu'au cours de la maturation on a une augmentation de l'activité O-GlcNAc transférase, concomitante à une diminution en activité glucosaminidase. On voit donc que le potentiel des protéines à être modifiées par la O-GlcNAc augmente au cours de la maturation.

Dans cette étude, nous avons pu démontrer que lors de la maturation des ovocytes de Xénope induite par le progestérone, le niveau de O-GlcNAc sur certaines protéines, notamment sur des protéines de 66 et 97 kDa et sur des protéines minoritaires. La protéine de 97 kDa pourrait être la bêta-caténine. Malheureusement l'identification de ces protéines par approche protéomique s'est révélée infructueuse, par le fait qu'elles soient en quantité réduite et par le fait que leur basicité ne les fasse pas migrer correctement en première dimension d'électrophorèse bidimensionnelle.

Nous avons aussi démontré une augmentation de l'activité O-GlcNAc transférase lors de cette maturation. Il serait intéressant de voir si cette augmentation de O-GlcNAc ne peut pas intervenir dans des événements postérieurs à la maturation comme la fécondation. Il aurait été intéressant pour cela de trouver des inhibiteurs de O-GlcNAc transférase. Des études utilisant l'UDP se sont montrées une fois encore infructueuses (en fait, il n'a pas encore été décrit d'inhibiteur spécifique de cette enzyme).

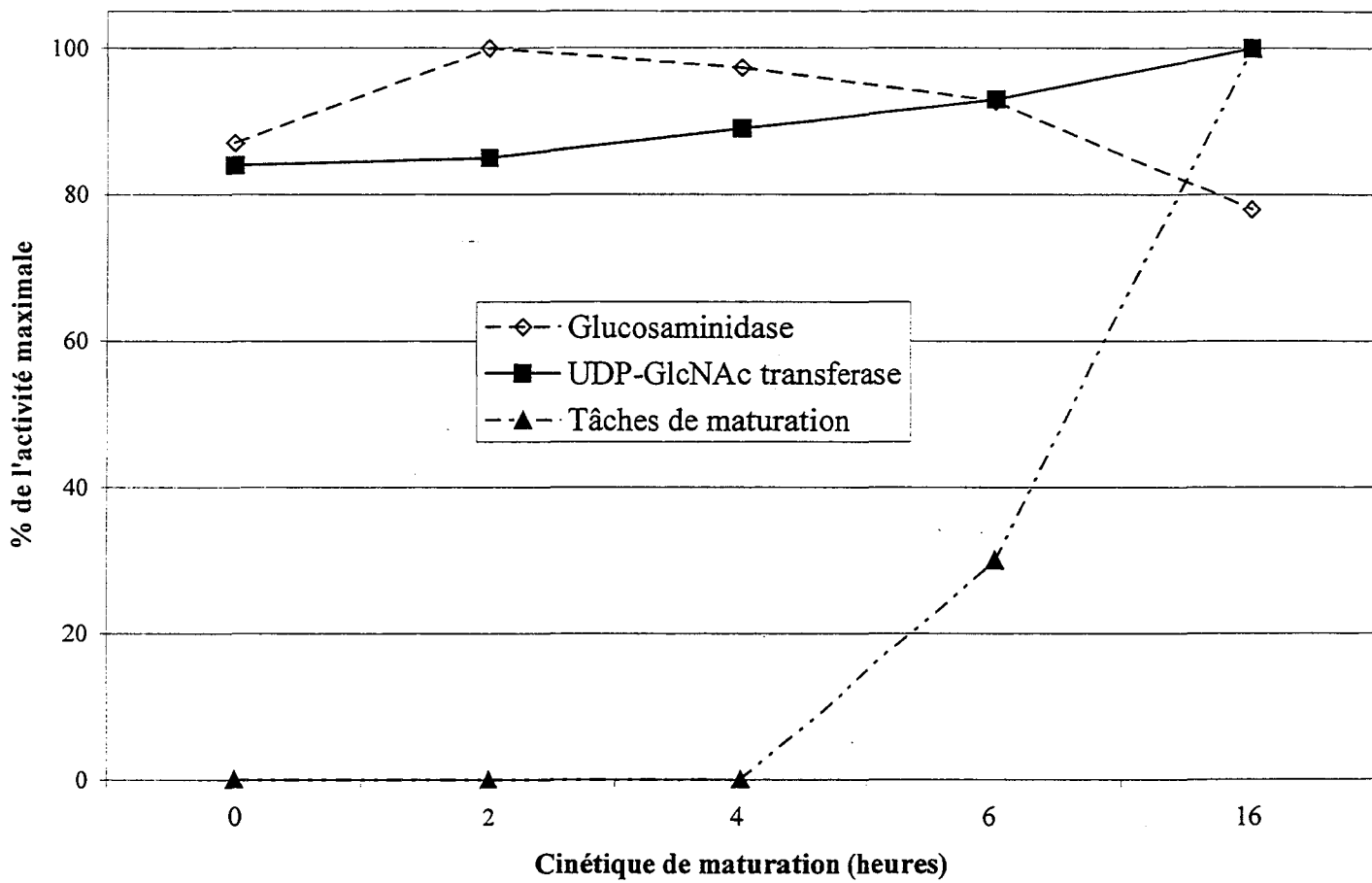


Figure 7-dosages des activités O-GlcNAc transférase et glucosaminidase pendant la maturation des ovocytes de Xénope

CONCLUSION GENERALE

Nous nous sommes attachés pendant notre thèse à l'étude de la O-N-Acétylglucosaminylation. Cette glycosylation, découverte en 1984, affecte majoritairement les protéines des compartiments cytosolique et nucléaire, et bien que la liste des protéines modifiées par la O-GlcNAc ne cesse de s'allonger, les fonctions de la O-GlcNAc restent mal connues.

Ce travail s'est divisé en cinq grandes parties et deux points majeurs ont pu être abordés. Le premier point concerne la balance phosphorylation/O-N-Acétylglucosaminylation. Ce travail a été mené sur l'ensemble des protéines d'une lignée de neuroblastomes puis sur une protéine en particulier, la protéine Tau. Le deuxième point abordé s'est axé sur l'implication de la O-GlcNAc dans le transport nucléaire des protéines cytosoliques. Nous avons pour cela travaillé sur cette même protéine Tau et avons essayé de relier la balance entre la phosphorylation et la O-N-Acétylglucosaminylation avec la localisation nucléaire de ces protéines Tau. Un autre aspect de cette étude a été de caractériser l'existence de lectines spécifiques du résidu de GlcNAc, dans le cytosol et le noyau de foie de rat, et pouvant intervenir dans le transport de protéines cytosoliques et jouant alors le rôle de navette. Deux autres études sont venues s'ajouter aux travaux précédents. La première a concerné l'étude de la O-GlcNAc sur les produits du gène Pax-6 et enfin la deuxième, et dernière, a été consacrée à l'étude de la maturation des ovocytes de Xénope sur les niveaux de O-GlcNAc.

Pour l'étude de la balance phosphorylation/O-N-Acétylglucosaminylation sur des cellules de neuroblastomes, nous avons utilisé un inhibiteur de phosphatases, l'AO. Ces études nous ont montré qu'il y avait une diminution de la fixation de la WGA pour certaines protéines après traitement des cellules par cet inhibiteur. L'utilisation de l'AO a aussi résulté en une diminution de l'incorporation de [¹⁴C]Glucosamine sur les protéines du neuroblastome, concomitamment à une augmentation de l'incorporation de [³³P]orthophosphate. Le dosage du pool intracellulaire d'UDP-GlcNAc après traitement par l'AO a démontré que la diminution de O-GlcNAc était due à une augmentation de l'occupation des sites par la phosphorylation, et pas d'une diminution du « pool » intracellulaire d'UDP-GlcNAc. Pendant ce travail, d'autres auteurs sont arrivés aux mêmes conclusions que nous, en utilisant des stratégies différentes: Haltiwanger *et al*, 1998, en utilisant un inhibiteur de la glucosaminidase, la PUGNAC, et Griffith *et Schmitz*, 1999, en

utilisant des activateurs et inhibiteurs de kinases. Cependant, il est clair aujourd'hui que la compétition de la O-GlcNAc vis-à-vis de la phosphorylation, n'affecte pas toutes les protéines ou tous les sites de phosphorylation. Dans un avenir proche, on peut s'attendre à ce que des travaux s'appliquent à la recherche des kinases réellement en compétition avec la O-GlcNAc transférase. Après avoir étudié la balance phosphorylation/O-N-Acétyleglucosaminylation sur l'ensemble des protéines des cellules de neuroblastome Kelly, nous avons fait cette étude sur une protéine particulière : la protéine Tau. Nous avons travaillé sur une souche de neuroblastomes transfectée avec la plus longue isoforme des protéines Tau : Tau441. Nous avons démontré que Tau441, localisée dans le cytosol et dans le noyau, était glycosylée. Après traitement par l'AO, il y a une diminution de 75% de la glycosylation de ces protéines Tau dans le cytosol, alors que dans le noyau la diminution de la glycosylation est directement corrélée à une diminution de Tau en elle-même (baisse de 50%). De plus en électrophorèse 2D- nous avons vu que la glycosylation de Tau se localisait spécifiquement au niveau des isoformes les moins phosphorylées. En plus des isoformes classiques des protéines Tau, une isoforme de bas poids moléculaire a pu être détectée dans le noyau, glycosylée aussi mais dont l'AO ne semble pas perturber pas, ni la glycosylation, ni la localisation nucléaire. Ces résultats sont le reflet d'une exclusion mutuelle entre la phosphorylation et la O-GlcNAc sur des résidus de sérine et de thréonine de la chaîne polypeptidique de certaines protéines. La localisation nucléaire de Tau441 semble être dépendante de cette balance phosphorylation /O-N-Acétyleglucosaminylation. Il serait intéressant de savoir quelles kinases sont en compétition avec la O-GlcNAc transférase, puisque toutes les protéines phosphorylées ne semblent pas être impliquées dans cette balance, comme nous l'avons mentionné plus haut. La protéine Tau pourrait être un modèle intéressant pour cette étude en vue, du nombre de sites de phosphorylation qu'elle contient, et des différentes kinases qui peuvent la phosphoryler.

Le travail effectué sur les produits du gène Pax-6, gène impliqué dans le développement de l'œil, s'est un peu démarqué des travaux précédemment présentés dans les deux premières parties. Nous avons démontré que seules les isoformes des produits du gène Pax-6 exclusivement nucléaires sont modifiées par la O-GlcNAc, ce qui renforce l'hypothèse de l'importance de cette glycosylation pour la localisation nucléaire. En outre, il semble que la O-GlcNAc ne soit pas indispensable à la fixation de l'ADN puisque après fixation elle reste accessible à la WGA et il a été démontré que ces facteurs de transcription produits chez *E. coli* sont aussi capables de fixer une sonde spécifique. Cette O-GlcNAc semble localisée de manière préférentielle dans le domaine paired de liaison à l'ADN, et l'examen de la séquence primaire a révélée un nombre de sites potentiellement O-GlcNAc au niveau du domaine

carboxyterminal. Malgré tout il nous restera à définir précisément les sites de O-*N*-Acétylglucosaminylation et leur rôle en ce qui concerne Pax-6. Malheureusement des systèmes de transcription *in vitro* avec le gène Pax-6 n'existent pas.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'existence de lectines spécifiques du résidu de GlcNAc dans le cytosol et le noyau de foie de rat. Si la O-GlcNAc est indispensable au transport de protéines vers le noyau, de telles lectines doivent exister. De telles études ont déjà été menées sur des cellules HL60 (Felin *et al*, 1994) et le concept du rôle de lectines à GlcNAc jouant la navette entre les compartiments cytosoliques et nucléaires n'est pas nouveau (Duverger *et al*, 1996). Nous avons retrouvé dans ces deux compartiments un triplet de protéines de masse moléculaire 70, 65 et 55 kDa retenues spécifiquement sur GlcNAc immobilisée. Une électrophorèse bidimensionnelle de ces lectines et l'utilisation d'anticorps anti-phospho-dépendants nous ont révélé que l'état de phosphorylation était différent suivant la localisation de ces lectines. Ces lectines existent sous la forme de multimères et sont associées à une activité phosphatasique. La reconnaissance de ligands endogènes par ces lectines nous pousse aujourd'hui à en rechercher la nature. Il ne faut pas oublier de mentionner que ces mêmes lectines à GlcNAc peuvent aussi jouer un rôle dans l'inhibition des interactions protéiques qui mettent en jeu la O-GlcNAc et le rôle de ces lectines dans le transport nucléaire reste à prouver.

Enfin l'étude de la maturation des ovocytes sur la O-*N*-Acétylglucosaminylation a été étudiée. Ainsi nous avons pu démontrer que la maturation induisait une augmentation de la O-GlcNAc sur certaines protéines notamment des protéines de masses moléculaires apparentes de 97 kDa et 66 kDa et exclusivement cytoplasmiques. La bande de 97 kDa pourrait être la bêta-caténine mais cette hypothèse doit être renforcée, notamment par approche protéomique. Cette augmentation de la O-*N*-Acétylglucosaminylation est le reflet d'une augmentation de l'activité O-GlcNAc transférase mais pas d'une augmentation de la synthèse protéique. Il sera intéressant de connaître le rôle de la O-GlcNAc sur la maturation ou sur les événements antérieurs comme la fertilisation.

Si la relation antagoniste de la O-*N*-Acétylglucosaminylation vis à vis de la phosphorylation ne semble faire aucun doute, il n'en va pas de même pour le rôle de la O-GlcNAc sur le transport nucléaire. Les études portant sur ce mécanisme sont peu nombreuses et il y a encore beaucoup à faire : si le triplet de protéines fait bien partie de la machinerie de transport, il sera important de connaître le rôle chacun des membres et d'éplucher soigneusement le mécanisme de transport. De même, quel est le rôle de la O-GlcNAc lors de

la maturation ? Si c'est bien la O-GlcNAc qui semble être une conséquence du démarrage de la maturation et non l'inverse, on ne sait pas à quoi la O-GlcNAc peut servir ultérieurement.

Comme nous pouvons le voir, beaucoup de choses restent à faire sur les rôles joués par la O-GlcNAc et d'autres fonctions non étudiées dans notre thèse méritent notre intérêt : en effet si la O-GlcNAc joue un rôle antagoniste à la phosphorylation, la connaissance du nombre de processus cellulaires mis en jeu par cette phosphorylation nous laisse imaginer l'importance de la O-GlcNAc et de la besogne à accomplir sur cette glycosylation originale.

Références
bibliographiques

A

- Akimoto, Y., Kreppel, L., K., Hirano, H. & Hart, G., W. (1999) **Localization of the O-linked N-acetylglucosamine transferase in rat pancreas.** *Diabetes* **48**, 2407-2413
- Andersen, C., B., Roth, R., A. & Conti, M. (1998) **Protein kinase B/Akt induces resumption of meiosis in *Xenopus* oocytes.** *J. Biol. Chem.* **273**, 18705-18708
- Andersson, H., Nilsson, I., & Vonheijne, G. (1996) **Calnexin can interact with N-linked glycans located close to the endoplasmic reticulum membrane.** *FEBS Lett.* **397**, 321-324
- Arias, C., Sharma, N., Davies, P. & Shafit-Zagardo, B. (1993) **Okadaic acid induces early changes in microtubule-associated protein 2 and tau phosphorylation prior to neurodegeneration in cultured cortical neurons.** *J. Neurochem.* **61**, 673-682
- Ashwell, G. (1994) **The physiological role of the hepatic lectin for asialoglycoproteins : an evaluation of current hypotheses, in *Lectin blocking. New strategies for the prevention and therapy of tumor metastasis and infectious diseases* (J. Beuth and G. Pulverer, eds) 26-36, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York**

B

- Barondes, S., H., Cooper, D., N., W., Gitt, M., A. & Leffler, H. (1994) **Galectins : Structure and function of a large family of animal lectins.** *J. Biol. Chem.* **269**, 20807-20810
- Blatch, G., L. & Lassle, M. (1999) **The tetratricopeptide repeat : a structural motif mediating protein-protein interactions.** *Bioessays* **21**, 932-939
- Borgne, A., Ostvold, A., C., Flament, S. & Meijer, L. (1999) **Intra-M phase-promoting factor phosphorylation of cyclin B at prophase-metaphase transition.** *J. Biol. Chem.* **274**, 11977-11986
- Brand, R. (1996) **The tau proteins in neuronal growth and development.** *Frontiers in Bioscience* **1**, 118-130.
- Buée, L. & Delacourte, A. (1997) **Normal and pathological Tau proteins as factors for microtubule assembly.** *Int. Rev. Cytol.* **171**, 167-224
- Buée, L. & Delacourte, A. (1999) **Comparative biochemistry of Tau in progressive supranuclear palsy, corticobasal degeneration, FTDP-17 and Pick's disease.** *Brain Pathol.* **4**, 681-693

Buée, L., Buissière, T., Buée-Scherrer, V., Delacourte, A. & Hof, P., R. (2000) **Tau proteins isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders.** *Brain Res. Rev.* (In press)

C

Caillet-Boudin, M., -L., Strecker, G. & Michalski, J.-C. (1989) **O-Linked GlcNAc in serotype-2 adenovirus fibre.** *Eur. J. Biochem.* **184**, 205-211

Caillet-Boudin, M., -L. & Delacourte, A. (1996) **Induction of a specific tau Alzheimer epitope in SY-5Y neuroblastoma cells.** *Neuroreport.* **8**, 307-310

Carrière, C., Plaza, S., Martin, P., Quatannens, B., Bailly, M., Stehelin, D., & Saule, S. (1993) **Characterization of quail Pax-6 (Pax-QNR) proteins expressed in the neurotina.** *Mol. Cell. Biol.* **13**, 7257-7266

Carrière, C., Plaza, S., Caboche, J., Dozier, C., Bailly, M., Martin, P., & Saule, S. (1995) **Nuclear localization signals, DNA Binding, and transactivation properties of quail Pax-6 (Pax-QNR) isoforms.** *Cell Growth & Differentiation* **6**, 1531-1540

Chalepakis, G., Wijnholds, J., Giese, P., Schachner, M. & Gruss, P. (1994) **Characterization of Pax-6 and Hoxa-1 binding to the promoter region of the neural cell adhesion molecule L1.** *DNA Cell. Biol.* **13**, 891-900

Chang, Q., Baker, J., R., Yang, X., Paterson, A., J. & Kudlow, J., E. (2000) **Phosphorylation of human glutamine : fructose-6-phosphate amidotransferase by cAMP dependent protein kinase at serine 205 blocks the enzyme activity.** *J. Biol. Chem.* **275**, 21981-21987

Chou, C., -F., Smith, A., J. & Omary, M., B. (1992) **Characterization and dynamics of O-linked glycosylation of human cytokeratin 8 and 18.** *J. Biol. Chem.* **267**, 3901-3906

Chou, C., -F., & Omary, M., -B. (1993) **Mitotic arrest-associated enhancement of O-linked glycosylation and phosphorylation of human keratins 8 and 18.** *J. Biol. Chem.* **268**, 4465-4472

Chou, T., -Y., Dang, C., -V. & Hart, G., W. (1995a) **Glycosylation of the c-Myc transactivation domain.** *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **92**, 4417-4421

Chou, T., -Y., Hart, G., W. & Dang, C., -V. (1995b) **c-Myc is glycosylated at threonine 58, a known phosphorylation site and a mutational hot spot in lymphomas.** *J. Biol. Chem.* **270**, 18961-18965

- Chow, L., R., Altmann, R., C., Lang, A., R. & Hemmati-Brivanlou, A. (1999). **Pax-6 induces ectopic eyes in vertebrate.** *Development* **126**, 4213-4222
- Cohen, P. (1989) **The Structure and Regulation of Protein Phosphatases.** *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 453-508
- Codogno, P., Bauvy, C., Sève, A., -P., Hubert, M., Ogier-Denis, E., Aubery, M. & Hubert, J. (1992) **Evidence for the presence of complex high-molecular mass N-linked oligosaccharides in intranuclear glycoproteins from HeLa cells.** *J. Cell. Biochem.* **50**, 93-102
- Cohen, P. & Cohen, P., T., W. (1989) **Protein Phosphatases Come of Age.** *J. Biol. Chem.* **264**, 21435-21438
- Cohen, P., Holmes C., F., B. & Tsukitani, Y. (1990) **Okadaic acid : a new probe for the study of cellular regulation.** *Trends Biochem. Sci.* **15**, 98-102
- Cole, R., N. & Hart, G., W. (1999) **Glycosylation sites flank phosphorylation sites on synapsin I : O-linked N-acetylglucosamine residues are localized within domains mediating synapsin I interactions.** *J. Neurochem.* **73**, 418-428
- Comer, F., I. & Hart, G., W. (1996) **Investigating the role of O-GlcNAc on RNA polymerase II.** *FASEB J.* **10**, A1119
- Comer, F., I. & Hart, G., W. (1999) **O-GlcNAc and the control of gene expression.** *Biochim. Biophys. Acta* **1473**, 161-171
- Comer, F., I. & Hart, G., W. (2000) **O-Glycosylation of nuclear and cytosolic proteins.** *J. Biol. Chem.* **275**, 29179-29182
- Cooper, D., N. & Barondes, S., H. (1999) **God must love galectins ; he made so many of them.** *Glycobiology* **9**, 979-984
- Corden, J., L. (1990) **Tails of RNA polymerase II.** *Trends Biochem. Sci.* **15**, 383-287
- Cordes, V., Waizenegger, I. & Krohne, G. (1991) **Nuclear pore complex glycoprotein p62 of Xenopus laevis and mouse: cDNA cloning and identification of its glycosylated region.** *Eur. J. Cell. Biol.* **55**, 31-47
- Couchie, D., Mavillia, C., Georgieff, I., S., Liem, R., K., Shelanski, M., L. & Nunez, J. (1992) **Primary structure of high molecular weight tau present in the peripheral nervous system.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89(10)**, 4378-4381
- Crocker, P., R., Clark, E., A., Filbin, M., Gordon, S., Jones, Y., Kehrl, J., H, Kelm, S., Le Douarin, N., Powell, L., Roder, J. & al. (1998) **Siglecs : a family of sialic acid binding lectins.** *Glycobiology* **8**, v

Cvekl, A., Sax, C., Bresnick, E. & Piatigorsky, J. (1994) **A complex array of positive and negative elements regulates the chicken α A-Crystallin gene : involvement of Pax-6, USF, CREB and/orCREM, and AP-1 proteins.** *Mol. Cell. Biol.* **14**, 7363-7376

D

Datta, B., Ray, M., K., Chakrabarti, D., Wylie, D., E. & Gupta, N., K. (1989) **Glycosylation of eukaryotic peptide chain Initiation Factor 2 (eIF2)-associated 67-kDa polypeptide (p⁶⁷) and its possible Role in the Inhibition of eIF-2 Kinase-catalysed Phosphorylation of the eIF-2 α -Subunit.** *J. Biol. Chem.* **34**, 20620-20624

Davis, L., I. (1995) **The nuclear pore complex.** *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 865-896

Delacourte, A. & Buée, L. (1997) **Normal and pathological tau proteins as factors for microtubule assembly.** *Int. Rev. Cytol.* **171**, 167-224

Desplan, C. (1997) **Fonction des gènes Pax : synergie de liaison à l'ADN entre le domaine paired et l'homéodomaine.** *Méd./Sci.* **13**, 147-155

Deuter-Reinhard, M., Appell, G., Pot, D., Klippel, A., Williams, L., T. & Kavanaugh, W., M. (1997) **SIP/SHIP inhibits Xenopus oocyte maturation induced by insulin and phosphatidylinositol 3-kinase.** *Mol. Cell. Biol.* **17**, 2559-2565

Ding, M. & Vandre, D., D. (1996) **High molecular weight microtubule-associated proteins contain O-linked-N-acetylglucosamine.** *J. Biol. Chem.* **271**, 12555-12561

Dong, D., L., -Y., & Hart, G., W. (1991) **Purification and initial characterization of a cytoplasmic and neutral N-Acetylglucosaminidase from rat spleen that has activity against O-GlcNAc.** *Glycoconjugate J.* **8**, 211

Dong, D., L., -Y, Xu, Z., -S., Chevrier, M., R., Cotter, R., J., Cleveland, D., W., & Hart, G., W. (1993) **Glycosylation of mammalian neurofilaments. Localization of multiple O-linked N-Acetylglucosamine moieties on neurofilament polypeptides L and M.** *J. Biol. Chem.* **268**, 16679-16687

Dong, D., L., -Y., & Hart, G., W. (1994) **Purification and characterization of an O-GlcNAc Selective N-Acetyl- β -D-glucosaminidase from rat cytosol.** *J. Biol. Chem.* **269**, 19321-19330

Dontenwill, M., Roussel, G. & Zanetta, J., -P. (1985) **Immunohistochemical localization of a lectin like molecule "R1" during the postnatal development of the rat cerebellum.** *Dev. Brain Res.* **17**, 245-252

Drickamer, K. (1999) **C-type lectin-like domains.** *Cur. Opin. Struc. Biol.* **9**, 585-590

- Dumont, J., N. (1972) **Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals.** *J. Morphol.* **136**, 153-179
- Dupont-Wallois, L., Sautière, P., E., Cocquerelle, C., Bailleul, B., Delacourte, A. & Caillet-Boudin, M., -L. (1995) **Shift from fetal-type to Alzheimer-type phosphorylated Tau proteins in SKNSH-SY 5Y cells treated with okadaic acid.** *FEBS Lett.* **357**, 197-201
- Duverger E., Carpentier, V., Roche A., -C. & Monsigny M. (1993) **Sugar-dependent nuclear import of glycoconjugates from the cytosol.** *Exp. Cell Res.* **207**, 197-201
- Duverger E., Pellerin-Mendes, C., Mayer, R., Roche A.-C. & Monsigny M. (1995) **Nuclear import of glycoconjugates is distinct from the classical NLS pathway.** *J. Cell Sci.* **108**, 1325-1332
- Duverger E., Roche A., -C. & Monsigny M. (1996) **N-Acetylglucosamine-dependent nuclear import of neoglycoproteins.** *Glycobiology* **6**, 381-386

E

- Elliot, S., P., Schmied, R., Gabel, C., A. & Ambron, R., T. (1993) **An 83 kDa O-GlcNAc-glycoprotein is found in the axoplasm and nucleus of *Aplysia* neurons.** *J. Neurosc.* **13**, 2424-2429

F

- Fang, F. & Newport, J., W. (1991) **Evidence that the G1-S and G2-M transitions are controlled by different cdc2 proteins in higher eukaryotes.** *Cell* **66**, 731-742
- Felin, M., Doyenne-Moyne, M., -A., Rousseau, C., Schröder, H., C. & Sève, A., -P. (1997) **Characterization of a putative 82 kDa nuclear ligand for the N-Acetylglucosamine-Binding Protein CBP70.** *Glycobiology* **7**, 23-29
- Felin, M., Doyenne-Moyne, M., -A., Hadj-Sahraoui, Y., Aubery, M., Hubert, J. & Sève, A., -P. (1994) **Identification of two nuclear N-Acetylglucosamine-Binding Proteins.** *J. Cell. Biochem.* **56**, 527-535
- Ferrell, J., E. (1999) ***Xenopus* oocyte maturation : new lessons from a good egg.** *BioEssays* **21**, 833-842

- Finidori-Lepicard, J., Schorderet-Stalkine, S., Hanoune, J. & Baulieu, E., -E. (1981) **Progesterone inhibits membrane-bound adenylate cyclase in *Xenopus laevis* oocytes.** *Nature* **292**, 255-257
- Finlay, D., R., Newmeyer, D., D., Price, T., M., & Forbes D., J. (1987) **Inhibition of In Vitro Nuclear Transport by a Lectin that Binds to Nuclear Pores.** *J. Cell Biol.* **104**, 189-200
- Finlay, D., R., Meier, E., Bradley, P., Horecka, J. & Forbes, D., J. (1991) **A complex of nuclear pore proteins required for pore function.** *J. Cell Biol.* **114**, 169-183
- Flament, S., Delacourte, A., Delaère, P., Duyckaerts, C. & Hauw, J., -J. (1990) **Correlation between microscopical changes and Tau 64 and 69 biochemical detection in senile dementia of the Alzheimer type. Tau 64 and 69 are reliable markers of the neurofibrillary degeneration.** *Acta. Neuropathol.* **80**, 212-215
- Flament, S., Browaeys, E., Rodeau, J., -L., Bertout, M. & Vilain, J., -P. (1996) **Xenopus oocyte maturation: cytoplasm alkalization is involved in germinal vesicle migration.** *Int. J. Dev. Biol.* **40**, 471-476
- Furiya, Y., Sahara, N. & Mori, H. (1993) **Okadaic acid enhances abnormal phosphorylation on tau proteins.** *Neurosc. Lett.* **156**, 67-69

G

- Gabius, H., J. (1997) **Animals lectins.** *Eur. J. Biochem.* **243**, 543-576
- Gewurz, H., Zhang, X., H. & Lint, T., F. (1995) **Structure and function of the galectins.** *Curr. Opin. Immunol.* **7**, 54-64
- Girault, J., -A. (1994) **Protein Kinases and Phosphatases.** *Res. Biochem. Int.* **X**, 1-6
- Glaser, T., Jepeal, L., Edwards, J., G., Young, R., Favor, J & Maas, R., L (1994) **Pax-6 gene dosage effect in a family with congenital cataracts, aniridia, anophthalmia and central nervous system defects.** *Nature genet.* **7**, 463-471.
- Godeau, J., -F., Schorderet-Slatkine, S., Hubert, P. & Baulieu, E., -E. (1978) **Induction of maturation in *Xenopus laevis* oocytes by a steroid linked to a polymer.** *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **75**, 2353-2357
- Goedert, M., Spillantini, M., G., Potier, M., C., Ulrich, J. & Crowther, R., A. (1989) **Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing 4 tandem repeats – Differential expression of tau protein messenger RNAs in human brain.** *EMBO J.* **8**, 393-399

- Goldberg, M. W. & Allen, T. D. (1995) **Structural and functional organization of the nuclear envelope.** *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 301-309
- Gonzalez, S., A. & Burrone, O., R. (1991) **Rotavirus NS26 is modified by addition of single O-linked residues of N-acetylglucosamine.** *Virology* **182**, 8-16
- Goodman, A., R., Cardozo, T., Abagyan, R., Altmeyer, A., Wisniewsky, H., G. & Vilak, J. (1996) **Long pentraxins : an emerging group of proteins with diverse functions.** *Cytokine Growth Factor Rev.* **7**, 191-202
- Görlich, D. & Mattaj, L., W. (1996) **Nucleocytoplasmic transport.** *Science* **271**, 1513-1518
- Greenwood, J., A. & Johnson, G., V. (1995) **Localization and in situ phosphorylation state of nuclear tau.** *Exp. Cell. Res.* **220**, 332-337
- Greis, K., D., Gibson, W. & Hart, G., W. (1994) **Site-specific glycosylation of the human cytomegalovirus tegument basic protein (UL32) at serine 921 and serine 952.** *J. Virol.* **68**, 8339-8349
- Griffith, L., S., Mathes, M. & Schmitz, B. (1995) **Beta-amyloid precursor protein is modified with O-linked N-Acetylglucosamine** *J. Neurosci. Res.* **41**(2), 270-278
- Griffith, L., S. & Schmitz, B. (1995) **O-linked N-Acetylglucosamine is upregulated in Alzheimer brains.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **213**(2), 424-431
- Griffith, L., S. & Schmitz, B. (1999) **O-linked N-Acetylglucosamine levels in cerebellar neurons respond reciprocally to perturbation of phosphorylation.** *Eur. J. Biochem.* **262**, 824-831
- Grindley, J., Davidson, D. & Hill, R. (1995) **The role of Pax-6 in eye and nasal development.** *Development* **121**, 1433-1442

H

- Hagmann, J., Grob, M. & Burger, M., M. (1992) **The cytoskeletal protein talin is O-glycosylated.** *J. Biol. Chem.* **276**, 14424-14428
- Halder, G., Gallaus, P. & Gehring, W., J. (1995) **Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in drosophila.** *Science* **267**, 1788-1792
- Haltiwanger, R., S., Holt, G., D. & Hart G., W. (1990) **Enzymatic addition of O-GlcNAc to nuclear and cytoplasmic proteins, identification of a uridine diphospho-N-Acetylglucosamine : peptide β -N-Acetylglucosaminyltransferase.** *J. Biol. Chem.* **265**, 2563-2568

- Haltiwanger, R., S., Blomberg, M., A. & Hart, G., W. (1991) **Glycosylation in the cytoplasm and the nucleus : purification and characterization of the O-GlcNAc transferase.** *Glycoconjugate J.* **8**, 212
- Haltiwanger, R., S., Blomberg, M., A. & Hart, G., W. (1992) **Glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins: purification and characterization of a uridine diphospho-*N*-Acetylglucosamine : Polypeptide β -*N*-Acetylglucosaminyltransferase.** *J. Biol. Chem.* **267**, 9005-9013.
- Haltiwanger, R., S. & Philipsberg, G., A. (1997) **Mitotic arrest with nocodazole induces selective changes in the level of O-Linked *N*-Acetylglucosamine and accumulation of incompletely processed *N*-Glycans on proteins from HT29 cells.** *J. Biol. Chem.* **272**, 8752-8758
- Haltiwanger, R., S., Busby, S., Grove, K., Li, S., Mason, D., Medina, L., Moloney, D., Philipsberg, G. & Scartozzi, R. (1997) **O-Glycosylation of nuclear and cytoplasmic Proteins : regulation analogous to phosphorylation ?** *Biochem. Biophys. Res. Com.* **231**, 237-242
- Haltiwanger, R., S., Grove, K. & Philipsberg, G., A. (1998) **Modulation of O-Linked *N* Acetylglucosamine levels on nuclear and cytoplasmic proteins *in vivo* using the peptide O-GlcNAc- β -*N*-acetylglucosaminidase inhibitor O-(2-Acetamido-2-deoxy-D-glucosaminopyranosylidene)amino-*N*-phenylcarbamate.** *J. Biol. Chem.* **273**, 3611-3617
- Han, I. & Kudlow, J., E. (1997) **Reduced O-Glycosylation of Sp1 is associated with increased proteasome susceptibility.** *Mol. Cell. Biol.* **17**, 2550-2558
- Han, I., Oh, E., -S. & Kudlow, J., E. (2000) **Responsiveness of the state of O-linked *N*-Acetylglucosamine modification of nuclear pore protein p62 to the extracellular glucose concentration.** *Biochem. J.* **350**, 109-114
- Hanasaki, K., Varki, A. & Powell, L., D. (1995) **CD-22 mediated cell adhesion to cytokine activated human endothelial cells.** *J. Biol. Chem.* **270**, 7533-7550
- Hansen, S. & Holmskov, U. (1998) **Structural aspects of collectins and receptors for collectins.** *Immunobiology* **199**, 165-189
- Hart, G., W., Kreppel, L., K., Comer, F., I., Arnold, C., S., Snow, D., M., Ye, Z., Cheng, X., DellaManna, D., Caine, D., S., Earles, B., J., Akimoto, Y., Cole, R., N. & Hayes, B., K. (1996) **O-GlcNAcylation of key nuclear and cytoskeletal proteins : reciprocity with O-phosphorylation and putative roles in protein multimerization.** *Glycobiology* **6**, 711-716
- Hausen, P. & Riebesell, M. (1991) **The early development of *Xenopus laevis*: an atlas of the histology.** *Berlin : Springer-verlag*

- Heese-Peck, A., Cole, R., N., Borkhsenius, O., N., Hart, G., W. & Raikhel, N., V. (1995) **Plant nuclear pore complex proteins are Modified by novel oligosaccharides with terminal N-Acetylglucosamine** *Plant Cell* **7**, 1459-1471
- Hill, R., E., Favor, J., Hogan, B., Ton, C., C., Saunders, G., Hanson, I., Prosser, J., Jordan, T., Hastie, N & Heyningen, V., V. (1991) **Mouse small eye results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene.** *Nature* **354**, 522-525.
- Hille-Rehfeld, A. (1995) **Mannose-6-phosphate receptors and lysosomal enzymes.** *Biochim. Biophys. Acta.* **1241**, 177-194
- Hirokawa, N., Shiomura, Y. & Okabe, S. (1988) **Tau proteins : the molecular structure and mode of binding on microtubules.** *J. Cell. Biol.* **107**, 1449-1459
- Holt, G., W. & Hart, G., W. (1986) **The subcellular distribution of terminal N-Acetylglucosamine moities.** *J. Biol. Chem.* **261**, 8049-8057
- Holt, G., W., Haltiwanger, R., S., Torres, C., -R., & Hart, G., W. (1987a) **Erythrocytes contain cytoplasmic glycoproteins. O-linked GlcNAc on Band 4.1.** *J. Biol. Chem.* **262**, 14847-14850
- Holt, G., W., Snow, C., M., Senior, A., Haltiwanger, R., S. , Gerace, L. & Hart, G. W. (1987b) **Nuclear pore complex glycoproteins contain cytoplasmically disposed O-linked N-Acetylglucosamine.** *J. Cell. Biol.* **104**, 1157-1164
- Hubert, J., Sève, A., -P., Bouvier, D., Masson, C., Bouteille, M. & Monsigny, M. (1985) **In situ ultrastructural localization of sugar-binding sites in lizard granulosa cell nuclei.** *Biol. Cell.* **55**, 15-20
- Hubert, M., Wang, S., -Y., Wang, J., L., Sève, A., -P. & Hubert, J. (1995) **Intranuclear distibution of galectin-3 in mouse 3T3 fibroblasts : comparative analyses by immunofluorescence and imunolectron microscopy.** *Exp. Cell Res.* **220**, 397-306.
- Hughes, R., C. (1999) **Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins.** *Biochim. Biophys. Acta* **1473**, 172-185

I

- Izumi, T., Walker, D., H & Maller, J., L (1992) **Periodic changes in phosphorylation of the Xenopus cdc25 phophatase regulate its activity.** *Mol. Cell. Biol.* **3**, 927-939

J

- Jackson, S., P. & Tjian, R. (1988) **O-Glycosylation of eukaryotic transcription factors : implications for mechanism of transcriptional regulation.** *Cell* **55**, 125-133
- Jiang, M., -S. & Hart, G., W. (1997) **A subpopulation of estrogen receptors are modified by O-linked N-acetylglucosamine.** *J. Biol. Chem.* **272**, 2421-2428

K

- Kaffman, A., Rank, N., M. & O'Shea, E., K. (1998) **The receptor Msn5 exports the transcription factor Pho4 out of the nucleus.** *Nature* **396**, 482-486
- Kaffman, A. & O'Shea, E., K. (1999) **Regulation of nuclear localization : a key to a door.** *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**, 291-339
- Kearse, K., P. & Hart, G., W. (1991a) **Topology of O-linked N-Acetylglucosamine in murine Lymphocytes.** *Arch. Biochem. Biophys.* **290**, 543-548
- Kearse, K., P. & Hart, G., W. (1991b) **Lymphocyte activation induces rapid changes in nuclear and cytoplasmic glycoproteins.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 1701-1705
- Kelly, W., G. & Hart, G.W. (1989) **Glycosylation of chromosomal proteins : localization of O-linked N-Acetylglucosamine in *Drosophila* chromatin.** *Cell* **57**, 243-251
- Kelly, W., G., Dahmus, M., E. & Hart, G., W. (1991) **The C-terminal domain of RNA polymerase II is modified by O-Linked GlcNAc.** *Glycoconjugate J.* **8**, 212
- Kelly, W., G., Dahmus, M., E. & Hart, G., W. (1993) **RNA polymerase II is a glycoprotein, modification of the COOH-terminal domain by O-GlcNAc.** *J. Biol. Chem.* **268**, 10416-10424
- King, I., A. & Hounsell, E., F. (1989) **Cytokeratin 13 contains O-glycosidically linked N-Acetylglucosamine residues.** *J. Biol. Chem.* **264**, 14022-14028
- Ko, L., H., Ko, E., C., Nacharaju, P., Liu, W., K., Chang, E., Kenessey, A. & Yen, S., H. (1999) **An immunochemical study on tau glycation in paired helical filaments.** *Brain Res.* **830**, 301-313
- Konrad, R., J., Janowski, K., M. & Kudlow, J., E. (2000) **Glucose and streptozotocin stimulate p135 O-Glycosylation in pancreatic islets.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **267**, 26-32

- Kosako, H., Nishida, E. & Gotoh, Y. (1993) **cDNA cloning of MAP kinase kinase reveals kinase pathways in yeasts to vertebrates.** *EMBO J.* **13**, 787-794
- Kreppel, L., K., Blomberg, M., A. & Hart, G., W. (1997) **Dynamic glycosylation of nuclear and cytosolic proteins : cloning and characterization of a unique O-GlcNAc transferase with multiple tetratricopeptide repeats.** *J. Biol. Chem.* **272**, 9308-9315
- Kreppel, L., K. & Hart, G., W. (1999) **Regulation of a cytosolic and nuclear O-GlcNAc transferase : role of the tetratricopeptide repeats.** *J. Biol. Chem.* **274**, 32015-32022
- Kumagai, A. & Dunphy, W., G. (1996) **Purification and molecular cloning of Plx1, a Cdc25-regulatory kinase from *Xenopus* egg extracts.** *Science* **273**, 1377-1380

L

- Ledesma, M., D. , Bonay P., Colaco C. & Avila J. (1994) **Analysis of microtubule-associated protein tau glycation in paired helical filaments.** *J. Biol. Chem.* **269**, 21614-9.
- Lee, S., C. & Steinhardt, R., A. (1981) **pH changes associated with meiotic maturation in oocytes of *Xenopus laevis*.** *Dev. Biol.* **85**, 358-369
- Leffler, H. (1997) **Introduction to galectins.** *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **9**, 9-19
- Lehmann, S., Kuchler, S., Theveniau, M., Vincendon, G. & Zanetta, J., -P. (1990) **An endogenous lectin and one of its neuronal glycoprotein ligands are involved in contact guidance of neuron migration.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 6455-6459
- Lichtsteiner, S. & Schibler, U. (1989) **A glycosylated liver-specific transcription factor stimulates transcription of the albumin gene.** *Cell* **57**, 1179-1187
- Liu, X., J., Sorisky, A., Zhu, L. & Pawson, T. (1995) **Molecular cloning of an amphibian insulin receptor substrate 1-like cDNA and involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced *Xenopus* oocyte maturation.** *Mol. Cell. Biol.* **15**, 3563-3570
- Liu, 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.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 2820-2825
- Loomis, P., A., Howard, T., H., Castleberry, R., P. & Binder, L., I. (1990) **Identification of nuclear tau isoforms in human neuroblastoma cells.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 8422-6.
- Lubas, W., A., Smith, M., Starr, C., M. & Hanover J., A. (1995) **Analysis of Nuclear Pore Protein p62 Glycosylation.** *Biochemistry* **34**, 1686-1694

- Lubas, W., A., Frank, D., W., Krause, M. & Hanover, J., A. (1997) **O-Linked GlcNAc transferase is a conserved nucleocytoplasmic protein containing tetratricopeptide repeats.** *J. Biol. Chem.* **272**, 9316-9324
- Lubas, W., A. & Hanover, J., A. (2000) **Functional expression of O-linked GlcNAc transferase. Domain structure and substrate specificity.** *J. Biol. Chem.* **275**, 10983-8
- Lucocq, J., Berger, E. & Hug, C. (1995) **The pathway of Golgi cluster formation in okadaic acid-treated cells.** *J. Struct. Biol.* **115**, 318-330

M

- Maller, J., -L. & Koontz, J., -W. (1981) **A study of the induction of cell division in amphibian oocytes by insulin.** *Dev. Biol.* **85**, 309-316
- Mandelkow, E. & Mandelkow, E., M. (1994) **Microtubule structure.** *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4**, 171-179
- Mann, K. (1999) **Isolation of a glycosylation form of the chicken eggshell protein ovocleidin and determination of th glycosylation site. Alternative Glycosylation/phosphorylation at an N- glycosylation site.** *FEBS Lett.* **463**, 12-14
- Mansouri, A., Hallonet, M., & Gruss, P. (1996) **Pax genes and their roles in cell differentiation and development.** *Curr. Op. Cell Biol.* **8**, 851-857
- Martin, P., Carrière, C., Dozier, C., Quatannens, B., Mirabel, M., Vandenbunder, B., Stéhelin, D. & Saule, S. (1992) **Characterization of a paired box- and homeobox-containing quail gene (Pax-6) expressed in the neuroretina.** *Oncogene* **7**, 1721-1728
- Masui, Y. & Marckert, C., L. (1971) **Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes.** *J. Exp. Zool.* **177**, 129-145
- Matten, W., Daar, I. & Vande Woude, G. F. (1994) **Proteins kinase A acts at multiple points to inhibit Xenopus oocytes maturation.** *Mol. Cell. Biol.* **14**, 4419-4426
- Matten, W., Copeland, T., D., Ahn, N., G. & Vande Woude, G., F. (1996) **Positive feedback between MAP kinase and Mos during Xenopus oocyte maturation.** *Dev. Biol.* **176**, 485-492
- Melchior, F. & Gerace, L. (1995) **Mechanisms of nuclear protein import.** *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 310-318

- Medina, L., Grove, K. & Haltiwanger, R. S. (1998) **SV40 large T antigen is modified with O-linked N-acetylglucosamine but not with other forms of glycosylation.** *Glycobiology* **8**, 383-391
- Miller, D., J., Hayward, D., C., Reece-Hoyes, J., S., Scholten, I., Catmull, J., Gehring, W., J., Callaerts, P., Larsen, J., E. & Ball, E., E. (2000) **Pax gene diversity in the basal cnidarian *Acropora millepora* (Cnidaria, Anthozoa) : Implications for the evolution of the Pax gene family.** *Proc. Natl. Assoc. Sci. USA* **97**, 4475-4480
- Miller, M., W. & Hanover, J., A. (1994) **Functional nuclear pores reconstituted with β 1-4 galactose-modified O-linked N-acetylglucosamine glycoproteins.** *J. Biol. Chem.* **269**, 9289-9297
- Moore, M., S. & Blobel, G. (1992) **The two steps of nuclear import, targeting to the nuclear envelope and translocation through the nuclear pore, require different cytosolic factors.** *Cell* **69**, 939-950
- Moore, M., S. & Blobel, G. (1994) **A G protein involved in nucleocytoplasmic transport : the role of Ran.** *Trends Biochem. Sci.* **19**, 211-216
- Morgan, D., O. (1995) **Principles of CDK regulation.** *Nature* **374**, 131-134
- Mori, H. Kondo, J. & Ihara, Y. (1987) **Ubiquitin is a component of paired helical filaments in Alzheimer's disease.** *Science* **235**, 1641-1644.
- Moutsatsos, I., K., Wade, M., Schindler, M. & Wang, J., L. (1987) **Endogenous lectins from cultured cells: nuclear localization of carbohydrate-binding protein 35 in proliferating 3T3 fibroblasts.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 6452-6456
- Murphy, J., -E., Hanover, J., A., Froehlich, M., DuBois, G. & Keen, J., H. (1994) **Clathrin assembly protein AP-3 is phosphorylated and glycosylated on the 50-kDa structural domain.** *J. Biol. Chem.* **269**, 21346-21352

N

- Nebreda, A., R., Gannon, J., V. & Hunt, T. (1995) **Newly synthesized protein(s) must associate with p34cdc2 to activate MAP kinase and MPF during progesterone-induced maturation in *Xenopus* oocytes.** *EMBO J.* **14**, 5597-5607
- Neve, R., L., Harris, P., Kosik, K., S., Kurnit, D., M. & Donlon, T., A. (1986) **Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal**

localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Brain Res.* **387**, 271-280

Nyame, K., Cummings, R., D. & Damian, R., T. (1987) **Schistosoma mansoni synthesizes glycoproteins containing terminal O-linked N-acetylglucosamine residues.** *J. Biol. Chem.* **262**, 7990-7995

O

Otteken, A. & Moss, B. (1996) **Calreticulin interacts with newly synthesized human immunodeficiency virus type-1 envelope glycoprotein, suggesting a chaperone function similar to that of calnexin.** *J. Biol. Chem.* **271**, 97-103

Ozaki, K., Lee, R., T., Lee, Y., C. & Kawasaki, T. (1995) **The differences in structural specificity for recognition and binding between asialoglycoprotein receptors of liver and macrophages.** *Glycoconjugate* **12**, 268-274

P

Palmer, A., Gavin, A., C. & Nebrada, A., R. (1998) **A link between MAP kinase and p34^{cdc2}/cyclin b during oocyte maturation : p90^{rsk} phosphorylates and inactivates the p34^{cdc2} inhibitory kinase Myt1.** *EMBO J.* **17**, 5037-5047

Panté, N. & Aebi, U. (1993) **The nuclear pore complex.** *J. Cell Biol.* **122**, 977-984

Pines, J. & Hunter, T. (1994) **The differential localization of cyclins A and B is due to a cytoplasmic retention signal in cyclin B.** *EMBO J.* **13**, 3772-3781

Plaza S., Dozier C. & Saule S. (1993) **Quail Pax-6 (Pax-QNR) encodes a transcription factor able to bind and trans-activate its own promoter.** *Cell Growth Differ.* **4**, 1041-1050

Plaza, S., Dozier, C., Turque, N. & Saule, S. (1995) **Quail Pax-6 (Pax-QNR) mRNAs are expressed from two promoters used differentially during retina development and neuronal differentiation.** *Mol. Cell. Biol.* **15**, 3344-3353

Plaza, S., Dozier, C., Martin, P. & Saule, S. (1996) **Coup d'œil sur Pax-6.** *Méd./Sci.* **12**, 921-928

Posada, J. & Cooper, J., A. (1992) **Requirements for phosphorylation of MAP kinase during meiosis in Xenopus oocyte.** *Science* **255**, 212-215

Powell, L., D. & Varki, A. (1995) **I-type lectins.** *J. Biol. Chem.* **270**, 14243-14246

Q

Qian, Y., W., Erikson, E. & Maller, J., -L. (1998) **Purification and cloning of a protein kinase that phosphorylate and activates the polo-like kinase plx1.** *Science* **282**, 1701-1704

R

Rao, A., Luo, C. & Hogan, P., G. (1997) **Transcription factors of the NFAT family : regulation and function.** *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 707-747

Reading, P., C, Hartley, C., A., Ezekowitz, R., A., B. & Anders, E., M. (1995) **A serum mannose-binding lectin mediates complement-dependent lysis of influenza virus-infected cells.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **217**, 1128-1136

Reason, A., J., Dell, A., Morris, H., R., Panico, M., Treisman, R., H., Marais, R., Hart, G., W. & Haltiwanger, R., S. (1991) **Identification of O-GlcNAc attachment sites in transcription factors.** *Glycoconjugate J.* **8**, 211

Reason, A., J., Morris, H., R., Panico, M., Marais, R., Treisman, R., H., Haltiwanger, R., S., Hart, G., W., Kelly, W., G. & Dell, A. (1992) **Localization of O-GlcNAc Modification on the Serum Response Transcription Factor.** *J. Biol. Chem.* **267**, 16911-16921

Resing, K., A., Mansour, S., J., Hermann, A., S., Johnson, R., S., Candia, J., M., Fukasawa, K., Vande Woude, G., F. & Ahn, N., G. (1995) **Determination of v-Mos catalyzed phosphorylation sites and autophosphorylation sites on MAP kinase kinase by ESI/MS.** *Biochemistry* **34**, 2610-2620

Rezai, K., Kulisz, A. & Wasserman, W., J. (1994) **Protooncogene product c-mos kinase, is involved in upregulating Na⁺/H⁺ antiporter in Xenopus oocytes.** *Am. Physiol. Soc.* **94**, C1717-C1722

Rini, J., M. & Lobsanov, Y., D. (1999) **New animal lectin structures.** *Cur. Opin. Struc. Biol.* **9**, 578-584

Roberts, D., L., Weix, D., J., Dahms, N., M. & Kim, J., J. (1998) **Molecular basis of lysosomal enzyme recognition : three-dimensional structure of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor.** *Cell* **93**, 639-648

Roquemore, E., P., Dell, A. & Hart, G., W. (1991) **Bovine Lens α - Crystallin subunits are modified by O-linked GlcNAc.** *Glycoconjugate J.* **8**, 211

- Roquemore, E., P., Chevrier, M., R., Cotter, R., J. & Hart, G., W. (1996) **Dynamic O-GlcNAcylation of the small heat shock protein α B-crystallin.** *Biochemistry* **35**, 3578-3586
- Ross, M., D., Su, K., Baker, J., R. & Kudlow, J., E. (1997) **O-glycosylation of an Sp1-derived peptide blocks known Sp1 protein interactions.** *Mol. Cell. Biol.* **17**, 6472-6480
- Ross, M., D., Xie, W., Su, K., Clark, J., A., Yang, X., Chin, E., Paterson, A., J. & Kudlow, J., E. (1998) **Streptozotocin, an analog of N-acetylglucosamine, blocks the removal of O-GlcNAc from intracellular proteins.** *Proc. Assoc. Am. Physi. USA* **110**, 422-432
- Rousseau, C., Felin, M., Doyennette-Moyne, M., A. & Sève, A., -P. (1997) **CBP-70, a glycosylated nuclear lectin.** *J. Cell. Biochem.* **66**, 370-85
- Rousseau, C., Muriel, M., P., Musset, M., Botti, J. & Sève, A., -P. (2000) **Glycosylated nuclear lectin CBP-70 also associated with endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus : Does the "classic pathway" of glycosylation also apply to nuclear glycoprotein ?** *J. Cell. Biochem.* **78**, 638-649

S

- Sagata, N. (1997) **What does Mos do in oocytes and somatic cells ?** *BioEssays* **19**, 23-28
- St-Onge, L., Sosa-Pineda, B., Chowdhury, K., Mansouri, A. & Gruss, P. (1997). **Pax6 is required for differentiation of glucagon-producing α -cells in mouse pancreas.** *Nature* **387**, 406-409.
- Salvini-Plawen, L., V. & Mayr, E. (1977) **On the evolution of photoreceptors and eyes.** *Evol. Biol.* **10**, 207-63
- Sautière, P., -E., Caillet-Boudin M., -L., Watez, A. , Buée-Scherrer, V. & Delacourte, A. (1993) **Détection d'épitopes pathologiques de type Alzheimer sur les protéines Tau de cellules de neuroblastome après traitement à l'acide okadaïque.** *Sciences Médicales* **316**, 533-535
- Sautière, P., -E., Caillet-Boudin M., -L., Watez, A. & Delacourte, A. (1994) **Detection of Alzheimer-type Tau proteins in okadaic acid-treated SKNSH-SY 5Y neuroblastoma cells.** *Neurodegeneration* **3**, 53-60
- Schatz, G. & Dobberstein, B. (1996) **Common principles of protein translocation across membranes.** *Science* **271**, 1519-1526
- Schröder, H., C., Facy, P., Monsigny, M., Pfeifer, K., Bek, A. & Müller, W., E., G. (1992) **Purification of a glucose-binding protein from rat liver nuclei. Evidence for a role in targeting of nuclear mRNP to nuclear pore complex.** *Eur. J. Biochem.* **205**, 1017-1025

- Schwab, M., S. & Dreyer, C. (1997) **Protein phosphorylation sites regulate the function of the bipartite NLS of nucleolin.** *Eur. J. Cell. Biol.* **73**, 287-297
- Sève, A., -P., Hubert, J., Bouvier, D., Bourgeois, C., A., Midoux, P., Roche, A., -C. & Monsigny, M. (1986) **Analysis of sugar-binding sites in mammalian cells nuclei by quantitative flow microfluorometry.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 5997-6001
- Shafi, R., N., Iyer, S., P., N., 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.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 5735-5739
- Shaw, P., Freeman, J., Bovey, R and Iggo, R. (1996) **Regulation of specific DNA binding by p53 : evidence for a role for O-glycosylation and charged residues at the carboxy-terminus.** *Oncogene* **12**, 921-930.
- Shane-Arnold, C., Johnson, G., V., W., Cole, R., N., Dong, D., L., -Y., Lee, M. & Hart, G., W. (1996) **The Microtubule-associated Protein Tau is extensively modified with O-linked N-acetylglucosamine.** *J. Biol. Chem.* **271**, 28741-28744
- Shane-Arnold, C. & Hart, G., W. (1999) **Dynamic cytoskeletal glycosylation and neurodegenerative disease.** *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **11**, 335-370
- Sharon, N. (1993) **Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals : an atomic view.** *Trends Biochem. Sci.* **18**, 221-226
- Sharon, N. & Lis, H. (1998) **110 years of lectin research.** *Carbohydrates in Europe* **23**, december 12-17
- Shea, T., B. & Cressman, M. (1998) **A 26-30 kDa developmentally-regulated tau isoform localized within nuclei of mitotic human neuroblastoma cells.** *Int. J. Dev. Neurosc.* **16**(1), 41-48
- Snow, D., M., Saper, J., H., Shaper, N., L. & Hart, G., W. (1996) **Cytosolic galactosyltransferase mediated capping of O-GlcNAc in CHO cells : a model to elucidate function.** *Mol. Biol. Cell* **6**, 357a
- Solomon, M., J., Glotzer, M., Lee, T., H., Philippe, M & Kirschner, M., W. (1990) **Cyclin activation of p34^{cdc2}.** *Cell* **63**, 1013-1024
- Strachan, T. & Read, A., P. (1994) **PAX genes.** *Cur. Op. Gen. Dev.* **4**, 427-438
- Sutherland, E., W. & Wosilait, W., D. (1955) *Nature* **175**, 169
- Sygowski, L. A., Fieles, A. W., Lo, M. M., Scott, C. W. & Caputo, C. B. (1993) **Phosphorylation of Tau protein in tau-transfected 3T3 cells.** *Brain Res.* **20**, 221-228

Symon, F., A. & Wardlaw, A., J. (1996) **Selectins and their counter receptors : a bitter sweet attraction.** *Thorax* **51**, 1155-1157

T

Tagawa, T., Kuroki, T. & Chida, K. (1995) **The cell cycle-dependant nuclear import of v-jun is regulated by phosphorylation of a serine adjacent to the nuclear localization signal.** *J. Cell Biol.* **130**, 255-263

Taylor, M., E., Bezouska, K. & drickamer, K. (1992) **Contribution to ligand binding by multiple carbohydrate-recognition domains in the macrophage mannose receptor.** *J. Biol. Chem.* **267**, 1719-1726

Thurston, V., C., Zinkowski, R., P. & Binder, L., I. (1996) **Tau as a nucleolar protein in human nonneural cells in vitro and in vivo.** *Chromosoma* **105**, 20-30

Torres, C., -R. & Hart, G., W. (1984) **Topography and polypeptide distribution of terminal N-Acetylglucosamine residues on the surface of intact lymphocytes, evidence for O-linked GlcNAc.** *J. Biol. Chem.* **259**, 3308-3317

Turque, N., Plaza, S., Radvanyi, F., Carrière, C. & Saule, S. (1994) **Pax-6, a paired box-and homeobox-containing gene expressed in neurons, is also expressed in pancreatic endocrine cells.** *Mol. Endocrinol.* **8**, 929-938

U

Uberti, D., Rizzini, C., Spano, P., F. & Memo, M. (1997) **Characterization of tau proteins in human neuroblastoma SH-SY5Y cell line.** *Neurosci. Lett.* **235(3)**, 149-153

W

Walther, C. & Gruss, P. (1991) **Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS.** *Development* **113**, 1435-1449

Wang, J., Z., Grundke-Iqbal, I. & Iqbal, K. (1996) **Glycosylation of microtubule-associated protein tau: an abnormal posttranslational modification in Alzheimer's disease.** *Nat Med.* **2**, 871-5.

- Waschulewski, I., H., Kruse, M., -L., Agricola, B., Kern, H., F. & Schmidt, W., E. (1996) **Okadaic acid disrupts Golgi structure and impairs enzyme synthesis and secretion in the rat pancreas.** *Am. Physiol. Soc.* G939-G947
- Weis, W., I., Taylor, M., E. & Drickamer, K. (1998) **The C-type lectin superfamily in the immune system.** *Immunol. Rev.* **163**, 19-34
- Whiteheart, S., W., Passaniti, A., Reichner, J., S., Holt, G., D., Haltiwanger, R., S. & Hart, G., W. (1989) **Glycosyltransferase probes.** *Methods in Enzymology* **179**, 82-95
- Wolff, B., Willingham, M., C. & Hanover, J., A. (1988) **Nuclear protein import : specificity for transport across the nuclear pore.** *J. Biol. Chem.* **265**, 2563-2568

Y

- Yamashita, K., Hara-Kuge, S. & Ohkura, T. (1999) **Intracellular lectins associated with N-linked glycoprotein traffic.** *Biochim. Biophys. Acta* **1473**, 147-160
- Yao, P., J. & Coleman, P., D. (1998) **Reduction of O-linked N-acetylglucosamine-modified assembly protein-3 in Alzheimer's disease.** *J. Neurosci.* **18**, 2399-2411
- Yew, N., Mellini, M., L. & Vande Woude, G., F. (1992) **Meiotic initiation by the Mos protein in Xenopus.** *Nature* **355**, 649-652
- Yoneda, Y. (1997) **How Proteins are Transported from Cytoplasm to the Nucleus ?** *J. Biochem.* **121**, 811-817

Z

- Zanetta, J., -P., Meyer, A., Kuchler, S. & Vincendon, G. (1987) **Isolation and immunochemical study of a soluble cerebellar lectin delineating its structure and function.** *J. Neurochem.* **49**, 1250-1257
- Zanetta, J., -P., Alonso, C. & Michalski, J., -C. (1996) **Interleukin 2 is a lectin that associates its receptor with the T-cell receptor complex.** *Biochem. J.* **318**, 49-53
- Zhang, X. & Bennett, V. (1996) **Identification of O-linked N-Acetylglucosamine modification of ankyrinG isoforms targeted to nodes of Ranvier.** *J. Biol. Chem.* **271**, 31391-31398

