

Université des Sciences et Technologies de Lille



Thèse

Présentée par

Céline GUINEZ-LELONG

Pour l'obtention du grade de

Docteur de l'université de Lille 1

Spécialité : Vie et Santé



**Implication de l'activité lectinique des HSP70
dans la protection des protéines O-GlcNAc
vis-à-vis de la dégradation protéasomale**

Présentée le 12 octobre 2006 devant la commission d'examen

Président : Professeur René CACAN
Rapporteurs : Professeur Gerald Warren HART
Professeur Els VAN DAMME
Examineurs : Docteur Bernard MONSARRAT
Docteur Jean-Claude MICHALSKI
Docteur Tony LEFEBVRE

A mon époux, **Michel**,
qui a été le moteur de cette réussite.

A toute ma famille en gage de mon affection,
A ma belle-famille pour son soutien.

A tous ceux qui m'ont aidée et encouragée.

*Je commencerai par remercier la personne qui m'a dirigée, motivée, encouragée et aidée tout au long de ce travail. **Tony**, merci pour m'avoir accueillie si chaleureusement et pour la confiance que tu as eu en moi, j'espère ne pas la décevoir. Ton enthousiasme pour la recherche, ton dynamisme et tes compétences ont beaucoup contribué à l'accomplissement de ces travaux. Merci pour les nombreuses discussions scientifiques que nous avons pu avoir. Je te suis profondément reconnaissante pour la liberté que tu m'as octroyée : liberté dans le travail mais aussi personnelle. Il me semble que cela a été efficace et productif. Enfin merci pour ton soutien et ton optimisme qui ont été appréciables en ces derniers jours de stress.*

*Je tiens également à remercier tout particulièrement **Jean-Claude Michalski** pour m'avoir, non seulement accueillie au sein de son unité de recherche, mais surtout pour avoir encouragé la réalisation de ce projet. Je le remercie pour la disponibilité dont il a fait preuve malgré de nombreuses responsabilités et un emploi du temps chargé. Un grand merci pour m'avoir offert la possibilité d'assister à de nombreux congrès qui ont contribué à mon épanouissement dans le domaine scientifique. Enfin, merci pour sa gentillesse et son soutien.*

*Je remercie **René Cacan** d'avoir accepté la présidence de ce jury ainsi que de m'avoir chaleureusement accueillie au 020. Je le remercie pour toutes les discussions scientifiques, qui ont permis d'avoir un regard différent sur cette recherche et qui ont été efficaces en terme de résultats. Merci pour sa grande humanité, même s'il fallait aller courir qu'il pleuve ou qu'il vente!*

*Je remercie Madame **Els Van Damme**, Monsieur **Gerald Warren Hart** et Monsieur **Bernard Monsarrat** de me faire l'honneur de juger ce travail.*

*Je remercie toutes mes collègues du 020. **Anne-Marie**, merci pour ta gentillesse et ton dynamisme, ton aide précieuse à la paillasse et les moments de détente et de rire au step. **Sandrine**, j'admire la joie de vivre débordante qui te caractérise ; j'ai trouvé au 020 plus gourmande que moi!! Merci à **Vanessa** pour sa complicité, son enthousiasme et tous les bons moments passés ensemble. Il est d'autant plus plaisant de travailler dans une telle ambiance.*

*Je tiens spécialement à remercier Monsieur **Dominique Leprince** (Institut de biologie de Lille) pour m'avoir accueillie et encadrée dans l'exercice délicat de la biologie moléculaire. Merci également pour son soutien précieux et sa disponibilité qui m'ont particulièrement*

touchée. Merci aux membres de son équipe : **Cateline, Nicolas, Sébastien** pour leur aide précieuse, avec une spéciale attention pour **Nathalie**, une femme débordante de bonne humeur, de courage et de générosité.

Merci à **Patricia, Christophe et Sandrine** pour avoir accepté de donner de leur temps pour juger ce travail.

Mes remerciements s'adressent également à **Anne-Sophie, Willy, Fred, Calliope, Catherine, Caroline et Walegh** avec un petit clin d'œil particulier à **Olivia** pour son aide évidente et les moments de douleurs (causés par les courbatures) affrontés ensemble.

Marie-Christine, je te remercie profondément pour la grande gentillesse dont tu as fait preuve, pour les nombreuses discussions que nous avons eues, entres autres, au cours des déjeuners, et pour les précieux conseils scientifiques que tu m'as donné. Plus qu'une collègue, une réelle amitié s'est développée.

Je tiens également à remercier les personnes qui ont contribué à l'accomplissement de ce travail, Monsieur **Gérard Vergoten** pour la modélisation moléculaire et Monsieur **Yves Leroy** pour la chromatographie. Merci pour leur gentillesse et pour avoir mis à disposition leurs connaissances afin de mener à bien ce projet.

Merci au premier étage où j'ai fait mes premiers pas en tant qu'étudiante « chercheur ». Merci à **Joël** et à **Elisabeth** pour m'avoir offert la possibilité de connaître l'univers d'un laboratoire, stage qui m'a plu puisque j'ai continué dans cette voie. Merci à **Monique** et **Annick** pour leur aide en biologie moléculaire, et à **Dominique** pour les manipulations au Biacore. Merci à Monsieur **Henry Debray** pour m'avoir appris la technique du SDS-PAGE, qui m'a d'ailleurs été très utile par la suite!!!

Je tiens à remercier toutes les personnes du rez-de-chaussée pour les moments de détente passés lors des pauses-café : **Mélanie, Sophie, Béatrice, Philippe, Anne et Daniel**.

Enfin merci à toutes les personnes de l'UMR, qui ont toujours répondu présentes en cas de besoin. Merci à **Michelle, Gaëlle, Brigitte et Nadège** pour leur travail colossal en secrétariat.

Ce travail a été réalisé sous la direction du Docteur Jean-Claude MICHALSKI et du Docteur Tony LEFEBVRE, dans l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (unité mixte de recherche UMR8576/CNRS dirigée par le Docteur Jean-Claude MICHALSKI) de l'Université des Sciences et Technologies de Lille.

Cette étude a été financée par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

TABLE DES MATIERES

ABBREVIATIONS	10
TABLE ET CODES DES ACIDES AMINES ET NUCLEOTIDES	12
INDEX DES FIGURES ET TABLEAUX	13
INTRODUCTION	16
GENERALITES.....	21
❖ Partie 1 : La O-N-acétylglucosaminylation O-GlcNAc	21
I. Introduction : La glycosylation chez les eucaryotes	22
II. La O-N-acétylglucosaminylation : O-GlcNAc	22
1) <u>Les caractéristiques générales de la O-GlcNAc</u>	22
<i>1.1- La découverte de la O-GlcNAc</i>	22
<i>1.2- L'aspect dynamique</i>	23
<i>1.3- La localisation</i>	23
<i>1.4- Distribution phylogénétique</i>	24
<i>1.5- Sites de O-GlcNAc</i>	24
2) <u>Les enzymes de la O-GlcNAc</u>	24
<i>2.1- L'uridine diphospho-N-acetylglucosamine : polypeptide β-N-</i> <i>acétylglucosaminyltransférase (OGT), EC 2.4.1.94</i>	25
<u>2.1.α : Caractéristiques générales</u>	25
<u>2.1.β : Localisations sub-cellulaire et tissulaire</u>	26
<u>2.1.γ : Les TPR ou tétratricopeptides-partenaires de l'OGT</u>	27
<u>2.1.δ : Données cinétiques et inhibiteurs</u>	28
<u>2.1.ε : Le gène codant l'OGT</u>	29
<u>2.1.ξ : Homologues de l'OGT chez les plantes : SPY et SEC</u>	30
<i>2.2- La N-Acétyl-β-D glucosaminidase (GlcNAcase), EC 3.2.1.52</i>	30
<u>2.2.α : La O-GlcNAcase : mise en évidence et composition</u>	30

<u>2.2.β : Le gène codant la O-GlcNAcase</u>	31
<u>2.2.γ : Localisations sub-cellulaire et tissulaire</u>	31
<u>2.2.δ: Comparaison aux hexosaminidases</u>	31
<u>2.2.ε : Les partenaires</u>	32
<u>2.2.ξ : NCOAT : "Nuclear Cytoplasmic O-GlcNAcase and Acetyltransferase"</u>	32
<u>2.2.η : Les inhibiteurs</u>	33
3) <u>La voie de biosynthèse des hexosamines : source de la O-GlcNAc</u>	34
4) <u>Les protéines modifiées par la O-GlcNAc. Fonctions supposées de la O-GlcNAc</u>	35
4.1- <i>La O-GlcNAc : une modification post-traductionnelle analogue à la phosphorylation/Théorie du "ying-yang"</i>	37
4.2- <i>Modulation des interactions protéine-protéine</i>	38
4.3- <i>Régulation de la transcription</i>	39
4.4- <i>O-GlcNAc et cycle cellulaire</i>	41
4.5- <i>La O-GlcNAc : un signal de rétention nucléaire</i>	43
4.6- <i>Rôle de la O-GlcNAc dans la stabilité protéique</i>	43
4.6.α : <u>La glycosylation des protéines augmente leur demi-vie</u>	44
4.6.β : <u>Le protéasome est lui-même O-GlcNAc</u>	45
4.7- <i>La O-GlcNAc comme senseur du stress cellulaire</i>	46
III. <u>La O-GlcNAc et pathologies associées</u>	47
1) <u>O-GlcNAc et diabète de type 2</u>	47
2) <u>La O-GlcNAc et les maladies neurodégénératives</u>	49
❖ <u>Partie 2 : Les protéines de choc thermique/Heat shock proteins/HSP</u>	51
I. <u>Introduction : les protéines de choc thermique</u>	52
1) <u>Induction des protéines de choc thermique</u>	52
2) <u>Distribution phylogénétique et sub-cellulaire/classification</u>	52
3) <u>Concept du chaperon moléculaire</u>	54

II. Chaperons moléculaires et mise en conformation dans le réticulum endoplasmique	56
1) <u>Bip</u>	56
2) <u>Le contrôle qualité dans le réticulum endoplasmique</u>	56
1.1- <i>Transfert en bloc du tétra-déca-oligosaccharide</i>	56
1.2- <i>Le cycle gluco/dé-gluco</i>	57
3) <u>Calnexine et calréticuline</u>	57
III. La famille des protéines de choc thermique de 70 kDa : HSP70	58
1) <u>Caractéristiques générales</u>	58
2) <u>Structure des HSP70</u>	59
3) <u>Séquences peptidiques reconnues</u>	60
4) <u>Régulation du gène codant pour les HSP70 - HSF et HSE</u>	61
4.1- <i>Le gène codant les HSP70</i>	61
4.2- <i>Structure des HSF</i>	61
4.3- <i>Régulation des gènes codant les HSP70 par les HSF</i>	62
4.4- <i>Autres facteurs régulant la transcription des Hsp70</i>	64
IV. Les fonctions des Hsp70	64
1) <u>Mise en conformation des protéines</u>	65
1.1- <i>Maintien des formes non conformées ou dénaturées dans le cytosol</i>	65
1.2- <i>Hop (Hsc70/Hsp90 organizing protein)</i>	66
1.3- <i>Le cycle ATP/ADP</i>	66
2) <u>Dégradation des protéines</u>	67
3.1- <i>Bag-1 : "Bcl-2-associated athanogene 1"</i>	67
3.2- <i>CHIP : "carboxyl-terminus of Hsc70-interacting protein"</i>	67
❖ Partie 3 : La dégradation protéasomale/ le système ubiquitine	
Proteasome	68
I. Introduction : la dégradation des protéines	69
II. L'ubiquitination	69

1) <u>Introduction</u>	69
2) <u>Modification des protéines par l'ubiquitine : polyubiquitination</u>	70
2.1- <i>Ubiquitine et dégradation des protéines</i>	70
2.2- <i>Réaction d'ubiquitination</i>	70
2.3- <i>Les signaux d'adressage des substrats pour la poly-ubiquitination et la dégradation</i>	72
<u>2.3.α : Les signaux constitutifs</u>	72
<u>2.3.β : Les signaux inductibles</u>	73
3) <u>Les enzymes de la poly-ubiquitination</u>	73
3.1- <i>E1 : enzyme d'activation de l'ubiquitine</i>	73
3.2- <i>E2 : enzyme de conjugaison</i>	74
3.3- <i>E3 : enzyme de ligation</i>	75
<u>3.3.α : E3 avec un domaine HECT</u>	75
<u>3.3.β : E3 avec un domaine RING</u>	75
<u>3.3.γ : E3 avec U-box</u>	76
3.4- <i>E4 : enzyme de la poly-ubiquitination</i>	77
4) <u>Les rôles de l'ubiquitine</u>	77
4.1- <i>La mono-ubiquitination</i>	77
4.2- <i>La poly-ubiquitination</i>	77
III. Le protéasome	79
1) <u>Introduction</u>	79
2) <u>Structure du protéasome</u>	80
2.1- <i>Le complexe catalytique : 20S</i>	81
2.2- <i>Le complexe régulateur : 19S (PA 700)</i>	83
<u>2.2.α : Constitution</u>	83
<u>2.2.β : Activité de fixation des peptides</u>	83
<u>2.2.γ : Dénaturation des substrats et translocation</u>	84
<u>2.2.δ : Dé-ubiquitination</u>	84

CONCLUSION DES GENERALITES	85
TRAVAUX PERSONNELS	87
CONCLUSION GENERALE	124
BIBLIOGRAPHIE	128
ANNEXES	151

3D	tridimensionnelle
AAA	ATPase associated with various cellular activities
AD	alzheimer disease
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
ADP	adénosine 5'-di-phosphate
AMP	adénosine 5'-mono-phosphate
AMPC	adénosine 5'-mono-phosphate cyclique
APP	beta-amyloid precursor protein
ARN	acide ribonucléique
ARNi	ARN interférentiel
ARNm	ARN messenger
ATP	adénosine 5'-tri-phosphate
BAG-1	Bcl-2-associated athanogene 1
<i>C.elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CHIP	carboxyl-terminus of Hsc70-interacting protein
Ct	C-terminal
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E-meg	glucosamine-6-phosphate acétyltransférase
ERK	extracellular signal-regulated kinase
GalNAc	N-acétylgalactosamine
GFAT	glutamine : Fructose 6-phosphate amido-transférase
Glc	glucose
GlcNAc	N-acétylglucosamine
GlcNAcase	N-acétyl- β -D glucosaminidase
Grp	glucose-regulated proteins
HBP	hexosamine biosynthetic pathway
HECT	homologous to E6-associated protein C-terminus
HEX	Hexosaminidase
HGBA	Hsp70 GlcNAc binding activity
Hip	Hsc70 interacting protein
Hop	Hsc70/Hsp90 organizing protein
HRE	Heat Shock Response Element
Hsc	Heat shock cognate protein
HSF	Heat Shock Factor
Hsp	Heat shock protein
kb	kilobase
KCl	chlorure de potassium
kDa	kiloDalton
Km	Constante de Michaelis
Man	mannose
MAP	microtubule associated protein
MAP kinases	mitogen activated proteins kinases
MTS	mitochondrial targeting sequence
NaCl	chlorure de sodium
NCOAT	Nuclear Cytoplasmic O-GlcNAcase and Acetyltransferase
NES	nuclear export sequence
NLS	nuclear localisation signal
nM/ μ M	nanomolaire/micromolaire

Nt	N-terminal
O-GlcNAc	O-N-acétylglucosaminylation
OGT	uridine diphospho-N-acetylglucosamine : polypeptide β -N-acétylglucosaminyltransférase
PACE	proteasome-associated control element
pb	paires de bases
PEST	régions riches en résidus de Pro (P), Glu (E), Ser (S) et Thr (T).
PPi	pyrophosphate
PUGNAc	O-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene) amino-N-phenylcarbamate
RE	réticulum endoplasmique
RER	réticulum endoplasmique rugueux
RING	really interesting new gene
RMN	résonance magnétique nucléaire
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Tau	tubulin associated unit
TPR	tetratricopeptide repeat
UDP	uridine diphosphate
UDP-GlcNAc	uridine diphospho-N-acétylglucosamine
UGGT	UDP-glucose : glycoprotein glucosyltransferase
UMP	uridine monophosphate
UPR	unfolded protein response
UPS	ubiquitin proteasome system
UTP	uridine triphosphate
WB	Western blot

TABLE ET CODES DES ACIDES AMINES ET NUCLEOTIDES

Symbole	Code 3 lettres	Acide Aminé	Codons
A	Ala	Alanine	GCT,GCC,GCA,GCG
B	Asp,Asn	Acide Aspartique, Asparagine	GAT,GAC AAT,AAC
C	Cys	Cystéine	TGT,TGC
D	Asp	Acide Aspartique	GAT,GAC
E	Glu	Acide Glutamique	GAA,GAG
F	Phe	Phénylalanine	TTT,TTC
G	Gly	Glycine	GGT,GGC,GGA,GGG
H	His	Histidine	CAT,CAC
I	Ile	Isoleucine	ATT,ATC,ATA
K	Lys	Lysine	AAA,AAG
L	Leu	Leucine	TTG,TTA CTT,CTC,CTA,CTG
M	Met	Méthionine	ATG
N	Asn	Asparagine	AAT,AAC
P	Pro	Proline	CCT,CCC,CCA,CCG
Q	Gln	Glutamine	CAA,CAG
R	Arg	Arginine	CGT,CGC,CGA,CGG AGA,AGG
S	Ser	Sérine	TCT,TCC,TCA,TCG AGT,AGC
T	Thr	Thréonine	ACT,ACC,ACA,ACG
V	Val	Valine	GTT,GTC,GTA,GTG
W	Trp	Tryptophane	TGG
X	Xxx	Inconnu	-
Y	Tyr	Tyrosine	TAT,TAC
Z	Glu,Gln	Acide Glutamique, Glutamine	GAA,GAG CAA,CAG
*	FIN	Stop	TAA,TAG,TGA

INDEX DES FIGURES ET TABLEAUX

INTRODUCTION

* verso

Figure 1 : Destinée d'une protéine nouvellement synthétisée ou ayant subi un stress. 17

GENERALITES

- Figure 2 : Structure schématique d'une séquence peptidique modifiée par la *O*-GlcNAc. 23
- Figure 3 : Les enzymes responsables du dynamisme de la *O*-GlcNAc. 25
- Figure 4 : Le gène de l'OGT humaine code quatre transcrits à l'origine des sous-unités p110 et p78. 27
- Figure 5 : La synthèse de la *O*-GlcNAc se fait par la voie des hexosamines-6-phosphate. 33*
- Figure 6 : Le "ying-yang" : une protéine peut exister sous 4 formes par la balance phosphorylation/*O*-GlcNAc. 36*
- Figure 7 : L'état de modification du CTD de l'ARN polymérase II module son activité transcriptionnelle. 40
- Figure 8 : Représentation des différents états conformationnels d'une protéine. Intervention des HSP pour la remise en conformation. 54
- Figure 9 : Le cycle gluco/dé-gluco : intervention des chaperons moléculaires : exemple de la calnexine. 56*
- Figure 10 : Structure commune aux HSP70 : représentations schématiques et spatiales des différents domaines. 58*
- Figure 11 : Le domaine C-terminal des Hsc70 présente une séquence conservée EEVD et des séquences riches en glycine (GGMP). 59*
- Figure 12 : Structure des facteurs de choc thermique ou HSF de levure et de mammifère. 62
- Figure 13 : Représentation schématique du mécanisme d'induction des Hsp70 lors d'un stress. 63
- Figure 14 : Remise en conformation des protéines par les HSP70 via le cycle ATP/ADP. 65*
- Figure 15 : Les domaines TPR des co-chaperonnes Hop et CHIP permettent leurs interactions avec les chaperonnes Hsc70 et Hsp90. 66*
- Figure 16 : Etiquetage des protéines par l'ubiquitine. 71
- Figure 17 : Les réactions successives permettant l'ubiquitination des protéines. 71
- Figure 18 : Mécanismes de transfert de l'ubiquitine par les enzymes E3/HECT et E3/RING 76

Figure 19 : CHIP interagit avec Hsp70 pour ubiquitiner des protéines mal-conformées.	77*
Figure 20 : Les protéasomes 20S, 26S et 30S.	80
Figure 21 : Protéasome 20S et 26S de <i>Xenopus laevis</i> , coloration negative.	81
Figure 22 : Organisation des sous-unités du protéasome 20S (A) et 19S (B).	82
Figure 23 : Inter-relation entre la <i>O</i> -GlcNAc, le protéasome et Hsp70.	85
Figure 24 : Le cycle glyco/déglyco : un acteur fondamental dans la destinée des protéines cellulaires.	86

Tableau I : Récapitulatif des caractéristiques des enzymes de la <i>O</i> -GlcNAc.	34
Tableau II : Exemples de protéines de mammifères identifiées comme étant <i>O</i> -GlcNAc.	36
Tableau III : Nomenclature des protéines de choc thermique en fonction de leur localisation cellulaire.	53
Tableau IV : Les différentes fonctions associées aux HSP.	55

TRAVAUX PERSONNELS

Figure 25 : Hypothèse de la protection des protéines par la <i>O</i> -GlcNAc vis-à-vis de la dégradation protéasomale.	89
Figure 26 : Hypothèse de l'auto-régulation de l'activité lectinique de Hsp70 par la <i>O</i> -GlcNAc.	90
Figure 27 : Hypothèse de l'interaction lectinique de Hsp70 avec un facteur inconnu.	93
Figure 28 : Vue chronologique des travaux effectués au cours du troisième cycle.	97
Figure 29 : Les niveaux de <i>O</i> -GlcNAc et l'activité lectinique de Hsp70 sont modulables avec le type de stress et le type cellulaire.	102
Figure 30 : Les cellules HeLa sont plus résistantes au stress par rapport aux cellules HepG ₂ .	103
Figure 31 : Effet de l'éthanol sur l'expression et l'activité lectinique de Hsp70 et sur le taux de protéines <i>O</i> -GlcNAc.	102
Figure 32 : Expression et activité lectinique des Hsp70 et niveaux de <i>O</i> -GlcNAc au cours d'une cinétique de stress à 2 % en éthanol.	105
Figure 33 : Séparation de l'ATP, ADP, AMP et UDP-GlcNAc.	106
Figure 34 : Dosage des charges énergétiques et des niveaux d'UDP-GlcNAc à la suite de différents stress sur les cellules HeLa.	107

Figure 35 : Modélisation moléculaire du domaine de fixation des peptides de Hsc70 humaine.	109
Figure 36 : Modélisation moléculaire du domaine de fixation des peptides de Hsc70 humaine avec le peptide Ser- <i>O</i> -GlcNAc.	110
Figure 37 : Carte du vecteur d'expression pCMV.SPORT6.	111
Figure 38 : Site multiple de clonage de pCMV.SPORT6.	111
Figure 39 : Séquence de Hsc70 sauvage humaine.	112
Figure 40 : Stratégie de clonage sur la protéine Hsc70.	121
Figure 41 : Mise en évidence de la protéine "flaggée" produite en Cos-7 par immuno-détection.	122 123
Figure 42 : Activité lectinique des clones de Hsc70.	
Figure 43 : Mise en évidence de la perte d'activité lectinique de la protéine clonée par mutation.	123
Tableau V : Souches de bactéries <i>E. coli</i>	114

CONCLUSION GENERALE

Figure 44 : Parallèle entre le cycle gluco/dégluco du RE et la reconnaissance des protéines <i>O</i> -GlcNAc par les Hsp70 dans le cytoplasme.	125
Figure 45 : Schéma hypothétique par lequel la <i>O</i> -GlcNAc protégerait les protéines lors d'un stress <i>via</i> l'interaction avec les Hsp70.	126

Introduction

Introduction

L'existence d'une protéine au sein de la cellule est régulée par deux mécanismes antagonistes : sa synthèse et sa dégradation. Les mécanismes gouvernant la vie ou la mort des protéines sont maintenant bien connus et sont schématisés sur la figure 1. Lorsque la protéine vient d'être synthétisée, sa bonne mise en conformation, lui conférant son activité biologique, va être assurée par l'intervention de chaperons moléculaires. Ces protéines sont capables de reconnaître des segments hydrophobes présents à la surface de la protéine non conformée. Cette capacité est également utilisée pour remettre en conformation des protéines dénaturées à la suite d'un stress (niveau 1). Si ce processus de (re)mise en conformation est efficace, la protéine est (re)mise en circulation pour effectuer son rôle cellulaire. Par contre, si ce mécanisme échoue, alors le processus de dégradation protéasomale se met en place. Ce mécanisme appelé UPS "ubiquitin proteasome system" peut être divisé en deux grandes étapes : d'une part l'"étiquetage" de la protéine à dégrader par l'ubiquitine, grâce à l'intervention des enzymes d'ubiquitination (niveau 2) et d'autre part, la reconnaissance et la dégradation de cette protéine ubiquitinée par le protéasome 26S (niveau 3). Ces trois niveaux sont schématisés en figure 1.

Les protéines sont rarement actives seules, elles sont souvent modifiées de façon post-traductionnelle. Parmi toutes ces modifications post-traductionnelles connues, la glycosylation en général et la *O*-N-acétylglucosaminylation, *O*-GlcNAc, en particulier semblent jouer un rôle majeur dans le contrôle de la demi-vie des protéines.

Nos généralités se découperont en trois parties : l'étude de la *O*-GlcNAc, l'étude des chaperons moléculaires (niveau 1 de la figure 1) et enfin l'étude du processus UPS (niveaux 2 et 3 de la figure 1). A chaque niveau, l'accent sera porté sur l'influence de la *O*-GlcNAc sur toutes les étapes étudiées.

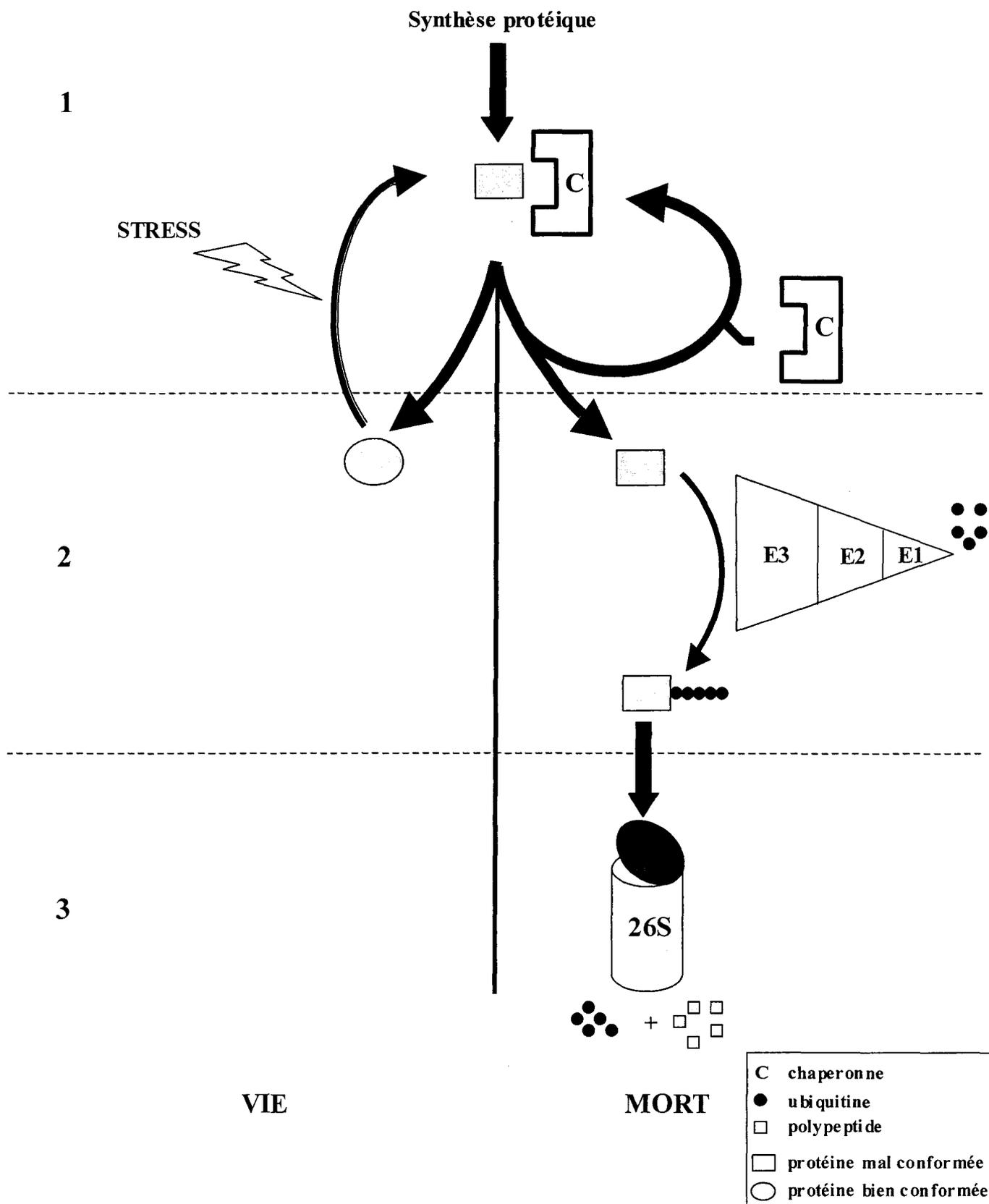


Figure 1 : Destinée d'une protéine nouvellement synthétisée ou ayant subi un stress.

La mauvaise conformation d'une protéine à la suite de sa traduction ou d'un stress, est rétablie par l'intervention de chaperonnes (niveau 1). Si ce processus échoue, la protéine est ubiquitinée (niveau 2) et dégradée par le protéasome (niveau 3).

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

Publications :

- **Céline Guinez**, Jérôme Lemoine, Jean-Claude Michalski and Tony Lefebvre
70-kDa-heat shock protein presents an adjustable lectinic activity towards O-linked N-acetylglucosamine (2004) *Biochem Biophys Res Commun.* 319(1):21-6.
- **Céline Guinez**, Willy Morelle, Jean-Claude Michalski and Tony Lefebvre
O-GlcNAc glycosylation: a signal for the nuclear transport of cytosolic proteins? (2005) *Int J Biochem Cell Biol.* 37(4):765-74.
- Tony Lefebvre, **Céline Guinez**, Vanessa Dehennaut, Olivia Beseme-Dekeyser, Willy Morelle and Jean-Claude Michalski
Does O-GlcNAc play a role in neurodegenerative diseases? (2005) *Expert Rev Proteomics.* 2(2):265-75.
- **Céline Guinez**, Marie-Estelle Losfeld, René Cacan, Jean-Claude Michalski and Tony Lefebvre.
Modulation of HSP70 GlcNAc-directed lectin activity by glucose availability and utilization (2006) *Glycobiology.* 16(1):22-28.

Communications par affiches

- **Céline GUINEZ**, Marie-Estelle LOSFELD, René CACAN, Jean-Claude MICHALSKI and Tony LEFEBVRE

Hsc70 and Hsp70 GlcNAc-directed lectinic activities are modulated by extracellular glucose rate.

Présenté aux:

-XVIII International Symposium on Glycoconjugates. Florence, Italie, 4-9 Septembre 2005.

- 5ème journée André Verbert. 28 Septembre 2005, Lille, France.

- 191st meeting of the Belgian Society of Biochemistry and Molecular Biology. 2 Décembre 2005.

Communications orales

- **Céline GUINEZ**, Marie-Estelle LOSFELD, René CACAN, Jean-Claude MICHALSKI and Tony LEFEBVRE

The chaperones Hsc70 and Hsp70 specifically bind O-linked N-acetyl-glucosamine residues. Modulation of their lectinic activity.

15th Joint Meeting of the “Netherlands Society for Glycobiology”, the “Studiengruppe Glycobiologie der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie” and the “Groupe Lillois de Glycobiologie”. Wageningen, Les Pays-bas, 28-30 Novembre 2004.

- **Céline GUINEZ**, Anne-Marie Mir, René CACAN, Jean-Claude MICHALSKI and Tony LEFEBVRE

Activité lectinique et glycosylation des protéines de choc thermique de 70kDa. Un rôle dans la dégradation protéasomale ?

Séminaire à l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Villeneuve d'ascq, France, 20 Mai 2005.

- **Céline GUINEZ**, Anne-Marie Mir, René CACAN, Jean-Claude MICHALSKI and Tony LEFEBVRE

O-GlcNAc glycosylation of proteins : a protective signal against proteasomal degradation?

Role of Hsp70 lectin activity.

16th Joint Meeting of the “Netherlands Society for Glycobiology”, the “Studiengruppe Glycobiologie der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie” and the “Groupe Lillois de Glycobiologie”. Hannover, Allemagne, 27-29 Octobre 2005.

Généralités

Partie 1

La *O*-N-acétylglucosaminylation

O-GlcNAc

I. Introduction : La glycosylation chez les eucaryotes

La glycosylation chez les eucaryotes a longtemps été exclusivement restreinte à la surface cellulaire ou à la lumière de compartiments tels que le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi ou le lysosome. Cette glycosylation a été comprise grâce à la localisation précise d'enzymes, les glycosyltransférases, greffant de manière spécifique un monosaccharide particulier sur un accepteur donné. La présence de glycosylation au sein des compartiments cytosoliques et nucléaires est longtemps restée énigmatique puisque aucun modèle de biosynthèse glycoprotéique ou de transport dans ces compartiments n'avait été validé. Par des expériences de reconnaissance lectinique ou de radiomarquage métabolique avec des sucres précurseurs, des glycosylations particulières ont pu être découvertes : les phospho-mannosyles O-liés, les oligosaccharides O-liés contenant du fucose, les protéoglycannes à mannose, l'alpha-glucosyl lié sur une tyrosine de la glycogénine, la N-acétylglucosamine sur l'hydroxyproline dans le cytosol, les glycoaminoglycannes (GAG) dans le noyau et la C-mannosylation. Il est maintenant admis que la glycosylation majoritaire dans le cytosol et le noyau est la *O*-N-acétylglucosaminylation, abrégé par *O*-GlcNAc.

II. La *O*-N-acétylglucosaminylation : *O*-GlcNAc

1) Les caractéristiques générales de la *O*-GlcNAc

*1.1- La découverte de la *O*-GlcNAc*

En 1984, l'équipe de G.W. Hart a mis en évidence ce nouveau type de glycosylation (Torres et Hart, 1984). A cette époque, il était clairement établi que la glycosylation des protéines membranaires intervenait dans les processus de reconnaissances antigéniques. C'est en s'intéressant à la distribution des oligosaccharides à résidus de N-acétylglucosamine terminaux que cette équipe a démontré un nouveau type de glycosylation différente de celles connues jusqu'alors puisqu'elle consiste en l'addition d'un seul monosaccharide, la N-acétylglucosamine (GlcNAc), sur des résidus de sérine ou de thréonine de l'axe peptidique des protéines. Ce résidu de GlcNAc est lié par une liaison de type bêta à la protéine. Par la suite, il n'est ni épimérisé, ni le substrat d'autre glycosyltransférase (figure 2). Depuis l'idée selon laquelle les protéines glycosylées sont uniquement secrétées ou associées aux membranes biologiques est complètement réfutée.

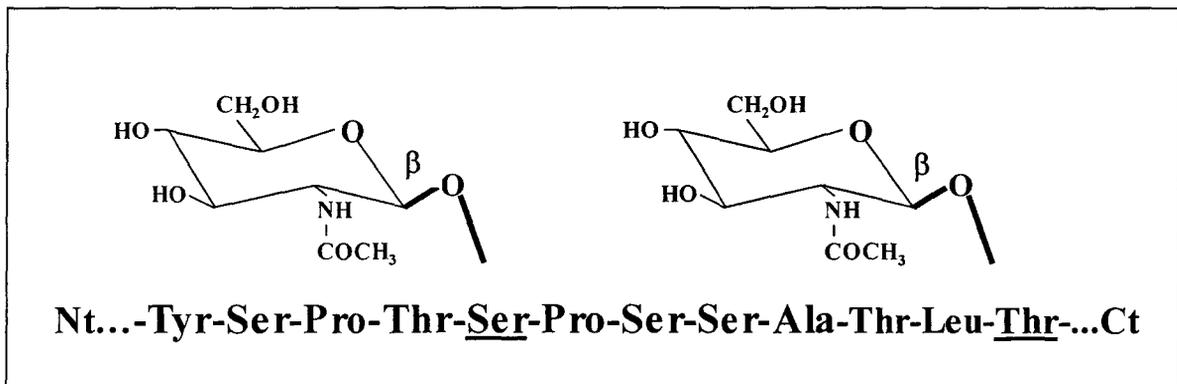


Figure 2 : Structure schématique d'une séquence peptidique modifiée par la *O*-GlcNAc.

1.2- L'aspect dynamique

Contrairement aux autres glycosylations caractérisées par leur aspect stable, la *O*-GlcNAc est une modification post-traductionnelle dynamique. En 1992, Chou *et al.* démontrent que les cytokératines 8 et 18 humaines sont glycosylées sur différents sites avec un résidu de *O*-GlcNAc et que cette glycosylation est un processus dynamique puisque la demi-vie de la partie saccharidique est plus courte que celle de la protéine en elle-même (Chou *et al.*, 1992). En étudiant les effets de l'activation des lymphocytes T murins par un mitogène (concanavaline A ou esters de phorbol) sur les protéines *O*-GlcNAc, Kearse et Hart ont également observé cet aspect dynamique de la glycosylation (Kearse et Hart, 1991a). En effet, ils ont montré que le taux global de glycosylation varie de façon très rapide après l'activation et que cette variation est transitoire. Ces niveaux de glycosylation changent également en réponse à de nombreux stress cellulaires (Zachara *et al.*, 2004).

1.3- La localisation

En 1986, Holt et Hart montrent que la *O*-GlcNAc est localisée principalement dans le cytosol et le noyau des cellules de foie de rat mais qu'elle se trouve également dans les autres compartiments cellulaires sauf dans la mitochondrie (Holt et Hart, 1986). Ils émettent alors l'hypothèse que les glycoprotéines entrent dans le compartiment golgien pour être maturées puis retournent dans le réticulum endoplasmique rugueux (RER), puis dans le cytosol et le noyau. Ils montrent également que 7 % de la *O*-GlcNAc totale se retrouve à la surface cellulaire. Mais une étude ultérieure de la topologie de la *O*-GlcNAc au sein de cellules primaires de lymphocytes a permis de montrer que la *O*-GlcNAc est une glycosylation majoritairement retrouvée dans le cytosol et le noyau (Kearse et Hart, 1991). La présence de

motifs *O*-GlcNAc au niveau de la mitochondrie a récemment été mise en évidence par l'utilisation d'anticorps reconnaissant spécifiquement le résidu *O*-GlcNAc de l'antigène H (Arvanitis *et al.*, 2005). Cependant l'équipe de Hanover, qui a découvert la forme mitochondriale de l'enzyme responsable de la *O*-GlcNAc, n'a jamais pu démontrer la présence de tels motifs dans cet organite.

1.4- Distribution phylogénétique

La *O*-GlcNAc est une modification post-traductionnelle phylogénétiquement conservée puisqu'elle a été décrite chez de nombreux organismes incluant les mammifères, les virus (SV40 : Medina *et al.*, 1998 ; Plum pox virus : Chen *et al.*, 2005), les insectes (drosophile : Kelly et Hart, 1989), les plantes (*Arabidopsis thaliana* : Swain *et al.*, 2001), les invertébrés (*Caenorhabditis elegans* : Hanover *et al.*, 2005) et les bactéries (*Listeria monocytogenes* : Schirm *et al.*, 2004). La présence de la *O*-GlcNAc a été mise en évidence chez les parasites mais dans une conformation de type alpha (*Plasmodium falciparum* : Dieckmann-Schuppert *et al.*, 1993). Enfin, la *O*-N-acétylglucosaminylation chez la levure est, à l'heure actuelle, un sujet controversé puisque aucune étude n'a permis de confirmer la présence de la modification dans cet organisme.

1.5- Sites de *O*-GlcNAc

L'étude des séquences glycosylées a permis de constater qu'il n'existe pas de séquence peptidique consensus réelle, contrairement à d'autres types de glycosylation comme la N-glycosylation qui nécessite la présence d'une séquence Asn-X-Ser/Thr (X étant n'importe quel acide aminé, sauf la proline). Toutefois, des séquences telles que proline-sérine-sérine (PSS), proline-valine-sérine (PVS) ou de sites riches en acides aminés hydroxylés est privilégiée pour cette glycosylation (Haltiwanger *et al.*, 1990).

2) Les enzymes de la *O*-GlcNAc

Deux enzymes très fortement conservées au cours de l'évolution sont responsables respectivement de l'addition ou de l'hydrolyse du résidu de GlcNAc sur les résidus de sérine ou de thréonine des protéines substrats. Ces enzymes ont été identifiées, clonées et caractérisées. L'uridine diphospho-N-acétylglucosamine : polypeptide β -N-

acétylglucosaminyltransférase (ou OGT) est responsable du transfert de GlcNAc en β sur les protéines et la N-acétyl- β -D glucosaminidase (ou GlcNAcase) hydrolyse ce dernier (figure 3).

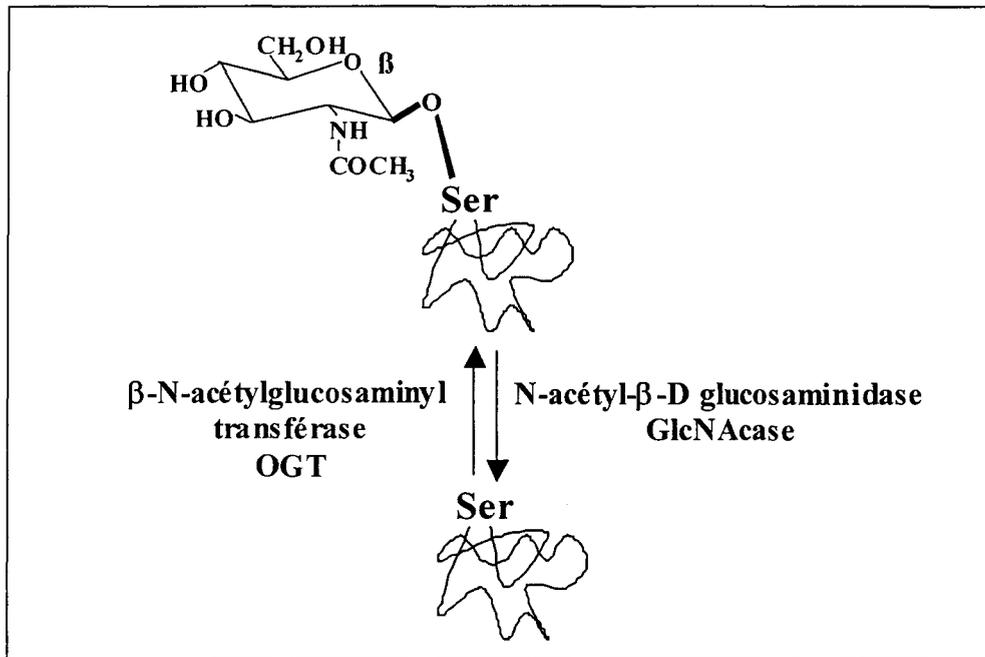


Figure 3 : Les enzymes responsables du dynamisme de la O-GlcNAc.

2.1- *L'uridine diphospho-N-acétylglucosamine : polypeptide β -N-acétylglucosaminyltransférase (OGT), EC 2.4.1.94*

2.1.α : Caractéristiques générales

Il s'agit d'une glycosyltransférase qui greffe des résidus de GlcNAc à partir du nucléotide sucre donneur, l'UDP-GlcNAc, sur des résidus de sérine ou de thréonine, ceci dans une conformation bêta. Cette activité a été caractérisée pour la première fois en 1990 (Haltiwanger *et al.*, 1990) et l'enzyme a été purifiée pour la première fois à partir de cytosol de foie de rat par chromatographie d'affinité (Haltiwanger *et al.*, 1992). Il s'agit d'un hétérotrimère de masse apparente de 340 kDa, formé de deux sous-unités α de 110 kDa (p110) et d'une sous-unité β de 78 kDa (p78). Cependant il a été suggéré qu'elle pourrait exister sous la forme d'un homotrimère constitué de trois sous-unités identiques (p110 \times 3). La forme homotrimérique possède la même activité que la forme hétérotrimérique, la sous-unité considérée comme la sous-unité régulatrice n'est vraisemblablement pas essentielle pour l'activité catalytique de l'OGT. Les deux sous-unités sont immunologiquement révélées par le même anticorps, laissant penser que la sous-unité de 78 kDa correspondrait à un fragment

protéolytique ou à un produit d'épissage de l'ARN messager de la sous-unité de 110 kDa (Kreppel *et al.*, 1997).

La sous-unité de 110 kDa de l'OGT nucléocytoplasmique humaine est structurellement composée de 3 domaines : un domaine N-terminal possédant des tétratricopeptides (TPR) qui forme une super-hélice, une partie centrale flexible et qui représente le domaine de liaison à la partie C-terminale qui porte l'activité catalytique et adopte une topologie de type "Rossmann fold". Ces critères ont été obtenus en se basant sur l'analyse d'enzymes qui utilisent l'UDP-GlcNAc ou des nucléotides apparentés (Wrabl et Grishin, 2001). Cependant, des méthodes de détermination de structures 3D comme la RMN ou la cristallographie aux rayons X permettraient de confirmer ces données obtenues *in silico*. La présence de ces motifs permet le classement de cette enzyme dans la superfamille des enzymes glycogène phosphorylase/glycosyltransférase (GPGT) (Wrabl et Grishin, 2001).

Le domaine de liaison est une région flexible qui représente la partie la moins bien conservée entre espèces en terme de longueur et de séquence en acides aminés. Chez le Nématode, cette partie présente parfois une séquence NLS ("Nuclear Localisation Signal") qui est une séquence de transport au noyau. Cependant, il n'y a peut-être pas d'implication de cette séquence dans le transport nucléaire de l'enzyme. Cette séquence NLS est absente chez le rat et l'homme.

La partie C-terminale qui porte l'activité catalytique est extrêmement conservée. La délétion de cette région abolit complètement l'activité de l'enzyme (Lubas et Hanover, 2000).

L'OGT porte elle-même des modifications post-traductionnelles. Elle est phosphorylée sur le résidu de tyrosine 979 ; une tyrosine kinase pourrait donc jouer un rôle dans la modulation de l'activité de l'OGT, reliant ainsi la *O*-N-acétylglucosaminylation à la cascade des signaux de transduction. Elle porte également un résidu de *O*-GlcNAc au niveau de sa sous-unité catalytique de 110 kDa.

2.1.β : Localisations sub-cellulaire et tissulaire

La partie N-terminale de l'OGT semble importante pour son adressage. Une isoforme est adressée à la mitochondrie par la présence d'une courte séquence peptidique MTS ("Mitochondrial Targeting Sequence"). Les autres formes qui ne possèdent pas cette séquence sont présentes dans le cytosol et le noyau (Love et Hanover, 2005). Des expériences d'immunofluorescence et de fractionnements cellulaires ont montré que la majorité de la protéine OGT et de son activité sont localisées au niveau du noyau (Kreppel *et al.*, 1997).

Chez l'humain, le gène de l'OGT code quatre transcrits de 3 à 10 kilobases générant les deux sous-unités (p110 et p78) (figure 4) (Kreppel *et al.*, 1997). Ces transcrits se trouvent dans tous les tissus mais sont particulièrement enrichis dans le pancréas avec une très forte concentration dans les cellules des îlots de Langherhans (Hanover *et al.*, 1999). D'autres tissus comme les muscles squelettiques, le cerveau, le muscle cardiaque, les adipocytes possèdent de hauts niveaux de ces ARNm. L'OGT est donc retrouvée dans plusieurs tissus mais plus particulièrement dans le pancréas et le cerveau (Nolte et Muller, 2002).

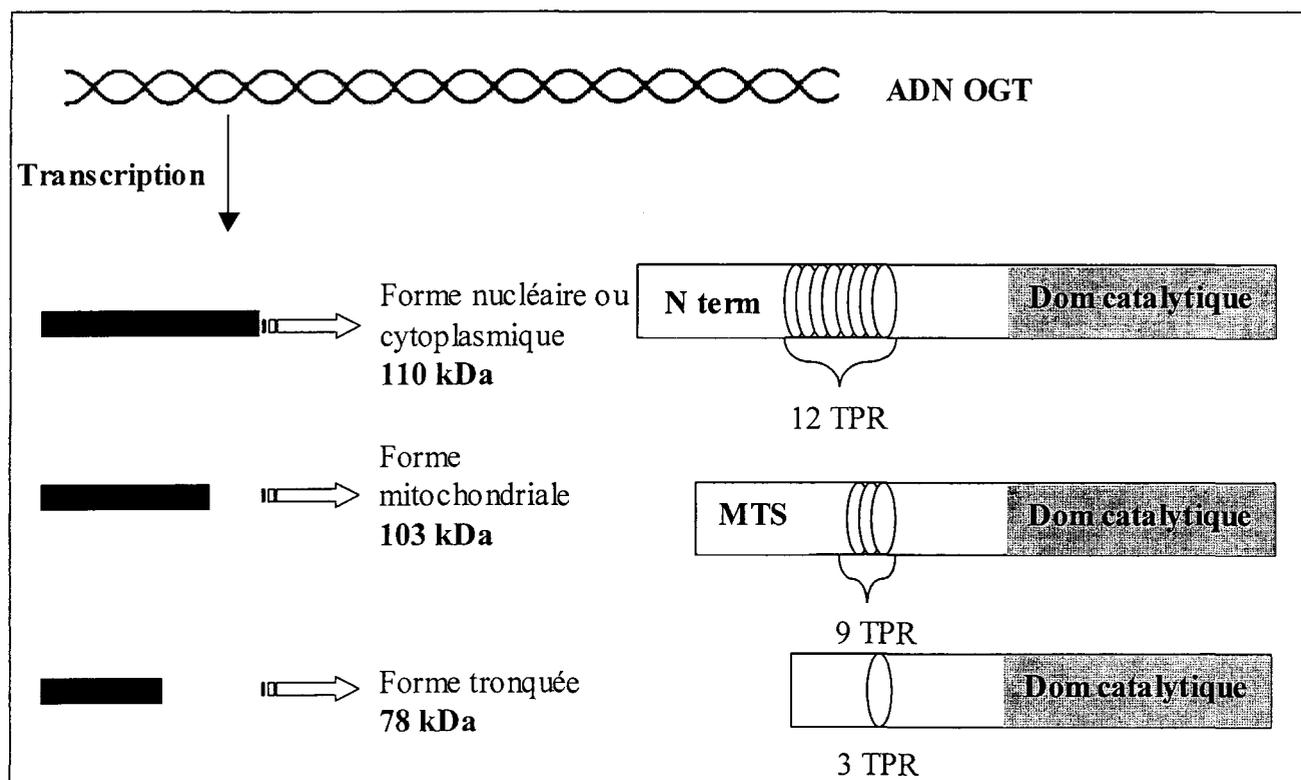


Figure 4 : Le gène de l'OGT humaine code quatre transcrits à l'origine des sous-unités p110 et p78.

2.1.γ : Les TPR ou tétratricopeptides-partenaires de l'OGT

Le domaine N-terminal possède des TPR correspondants à des répétitions de 34 acides aminés. Le nombre de répétitions de ces TPR varie en fonction de l'espèce : il en existe 9 chez l'humain, 11 chez le rat (Kreppel *et al.*, 1997) et 13 chez le nématode (Lubas *et al.*, 1997). L'alignement des séquences de ces domaines TPR révèle qu'il existe une séquence consensus WLGYAFAP. Les TPR interviennent dans une grande variété de processus biologiques dont la régulation du cycle cellulaire (Hirano *et al.*, 1990 ; Lamb *et al.*, 1995), le contrôle transcriptionnel (Schultz *et al.*, 1990 ; Rameau *et al.*, 1994), le transport des protéines

mitochondriales et péroxysomales (Haucke *et al.*, 1996), la mise en conformation des protéines, la réponse au choc thermique et aux stress cellulaires. Ces TPR permettent la trimérisation de l'enzyme et sont impliqués dans son activité. Cependant tous les TPR ne sont pas essentiels pour l'activité intrinsèque de l'enzyme. La délétion des trois premiers TPR n'a pas d'effet sur la reconnaissance de substrats de petite taille mais elle abolit la reconnaissance de protéine de pleine longueur. Les TPR participent donc à la spécificité de substrat (Lubas et Hanover, 2000 ; Kreppel *et al.*, 1997). Par contre les six premiers TPR sont indispensables à l'association entre les différentes sous-unités de l'enzyme.

Ces TPR permettent également les interactions protéine-protéine. La présence de ces TPR au niveau de la séquence protéique de l'OGT suggère que l'enzyme est capable d'interagir avec d'autres protéines *via* ces domaines. En effet, l'OGT possède différents partenaires parmi lesquels on retrouve mSin3 A (Yang *et al.*, 2002), Grif-1 et OIP 106 (Iyer *et al.*, 2003). Ces deux dernières protéines interagissent avec le domaine TPR de l'OGT de façon stoechiométrique. Ces interactions pourraient être à l'origine de la distribution précise de l'OGT au sein de la cellule et l'interaction avec OIP106 apparaît importante pour l'adressage de l'OGT au niveau des sites de transcription. De plus ces deux protéines sont modifiées par la *O*-GlcNAc, indiquant qu'elles sont les substrats de l'OGT. Enfin, la phosphatase PP1 est également partenaire de l'OGT, confortant l'hypothèse selon laquelle la *O*-GlcNAc pourrait réguler de nombreux processus cellulaires en modulant la phosphorylation des protéines : ce complexe aurait un rôle majeur dans la modification des protéines *O*-GlcNAc en assurant au préalable la déphosphorylation des protéines (Wells *et al.*, 2004).

L'activité de l'OGT pourrait donc être régulée par ses modifications post-traductionnelles, ses interactions avec différents partenaires et sa localisation au niveau de la cellule.

2.1.8 : Données cinétiques et inhibiteurs

Contrairement aux autres glycosyltransférases résidentes du compartiment golgien ou du réticulum endoplasmique dont le K_m est de l'ordre du micromolaire (μM), l'OGT est une enzyme qui possède une très forte affinité pour l'UDP-GlcNAc ($K_m=545nM$), ceci étant dû à la concentration faible du substrat dans le cytosol. L'activité de l'OGT est dépendante de sa concentration, de celle du substrat (UDP-GlcNAc) et du temps d'incubation. Les données cinétiques montrent que l'OGT est capable de répondre à une grande variété de concentrations en UDP-GlcNAc en modulant son K_m (Kreppel et Hart, 1999). La concentration en UDP-GlcNAc peut varier de l'ordre de la nanomole à la micromole en fonction du type

cellulaire et du tissu. Une explication possible pour la grande variabilité de réponse de l'OGT serait un mécanisme bibi-aléatoire même si cette hypothèse n'a pas encore été prouvée.

L'OGT présente un pH optimum de 6,0. Cette enzyme n'est pas inhibée par l'UDP-GalNAc ni par l'UMP, ni par l'EDTA suggérant que son activité n'est pas dépendante de cations divalents contrairement aux autres glycosyltransférases. Par contre elle est inhibée par l'UTP, les sels (NaCl et KCl) et l'UDP-GlcNAc suggérant un mécanisme de rétro-contrôle. L'UDP est également un puissant inhibiteur ($K_i=200\text{nM}$).

Il n'existe pas d'inhibiteurs spécifiques pour cette enzyme. L'alloxane, un analogue de l'uracile peut inhiber l'OGT *in vitro* mais cet inhibiteur n'est pas spécifique *in vivo* (Konrad *et al.*, 2001). Gross *et al.* ont testé 102 composés sur l'activité de l'OGT produite chez *E. coli*. Ils ont établi que 19 de ces 102 composés inhibent l'OGT avec un rendement d'inhibition supérieur à 40 % et deux d'entre eux entrent en compétition avec l'UDP-GlcNAc (Gross *et al.*, 2005). Les structures de ces inhibiteurs ne sont pas connues et les études sur les niveaux de glycosylation dans un système cellulaire sont à mener pour juger de leur efficacité.

2.1.ε : Le gène codant l'OGT

Le gène codant l'OGT a été caractérisé des bactéries à l'homme, mais pas chez les levures. L'absence de cette modification chez la levure pourrait s'expliquer par sa grande dépendance vis-à-vis de l'UDP-GlcNAc utilisé pour la production de la chitine responsable de la rigidité de la paroi cellulaire. Les ADN complémentaires de l'humain, du rat et du nématode codent une protéine de masse moléculaire de 103, 116 et 128 kDa respectivement (Kreppel *et al.*, 1997 ; Lubas *et al.*, 1997). Le gène codant la sous-unité de 110 kDa est conservé au cours de l'évolution suggérant qu'elle a une fonction cellulaire importante. Ce gène se trouve en simple copie sur le chromosome X chez l'humain et la souris.

Nolte et Muller ont entrepris en 2001 la recherche du gène de l'OGT humaine pour en avoir la séquence entière. Ils ont montré que les séquences humaines (en position Xq13) et du rat (en position X, région D) possèdent quasiment 100 % d'identité et il existe 80 % d'identité entre la séquence protéique de l'OGT humaine et de *C.elegans* (Nolte et Muller, 2001).

L'importance de l'OGT a été confirmée par des expériences de "knock-out" de son gène dans des cellules embryonnaires de souris. L'extinction du gène entraîne une mortalité des cellules au bout de 6.5 jours. Ceci suggère que l'OGT est unique et indispensable chez les mammifères. De plus la délétion dirigée du gène de l'OGT dans des tissus cibles induit l'arrêt

du développement des organes cibles. Cette expérience montre l'importance de l'OGT et de la O-GlcNAc dans le développement (O'Donnell *et al.*, 2004).

2.1.ξ : Homologues de l'OGT chez les plantes : SPY et SEC

Alors qu'il n'y a qu'un seul gène codant l'OGT découvert chez les mammifères, deux gènes ont été identifiés chez les plantes. La protéine Spindly (SPY) chez *Arabidopsis thaliana* est une molécule importante de la voie de signalisation de la girébelline GA (une hormone) (Jacobsen et Olszewski, 1993). Elle présente un pourcentage d'identité avec l'OGT significatif. Des mutants SPY présentent une diminution des protéines modifiées par la O-GlcNAc suggérant qu'il pourrait y avoir d'autres OGT chez les plantes (Thornton *et al.*, 1999). Cette réflexion a mené à la purification et au clonage d'un autre gène appelé "secret agent" (SEC) qui présente de grandes similitudes avec le gène de l'OGT et de SPY. La mutation seule de SEC ne montre pas de phénotype particulier alors que les mutations simultanées de SEC et SPY entraînent la mort des plantes (Hartweck *et al.*, 2002). Les deux protéines ont donc des fonctions semblables et complémentaires et sont toutes deux indispensables pour la vie végétale.

2.2- La N-Acétyle-β-D glucosaminidase (GlcNAcase), EC 3.2.1.52

Les informations sur l'enzyme qui hydrolyse les résidus de GlcNAc présents au niveau de résidus hydroxylés de sérine ou de thréonine, la O-GlcNAcase, sont moins nombreuses par rapport à celles de l'OGT même si ces études sont en plein essor depuis ces dernières années.

2.2.α : La O-GlcNAcase : mise en évidence et composition

Les caractéristiques de la O-GlcNAcase ont été dévoilées pour la première fois sous la forme d'une hyaluronidase associée au méningiome et donc appelée MGAE5 ("meningioma expressed antigen 5"). Heckel *et al.* démontrent qu'un des gènes impliqués dans le méningiome et localisé sur le chromosome 10 en position q24-1_q24-3, code au moins deux variants fortement exprimés dans les tissus de mammifères (Heckel *et al.*, 1998). La plus longue des protéines correspondantes a été par la suite désignée comme étant la O-GlcNAcase. Elle a été caractérisée pour la première fois à partir de cytosol de foie de rat (Dong et Hart, 1994). Il s'agit d'une protéine de 916 acides aminés, de masse moléculaire

apparente de 106 kDa. Elle existe sous la forme d'un hétérodimère constitué d'une sous-unité α de 54 kDa et d'une sous-unité β de 51 kDa.

2.2.β : Le gène codant la O-GlcNAcase

La purification de la O-GlcNAcase à partir de cerveau a permis son séquençage et son clonage chez l'homme. L'alignement de séquences des variants de mammifères a montré que cette enzyme est bien conservée ($\geq 80\%$) mais le pourcentage d'identité entre l'homme et *C. elegans*, d'une part, et la drosophile, d'autre part, est moins importante (55 % et 43 % respectivement) (Gao *et al.*, 2001). Contrairement à l'OGT qui se trouve sur le chromosome X, le gène de la O-GlcNAcase est localisé sur le chromosome 10q24, ce qui suggère, à l'instar de l'OGT, que la O-GlcNAcase pourrait être directement impliquée dans les désordres neurologiques (puisque ce gène est proche de celui responsable de la maladie d'Alzheimer) (Farook *et al.*, 2002).

2.2.γ : Localisations sub-cellulaire et tissulaire

La O-GlcNAcase est présente essentiellement dans le compartiment cytoplasmique (90 %) mais également dans le noyau (10 %) (Gao *et al.*, 2001 ; Wells *et al.*, 2002a). Le transcrit correspondant de 5.5 kb est exprimé dans tous les tissus, mais est plus prépondérant dans le cerveau, le placenta et le pancréas, de la même façon que l'OGT. La O-GlcNAcase est exprimée sous la forme de deux variants, la protéine de pleine longueur (p130) et une protéine plus courte (p75) avec une extrémité C-terminale différente puisqu'elle ne possède pas le tiers C-terminal de la protéine de pleine longueur. La forme p75 est exprimée préférentiellement dans le noyau et ne possède pas d'activité catalytique.

2.2.δ : Comparaison aux autres hexosaminidases

La cellule eucaryote possède deux types d'hexosaminidases (HEX) :

- le premier groupe est constitué des HEX A, B, I et S qui sont exclusivement localisées dans le lysosome, présentent un pH optimum acide (3,5-5,5) et sont fortement inhibées par la GalNAc.
- le second groupe est constitué de deux HEX neutres : une "GlcNAc-specific glucosaminidase" (Hex C) et une "GalNAc specific galactosaminidase" (Hex D) qui sont localisées dans le cytosol, présentent un pH optimum neutre et sont plus thermolabiles.

Contrairement aux hexosaminidases lysosomales qui possèdent un pH acide, la *O*-GlcNAcase présente un pH optimum neutre (5,7-7,0) en accord avec sa localisation dans les compartiments nucléaires et cytoplasmiques. Néanmoins, les similitudes de leurs compositions en sous unités et de leurs masses moléculaires suggèrent que ces enzymes pourraient dériver d'un gène ancestral commun ou présenter des homologies de séquence, mais la *O*-GlcNAcase n'est pas reconnue par les anticorps dirigés contre ces hexosaminidases lysosomales. Ceci suggère que les deux enzymes possèdent des différences structurales. Les caractéristiques de la *O*-GlcNAcase sont communes à celle de l'hexosaminidase C (pH neutre, localisation nucléocytoplasmique, thermolabilité accrue).

2.2.ε : Les partenaires

Des études réalisées avec l'enzyme recombinante exprimée chez *E. coli* ont montré que l'enzyme est monomérique, avec une sous-unité de masse apparente de 130 kDa. C'est l'analyse de l'enzyme native qui a permis de montrer que celle-ci existe dans la cellule sous la forme complexée à d'autres protéines puisqu'elle migre à 600 kDa en conditions non dénaturantes. Plusieurs partenaires de la *O*-GlcNAcase ont ensuite été identifiés (Wells *et al.*, 2002b) : il s'agit des protéines de stress (Hsp110 et Hsc70) d'une part, et des protéines associées aux maladies neurologiques (amphiphysine, DRP-2) d'autre part. Ces protéines pourraient donc intervenir dans la régulation de l'activité de la *O*-GlcNAcase.

2.2.ξ : NCOAT : "Nuclear Cytoplasmic *O*-GlcNAcase and Acetyltransferase"

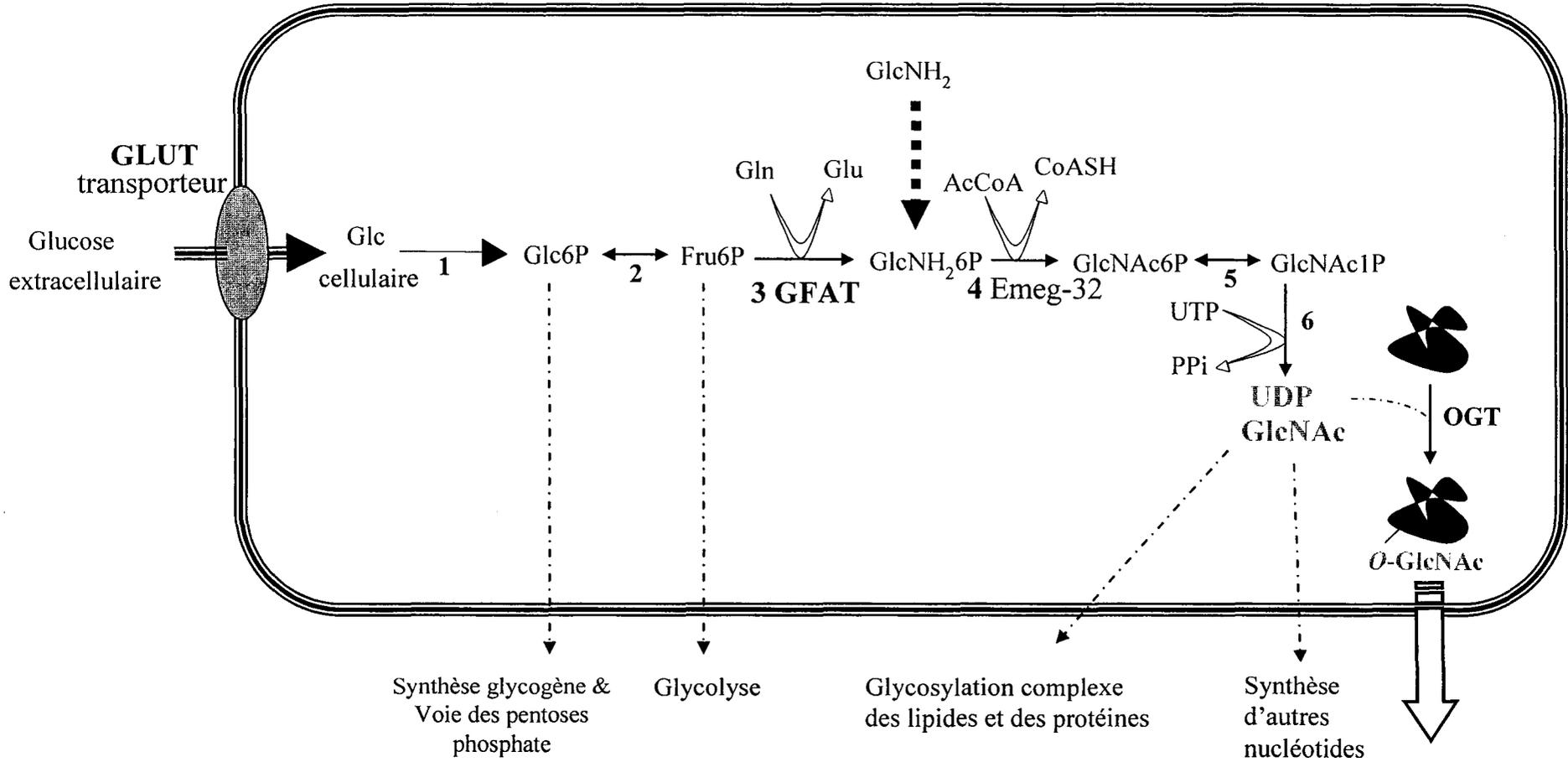
Depuis peu, la *O*-GlcNAcase est appelée NCOAT pour "Nuclear Cytoplasmic *O*-GlcNAcase and Acetyltransferase" car il s'agit en réalité d'une enzyme bi-fonctionnelle avec deux domaines catalytiques, le premier, en partie N-terminale, étant homologue aux hyaluronidases bactériennes et le second, en partie C-terminale, appartenant à la famille des acétyltransférases GCN5 ("Gcn5-related N-acetyltransferases") (GNATs) (Heckel *et al.*, 1998 ; Schultz et Pils, 2002). Les études relatives au domaine catalytique de l'enzyme sont controversées. En effet, en utilisant des informations de séquence et de structure, il a été prédit que l'activité catalytique de l'enzyme est portée par le domaine C-terminal homologue aux GNATs. Par ailleurs ce domaine possède une activité intrinsèque d'histone acétyltransférase (HAT) mais il n'est pas complet et nécessite la présence de protéines accessoires pour acquérir sa pleine activité (Toleman *et al.*, 2004). Cette activité est importante puisque l'OGT interagit également avec le complexe de répression transcriptionnel mSin3A (Yang *et al.*,

2002). L'OGT et la NCOAT pourraient participer au processus de remodelage de la chromatine associé à la répression transcriptionnelle. D'ailleurs, Whisenhunt *et al.* ont montré que la NCOAT et l'OGT sont associées de façon très forte de manière à ce que la NCOAT accompagne l'OGT, avec les histones désacétylases dans les complexes de co-répression transcriptionnelle (Whisenhunt *et al.*, 2006).

Cependant, les travaux de Toleman *et al.* d'une part, et ceux de Cetinbas *et al.* d'autre part, ont montré que le site actif de la NCOAT se trouve au niveau du domaine N-terminal dont les résidus essentiels à la catalyse seraient les résidus d'acide aspartique 175 et 177 chez la souris suivant le motif Asp-N-Asp (N étant un acide aminé hydrophobe) retrouvé chez l'humain. La réaction se ferait selon un mécanisme acide-base qui requiert un donneur de proton et un nucléophile (mécanisme retrouvé chez les enzymes de la famille 84 des glycosides hydrolases dont font partie les chitinases, les β -hexosaminidases et les hyaluronidases). Dans ce mécanisme, le groupement 2-acétamido du substrat est impliqué dans le mécanisme catalytique (Toleman *et al.*, 2006 ; Cetinbas *et al.*, 2006).

2.2.η : Les inhibiteurs

La surexpression de cette enzyme entraîne une chute globale du taux de *O*-GlcNAc. Par contre, le *O*-(2-acétamido-2-déoxy-D-glucopyranosylidène) amino-N-phénylcarbamate (PUGNAc) qui est un composant non toxique pour la cellule inhibe cette enzyme ($K_i=54\text{nM}$, Haltiwanger *et al.*, 1998) et conduit à l'accumulation des protéines *O*-GlcNAc mais induit également une résistance à l'insuline des adipocytes (Vosseler *et al.*, 2002). Néanmoins, ces effets ne peuvent pas être exclusivement reliés à l'inhibition de la *O*-GlcNAcase puisque le PUGNAc inhibe également les hexosaminidases A et B. Ce problème a été résolu par l'équipe de Hanover qui est parvenue à inhiber spécifiquement la *O*-GlcNAcase par un dérivé du PUGNAc possédant une extension de sa partie N-acétyl (Kim *et al.*, 2006). La streptozotocine, un inhibiteur moins puissant mais irréversible, peut conduire à une accumulation dramatique des protéines *O*-GlcNAc (Konrad *et al.*, 2001 ; Toleman *et al.*, 2006). Cet inhibiteur a des effets toxiques sur la cellule puisqu'il engendre notamment l'alkylation de l'ADN.



- 1 : glucokinase ou hexokinase
- 2 : glucose-6P-isomérase
- 3 : Glutamine: Fructose-6-phosphate Amido Transférase GFAT
- 4 : glucosamine-6-phosphate acétyltransférase EMeg32
- 5 : phosphate-acétylglucosamine mutase
- 6 : UDP-N-acétylglucosamine pyrophosphorylase

Modification des
protéines
nucléaires et
cytosoliques

Figure 5 : La synthèse de la *O*-GlcNAc se fait par la voie des hexamines-6-phosphate.

Tableau I : Récapitulatif des caractéristiques des enzymes de la *O*-GlcNAc.

	OGT	<i>O</i>-GlcNAcase
Année de mise en évidence	1990	1991
Année de clonage de l'ADNc	1997	2002
Masse apparente en SDS-PAGE	Hétérotrimère $\alpha_2\beta$ de 340 kDa Sous unité α : 110 Sous unité β : 78	Hétérodimère $\alpha\beta$ de 106 kDa Sous unité α : 54 Sous unité β : 51
Expression tissulaire	Tous les tissus et plus particulièrement dans le pancréas et le cerveau	Tous les tissus et plus particulièrement dans le placenta et le cerveau
Localisation cellulaire	Noyau et cytosol	Noyau et cytosol
Inhibiteurs	Alloxane	PUGNAc et dérivés Streptozotocine
Modification post-traductionnelle	Phosphate sur tyrosine <i>O</i> -GlcNAc	Substrat pour la caspase-3
Caractéristiques structurales	Possède 11 tétratricopeptides en N-terminal et l'activité catalytique est portée par l'unité α	Possède deux domaines Nt : hyaluronidase Ct: histone acétyltransférases

3) La voie de biosynthèse des hexosamines : source de la *O*-GlcNAc

L'uridine-diphospho N-acétylglucosamine ou UDP-GlcNAc est le nucléotide sucre donneur pour l'addition de GlcNAc sur les protéines. La synthèse d'UDP-GlcNAc à partir du glucose se fait par la voie des hexosamine-6-phosphate (HBP, "hexosamine biosynthetic pathway") selon un processus extrêmement régulé (figure 5). Le glucose extracellulaire pénètre dans la cellule *via* des transporteurs spécifiques GLUT. Une fois entré dans la cellule, le glucose est immédiatement phosphorylé par la glucokinase, générant ainsi du glucose-6-phosphate qui pourra entrer dans la voie des pentoses phosphates, participer à la synthèse du glycogène ou être épimérisé en fructose-6-phosphate par l'intervention de la glucose-6-phosphate isomérase. Le fructose-6-phosphate ainsi formé va pouvoir fournir de l'énergie par son entrée dans la voie de la glycolyse ou être le substrat d'une enzyme-clef de la synthèse de la *O*-GlcNAc, la glutamine : fructose-6-phosphate amido transférase ou GFAT. Cette enzyme permet la synthèse de la glucosamine-6-phosphate qui permettra à son tour la synthèse d'un nucléotide sucre, l'UDP-GlcNAc après l'intervention notamment de la GlcNH₂ acétyltransférase ou EMeg-32. L'UDP-GlcNAc ainsi formé participe à la glycosylation complexe des lipides et des protéines, à la synthèse d'autres nucléotides et à la modification des protéines nucléaires et cytosoliques par la *O*-GlcNAc. Cette voie de biosynthèse est

extrêmement régulée par deux enzymes clefs, la GFAT et EMeg-32. La GFAT est considérée comme l'enzyme limitante à la formation de la *O*-GlcNAc puisque l'UDP-GlcNAc, qui est le nucléotide sucre donneur pour la formation de la *O*-GlcNAc, est un inhibiteur de cette enzyme par un mécanisme de rétrocontrôle. Elle est également inhibée par phosphorylation. Cependant EMeg-32 est également une enzyme importante puisqu'elle gouverne le maintien correct des concentrations intracellulaires en UDP-GlcNAc. La GFAT est une enzyme cytosolique contrairement à EMeg-32 qui est une enzyme associée à la membrane.

Deux à 5 % du glucose extracellulaire sont dirigés vers la synthèse de ce nucléotide (Zhivkov *et al.*, 1975). Les niveaux de *O*-GlcNAc sur les protéines cellulaires peuvent donc être modulés en altérant les niveaux de glucose extracellulaires. La surexpression de l'enzyme limitante de cette voie, la GFAT, résulte en une augmentation de l'UDP-GlcNAc responsable d'une hyper-insulinémie et d'une résistance à l'insuline (cf partie *O*-GlcNAc et pathologies). La glucosamine permet d'augmenter artificiellement le taux de *O*-GlcNAc, dans le sens où elle est transformée en glucosamine-6-phosphate et entre directement dans la voie de biosynthèse des hexosamines en contournant la GFAT, l'enzyme limitante de cette réaction. De la même façon, il a été démontré que l'administration de glucosamine induit rapidement une résistance à l'insuline (Robinson *et al.*, 1995).

4) Les protéines modifiées par la *O*-GlcNAc. Fonctions supposées de la *O*-GlcNAc

Depuis 1984, les travaux relatifs à cette glycosylation atypique n'ont cessé d'augmenter. A l'heure actuelle, près de deux cents protéines *O*-GlcNAc ont été identifiées. Plusieurs protéines connues sont répertoriées dans le tableau II. Cette glycosylation affecte toutes les catégories de protéines : enzymes et facteurs de transcription, protéines structurales, protéines du pore nucléaire, phosphatases et kinases, enzymes métaboliques etc... Malgré les nombreuses études effectuées sur la *O*-GlcNAc, les rôles associés à cette glycosylation ne sont pas clairement établis. Cependant, d'après la connaissance des protéines modifiées, certains rôles émergent. De nombreux travaux tendent à attribuer à l'addition de la *O*-GlcNAc un effet antagoniste à la phosphorylation. De plus, la modification des niveaux de *O*-GlcNAc a permis de montrer qu'elle pouvait jouer un rôle sur le comportement des protéines en modulant : les interactions protéine-protéine, les activités enzymatiques proprement dites ou leur régulation, la fixation à l'ADN, la localisation cellulaire et la demie-vie des protéines.

Tableau II : Exemples de protéines de mammifères identifiées comme étant *O*-GlcNAc.

Protéines	Exemples	Références
Protéines intervenant dans la transcription	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Enzymes</u> RNA pol II Elongation factor 1-α^a 40S ribosomal protein s24^a RNA-binding protein eukaryotic initiation factor 4A1^a • <u>Facteurs de transcription</u> c-myc Sp1 EIF 1 Pax-6 Stat5 Plakoglobin CREB NF-κB β-catenin ER-α, β • <u>suppresseurs de tumeurs</u> P53 Hic1 	<p>Kelly <i>et al.</i>, 1993 Wells <i>et al.</i>, 2002b Wells <i>et al.</i>, 2002b Wells <i>et al.</i>, 2002b</p> <p>Chou <i>et al.</i>, 1995 Jackson et Tiang, 1988 Juang <i>et al.</i>, 2002 Lefebvre <i>et al.</i>, 2002 Gewinner <i>et al.</i>, 2004 Hatsell <i>et al.</i>, 2003 Lamarre-Vincent et Hsieh-Wilson, 2003 James <i>et al.</i>, 2002 Zhu <i>et al.</i>, 2001</p> <p>Cheng <i>et al.</i>, 2000 ; Cheng et Hart, 1997, 2001 ; Jiang et Hart, 1997</p> <p>Shaw <i>et al.</i>, 1996 Lefebvre <i>et al.</i>, 2004</p>
Protéines de structure	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Protéines de structure</u> Kératine k8/18/13 Alpha-crystalline Chaîne lourde de la myosine Myosine α-tubuline • <u>Protéines neuronales</u> Neurofilament Tau Synapsine Amyloid Protein Precursor Ankyrine 	<p>Chou <i>et al.</i>, 1992 ; Ku et Omary, 1995 ; King <i>et al.</i>, 1989 Roquemoire <i>et al.</i>, 1992 Cieniewski-Bernard <i>et al.</i>, 2004 Pol-Rodriguez <i>et al.</i>, 2001 Walgren <i>et al.</i>, 2003</p> <p>Dong <i>et al.</i>, 1996, 1993 Arnold <i>et al.</i>, 1996 Cole et Hart, 1999 Griffith <i>et al.</i>, 1995 Zhang et Bennett, 1996</p>
Enzymes	<ul style="list-style-type: none"> • <u>De la glycolyse</u> Enolase Pyruvate kinase Phospho glycérate Kinase (PGK) Créatine kinase Glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogénase 	<p>Wells <i>et al.</i>, 2002b Wells <i>et al.</i>, 2002b Wells <i>et al.</i>, 2002b Cieniewski-Bernard <i>et al.</i>, 2004 Wells <i>et al.</i>, 2002b</p>

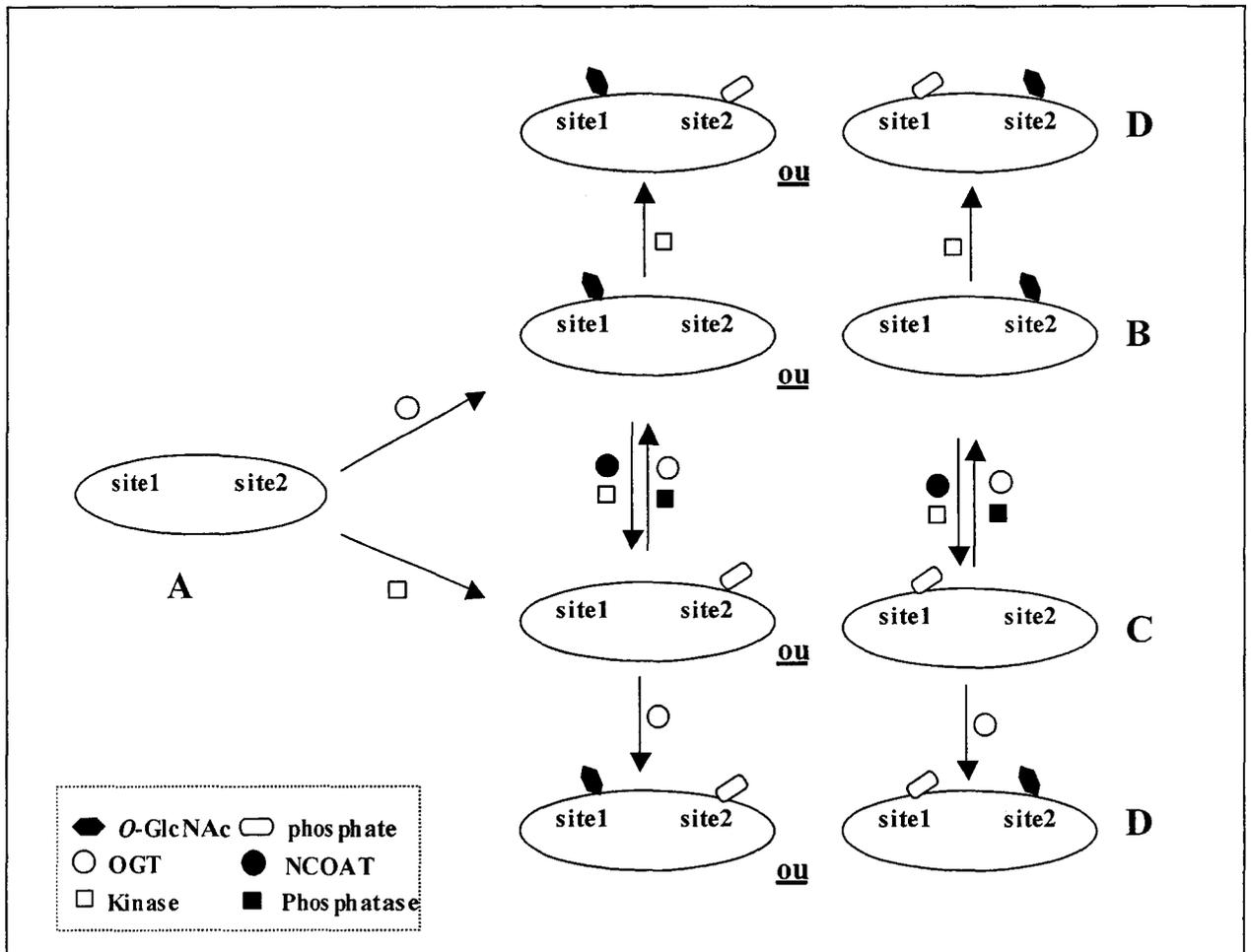


Figure 6 : Le "ying-yang" : une protéine peut exister sous 4 formes par la balance phosphorylation/O-GlcNAc.

Protéines	Exemples	Références
Enzymes	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Du métabolisme du glucose</u> Glycogène synthase UDP-glucose pyrophosphorylase	Parker <i>et al.</i> , 2003 Wells <i>et al.</i> , 2002b
Chaperonnes	Hsp27 Hsc70 Hsp70 Hsp90	Roquemore <i>et al.</i> , 1996, 1992 Lefebvre <i>et al.</i> , 2001 Walgren <i>et al.</i> , 2003 Wells <i>et al.</i> , 2002b
Protéines du pore nucléaire	P62 Nup 54, 155	Holt <i>et al.</i> , 1987 Wells <i>et al.</i> , 2002b

4.1- La O-GlcNAc : une modification post-traductionnelle analogue à la phosphorylation/Théorie du "ying-yang"

Par le fait que la O-GlcNAc soit une modification dynamique qui affecte des résidus de sérine ou de thréonine, un parallèle a très vite été établi entre la O-N-acétylglucosaminylation et la phosphorylation. A l'instar de la phosphorylation, la O-GlcNAc interviendrait dans la régulation de nombreux processus cellulaires par la régulation même de la phosphorylation des protéines. En effet, de nombreuses études ont montré que les niveaux de O-GlcNAc varient sous l'effet de mitogènes (Kearse et Hart, 1991a), de signaux cellulaires (Kneass et Marchase, 2004), de facteurs de croissance (Gandy *et al.*, 2006) et du développement cellulaire (Slawson *et al.*, 2002).

L'analyse précise des sites modifiés par la O-GlcNAc au niveau des protéines a montré que ces sites sont similaires à ceux affectés par les protéines kinases. Toutes ces données ont permis d'établir l'hypothèse du "ying-yang", selon laquelle la phosphorylation et la O-GlcNAc pourrait entrer en compétition pour des sites identiques de la protéine. Autrement dit, la phosphorylation d'un acide aminé empêcherait la fixation de O-GlcNAc et inversement (figure 6). Un système quaternaire où une protéine A pourrait être soit O-GlcNAc (état B), soit phosphorylée (avec une exclusion des deux modifications au niveau d'un même site) (état C) soit les deux à la fois (état D) serait le point de départ de nombreuses régulations.

Ceci a été démontré pour le récepteur aux estrogènes bêta (ER- β) où la balance O-GlcNAc/phosphorylation s'applique sur un résidu de sérine 16 se trouvant à proximité de son domaine de transactivation, ce qui laisse supposer un rôle de ces modifications post-

traductionnelles dans la régulation de la transactivation. De plus, cette sérine se trouvant dans un motif PEST, responsable de la dégradation du récepteur lorsque ce motif est phosphorylé, imputerait à la *O*-GlcNAc un effet sur le "turn-over" du récepteur (Jiang et Hart, 1997).

Medina *et al.* ont montré que l'antigène large T du SV40 est modifié par la *O*-GlcNAc sur un site connu comme étant phosphorylé (sérines 111 et 113) et impliqué dans l'efficacité de réplication du SV40. De plus, ces résidus de sérine se trouvent dans une région permettant la fixation du produit du gène du rétinoblastome, suggérant que la modification par la *O*-GlcNAc pourrait jouer un rôle dans la modulation de ces interactions (Medina *et al.*, 1998).

La phosphorylation de c-myc par la caséine kinase II ou la GSK3 ("glycogen synthase kinase") au niveau d'un résidu de thréonine 58 et de sérine 62, module la transactivation et la transformation cellulaire (Albert *et al.*, 1994 ; Pulverer *et al.*, 1994). La mutation de cette thréonine 58 est associée alors à une augmentation de l'activité de transformation et engendre l'apparition de tumeurs. Il a été montré que c-myc existe sous trois formes au niveau de ce résidu de thréonine 58 : une forme phosphorylée, une forme *O*-GlcNAc et une forme non modifiée (Chou *et al.*, 1995). La phosphorylation de la thréonine 58 nécessite au préalable la phosphorylation de la sérine 62 et la mutation de cette sérine entraîne une diminution de phosphorylation de la thréonine 58 avec, par contre, une augmentation de sa glycosylation. Ces données montrent que la balance *O*-GlcNAc/phosphorylation au niveau du résidu de thréonine 58 régule les fonctions de c-myc dans la cellule.

Cette relation entre la *O*-GlcNAc et la phosphorylation a pu être clairement montrée en comparant les niveaux de ces deux modifications post-traductionnelles avant et après l'utilisation d'inhibiteurs de kinases et de phosphatases. Lefebvre *et al.*, d'une part, et Griffith *et al.*, d'autre part, ont montré que le traitement de cellules avec des inhibiteurs de phosphatases, comme l'acide okadaïque, provoque une augmentation des formes phosphorylées des protéines en association à une diminution du taux global de glycosylation (Lefebvre *et al.*, 1999 ; Griffith *et al.*, 1999).

D'ailleurs l'OGT se trouve complexée à la phosphatase 2 (PP2A), validant l'idée selon laquelle les deux modifications post traductionnelles, *O*-GlcNAc et phosphorylation, s'excluraient mutuellement pour un même site, ou que la modification d'un résidu nécessiterait au préalable la modification d'un autre résidu.

4.2- Modulation des interactions protéine-protéine

Etant donné que le résidu de phosphate est anionique alors que le résidu de GlcNAc est neutre, l'addition de l'une ou l'autre de ces modifications post-traductionnelles sur une

protéine pourrait engendrer une conformation différente de celle-ci, ce qui aurait une incidence sur ses interactions avec d'autres protéines. De plus, la glycosylation favoriserait un type supplémentaire d'interaction, l'interaction lectinique.

De nombreuses protéines modifiées par la *O*-GlcNAc jouent un rôle essentiel dans l'organisation et l'assemblage du cytosquelette. Parmi ces protéines sont retrouvées les cytokératines (8, 18 et 13) (Chou *et al.*, 1992 ; Ku et Omary, 1995), l'ankyrine (Zhang et Bennett, 1996), la taline (Hagmann *et al.*, 1992), la crystalline (Roquemoire *et al.*, 1992, 1996), la bande 4.1 (Inaba et Maede, 1989) mais également les neurofilaments (H, L et M) (Dong *et al.*, 1993), les protéines associées aux microtubules (MAP 1, 2 et 4) (Ding et Vandr , 1996) et enfin la synapsine I. Toutes ces protéines *O*-GlcNAc sont connues comme étant des phosphoprotéines impliquées dans des complexes multiprotéiques dont l'assemblage ou le désassemblage est souvent dépendant de l'état de phosphorylation de ces protéines et donc peut-être de leur état de glycosylation.

Nous prendrons l'exemple de la synapsine, une protéine concentrée au niveau des terminaisons présynaptiques où elle permet l'ancrage des vésicules synaptiques au cytosquelette. Ce processus est dépendant de sa phosphorylation, la synapsine I étant une des phosphoprotéines les plus abondantes dans le cerveau. Les travaux de Cole et Hart ont révélé que les sites phosphorylés et *O*-GlcNAc sont voisins ( loign s de 10 acides aminés) et que la glycosylation d'un site peut moduler la phosphorylation du site voisin (Cole et Hart, 1999). Ces sites de phosphorylation ou de *O*-GlcNAc sont particulièrement regroupés dans les domaines B et D, régions régulatrices importantes de la synapsine.

4.3- Régulation de la transcription

La transcription des gènes est un processus extrêmement régulé d'une façon spatiale et temporelle par une relation dynamique entre l'activation de la transcription et sa répression. Une liste récente des facteurs de transcription modifiés par la *O*-GlcNAc a été publiée, on peut y compter 25 membres ; il est fortement probable que ce chiffre ne cessera d'augmenter avec les recherches effectuées sur cette glycosylation (Zachara et Hart, 2004).

Le cas le mieux connu et le mieux étudié est celui de l'ARN polymérase II qui contient dans sa partie C-terminale un domaine contenant 52 répétitions de la séquence suivante, Y-S-P-T-S-P. Ce domaine, désigné "COOH-Terminal-Domain" (CTD) permet, lorsqu'il est phosphorylé, de passer d'une phase d'initiation de la transcription à une phase d'élongation : on parle de clairance du promoteur. Kelly *et al.* ont montré que ce CTD est glycosylé sur des

sites similaires à ceux phosphorylés et que la forme glycosylée n'est pas phosphorylée (Kelly *et al.*, 1993). La glycosylation aurait alors un autre rôle : elle permettrait de garder l'enzyme en phase d'initiation, afin de recruter les facteurs de transcription permettant ainsi le bon positionnement de l'ARN polymérase II (ARN pol IIA). Puis la déglycosylation suivie d'une phosphorylation autoriserait alors son entrée en phase d'élongation (ARN pol IIO) (figure 7). Ce système *O*-GlcNAc/phosphorylation apporterait un niveau de régulation encore plus élaboré pour contrôler la transcription des gènes de classe II.

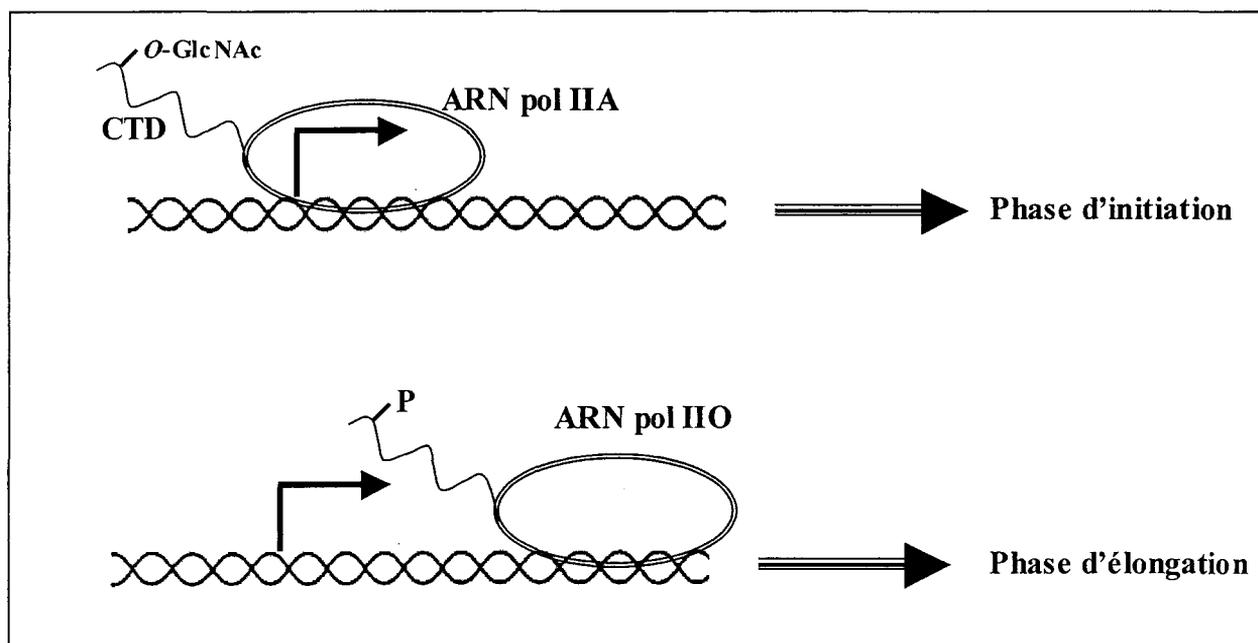


Figure 7 : L'état de modification du CTD de l'ARN polymérase II module son activité transcriptionnelle.

La répression de la transcription par la *O*-GlcNAc de l'ARN polymérase II pourrait être établie en amont par l'interaction de l'OGT avec le co-répresseur mSin3A. La répression transcriptionnelle responsable du "gene silencing" est assurée par un remodelage de la chromatine qui, une fois désacétylée par les histone désacétylases (HDACs), provoque une condensation de la chromatine, responsable de l'état transcriptionnel inactif. L'OGT interagit avec le complexe des histones désacétylases en fixant le co-répresseur mSin3A. Ce complexe réprime coopérativement la transcription en parallèle à la désacétylation des histones. mSin3A dirige alors l'OGT sur les promoteurs pour inactiver, par la *O*-GlcNAc, les facteurs de transcription et l'ARN polymérase II, et agit synergiquement avec la désacétylation des histones pour promouvoir le "gene silencing" de façon efficace et spécifique (Yang *et al.*, 2002).

La régulation de la transcription par la *O*-GlcNAc a également été montrée pour le facteur de transcription Sp1 (Jackson et Tjian, 1988). La forme *O*-GlcNAc est capable de fixer

l'ADN et d'induire la transcription. Cependant la présence de la glycosylation au niveau du domaine riche en glutamine de Sp1 empêche son interaction avec la protéine "TATA-binding-protein-associated factor" TAF_{II}110 et holoSp1, ce qui a pour conséquence une diminution de l'activité transactivatrice (Ross *et al.*, 1997). L'inhibition de ces interactions hydrophobes permettrait de prévenir les interactions protéine-protéine non spécifiques ou prématurées entre les facteurs de transcription et les TAFs avant que ces facteurs de transcription ne soient associés correctement au niveau de Sp1. Yang *et al.* ont également montré qu'une augmentation de glycosylation au niveau de ce domaine de Sp1 cause une réduction de son activité transcriptionnelle (Yang *et al.*, 2001).

Enfin, le suppresseur de tumeur p53 a été identifié comme étant modifié par la O-GlcNAc et cette glycosylation, qui inhibe son interaction avec Sp1, stimule la fixation de p53 sur l'ADN et inhibe par conséquent la transcription de gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire et dans l'apoptose (Shaw *et al.*, 1996). Les auteurs en ont conclu que le motif O-GlcNAc cacherait une région de la partie C-terminale de p53 impliquée dans la fixation à l'ADN et responsable de la répression, et par conséquent permettrait l'activation transcriptionnelle.

4.4- O-GlcNAc et cycle cellulaire

Plusieurs études ont permis de montrer le rôle de la O-GlcNAc dans la régulation des processus cellulaires.

- Pour étudier le rôle possible de la O-GlcNAc dans la régulation des processus cellulaires, Kearse et Hart ont étudié les effets de l'activation des lymphocytes murins par un mitogène, la concanavaleine A (Con A). Ils ont montré que cette activation s'accompagne d'une baisse des taux de O-GlcNAc au niveau des protéines cytosoliques et d'une augmentation des taux de O-GlcNAc au niveau des protéines nucléaires. Ces niveaux de glycosylation sont rétablis après quelques heures (Kearse et Hart, 1991a).

- Les travaux de Chou *et al.* ont montré une augmentation des niveaux de O-GlcNAc des cytokératines 8 et 18 lors de l'arrêt mitotique lors de la transition G2/M du cycle cellulaire des cellules HT29. Cette augmentation de glycosylation est également associée à une augmentation de phosphorylation, mais les protéines affectées par ces deux modifications post-traductionnelles ne sont pas les mêmes : avec l'arrêt mitotique, l'augmentation de phosphorylation des kératines intervient préférentiellement sur les cytokératines K8 alors que les K18 montrent une glycosylation plus importante. Cette modulation de glycosylation n'est

pas retrouvée aux autres points du cycle (G0/G1, G1/S, S). L'arrêt du cycle par le nocodazole a permis de montrer que l'arrêt mitotique et l'augmentation de glycosylation sont réversibles (Chou *et al.*, 1992).

- Cependant, l'étude de la glycosylation des extraits cellulaires totaux ou de protéines spécifiques comme les kératines, des protéines du pore nucléaire ou le facteur de transcription Sp1, dans des cellules HT29 traitées au nocodazole, a permis d'établir qu'il n'y a pas de changements majeurs des niveaux de *O*-GlcNAc sur ces protéines en particulier, et que les modifications de glycosylation sur les kératines sont un événement spécifique, mais qu'il y a cependant bien une augmentation globale des résidus de GlcNAc terminaux. En fait, cette augmentation est largement due à une accumulation de N-glycannes dont la glycosylation est incomplète dans les cellules traitées au nocodazole (Haltiwanger et Philipsberg, 1997).

- Des expériences par micro-injection de galactosyltransférase dans des ovocytes de Xénope de stade VI ont permis de montrer l'influence de la *O*-GlcNAc dans la progression du cycle cellulaire. La galactosyltransférase est une enzyme qui catalyse l'addition de galactose sur des résidus de GlcNAc terminaux, empêchant la déglycosylation et la reconnaissance spécifique par des lectines. La stimulation de la maturation de ces ovocytes par la progestérone est accompagnée d'un effet toxique, phénomène lié au "capping" par la galactose. Ce "capping" semble perturber la formation des asters durant la phase M (Fang et Miller, 2001).

- Dans une autre étude, les ovocytes de Xénope de stade VI ont été incubés avec des composés qui modulent le flux de la voie de biosynthèse des hexosamines-6-phosphate et mûrent en présence de progestérone. Le glucose, la glucosamine et le PUGNAc (l'inhibiteur de la *O*-GlcNAcase) ralentissent le temps de maturation de ces ovocytes. Cet effet provoqué par le glucose a pu être aboli par l'incubation simultanée de DON (6-diazonorleucine), un inhibiteur de la GFAT, l'enzyme limitante de cette voie. De plus, les auteurs ont montré que les niveaux de la *O*-GlcNAcase augmentent à chaque étape de l'ovogénèse des ovocytes alors que les niveaux de *O*-GlcNAc diminuent (Slawson *et al.*, 2002).

- L'implication directe de la voie de biosynthèse des hexosamines-6-phosphate a été démontrée par des expériences utilisant des cellules ou des embryons dont le gène codant l'autre enzyme clef de cette voie, EMeg32, est inactivé par recombinaison homologe. De tels embryons meurent au bout de 7,5 jours avec un retard général du développement. *In vitro*, des cellules ES différenciées mutées au niveau du gène EMeg32 montrent une réduction de prolifération. Enfin, des fibroblastes embryonnaires de souris déficientes en EMeg32 montrent également des défauts de prolifération et une perte des capacités d'adhésion. Ces

capacités peuvent être rétablies par une ré-expression stable de EMeg32 ou par la restauration nutritionnelle des niveaux intracellulaires d'UDP-GlcNAc (Boehmelt *et al.*, 2000).

- Des études du cancer mammaire humain ont démontré une diminution globale des niveaux de *O*-GlcNAc avec une augmentation significative de l'activité de la *O*-GlcNAcase. Cette étude suggère fortement que, lors de la transformation maligne des cellules, la régulation des niveaux de *O*-GlcNAc est perturbée, conduisant à une diminution des taux de *O*-GlcNAc et à la croissance aberrante des cellules (Slawson *et al.*, 2001).

- Enfin, la progression correcte dans le cycle cellulaire et la division cellulaire sont effectivement sensibles aux variations de glycosylation puisque l'équipe de Hart a montré qu'une augmentation artificielle de la *O*-GlcNAc était accompagnée de "défauts de croissance", ceci étant lié au retard dans la progression G2/M, dû à une modulation de la phosphorylation mitotique et de l'expression des cyclines (Slawson *et al.*, 2005).

4.5- La *O*-GlcNAc : un signal de rétention nucléaire

Ce point a fait l'objet d'une revue, jointe en annexe, intitulée :

"*O*-GlcNAc glycosylation: a signal for the nuclear transport of cytosolic proteins?" *Int J. Biochem. Cell. Biol.* 2005;37(4):765-74.

Partant de l'observation qu'un grand nombre de protéines *O*-GlcNAc sont nucléaires, plusieurs chercheurs se sont interrogés sur la possibilité que la *O*-GlcNAc soit un nouveau signal de transport nucléaire, différent du signal connu pour cette fonction, le "Nuclear Localization Signal" ou NLS (qui se distingue par une séquence riche en acides aminés basiques). D'après toutes les données de la littérature, la *O*-GlcNAc devrait plutôt être considérée comme un signal de rétention nucléaire et non pas un nouveau type de signal de translocation nucléaire, à l'instar de la séquence NLS.

4.6- Rôle de la *O*-GlcNAc dans la stabilité protéique

L'homéostasie cellulaire est assurée par un maintien correct des taux de protéines : le niveau de nombreuses protéines-clefs est contrôlé par deux processus : la synthèse et la dégradation protéique. L'un des mécanismes permettant à une protéine d'être dégradée rapidement est la présence d'une région spécifique appelée PEST, région riche en résidus de Pro (P), Glu (E), Ser (S) et Thr (T). La présence de ces régions au niveau d'une protéine permet son adressage au protéasome (ce point sera détaillé dans la partie ubiquitination et dégradation protéasomale). Mais dans la majorité des cas, cette séquence PEST nécessite une

activation par un mécanisme de phosphorylation. Etant donné que la *O*-GlcNAc jouerait un rôle antagoniste à la phosphorylation, il a été suggéré que la *O*-GlcNAc pourrait contrecarrer les effets de la phosphorylation au niveau des séquences PEST et ainsi empêcher la dégradation des protéines. Il est d'ailleurs intéressant de souligner que ces régions PEST sont très similaires aux sites requis pour la *O*-GlcNAc. En effet, cette glycosylation se fait au niveau de sites proline-sérine-sérine (PSS), proline-valine-sérine (PVS) ou de sites riches en acides aminés hydroxylés.

La régulation de la dégradation des protéines par la *O*-GlcNAc se fait à deux niveaux : d'une part, la glycosylation des protéines elles-mêmes augmente leur demi-vie et d'autre part la glycosylation du protéasome inhibe son activité de dégradation des protéines.

4.6.α : La glycosylation des protéines augmente leur demi-vie

Une corrélation entre l'état de glycosylation de Sp1 et sa dégradation a pu être établie : lorsque Sp1 se trouve sous une forme hypo-glycosylée, induit par une carence en glucose, il est rapidement dégradé par les voies du protéasome 26S. Par contre, la culture de cellules en présence de glucose ou de glucosamine protège Sp1 de cette dégradation, suggérant ainsi le lien entre la *O*-GlcNAc et la stabilité protéique. Ces expériences ont permis d'établir une bonne relation entre l'état de glycosylation de Sp1, sa capacité de fixation à l'ADN et surtout sa susceptibilité à être dégradé par le protéasome (Han et Kudlow, 1997).

Le cas du récepteur murin aux oestrogènes bêta (mER-β) est similaire. Ce récepteur aux oestrogènes nucléaire est modifié à la fois par phosphorylation et par la *O*-GlcNAc majoritairement sur la sérine 16 qui se trouve dans une région riche en séquences PEST (Cheng *et al.*, 2000). Il a donc été suggéré que la phosphorylation de cette séquence serait à l'origine de la dégradation de ce récepteur alors que sa modification par la *O*-GlcNAc lui assurerait une durée de vie plus longue. Des expériences ont permis de montrer que le "turnover" d'un mutant contenant un résidu d'acide glutamique au niveau de la Ser 16, acide aminé mimant une phosphorylation constitutive à cet endroit, est plus rapide que la protéine sauvage. Le mutant ne possédant pas d'acide aminé hydroxylé à cet endroit est dégradé à une vitesse plus lente que la protéine sauvage, indiquant que la balance *O*-GlcNAc/*O*-phosphate au niveau du résidu de Ser16 module la stabilité du récepteur aux oestrogènes.

La régulation du taux de protéines par la *O*-GlcNAc a été montré au niveau même des mécanismes de la traduction des protéines. Le facteur d'initiation eucaryotique de la traduction (eIF) autorise la traduction des protéines lorsqu'il n'est pas phosphorylé. La régulation de la phosphorylation de eIF-2 est assurée par une protéine, p67 qui s'associe à

eIF-2 et empêche sa phosphorylation, ce qui a pour conséquence de stimuler la traduction. p67 est une protéine qui a été identifiée comme étant *O*-GlcNAc (Datta *et al.*, 1989). Les auteurs ont montré que la glycosylation de p67 est requise pour l'inactivation de la kinase. Par contre, la carence en sérum induisant la déglycosylation de p67 conduit à sa dégradation et par conséquent à la phosphorylation de eIF-2, donc à l'inhibition de la synthèse protéique (Ray *et al.*, 1992). Le facteur eIF-2 lui-même a été identifiée comme étant modifié par la *O*-GlcNAc.

La plakoglobine est une protéine qui joue un rôle capital dans le maintien de l'intégrité tissulaire. Hatsell *et al.* ont découvert que la plakoglobine est modifiée par la *O*-GlcNAc au niveau du domaine N-terminal, et plus spécifiquement au niveau du résidu Thr14. Ce résidu est très proche de la "destruction box" dont la phosphorylation induit la dégradation de la protéine. La glycosylation de ce résidu de la plakoglobine est associée à une durée de vie plus longue, ce qui suggère une fois de plus l'effet antagoniste à la phosphorylation, à savoir que la *O*-GlcNAc assurerait une stabilité protéique (Hatsell *et al.*, 2003).

4.6.β : Le protéasome est lui-même *O*-GlcNAc

Enfin, le protéasome, complexe catalytique impliqué dans la dégradation rapide des protéines intracellulaires, est également modifié et régulé par la *O*-GlcNAc.

Pour évaluer le rôle potentiel de la *O*-GlcNAc dans la régulation de l'activité du protéasome 26S, l'équipe de Sümegei a entrepris l'étude de la glycosylation des unités de ce complexe chez la drosophile par reconnaissance lectinique et immuno-détection. Ils ont montré que cinq sous-unités de la partie régulatrice du protéasome et au moins neuf sous-unités de sa partie catalytique sont modifiées par la *O*-GlcNAc (Sümegei *et al.*, 2003).

La relation entre la modification du protéasome par la *O*-GlcNAc et sa régulation semble évidente par le fait que le protéasome est également modifié par phosphorylation. L'analyse des composants du protéasome isolés de foie de rat et de cellules a permis l'identification de sous-unités régulatrices phosphorylées. Mason *et al.* ont ainsi montré que trois sous-unités régulatrices du protéasome sont phosphorylées (Mason *et al.*, 1998). Ces trois sous-unités présentent une activité ATPasique, activité nécessaire à l'action protéasomale puisque la protéine à dégrader, doit au préalable être dénaturée pour pouvoir entrer dans la chambre catalytique du protéasome. Ces auteurs suggèrent que la phosphorylation permettrait de réguler l'activité du protéasome en favorisant son activité protéolytique. Il est intéressant de souligner que ces sous-unités ont été retrouvées comme étant modifiées par la *O*-GlcNAc dans les travaux de Sümegei *et al.*

La relation directe entre la glycosylation du protéasome et son activité a été démontrée par les travaux de Zhang *et al.* L'utilisation de peptides fluorescents ne pouvant être ni phosphorylés, ni *O*-GlcNAc, a permis de tester l'activité catalytique du protéasome en fonction de son état de glycosylation. Ces auteurs ont montré que les activités ATPasiques des sous-unités régulatrices sont également inhibées par la *O*-GlcNAc. Enfin "l'extinction" du gène de l'OGT par la méthode d'ARN interférentiel a montré une augmentation de la dégradation d'une protéine rapportrice et cette inhibition d'activité protéolytique peut être levée par l'ajout de la *O*-GlcNAcase (Zhang *et al.*, 2003).

Ces travaux montrent que la *O*-GlcNAc peut moduler la dégradation protéasomale des protéines par la modification même du protéasome.

4.7- La *O*-GlcNAc comme senseur du stress cellulaire

En réponse à de nombreux types de stress, les cellules augmentent rapidement leur concentration intracellulaire en glucose. Pour cela, l'augmentation du transport en glucose est assurée par la modification des K_m et V_m des transporteurs de glucose, présents au niveau de la membrane cellulaire et dont le nombre augmente en cas de stress. De nombreuses études ont montré que l'inhibition de la glycolyse ou de la voie de biosynthèse des hexosamines-6-phosphate (HBP) est à l'origine d'une baisse de la viabilité cellulaire (Boehmelt *et al.*, 2000). Etant donné que 2 à 5 % du glucose importé dans la cellule est utilisé pour la formation de l'UDP-GlcNAc, le nucléotide-sucré donneur pour la synthèse de la *O*-GlcNAc, à travers la HBP, les niveaux de *O*-GlcNAc de protéines cellulaires-clefs peuvent être directement modulés en altérant les niveaux de glucose extracellulaire. Zachara *et al.* ont étudié le lien possible entre la tolérance au stress et la *O*-GlcNAc présente au niveau de protéines cytonucléoplasmiques en étudiant les niveaux de *O*-GlcNAc en réponse à de nombreux stress infligés à la cellule. Ils ont montré que la réponse à de multiples stress (peroxyde d'hydrogène, cobalt, UV_B, éthanol, NaCl, stress thermique et arsenic) se traduit, quelque soit le type cellulaire, par une modulation des niveaux de *O*-GlcNAc : les taux de *O*-GlcNAc au niveau des protéines nucléaires et cytoplasmiques augmentent rapidement et de façon dynamique en réponse à chacun de ces stress. Cette augmentation de glycosylation est dose-dépendante. Ces données montrent que la *O*-GlcNAc est un effecteur de la voie de réponse au stress. Cette hyper-glycosylation est due en fait à une augmentation de l'activité de l'OGT qui ne nécessite pas la synthèse de nouvelles enzymes et n'est pas due à une diminution du taux de la *O*-GlcNAcase. La délétion de l'OGT entraîne une sensibilité accrue des cellules au stress thermique, ce qui suggère que l'OGT est nécessaire aux cellules pour tempérer un stress

cellulaire. A l'inverse, l'augmentation des taux de *O*-GlcNAc par l'inhibition de la *O*-GlcNAcase par le PUGNAc augmente la thermotolérance. Pour évaluer le rôle joué par la *O*-GlcNAc dans la protection des cellules au stress, ils ont également étudié l'induction des protéines de choc thermique. Ils montrent une induction rapide des Hsp70 et Hsp40 dont la surexpression est connue pour augmenter la tolérance au stress. La réduction des niveaux de Hsp70 et Hsp40 est observée dans les lignées cellulaires dans lesquelles l'OGT est également inhibée (Zachara *et al.*, 2004). Ces données permettent de conclure que la *O*-GlcNAc apporte une thermotolérance au stress en altérant, entre autres, les niveaux des Hsp70.

Ces observations sont en accord avec celles de l'équipe de Sohn *et al.* qui ont montré que les niveaux de *O*-GlcNAc sont élevés lors d'un stress thermique et que cette augmentation de *O*-GlcNAc est accompagnée d'une thermotolérance, directement liée à l'OGT à travers l'atténuation de l'agrégation des protéines. Pendant ce traitement thermique, ni les niveaux d'ARNm, ni l'activité catalytique de l'OGT ne sont augmentés de façon significative. De la même façon il n'y a pas de modification des niveaux d'UDP-GlcNAc ni de l'activité enzymatique de la *O*-GlcNAcase lors du stress. Ils proposent alors que l'augmentation de *O*-GlcNAc serait due à une augmentation de l'accessibilité des protéines substrats de l'OGT, qui lors du stress thermique subiraient des modifications conformationnelles démasquant des séquences hydrophobes substrats pour l'OGT : ils définissent l'OGT comme une chaperonne (Sohn *et al.*, 2004).

III. La *O*-GlcNAc et pathologies associées

1) *O*-GlcNAc et diabète de type 2

Cliniquement, la résistance à l'insuline se traduit par une diminution de la capacité de l'insuline à réduire les taux de glucose plasmatique. L'hyperglycémie induit une résistance à l'insuline chez les humains et des modèles animaux qui conduit au concept de « toxicité du glucose ». La résistance à l'insuline se produit à trois niveaux différents : les cellules β pancréatiques, au niveau du foie et des tissus périphériques (adipocytes et muscles squelettiques). De nombreuses données permettent d'établir un lien entre la disponibilité des nutriments et l'action de l'insuline. Cependant le débat sur les mécanismes par lesquels la disponibilité des nutriments module la signalisation de l'insuline et comment les excès de nutrition conduisent à la résistance à l'insuline reste d'actualité.

Une des voies les mieux caractérisées pour discerner l'état de nutrition est la voie de biosynthèse des hexosamines (HBP) qui permet la synthèse de l'UDP-GlcNAc, nucléotide sucre essentiel à la formation de la O-GlcNAc. En partant de ces observations, et du fait que l'OGT est particulièrement enrichie dans le pancréas, l'idée selon laquelle cette modification post-traductionnelle puisse être considérée comme un senseur nutritionnel est vite apparue.

La première preuve en faveur de cette hypothèse a été établie par Marshall *et al.* qui ont montré que la résistance à l'insuline nécessite trois composés : l'insuline, le glucose et la glutamine (Marshall *et al.*, 1991). Si un seul de ces composés est absent, alors peu ou pas de désordre est observé. Ils mentionnent alors le rôle de l'insuline tendant à favoriser l'entrée du glucose dans la cellule en augmentant le nombre de transporteurs de glucose à la surface cellulaire.

La glutamine a été utilisée pour induire une résistance à l'insuline dans une grande variété de cellules, tissus et organismes. D'ailleurs, l'inhibition de l'activité ou la suppression de l'expression de la GFAT bloque les effets de résistance à l'insuline causés par l'hyperglycémie, ce qui démontre l'implication de la HBP dans cette pathologie. Chez la souris, la surexpression de la GFAT dans les muscles squelettiques ou les tissus adipeux conduit à une résistance à l'insuline (Hebert *et al.*, 1996). Yki-Jarvinen *et al.* ont montré que l'induction d'une résistance à l'insuline chez des rats par la glucosamine et l'hyperinsulinémie sont associées à une augmentation des niveaux de O-GlcNAc sur des protéines squelettiques (Yki-Jarvinen *et al.*, 1998). IRS-1, la protéine kinase B, la glycogène synthase kinase 3 et la glycogène synthase font parties de la cascade qui permet, une fois l'insuline libérée, de stocker le glucose sous forme de glycogène (Parker *et al.*, 2003, 2004). Toutes ces protéines ont été identifiées comme étant O-GlcNAc en réponse à une augmentation du flux de HBP. Dans plusieurs études, la streptozotocine (STZ) et le PUGNAc ont été utilisés pour inhiber l'activité de la O-GlcNAcase afin d'augmenter les niveaux des protéines O-GlcNAc dans les cellules (revue de Zachara et Hart, 2004). Dans les adipocytes, ces composés réduisent dramatiquement la sensibilité à l'insuline. La STZ est sélectivement toxique pour les cellules β pancréatiques et a été utilisée pendant de nombreuses années pour générer des modèles de souris diabétiques (Konrad *et al.*, 2001).

La signalisation de l'insuline est souvent étudiée dans les adipocytes ou dans les lignées cellulaires 3T3 L1. Quand elles sont différenciées, les cellules 3T3 L1 qui expriment les transporteurs GLUT4 sont un modèle bien caractérisé pour l'étude de la résistance à l'insuline. Vosseler *et al.* ont étudié la relation entre l'augmentation des niveaux de O-GlcNAc et l'activation des effecteurs en amont des récepteurs à l'insuline. Ils se sont également intéressés à l'état de modification par la O-GlcNAc de chacun des membres de la cascade de signalisation de l'insuline dans des adipocytes 3T3-L1 sensibles et résistants à

l'insuline. Ils ont ainsi montré que l'augmentation de la glycosylation nucléocytoplasmique par la *O*-GlcNAc résulte en une résistance à l'insuline associée à des défauts d'activation de Akt (Vosseler *et al.*, 2002).

Les résultats qui associent la *O*-GlcNAc au diabète de type 2 semblent prometteurs et permettront de comprendre, du moins en partie, les mécanismes aboutissant à une résistance à l'insuline.

2) La *O*-GlcNAc et les maladies neurodégénératives

De nombreuses protéines neuronales sont modifiées par la *O*-GlcNAc, en relation avec la prépondérance des transcrits codant l'OGT et la *O*-GlcNAcase dans le cerveau. En rapport avec cette localisation et par l'observation d'une diminution des taux de glucose dans les neurones malades, l'implication du métabolisme de la *O*-GlcNAc dans les fonctions du système nerveux et dans les maladies humaines, en particulier les maladies neurodégénératives, semble évidente.

Parmi les protéines neuronales modifiées par la *O*-GlcNAc, certaines ont un rôle prépondérant dans les maladies neurodégénératives : il s'agit en particulier de la protéine Tau et de la protéine bêta-amyloïde impliquées dans la maladie d'Alzheimer et des neurofilaments impliqués dans la sclérose latérale amyotrophique et dans la maladie d'Alzheimer.

La protéine Tau ("tubulin associated unit") est une phosphoprotéine appartenant à la famille des protéines associées aux microtubules. Elle est très fortement exprimée dans les neurones où elle joue un rôle important dans l'assemblage, la stabilité et l'orientation des monomères de tubuline dans les microtubules pour constituer le réseau axonal microtubulaire. Dans la maladie d'Alzheimer (AD), les protéines Tau sont anormalement hyper-phosphorylées, ne fixent plus les microtubules et s'associent entre elles pour former des paires de filaments hélicoïdaux responsables de la mort des neurones. Cette phosphoprotéine est également modifiée par la *O*-GlcNAc. Cette glycosylation est retrouvée chez la protéine normale bovine (Arnold *et al.*, 1996) et humaine (Lefebvre *et al.*, 2003). Lefebvre *et al.* ont montré que l'hyper-phosphorylation de Tau induite par l'acide okadaïque s'accompagne d'une diminution des niveaux de *O*-GlcNAc au niveau de ces protéines. De plus, une carence en glucose induit une hyper-phosphorylation de Tau dans le cerveau de souris, hyper-phosphorylation qui ne semble être possible dans des conditions riches en nutriments, certainement par la compétition sur ces sites phosphorylés par la *O*-GlcNAc (Yanagisawa *et al.*, 1999). Enfin l'étude comparative de la glycosylation des fractions cytosquelettiques enrichies en protéines Tau provenant de cerveaux atteints de la maladie d'Alzheimer et de

cerveaux sains a montré qu'il existe une relation inverse entre la phosphorylation et la *O*-GlcNAc : les cerveaux sains sont enrichis en Tau sous la forme *O*-GlcNAc alors que les formes phosphorylées de Tau sont préférentiellement retrouvées dans les cerveaux malades. Des cellules transfectées avec l'ADN codant l'OGT présentent des niveaux de Tau phosphorylés altérés, suggérant que les changements de glycosylation de Tau peuvent influencer son état de phosphorylation (Robertson *et al.*, 2004).

Les protéines MAP ("Microtubule Associated Protein") sont des protéines qui appartiennent à la famille des protéines associées aux microtubules de haute masse moléculaire. De la même façon que Tau, la phosphorylation de ces protéines réduit leur capacité à promouvoir l'assemblage des microtubules. Les protéines MAP2 et MAP4 sont des protéines modifiées par la *O*-GlcNAc et cette glycosylation pourrait avoir le même effet au niveau de la phosphorylation avec le même effet pathologique pour les maladies neurodégénératives.

L'autre protéine dont le rôle est majeur dans la maladie d'Alzheimer est la protéine bêta-amyloïde. Une des caractéristiques majeures de cette maladie est l'accumulation progressive de fibrilles amyloïdes formant les plaques séniles constituées de la protéine bêta-amyloïde. Cette protéine est obtenue par clivage de la protéine APP ("beta-amyloid precursor protein"). APP est également modifiée par la *O*-GlcNAc (c'est la première et unique protéine plasmatique identifiée comme étant *O*-GlcNAc) (Griffith et Schmitz, 1995).

Les neurofilaments représentant les composants les plus abondants des axones larges myélinisés, sont *O*-GlcNAc (Dong *et al.*, 1993, 1996). Ils jouent un rôle important dans le contrôle du potentiel d'action par leur implication dans le calibre de l'axone. La phosphorylation de ces neurofilaments interviendrait dans la modulation de la flexibilité de la protéine. La perte de ces neurofilaments est associée à une diminution du diamètre axonal, de la diminution de vitesse du potentiel d'action et de l'atrophie âge-dépendante de certains tissus neuronaux. Les formes hypo-phosphorylées de ces neurofilaments sont concentrées au niveau du corps cellulaire, des dendrites et des nœuds de Ranvier. Les résidus de *O*-GlcNAc des neurofilaments sont retrouvés au niveau de domaines responsables du macro-assemblage des filaments, ce qui suggère que la *O*-GlcNAc pourrait agir comme un potentiel régulateur du processus d'assemblage.

Enfin bien d'autres protéines importantes pour le bon fonctionnement des neurones ont été identifiées comme étant *O*-GlcNAc : la synapsine I, la protéine AP-3 (Assembly Protein), l'ankyrine... Il est d'ailleurs intéressant de remarquer que le gène codant l'OGT se trouve sur le chromosome X dans une région "responsable" de la maladie de Parkinson et que le gène codant la *O*-GlcNAcase est proche du locus "responsable" de la maladie d'Alzheimer sur le chromosome 10.

Partie 2

Les protéines de choc thermique

Heat shock proteins

HSP

I. Introduction : les protéines de choc thermique

1) Induction des protéines de choc thermique

Les protéines de choc thermique ou HSP (Heat Shock Protein) sont des protéines qui, comme leur nom l'indique, sont induites lorsque les cellules sont exposées à un stress thermique subléthal. Elles ont été découvertes pour la première fois en 1962 en plaçant des glandes salivaires de drosophile à 37°C pendant 30 minutes. Ritossa a observé qu'après le retour de ces cellules à une température normale de croissance (27°C), un groupe de gènes est activé, accompagné par une augmentation de l'expression de protéines de masses moléculaires de 70 kDa et 27 kDa (Ritossa, 1962). Ces protéines ont donc été appelées protéines de choc thermique. Depuis un grand nombre d'autres protéines de ce genre ont été découvertes : elles constituent la famille des HSP et sont également dénommées "protéines de stress". De nombreux stimuli, autres que le choc thermique, sont également capables d'induire l'expression de telles protéines : des stimuli physiologiques tels que les hormones (Lu *et al.*, 2002), les facteurs de croissance (Takenaka et hightower, 1992), les antibiotiques (Takumida et Anniko, 2005). L'expression est également augmentée lors de certaines étapes du cycle cellulaire et en cas de cancérisation (Zhao et Shen, 2005) et lors de l'exposition des cellules aux analogues d'acides aminés (Kelley et Schlesinger, 1978). Des stimuli physiopathologiques tels que les phénomènes inflammatoires (Svensson *et al.*, 2006), les infections (Liao *et al.*, 2005), l'hypoglycémie (Shyu *et al.*, 2005), l'hypoxie (De Jond *et al.*, 2006) ou encore de nombreux autres stress comme les métaux lourds, le chlorure de sodium (Lee et Seo, 2002), les radiations aux ultra-violets (Trautinger *et al.*, 1999) induisent ces protéines.

2) Distribution phylogénétique et sub-cellulaire/classification

Les HSP forment une famille de protéines remarquablement conservée au cours de l'évolution. Ce sont des protéines retrouvées dans tous les organismes, chez les bactéries (Bardwell et Craig, 1983), les levures (Brazzell et Ingolia, 1984), jusqu'aux humains (pour revue, Fleshner et Johnson, 2005). Elles sont localisées dans le cytosol, le réticulum endoplasmique, le chloroplaste, la mitochondrie et le noyau. Leur dénomination sera différente en fonction de leur masse moléculaire et de leur localisation cellulaire (tableau III).

Tableau III : Nomenclature des protéines de choc thermique en fonction de leur localisation cellulaire.

Eucaryote	Homologue procaryote	Localisation cellulaire
Hsp110	C1p	Cytosol/noyau
Hsp90	Htp G	Cytosol/noyau
Grp78 (Bip)	Dna K	Réticulum endoplasmique
Hsp73	Dna K	Cytosol/noyau
Hsp72	Dna K	Cytosol/noyau
Grp75	Dna K	Mitochondrie/chloroplaste
Hsp60	GroEL	Mitochondrie/chloroplaste
Hsp56	?	Cytosol
Hsp47	?	Réticulum endoplasmique
Hsp20	?	Cytosol/noyau
Hsp10	GroES	Mitochondrie/chloroplaste
Ubiquitine	?	Cytosol/noyau

La plupart des HSP sont exprimées à 37°C, c'est à dire même en absence de choc thermique : ce sont les formes constitutives Hsc ("Heat shock cognate protein") alors que les protéines induites lors d'un choc thermique sont appelées Hsp ("Heat shock protein"). Cependant certaines Hsp sont exprimées même en absence de choc thermique. Les HSP ont une durée de vie relativement longue (environ 48h) dans des cellules épidermiques humaines.

Les protéines de choc thermique peuvent être classées en trois groupes :

- un premier groupe est constitué des HSP de haute masse moléculaire : ce sont les Hsp110, 90, 70 et 60,
- le second groupe, référencé comme les protéines de choc thermique mineures, est induit dans des conditions de déprivation en glucose et inclut les Grp ("glucose-regulated proteins") : ce sont les Grp34, 47, 56, 75, 78 et 174 (Sciandra et Subject, 1983),
- le troisième groupe constitué par les HSP ayant une masse moléculaire d'environ 20 kDa qui sont exprimées de façon importante dans des cellules de drosophile soumises à un choc thermique (Vitek et Berger, 1984) et lors de l'ischémie des cardiomyocytes (Mestril *et al.*, 1994).

3) Concept du chaperon moléculaire

Tous les stress impliquant la transcription préférentielle du groupe de gènes codant les HSP n'ont à priori pas de point commun. Cependant ces inducteurs agissent en déstabilisant le repliement des protéines ou en détruisant des structures protéiques déjà présentes. D'ailleurs, l'exposition des cellules aux analogues d'acides aminés en est une preuve puisqu'ils induisent directement une dénaturation (même partielle) des protéines. De même, la micro-injection de protéines dénaturées dans la cellule induit la synthèse des HSP (Ananthan *et al.*, 1986). Ces stress génèrent ainsi l'apparition de protéines mal conformées laissant apparaître des zones hydrophobes qui, en conditions physiologiques normales, sont enfouies au cœur de la macromolécule. Cet état correspond à un état de conformation du type globule fondu ou "molten globule". Or ces zones hydrophobes sont toxiques pour la cellule puisqu'elles peuvent interagir entre elles et ainsi former des agrégats résistants à la protéolyse (on parle d'état lipofuscine). Ces agrégats peuvent être délétères pour la cellule en favorisant l'apparition de pathologies d'agrégation du type maladie d'Alzheimer (figure 8).

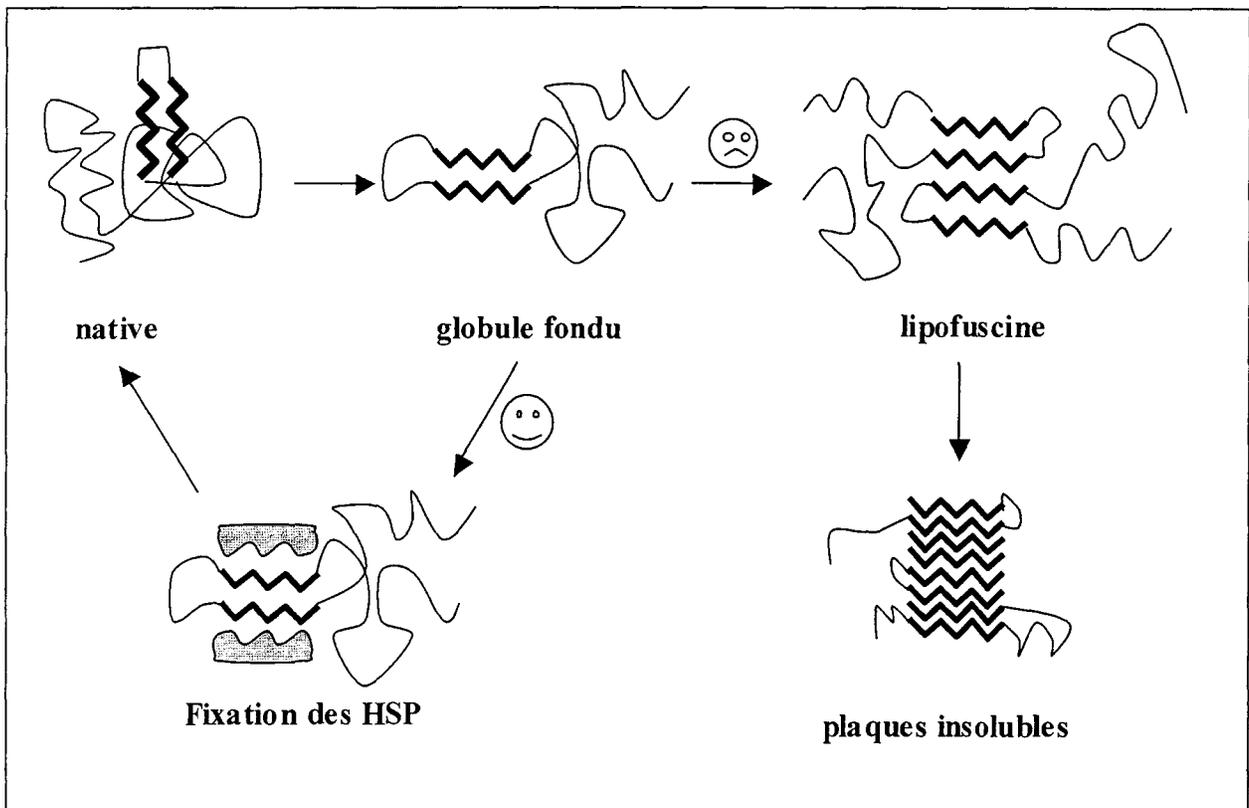


Figure 8 : Représentation des différents états conformationnels d'une protéine. Intervention des HSP pour la remise en conformation.

La mauvaise conformation due à un stress est dépendante de l'intensité de ce stress et peut, dans certains cas, être irréversible et entraîner la mort cellulaire. Cependant elle peut être rétablie par l'intervention des HSP. En 1989, Ellis *et al.* ont proposé que les protéines de choc thermique agissent comme des chaperons moléculaires dont le rôle est d'aider au repliement et à l'assemblage des polypeptides formant des structures oligomériques et ainsi de prévenir l'apparition de structures protéiques incorrectes engendrées par l'exposition de surfaces hydrophobes ou de zones impliquées dans les interactions inter-polypeptidiques (Ellis *et al.*, 1989). Elles vont donc lier les peptides, les protéines en cours de synthèse ou à fort risque d'agrégation, pour permettre leur repliement correct et leur translocation dans les compartiments sub-cellulaires (Gething et Sambrook, 1992 ; Young *et al.*, 2004). Elles fixent des protéines dénaturées afin de rétablir leurs fonctions (Parsell et Lindquist, 1993). Ces phénomènes ont lieu dans des conditions physiologiques normales tel que la synthèse des polypeptides et leur translocation au travers des membranes, lors des changements structuraux engendrés pour le fonctionnement des complexes protéiques, mais également à la suite d'un stress thermique. La majeure partie des HSP est impliquée dans le repliement des protéines. Toutefois elles occupent aussi d'autres rôles dans la cellule (tableau IV).

Tableau IV : Les différentes fonctions associées aux HSP.

HSP	Fonctions
HSP110	Nécessaire pour estomper les effets de stress sévères chez la levure
HSP90	Se lie aux récepteurs des stéroïdes pour les stabiliser dans le cytoplasme et empêcher leur action
Grp-78 (Bip)	Chaperon moléculaire et cytoprotection
Hsp73	Chaperon moléculaire
Hsp72	Chaperon moléculaire
Grp75	Chaperon moléculaire
Hsp60	Chaperon moléculaire
Hsp56	Fixe les récepteurs des glucocorticoïdes
Hsp47	Chaperon des collagènes
Hsp20	Contrôle la polymérisation de l'actine, chaperon moléculaire et cytoprotection
Hsp10	Co-chaperonne de Hsp60
Ubiquitine	Voie de dégradation ATP-dépendante non lysosomale des protéines

II. Chaperons moléculaires et mise en conformation dans le réticulum endoplasmique

1) Bip "Immunoglobulin binding protein"

Le contrôle qualité est un processus cellulaire essentiel survenant tout au long de la vie. Bip ou Grp78, représente l'homologue de Hsc70 cytosolique et nucléaire. Bip permet d'assister le transfert des protéines au niveau du translocon (Lyman et Schekman, 1997). Elle va permettre, de la même façon que Hsc70, la mise en conformation des protéines réticulaires par un cycle ATP/ADP nécessitant la présence de Grp94, l'homologue réticulaire de Hsp90, ceci en reconnaissant des segments hydrophobes. Ce mécanisme a lieu dans des conditions normales (Hammond et Helenius, 1995). Enfin, Bip permet également l'occlusion du translocon quand il n'y a pas de ribosome associé à la membrane (Hamman *et al.*, 1998).

Dans certaines conditions cellulaires, des protéines de conformation anormale s'accumulent dans le réticulum endoplasmique et induisent la réponse UPR ("unfolded protein response"). Chez les mammifères, la réponse UPR inclut une activation de la transcription de gènes cibles et une profonde inhibition de la traduction, ce qui augmente les capacités de repliement et de dégradation et limite l'arrivée de nouvelles protéines dans le réticulum endoplasmique (RE) (Urano *et al.*, 2000). Le mécanisme de remise en conformation est particulièrement actif lors d'un tel stress. Bip agit alors en tant que chaperon moléculaire (Morris *et al.*, 1997) et en tant qu'élément de détection de l'UPR (Gülow *et al.*, 2002).

2) Le contrôle qualité dans le réticulum endoplasmique

1.1- Transfert en bloc du tétra-déca-oligosaccharide

Les protéines synthétisées au niveau des ribosomes vont subir des modifications co- et post-traductionnelles au niveau du (RE) et de l'appareil de Golgi de façon à acquérir leurs structures finales et fonctionnelles. La majorité des protéines synthétisées dans le RE sont des N-glycoprotéines, c'est à dire des protéines portant un oligosaccharide au niveau d'un résidu d'asparagine. Le RE est le lieu de synthèse d'un oligosaccharide constitué de 14 monosaccharides, le Glc₃-Man₉-GlcNAc₂, qui sera transféré en bloc au niveau de la protéine grâce à la reconnaissance de la séquence peptidique de N-glycosylation (Asn-X-Ser/Thr, X étant n'importe quel acide aminé sauf la proline). Ce transfert est effectué par un complexe protéique, l'oligosaccharyltransférase (OST). Cet oligosaccharide sera ensuite modifié lors de

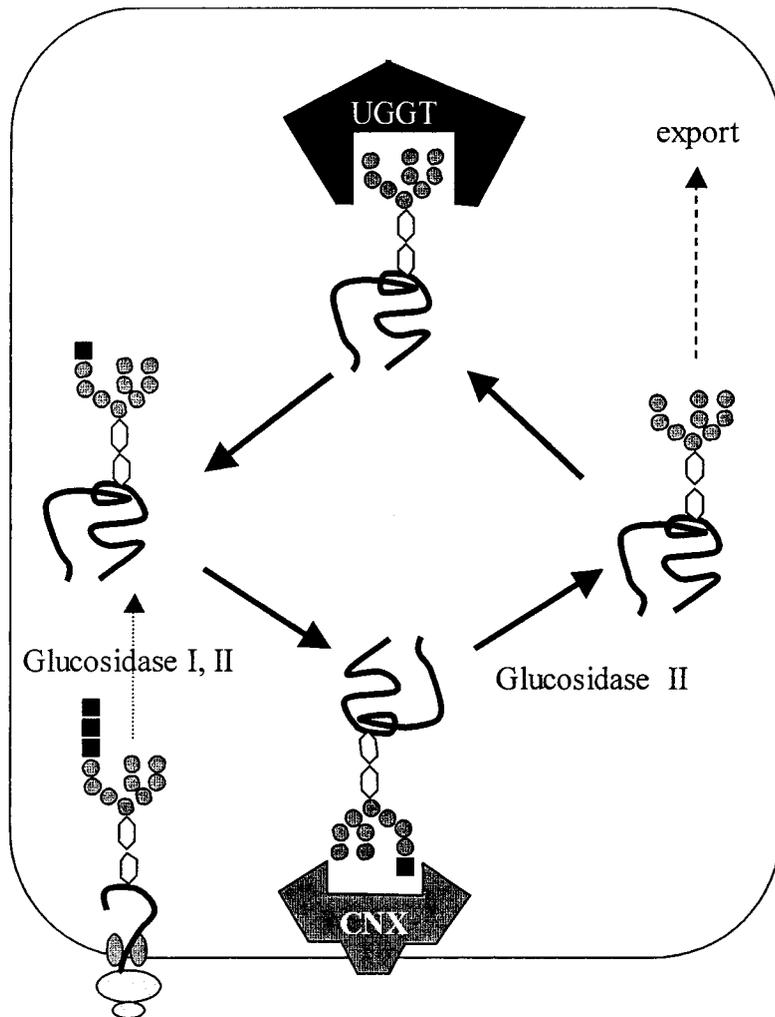


Figure 9 : Le cycle gluco/dégluco : intervention des chaperons moléculaires : exemple de la calnexine.

son cheminement au sein des différents compartiments réticulaires et golgiens. L'addition de ce noyau oligosaccharidique permet, d'une part, de stabiliser la protéine en augmentant sa solubilité au sein du compartiment réticulaire, et d'autre part, de permettre la mise en conformation de la protéine. En effet, une fois les deux derniers résidus de glucose retirés par les glucosidases I et II, le glucose terminant la structure saccharidique sera l'élément clef du contrôle qualité permettant la mise en conformation correcte des protéines par la calnexine ou la calréticuline et le cycle gluco/dégluco.

1.2- Le cycle gluco/dégluco

Les chaperonnes résidentes du RE, Bip (ou Grp78) et Erp57 reconnaissent et retiennent les protéines présentant des séquences hydrophobes. Ces chaperonnes agissent de concert avec la calnexine et la calréticuline, la première étant membranaire et la seconde soluble. Ces chaperonnes s'associent aux protéines monoglucosylées ($\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) permettant leur remise en bonne conformation par Erp57. Les glycoprotéines mal conformées restent fixées à ces chaperonnes jusqu'à ce qu'elles soient déglucosylées par la glucosidase II dont le rôle est de détacher le dernier résidu de glucose du noyau oligosaccharidique, libérant ainsi les protéines substrats. Puis si les protéines sont toutefois encore mal conformées, elles sont re-glucosylées par l'UGGT ("UDP-glucose : glycoprotein glucosyltransferase"), enzyme qui a pour unique rôle de reconnaître à la fois la partie saccharidique (dépourvue de glucose) et des segments hydrophobes de 20-30 résidus, typiques des protéines presque définitivement repliées. Les protéines imparfaitement repliées sont alors re-glucosylées et ré-associées à la calnexine ou à la calréticuline qui permettront de leur donner leur forme native par l'association avec Erp57. L'ensemble de ces réactions constitue le cycle gluco/dégluco assurant le contrôle qualité des glycoprotéines (figure 9). Le résidu de glucose terminal et l'intervention des chaperons reconnaissant ce monosaccharide sont primordiaux dans le contrôle qualité des glycoprotéines.

2) Calnexine et calréticuline

La calnexine et la calréticuline sont des chaperonnes résidentes du RE. Elles sont primordiales dans le processus de remise en conformation des protéines synthétisées au niveau du RE. Ces deux protéines sont très similaires avec des différences apparaissant principalement au niveau de leur partie C-terminale. La calréticuline est une protéine de masse moléculaire de 46.5 kDa constituée de 400 acides aminés. Il s'agit d'une lectine de type

C (elle nécessite la présence d'ions Ca^{2+} pour permettre la mise en conformation des protéines nouvellement synthétisées et des glycoprotéines) soluble alors que la calnexine est une protéine membranaire de type I composée d'un domaine luminal fortement similaire à la calréticuline et d'une région membranaire située au niveau de sa partie C-terminale. Cette protéine de 572 acides aminés a une masse moléculaire de 65.4 kDa.

Ces chaperonnes présentent des points communs aux HSP70. En effet, elles préviennent de l'export de protéines dont la conformation est incorrecte ou incomplète (Rajagopalan et Brenner, 1994). Elles aident également à prévenir de la dégradation rapide des protéines (Kearse *et al.*, 1994). La fonction de chaperons de ces deux protéines a clairement été démontrée en étudiant la fixation prolongée de celles-ci sur des mutants de glycosylation qui ne peuvent acquérir une conformation correcte (Peterson *et al.*, 1995). Enfin, l'interaction prolongée du substrat avec la calnexine résulte en l'envoi de ces protéines au niveau de la dégradation protéasomale. Un autre point commun entre les chaperonnes résidentes du RE et les HSP70 est la fixation et l'hydrolyse de l'ATP. La calnexine et la calréticuline sont capables de fixer l'ATP *in vitro* (Ou *et al.*, 1995). L'activité ATPasique de ces deux protéines est certes faible, mais existe néanmoins *in vivo* (Ihara *et al.*, 1999).

III. La famille des protéines de choc thermique de 70 kDa : HSP70

1) Caractéristiques générales

Les protéines de choc thermique de 70 kDa (HSP70) représentent certainement la famille de HSP la plus conservée, la plus abondante et la plus étudiée. Elle regroupe plusieurs membres présentant une forte homologie: par exemple, il existe 40 à 60 % d'identité entre les gènes eucaryotiques et DnaK, son homologue chez *E. coli* et 60 à 96 % d'identité entre les gènes codant les HSP70 chez les eucaryotes (Bardwelle et Craig, 1983 ; Lindquist, 1986).

La famille des HSP70 peut être sub-divisée en deux grands groupes:

- les Hsc70 qui sont les formes constitutives, exprimées principalement dans des conditions normales, et faiblement induites lors d'un stress (l'augmentation observée de sa synthèse résulte plus de la stabilisation de son ARNm que de son induction). Elles sont localisées dans le cytosol et le noyau. On les retrouve également sous le nom de Hsp73.
- les Hsp70 qui existent en faible quantité dans la cellule non stressée mais dont l'expression est induite lors d'un stress thermique en particulier. On parle également d'Hsp72. Ce sont les

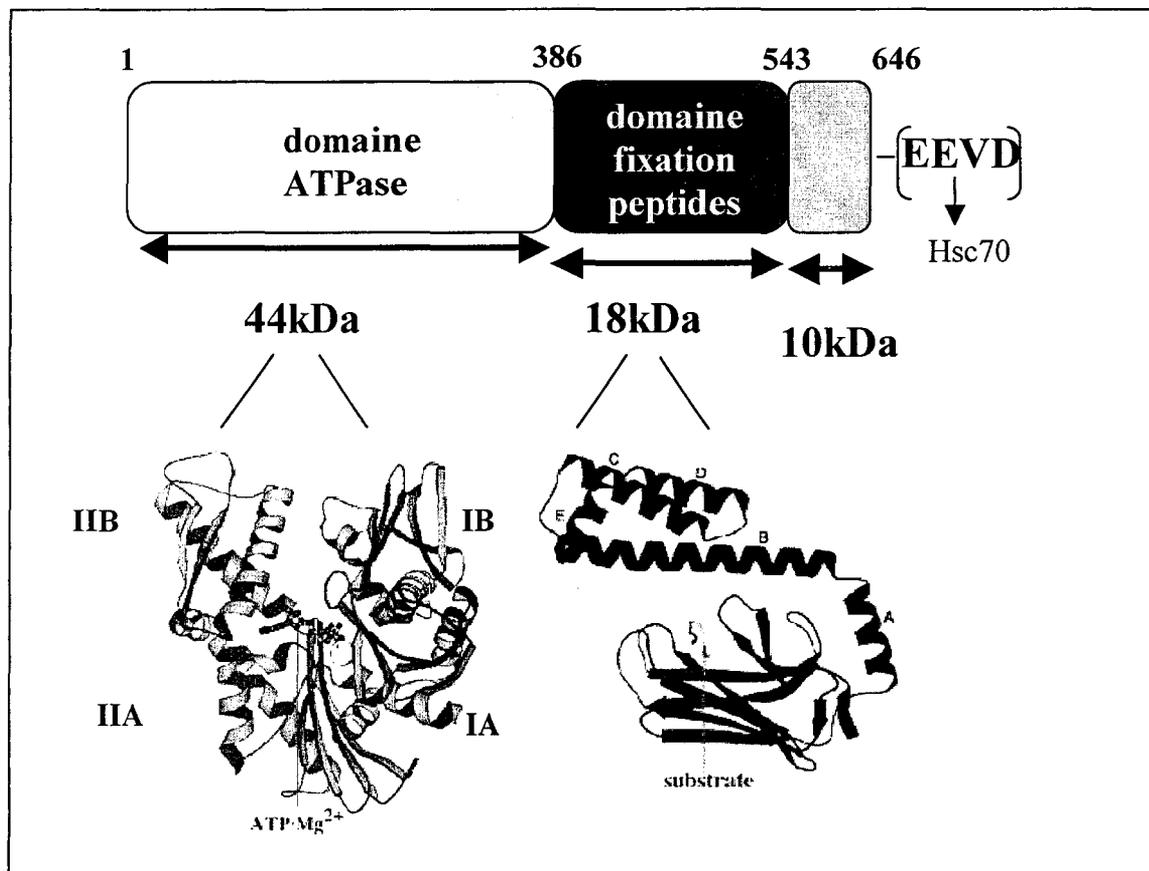


Figure 10 : Structure commune aux HSP70 : représentations schématiques et spatiales des différents domaines.

protéines les plus sensibles au stress thermique, c'est-à-dire que lorsque la cellule subit un stress, les Hsp70 sont les protéines les plus abondamment produites par rapport aux autres HSP. Elles sont localisées dans le cytosol et le noyau.

Chez la souris il existe cinq protéines constitutives : Hsp70.2, Hsc70 et Hsc70t, Grp78, Grp75 et deux protéines inductibles : Hsp70.1 et Hsp70.3. Le niveau d'expression basal de Hsp70 *in vivo* est hautement dépendant du tissu et de l'âge : la peau, le tube digestif, les poumons et les reins expriment un niveau de base relativement plus élevé que le cœur, le muscle et le foie (Tanguay *et al.*, 1993 ; Blake 1990, 1993). Or ces tissus sont en contact permanent avec l'environnement extérieur, ce qui expliquerait que ces organes soient adaptés à un éventuel stress exogène.

2) Structure des HSP70

Toutes les HSP70 sont capables de fixer l'ATP (Chappell *et al.*, 1987 ; Milarski et Morimoto, 1989). Chez l'humain, Hsc70 est constituée de 646 acides aminés et Hsp70 en possède 640 (il existe 86 % d'identité entre les protéines). Des études analytiques ont permis de déterminer la structure de la forme bactérienne (*E. coli*), bovine et humaine de cette protéine: elles possèdent toutes trois domaines plus ou moins conservés et des études biochimiques ont permis d'assigner à chacun de ces domaines une fonction. Les HSP70 sont constituées :

- d'un domaine N-terminal de 44 kDa (des résidus 1 à 386) hautement conservé et présentant une activité ATPasique. Ce domaine a été caractérisé par diffraction des rayons X : il est constitué de quatre domaines formant deux lobes. Deux sous-domaines larges globulaires I et II, chacun divisé en deux petits sous-domaines A et B. Ces sous-domaines sont séparés par le domaine de fixation du nucléotide complexé à un ion magnésium (Mg^{2+}) et à deux ions potassium (K^+) (figure 10).

- d'un domaine de fixation des peptides de 18 kDa (acides aminés 386 à 543). Ce domaine est extrêmement conservé au sein de la famille des HSP70. La grande majorité des informations sur ce domaine existe chez *E. coli*, DnaK (Zhu *et al.*, 1996 ; Morshauser *et al.*, 1995). La RMN a permis de définir sa structure : ce domaine est formé d'un sandwich de deux ensembles de feuillets β anti-parallèles et d'une hélice α (Morshauser *et al.*, 1999). Il est responsable de la reconnaissance et de la fixation de peptides conformés et de peptides mal conformés par le biais de la reconnaissance de séquences hydrophobes (figure 10).

- d'un domaine C-terminal de 10 kDa (acides aminés 543 à 646) moins bien conservé puisque celui d'Hsp70 diffère de 26 acides aminés par rapport à celui d'Hsc70 et est plus

	613	646
Hsc70 rat	SAGGMPGGMPGGFPGGGAPPSGGASSGPTI	<u>EEVD</u>
Hsc70 xénope	GGVPGGVPPGGMPGSSCGAQRQGGNSGPTI	<u>EEVD</u>
Hsc70 levure (Ssa1)	GGAPGGAAGGAPGGFPGGAPPAPAEAGPTV	<u>EEVD</u>
Hsc70 Trypanosome	PPGGMPGGMPGGMPGGMPGGANPSSSSGPEV	<u>EEVD</u>
Hsc70 humain	SAGGMPGGMPGGFPGGGAPPSGGASSGPTI	<u>EEVD</u>

Figure 11 : Le domaine C-terminal des Hsc70 présente une séquence conservée EEVD et des séquences riches en glycine (GGMP).

court de 6 acides aminés. Il a été déterminé *in silico* en utilisant l'algorithme Garnier. Il s'agirait d'une hélice α suivie par un segment apériodique riche en glycine et en proline (GGMP) proche de la partie extrême C-terminale qui contient une séquence particulièrement conservée : la séquence EEVD (Freeman *et al.*, 1996) (figure 11). Ces quatre derniers acides aminés, présents chez Hsc70 mais absents chez Hsp70, auraient plusieurs rôles : cette séquence agirait sur le taux d'ARNm transcrit lors d'un choc thermique (Denisenko et Yarchuk, 1990), elle serait essentielle pour la protection cellulaire vis-à-vis de ce même stress (Li *et al.*, 1991) et enfin elle permettrait la reconnaissance d'Hsc70 au niveau de la membrane externe de la mitochondrie, permettant ainsi le transport de protéines "cargo" au niveau de ce compartiment cellulaire.

Ce domaine est impliqué dans la fixation des co-chaperonnes (Hsp40 et Hop) permettant ainsi de moduler l'activité ATPasique de HSP70 *via* cette séquence EEVD et les tétratricopeptides (Demand *et al.*, 1998 ; Boice et Hightower, 1997 ; Liu *et al.*, 1999). La fixation de l'ATP sur le domaine ATPasique altère la conformation du domaine de 18 kDa et les cinétiques de fixation des peptides mais le mécanisme de la communication inter-domaine n'a été comprise que grâce à l'élaboration de la structure cristalline de la chaperonne bovine entière et fonctionnelle, possédant les deux principaux domaines (Jiang *et al.*, 2005 et 2006). Des expériences de mutation ont permis d'établir que les interactions inter-domaines sont critiques pour la fonction de chaperonne et ces analyses sont en faveur d'un mécanisme allostérique.

3) Séquences peptidiques reconnues

Gragerov et Gottesman ont démontré en 1994 que des peptides du type NRLLLTG contenant des résidus internes aliphatiques sont les substrats préférentiellement reconnus par les HSP70. La présence de résidus basiques favorise la fixation alors que les résidus acides la défavorisent (Gragerov et Gottesman, 1994). Dans la cellule eucaryote, HSP70 fixe deux motifs peptidiques différents. Le premier motif riche en acides aminés hydrophobes et aromatiques comme FYQLALT est un bon stimulateur de l'activité ATPasique et représente certainement les sites utilisés par HSP70 pour distinguer la forme native bien conformée de la forme mal conformée de la protéine (Fourie *et al.*, 1994). Le second motif, riche en acides aminés hydrophobes et basiques et du type NIVRKKK, induit quant à lui faiblement l'activité ATPasique et serait plutôt utilisé pour le transport des protéines vers les organelles cibles ou pour la fixation de certaines protéines mal conformées (Takenaka *et al.*, 1995).

4) Régulation du gène codant les HSP70 - HSF et HSE

4.1- *Le gène codant les HSP70*

La famille multigénique HSP70 humaine contient au moins dix gènes dont huit ont été localisés sur cinq chromosomes différents : trois de ces gènes sont localisés à proximité du complexe d'histocompatibilité présent sur le chromosome 6 (Milner et Campbell, 1990 ; Sargent *et al.*, 1989), deux sont localisés sur le chromosome 1 (Leung *et al.*, 1992), un sur le chromosome 5 (Fathallah *et al.*, 1993), un sur le chromosome 9 (Hendershot *et al.*, 1994) et un sur le chromosome 14 (Bonnycastle *et al.*, 1994). La forme constitutive, Hsc70, est codée par un gène situé sur le chromosome 11 (Tavaria *et al.*, 1995). Le gène codant Hsp70 humaine est un gène de 2440 pb contenant une séquence "leader" de 212 pb et une région 3' non transcrite de 242 pb (Wu *et al.*, 1986). Il présente au moins deux éléments régulateurs dans la région 5'. Chez la souris, Hsp70 est codée par deux gènes localisés à proximité du complexe d'histocompatibilité présent sur le chromosome 17 (Lee et Seo, 2002). L'identité des gènes codant Hsp70.1 et Hsp70.3 est d'environ 98 %. Le gène codant Hsp70.2 qui n'est pourtant pas induite mais bien constitutive est exprimé uniquement dans les spermatocytes. Sa régulation positive durant la phase méiotique de la spermatogenèse est nécessaire pour la progression de la méiose dans les cellules germinales des souris mâles, puisque des souris n'exprimant plus ce gène ne produisent plus de spermatides et sont donc stériles (Eddy, 1998, 1999).

4.2- *Structure des HSF*

Chez les eucaryotes, les gènes codant les Hsp70 sont sous le contrôle de facteurs de transcription, activés lors d'un stress. Ces facteurs sont communément appelés facteurs de choc thermique ou HSF ("Heat Shock Factor"). Ces HSF se fixent sur des régions spécifiques du promoteur composées de la répétition de cinq séquences (nGAAn), les éléments de réponse ou HRE ("Heat Shock Response Element"). Ces HSF se fixent sur les HRE lors d'un stress et suffisent à induire la transcription des Hsp70. Quatre HSFs ont été identifiés chez les vertébrés : HSF1, HSF2, HSF3 et HSF4. Chacun de ces facteurs de transcription est stimulé par des stress différents et possède une localisation tissulaire spécifique (Ding *et al.*, 1998). HSF1 représente l'homologue fonctionnel de HSF décrit chez les procaryotes (Satyal *et al.*, 1998). La structure de ces facteurs de transcription est représentée sur la figure 12. Ils possèdent :

- un domaine de liaison à l'ADN formé par un motif "helix turn helix" avec trois hélices α autour d'un feuillet β anti-parallèle à quatre brins se trouvant en position N-terminale,
- une surface de trimérisation avec des motifs "leucine Zipper" impliquée dans la formation du trimère,
- une courte séquence conservée, CE-2 chez les levures et SuA chez les eucaryotes supérieurs.

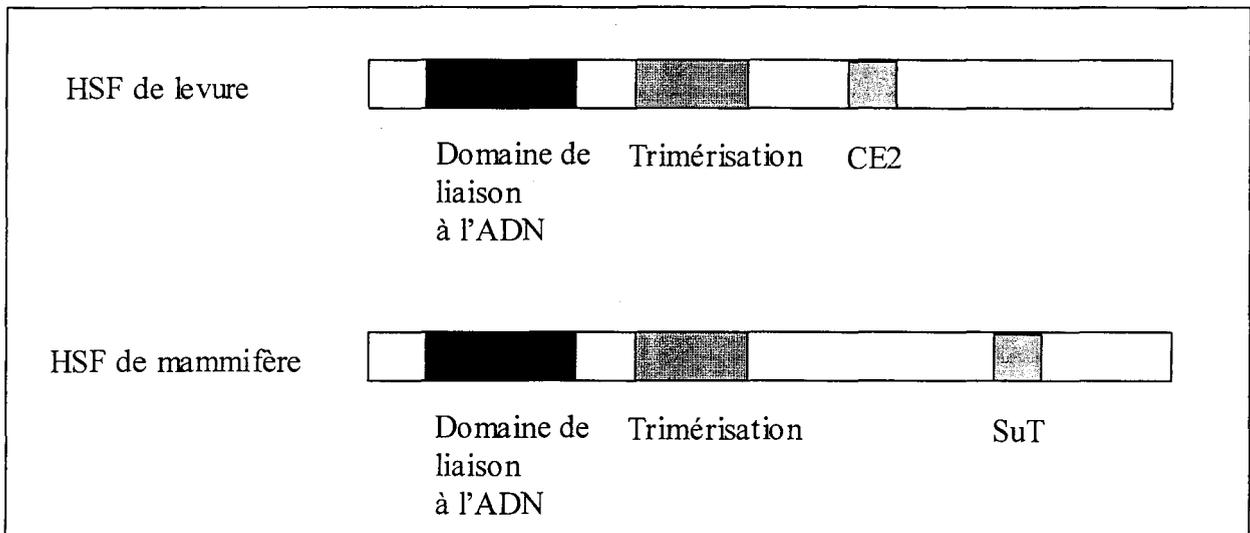


Figure 12 : Structure des facteurs de choc thermique ou HSF de levure et de mammifère.

4.3- Régulation des gènes codant les HSP70 par les HSF

La figure 13 est une représentation schématique du mécanisme d'induction des HSP70 par les HSF lors d'un stress. La régulation de la transcription de la forme induite Hsp70 est bien connue. Par contre, celle de la forme constitutive (niveau basal de Hsp70) est moins bien comprise. Il semblerait que les HSF ne soient pas impliqués.

Dans la cellule non stressée, Hsp70, en faible quantité, est complexée à son facteur de transcription, HSF. Lorsqu'un stress survient au niveau de la cellule, les protéines qui étaient dans leur état natif sont malmenées et laissent apparaître des segments hydrophobes à leur surface. Cet état, du type globule fondu, est préférentiellement reconnu par les HSP70 qui se détachent alors de HSF. Ce système permet à la cellule de répondre immédiatement à un stress, en empêchant l'agrégation des protéines mal conformées par la fixation des HSP70 présentes dans la cellule. La dissociation de HSP70 de HSF va permettre la phosphorylation par une PKC (sérine/thréonine kinase) de ce facteur de transcription. Cet état phosphorylé autorise la trimérisation de HSF, le trimère est alors transporté dans le noyau pour aller ensuite se fixer sur les éléments de réponse (HRE) du promoteur des gènes codant les Hsp70.

La trimérisation permet d'accroître l'affinité de liaison à l'ADN. La forme monomérique de HSF, présente dans le cas de la cellule non stressée, se lie très mal sur son élément de réponse. L'induction de la transcription va permettre une augmentation du taux de Hsp70 au niveau du cytoplasme. Ces Hsp70 vont venir en renfort des Hsp70 déjà présentes et permettent, grâce à l'interaction avec des co-chaperonnes comme Hsp40, de remettre en conformation les protéines dénaturées ou le cas échéant, par l'interaction avec d'autres co-chaperonnes comme CHIP ("carboxyl-terminus of Hsc70-interacting protein"), d'adresser les protéines au protéasome pour leur dégradation. Ce système d'amplification est géré par un mécanisme de rétro-contrôle : quand le taux de Hsp70 est suffisant dans la cellule pour palier les effets causés par le stress, les Hsp70 libres vont fixer de nouveau les HSF, empêchant ainsi leur phosphorylation et l'induction consécutive de la transcription (Li *et al.*, 1995).

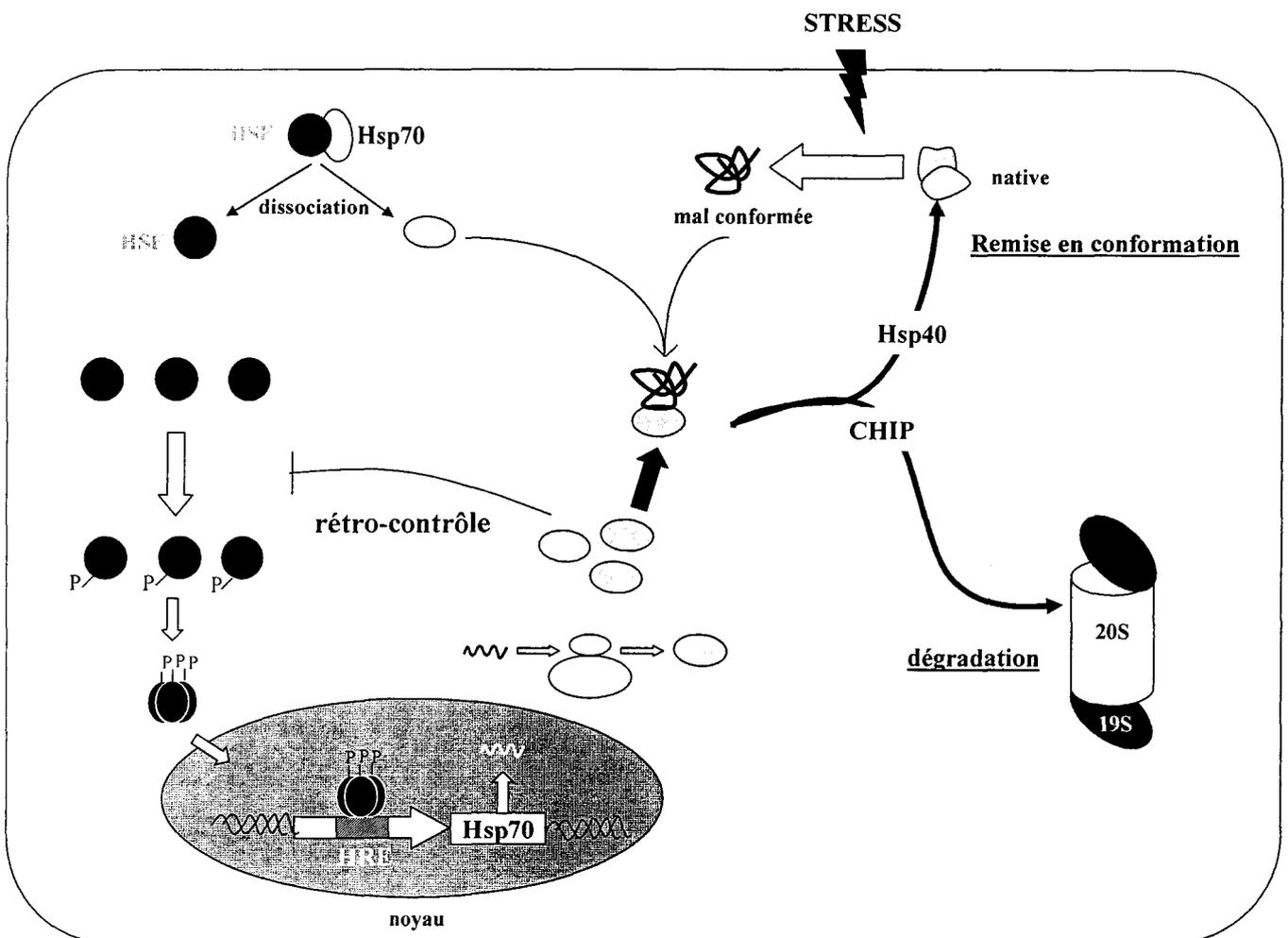


Figure 13 : Représentation schématique du mécanisme d'induction des Hsp70 lors d'un stress.

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, le système semble différent puisque HSF est toujours fixé sur l'élément de réponse HRE mais Halladay et Craig ont proposé qu'une protéine dénommée "suppresseur extragénique" permettrait d'inactiver HSF (Halladay et Craig, 1995).

Hoj et Jakobsen ont suggéré que ce serait la phosphorylation du résidu de sérine 460 du facteur de transcription qui causerait son inactivation (Hoj et Jakobsen, 1994).

4.4- Autres facteurs régulant la transcription des Hsp70

Des protéines kinases sont impliquées dans la modulation de l'activité des HSF. Les MAP kinases ("Mitogen activated proteins"), ERK1 et ERK2 ("extracellular signal-regulated kinase") modulent l'expression génique de Hsp70. Ces kinases sont parfois induites par des facteurs générant des espèces activées de l'oxygène comme l'H₂O₂, les radiations ionisantes (UV) et le choc thermique. ERK1 régule de façon positive le gène Hsp70 : la surexpression de ERK1 dans des cellules subissant un choc thermique conduit à une augmentation de la phosphorylation de HSF1 (Mivechi et Giaccia, 1995).

Le processus seul de phosphorylation, de trimérisation et de transport au noyau ne permet pas la transcription des gènes codant les Hsp70 : d'autres facteurs sont nécessaires à ce processus. Par exemple, le CHBF ("constitutive heat shock element binding factor") est un élément régulateur de l'ADN qui joue un rôle dans la réparation de l'ADN (Gottlieb et Jackson, 1993). Il serait nécessaire à l'activité génique de Hsp70. Cette régulation "multi-factorielle" est retrouvée pour la régulation de l'expression de Grp78 et Grp94 (Cao *et al.*, 1998 ; Ramakrishnan, 1995).

IV. Les fonctions des Hsp70

De nombreuses recherches ont démontré que les HSP ont un rôle cytoprotecteur, qu'elles sont impliquées dans de nombreuses voies de régulations et se comportent comme des chaperons moléculaires vis-à-vis d'autres protéines cellulaires. La mise en conformation des protéines et l'assemblage des structures multimériques *in vivo* ne sont pas spontanées mais nécessitent l'intervention de chaperons moléculaires, notamment des Hsc70 qui facilitent ces processus. Hsc70 se fixe d'une manière transitoire et non covalente aux polypeptides naissants et aux protéines mal conformées et mal assemblées. Elles bloquent les interactions protéine-protéine indésirables et permettent la mise en conformation de ces protéines dans leur état natif et fonctionnel en séquestrant les états intermédiaires susceptibles de s'agréger, permettant ainsi la bonne mise en conformation de chacune des chaînes polypeptidiques et le bon assemblage des structures oligomériques.

Pour exercer leurs fonctions lors de divers processus cellulaires, les Hsc70 coopèrent avec une multitude de co-facteurs chaperons. Ces co-facteurs vont permettre soit de moduler

l'activité ATPasique et les cycles de fixation du peptide de Hsc70, soit de permettre leur adressage vers des compartiments sub-cellulaires.

La multitude de fonctions de Hsc70 montre l'importance de cette protéine pour la survie de la cellule en condition normale et lors d'un stress protéotoxique. Elles permettent, entre autre, le maintien des formes non encore conformées ou dénaturées dans le cytosol, l'adressage des protéines au niveau de la mitochondrie, du lysosome ou du noyau et la dégradation des protéines.

1) Mise en conformation des protéines

1.1- Maintien des formes non conformées ou dénaturées dans le cytosol

Une protéine nouvellement synthétisée doit être protégée contre les interactions indésirables à au moins quatre étapes de son processus de mise en conformation :

- au moment de la traduction,
- lorsqu'elle est dans un état non conformé, à la suite de son décrochage du ribosome,
- lorsqu'elle est dans un état intermédiaire compact qui expose des fragments hydrophobes, normalement enfouis sous sa forme native,
- quand elle est sous une forme mal conformée.

Deux catégories de réactions intracellulaires sont effectuées par les HSP : la fixation des protéines ou "protein holding" et la mise en conformation ou "protein folding". La première catégorie est assurée par la famille des Hsp70 et Hsp90 qui fixent des séquences mal conformées de polypeptides avec une préférence pour les zones hydrophobes (Wegele *et al.*, 2004 ; Mayer et Bukau, 2005). Ces interactions s'effectuent :

- lors de la traduction de l'ARN messager, c'est à dire lorsque les Hsp70 fixent le polypeptide naissant au niveau du ribosome pour empêcher des associations prématurées.
- lors d'un choc thermique générant l'apparition de séquences hydrophobes au niveau de la protéine affectée et reconnues par les Hsp70.
- dans la cellule normale, lorsque les Hsp90 fixent les protéines contenant des structures tertiaires instables.

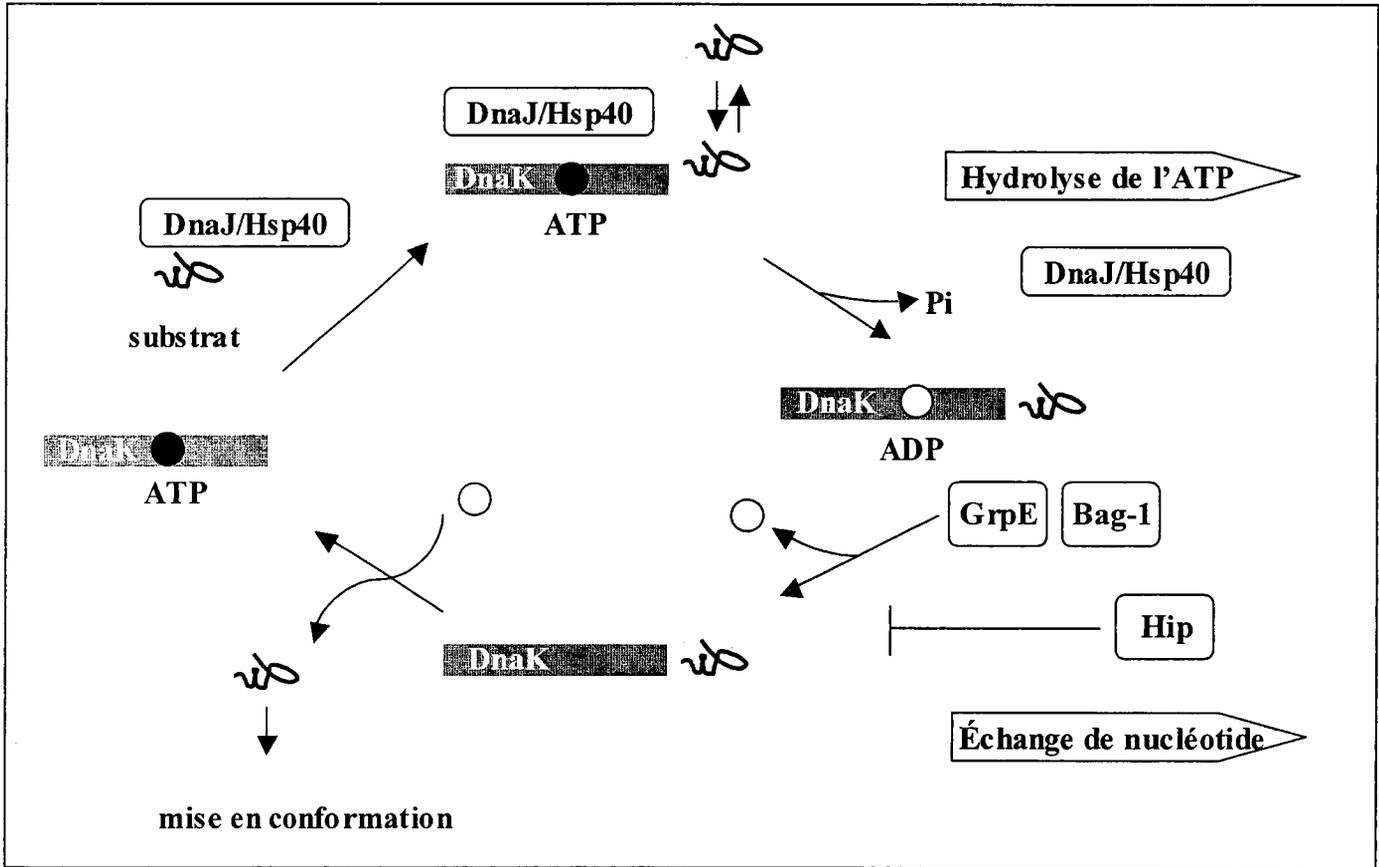


Figure 14 : Remise en conformation des protéines par les HSP70 via le cycle ATP/ADP.

1.2- Hop (*Hsc70/Hsp90 organizing protein*)

La mise en conformation des protéines est assurée par l'association de plusieurs chaperonnes (Hsc70 et Hsp40 ou Hsc70 et Hsp90). L'interaction entre Hsc70 et Hsp90 est coordonnée par une troisième co-chaperonne : Hop. Hop est composée de trois domaines TPR distincts (TPR1, TPR2a, TPR2b). Ces domaines TPR sont typiquement composés de répétitions de motifs conservés de 34 acides aminés (Smith, 2004). Ces TPR sont des sites de fixation pour la séquence conservée EEVD de Hsp70 et de Hsp90. Hop assure ainsi un lien important entre Hsp70 et Hsp90 puisqu'elle peut fixer simultanément les deux chaperonnes et envoie Hsp90 aux complexes pré-existants entre Hsp70 et les protéines substrats (Chen et Smith, 1998). Hop s'associe préférentiellement avec les formes ADP des deux chaperonnes (Wegele *et al.*, 2005).

Une fois que les Hsp70 et Hsp90 ont joué leur rôle de chaperons moléculaires, elles se détachent de leur substrat au moyen de leur domaine intrinsèque ATPasique.

1.3- Le cycle ATP/ADP

Le cycle ATP/ADP de fixation et de relargage des peptides est mieux connu pour la forme bactérienne de Hsp70, DnaK (Bukau et Horwich 1998). La figure 14 est une représentation schématique de ce cycle (adapté de Morishima, 2005).

Les polypeptides présentant des séquences hydrophobes interagissent avec le domaine de liaison aux peptides de DnaK (Hsp70), ce qui stimule l'hydrolyse de l'ATP et mène à un changement de conformation de DnaK, augmentant son affinité pour le peptide. Le changement de statut de DnaK, sous sa forme ATP ou ADP est régulé par l'intervention de divers co-facteurs DnaJ (Hsp40) et GrpE (qui existe uniquement chez les bactéries). DnaJ stimule l'activité ATPasique de DnaK, facilitant la capture et la rétention du peptide substrat. DnaJ est également capable de reconnaître des peptides hydrophobes et de les présenter à DnaK. GrpE, un facteur d'échange de nucléotide spécifique des bactéries induit la dissociation de l'ADP de DnaK. Le peptide lié est ensuite relâché lors de l'échange de l'ADP avec une nouvelle molécule d'ATP. Le peptide entrera plusieurs fois dans ce cycle, jusqu'à l'obtention de sa conformation native (Minami *et al.*, 1996).

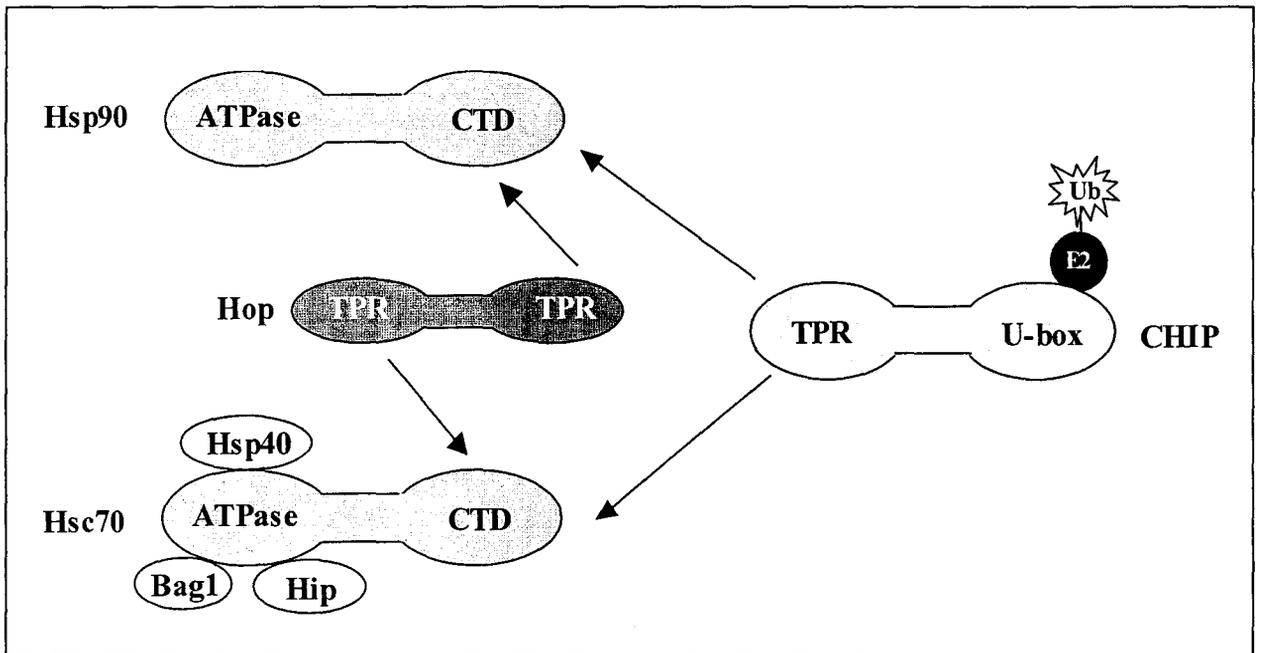


Figure 15 : Les domaines TPR des co-chaperonnes Hop et CHIP permettent leurs interactions avec les chaperonnes Hsc70 et Hsp90.

2) Dégradation des protéines

Lorsque la remise en conformation des protéines nouvellement synthétisées ou mal conformées échoue, les processus de dégradation sont enclenchés. Les chaperons moléculaires Hsp70 sont alors capables d'acheminer les protéines au système de dégradation. Ce phénomène est possible par un changement de partenaires : la fixation d'autres co-chaperonnes telles que Bag-1 ("Bcl-2-associated athanogene1") et CHIP (carboxyl-terminus of Hsc70-interacting protein) va induire la dégradation de ces protéines indésirables.

3.1- Bag-1: "*Bcl-2-associated athanogene 1*"

Bag-1 est une protéine multi-fonctionnelle qui interagit avec de nombreuses protéines cibles pour réguler la croissance cellulaire de cellules normales et malignes : elle régule l'apoptose, la prolifération, la transcription et la mobilité cellulaire (Townsend *et al.*, 2003). Cependant un autre rôle a été décrit dans la modulation de l'activité de chaperon de Hsp70 par cette protéine (Takayama *et al.*, 2001; Zeiner *et al.*, 1997). BAG-1 se fixe sur le domaine ATPasique de Hsp70 de façon à réguler l'activité de remise en conformation des protéines : elle stimule la libération du peptide mal conformé en entrant en compétition avec la co-chaperonne Hip. Cette protéine contient un domaine "ubiquitin-like" dans sa partie C-terminale, qui sert de signal d'adressage au protéasome et permet à BAG-1 de recruter Hsc70 ou Hsp70 au protéasome (Lüders *et al.*, 2000). Bag-1 coopère avec CHIP.

3.2- CHIP : "*carboxyl-terminus of Hsc70-interacting protein*"

CHIP est une co-chaperonne de Hsp70 et de Hsp90. Elle présente des TPR dans sa partie N-terminale qui lui permettent une interaction avec Hsc70 et Hsp90 : elle se fixe au niveau du domaine C-terminal de ces deux protéines (Figure 15). CHIP inhibe les fonctions de remise en conformation des chaperonnes en permettant l'ubiquitination et la dégradation protéasomale de protéines fixées par Hsp70. La partie C-terminale de CHIP est un domaine U-box responsable de l'activité d'"ubiquitine ligase" (Jiang *et al.*, 2001). Complémentaire avec des enzymes de conjugaison (E2), CHIP gouverne la poly-ubiquitination des protéines substrats présentées par les HSP70 et Hsp90. CHIP induit la dégradation de substrats connus de ces chaperonnes comme le récepteur aux hormones glucocorticoïdes ou les formes immatures du RE du CFTR ("cystic fibrosis transmembrane conductance regulator") (Connell *et al.*, 2001; Meacham *et al.*, 2001). Le facteur d'ubiquitination CHIP permet donc le relargage des protéines sélectionnées par les chaperonnes dans la voie de mise en conformation et les dirige vers la dégradation protéasomale.

Partie 3

La dégradation protéasomale

Le système ubiquitine protéasome

"Ubiquitin Proteasome System" (UPS)

I. Introduction : la dégradation des protéines

L'équilibre entre la synthèse des protéines et leur dégradation assure le maintien de l'homéostasie cellulaire. Cette dynamique permet également à la cellule de s'adapter aux changements de l'environnement. Les protéines sont continuellement renouvelées, ce qui implique des processus permanents de synthèse et de dégradation. Le "turnover" d'une protéine est très différent d'une protéine à une autre. Effectivement, les protéines de la matrice extracellulaire ont une demi-vie de l'ordre de quelques jours et même de quelques mois alors que la majorité des enzymes ont une demi-vie de quelques heures, et certains facteurs de transcription de quelques minutes.

La cellule dispose de trois systèmes pour la dégradation de ses protéines, ayant chacun un jeu spécifique d'enzymes de dégradation (ou protéases) :

- ✓ dégradation d'une protéine par le protéasome,
- ✓ dégradation d'une protéine donnée ou d'un organelle entier par le lysosome,
- ✓ autodestruction de la cellule entière par des caspases (phénomène de l'apoptose).

Des mécanismes spécifiques de contrôle sont attachés à chaque système protéolytique, de manière à éviter les dégradations indésirables. Les protéases sont synthétisées comme précurseurs inactifs (pro-enzymes) qui seront rendus fonctionnels par des modifications post-traductionnelles survenant dans le site cellulaire approprié. Les protéases actives sont contrôlées par des facteurs tels que des inhibiteurs (comme la pepstatine), le pH local ou l'accès au substrat (pore d'entrée du protéasome).

II. L'ubiquitination

1) Introduction

Dans les cellules eucaryotes, la voie principale responsable de la protéolyse spécifique des protéines intracellulaires est le système UPS ("ubiquitin-proteasome system"). Dans ce système, les protéines devant être dégradées sont marquées par une modification post-traductionnelle, l'ubiquitine (du latin *ubique* : partout).

Aujourd'hui, il est évident que la régulation de la dégradation protéique par la voie UPS affecte tous les processus cellulaires.

En 2004, Aaron Ciechanover, Avram Hershko et Irwin Rose se sont vus décerner le prix Nobel de chimie. La découverte de l'ubiquitine dans les années 1970 et l'élucidation de son rôle dans la chaîne de dégradation a permis de montrer que la dégradation est un processus capital régulé et extrêmement sélectif : une protéine mal conformée ou inutile (parce que la tâche pour laquelle elle a été synthétisée est accomplie) est détectée puis "étiquetée". Les lauréats parle du "baiser de la mort". En effet, la protéine ainsi marquée est alors reconnue par le protéasome, structure dédiée à la dégradation, qui la découpe alors en courtes chaînes polypeptidiques de 10 à 25 acides aminés.

2) Modification des protéines par l'ubiquitine : polyubiquitination

2.1- Ubiquitine et dégradation des protéines

Le rôle de l'ubiquitine dans la dégradation des protéines à été découverte par une étude portant sur le mode d'action d'un système protéolytique ATP-dépendant dans les réticulocytes (Hershko *et al.*, 1979). Ces expériences ont montré que la présence d'un polypeptide thermostable est essentiel pour l'activité de ce système. Hershko et Rose ont ensuite montré que le polypeptide est attaché de façon covalente à la protéine substrat par une réaction nécessitant de l'ATP (Hershko *et al.*, 1980 ; Ciechanover *et al.*, 1980). L'introduction d'ubiquitine marquée et d'hémoglobine oxydée par micro-injection dans des cellules a montré que le niveau d'hémoglobine couplée à l'ubiquitine est directement proportionnel aux taux de dégradation des chaînes d'hémoglobine (Chin *et al.*, 1982). Ces premières expériences ont ensuite permis d'établir le mécanisme d'ubiquitination et d'en élucider ses fonctions.

2.2- Réaction d'ubiquitination

L'ubiquitine est un polypeptide extrêmement conservé de 76 acides aminés et possède une masse moléculaire de 8,5 kDa. Il permet la modification post-traductionnelle des protéines par la formation d'une liaison entre le résidu de glycine terminal de l'ubiquitine et la fonction ϵ NH₂ d'un résidu de lysine (K) de la protéine cible (figure 16).

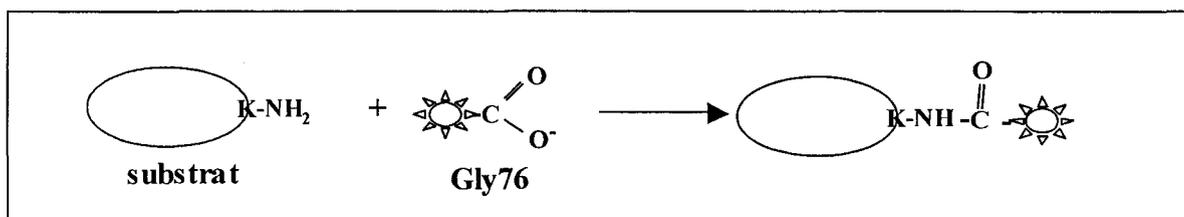


Figure 16 : Etiquetage des protéines par l'ubiquitine.

Cette réaction d'ubiquitination nécessite l'intervention successive de plusieurs enzymes : une enzyme activatrice E1, une enzyme de conjugaison E2 et une ligase E3. Les réactions principales de ce système ont été élucidées par des études biochimiques *in vitro*, dans des réticulocytes. Ces étapes successives conduisant à l'ubiquitination des protéines sont illustrées sur la figure 17.

Le résidu terminal de glycine de l'ubiquitine est activé lors d'une étape ATP-dépendante par une enzyme activatrice E1. Cette étape permet la formation d'un intermédiaire de l'ubiquitine sous une forme adénylate, suivie par la formation d'une liaison thioester entre la fonction carboxyle du résidu de glycine terminal de l'ubiquitine et le résidu thiol d'une cystéine constituant le site actif de E1. Il y a alors libération d'adénosine mono-phosphate (AMP) et de pyrophosphate (PPi). L'ubiquitine activée est ensuite transférée sur la fonction thiol d'une cystéine du site actif d'une seconde enzyme, E2. La troisième étape est catalysée par une ligase, E3, où l'ubiquitine est liée par son extrémité C-terminale à une fonction ε NH₂ d'une lysine présente sur la protéine substrat. Il y a formation d'une liaison isopeptidique. Les enzymes E3 jouent un rôle essentiel dans cette voie de l'ubiquitine. En effet, elles sont responsables de la reconnaissance sélective des protéines substrats. Dans le cas où ce sont des ligases contenant des domaines HECT (homologous to E6-associated protein C-terminus), il y a d'abord la fixation de l'ubiquitine provenant de E2 par leur résidu de cystéine C-terminal avant la fixation de la protéine cible.

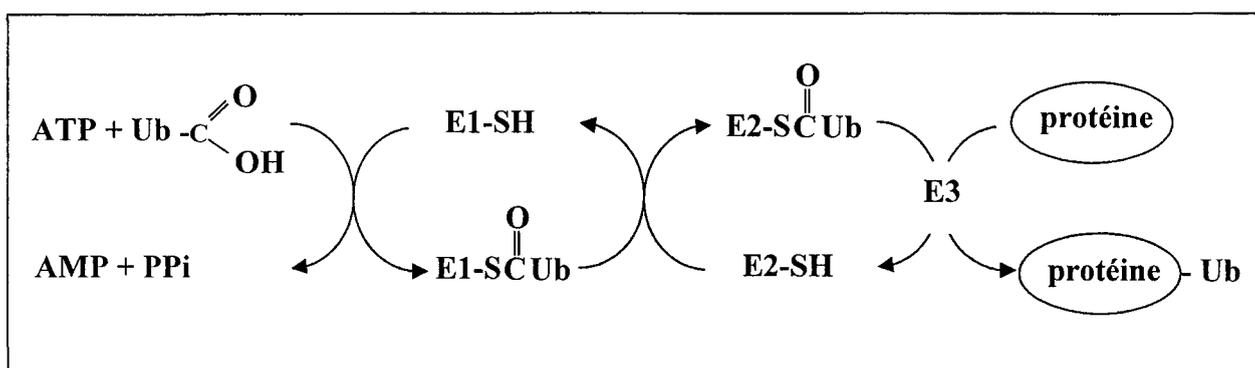


Figure 17 : Les réactions successives permettant l'ubiquitination des protéines.

La dégradation des protéines par le protéasome 26S nécessite la présence d'une chaîne de poly-ubiquitine sur la protéine cible. La fixation de plusieurs résidus d'ubiquitine pour former une chaîne de poly-ubiquitine a longtemps été assignée aux mêmes enzymes E2 et E3. Pourtant de récentes études ont montré l'existence d'une protéine E4 qui permet la catalyse de la chaîne sur des substrats particuliers (Koegl *et al.*, 1999 ; Grossman *et al.*, 2003). Dans tous les cas, les chaînes de poly-ubiquitine résultent de la polymérisation des résidus d'ubiquitine. Un résidu spécifique de lysine de chaque molécule d'ubiquitine formant la chaîne sert de site pour l'extension par un autre résidu d'ubiquitine. L'ubiquitine contient plusieurs résidus de lysines internes : les lysines en position 6, 11, 27, 29, 33, 48 et 63. Il a été montré que chacun de ces résidus peut être utilisé pour la formation de la chaîne *in vivo* (Peng *et al.*, 2003). La plupart des substrats poly-ubiquitinés dont la polymérisation se fait par les résidus K48 et possédant au moins quatre résidus d'ubiquitine sont adressés à la dégradation protéasomale. Cependant d'autres types de liaison peuvent intervenir, notamment au niveau des résidus de lysine 29 et 63 et les fonctions associées à chacune de ces liaisons ne sont pas les mêmes.

2.3- Les signaux d'adressage des substrats pour la poly-ubiquitination et la dégradation

2.3.α : Les signaux constitutifs

La nature de l'acide aminé N-terminal de la protéine peut définir son taux de poly-ubiquitination et sa dégradation. Il s'agit de la règle du N-terminal ou "N-end rule" (Varshavsky, 1995). Les acides aminés concernés se combinent avec une lysine située légèrement en aval pour former une cassette appelée "N-degron". Le "N-degron" est reconnu par un complexe protéique E2-E3 qui ajoute des résidus d'ubiquitine à la lysine. La protéine est ensuite détruite par le protéasome. Les acides aminés R, K, F, L, W, Y situés en position N-terminale de la protéine induisent sa dégradation rapide.

La "destruction box" est un motif partiellement conservé de 9 acides aminés (l'arginine ou la leucine sont des acides aminés en position invariables 1 et 4 alors que le reste est représenté par des acides aminés dégénérés), généralement localisés approximativement à 40-50 acides aminés de la partie N-terminale des cyclines mitotiques. Ce motif est nécessaire pour l'ubiquitination des cyclines et leur dégradation dans les extraits d'œufs de Xénope (Glotzer *et al.*, 1991). La "destruction box" en elle même n'est pas un site d'ubiquitination mais est un signal de dégradation. Des protéines rapporteurs contenant de tels motifs sont

rapidement dégradées de façon cycle cellulaire dépendante : ce signal est essentiel pour l'ubiquitination et la dégradation des cyclines mitotiques et des autres régulateurs du cycle cellulaire, ceci "*in vivo*" (King *et al.*, 1996) et "*in vitro*" (Yamano *et al.*, 1996).

2.3.α : Les signaux inductibles

De récentes études ont montré que la plupart des protéines sont dirigées vers le protéasome par la phosphorylation. C'est le cas de la protéine STAT1 (Kim et Maniatis, 1996), de IκBα (l'inhibiteur du régulateur de transcription NF-κB) (Chen *et al.*, 1996), des cyclines E et D1 régulatrices de la phase G1 chez les mammifères (Won et Reed, 1996 ; Diehl *et al.*, 1997), etc... La phosphorylation s'établit au niveau de régions PEST, régions riches en proline, acide glutamique, sérine et thréonine (Rogers *et al.*, 1986 ; Rechsteiner et Rogers, 1996). Le rôle de certaines ubiquitine ligases dans la reconnaissance des formes phosphorylées des protéines substrats a été vérifié pour les enzymes E3 PULC/SCF ("Skp1-cullin-F-box (SCF)-class ubiquitin-protein ligase") (Hershko et Ciechanover, 1998). Ces motifs PEST sont caractéristiques de la dégradation rapide des protéines et sont en sorte des sites consensus de phosphorylation pour plusieurs protéines kinases.

Finalement, les protéines anormales (mal conformées, oxydées ou mutées) sont de bons substrats pour la voie de l'UPS par l'apparition de segments hydrophobes. Cette voie sera assurée par les chaperons moléculaires dont fait partie Hsp70.

3) Les enzymes de la poly-ubiquitination

Des études récentes ont montré l'existence de plus de 40 enzymes de conjugaison différentes E2 et de 500 ligases E3 chez les eucaryotes supérieurs. Le nombre élevé de ces enzymes montre que l'ubiquitination joue un rôle important au niveau des voies de signalisation.

3.1- E1 : enzyme d'activation de l'ubiquitine

Dans la plupart des organismes, incluant l'homme et la levure *S. cerevisiae*, une unique enzyme E1 active l'ubiquitine (Zacksenhaus et Sheinin, 1990). La réaction commence par la fixation du nucléotide couplé au magnésium (MgATP) puis de l'ubiquitine et conduit à la formation d'un intermédiaire ubiquitine sous forme adénylate qui est reconnu par un résidu de

cystéine du site actif de E1. Chaque molécule de E1 porte deux molécules d'ubiquitine activées, l'une sous forme thiol-ester et l'autre sous forme adénylate. L'efficacité de E1 permet la production de suffisamment de molécules d'ubiquitine activées pour l'ensemble des réactions de conjugaison, même si les concentrations en E1 sont généralement plus faibles que les concentrations totales des E2 (Hershko *et al.*, 1983). La relation structure-fonction de E1 n'est pas bien caractérisée. E1 possède une affinité minimale pour l'ubiquitine avant la fixation de l'ATP, ce qui suggère que les changements de conformation ATP-dépendants permettent d'augmenter l'accessibilité du site de fixation de l'ubiquitine (Hershko *et al.*, 1983). Les interactions entre l'enzyme et l'ubiquitine couplée à l'AMP sont importantes. E1 est une enzyme essentielle mais un nombre de lignées cellulaires de mammifères portent une mutation sensible à la température dans le gène de E1 (Zacksenhaus et Shernin, 1990). De telles cellules permettent de démontrer que l'ubiquitine permet la protéolyse de la majorité des protéines à demi-vie courtes. Ces lignées sont utilisées pour savoir si un processus est ubiquitine-dépendant.

3.2- E2 : enzyme de conjugaison

Ces enzymes sont caractérisées par un domaine très conservé, adjacent au résidu de cystéine qui forme la liaison thioester avec l'ubiquitine. Il y a une enzyme E1, un nombre significatif mais limité de E2, chacune d'entre elles pouvant servir plusieurs E3 et un nombre considérable de E3. Il existe 11 enzymes E2 chez *S.cerevisiae*. Chaque E3 reconnaît des substrats portant un ou plusieurs signaux d'ubiquitination et coopère avec une ou plusieurs E2 (Hershko et Ciechanover, 1998 ; Hochstrasser, 1996).

La structure de cette famille est bien caractérisée : 5 structures cristallines et une structure en milieu aqueux ont été publiées (Huang *et al.*, 1999 ; Zheng *et al.*, 2000 ; Cook *et al.*, 1992 ; Worthylake *et al.*, 1998). Chaque E2 présente un domaine conservé de 150 acides aminés formé par quatre hélices, une hélice courte et un sandwich de quatre feuillets anti-parallèles. Certains membres de cette famille présentent spécifiquement des extensions C- ou N-terminales pouvant faciliter les interactions spécifiques.

Par l'étude des effets spécifiques de mutations de certains gènes codant E2, il a été proposé que E2 pourrait participer à la reconnaissance de protéines substrats soit directement, soit en association avec une enzyme E3 (Hochstrasser, 1996). Toutefois il n'y a pas eu d'expériences prouvant l'interaction directe de E2 avec le substrat, à l'exception de l'interaction de Ubc9 et de E2 avec l'huntingtine, le produit du gène affecté dans la maladie d'Huntington (Kalchman *et al.*, 1996).

3.3- E3 : enzyme de ligation

Les enzymes E3 constituent un groupe divers et riche en protéines, caractérisées par un ou plusieurs motifs définis. Ces motifs sont trouvés dans plusieurs centaines de séquences génomiques chez les mammifères, plantes et virus, suggérant que certaines de ces séquences pourraient coder des enzymes E3.

E3 constitue un groupe diverse de protéines en terme de taille et de structure de domaines : elles peuvent présenter des domaines HECT ("homologous to E6-associated protein C-terminus"), RING ("really interesting new gene") ou U-box (motif RING modifié). Alors que la famille E3/HECT a un rôle direct dans la catalyse au cours de l'ubiquitination, les familles E3/RING et E3/U-box facilitent l'ubiquitination des protéines. Ces trois types de E3 interviennent comme des molécules adaptatrices : elles fixent E2 et le substrat, les interactions étant suffisamment proches dans l'espace pour promouvoir l'ubiquitination du substrat. Même si certaines E3/RING comme MDM2 ("murine double minute clone 2 oncoprotein") agissent apparemment seules, d'autres enzymes de cette classe sont retrouvées associées dans des complexes multiprotéiques comme le complexe APC ("anaphase promoting complex").

Cette multitude de propriétés et d'interactions permettent à E3 d'assurer un mécanisme spécifique pour la clairance des protéines dans toutes les cellules eucaryotiques.

3.3.α : E3 avec un domaine HECT

Ces enzymes E3/HECT fonctionnent de la même façon que E1 et E2. Chacune contient un résidu de cystéine central près d'un domaine HECT qui sert d'accepteur pour l'ubiquitine. L'enzyme E3/HECT fixe le substrat, puis il y formation d'une liaison thioester entre le groupement thiol de la cystéine de E3 et la fonction carboxyle du résidu de glycine C-terminal de l'ubiquitine (apporté par E2). Puis l'enzyme va réaliser le transfert de l'ubiquitine sur le substrat (figure 18, partie A). La partie C-terminale des E3/HECT confère leur activité de fixation de l'ubiquitine sur la protéine substrat alors que le domaine N-terminal est impliqué dans la fixation de ce substrat.

3.3.β : E3 avec un domaine RING

Elles représentent le groupe le plus important de la famille des enzymes E3 avec plusieurs centaines de protéines contenant des domaines à doigt de zinc. Même si leur

structure suggère une fonction dans la fixation de l'ubiquitine, une telle activité n'a pas été prouvée *in vivo*. Contrairement aux protéines E3/HECT, les enzymes E3/RING semblent ne pas avoir de rôle catalytique direct dans l'ubiquitination des protéines. En fait, les E3/RING serviraient de partenaires facilitant l'interaction entre l'enzyme E2 et le substrat (Borden et Freemont 1996) (Figure 18, partie B).

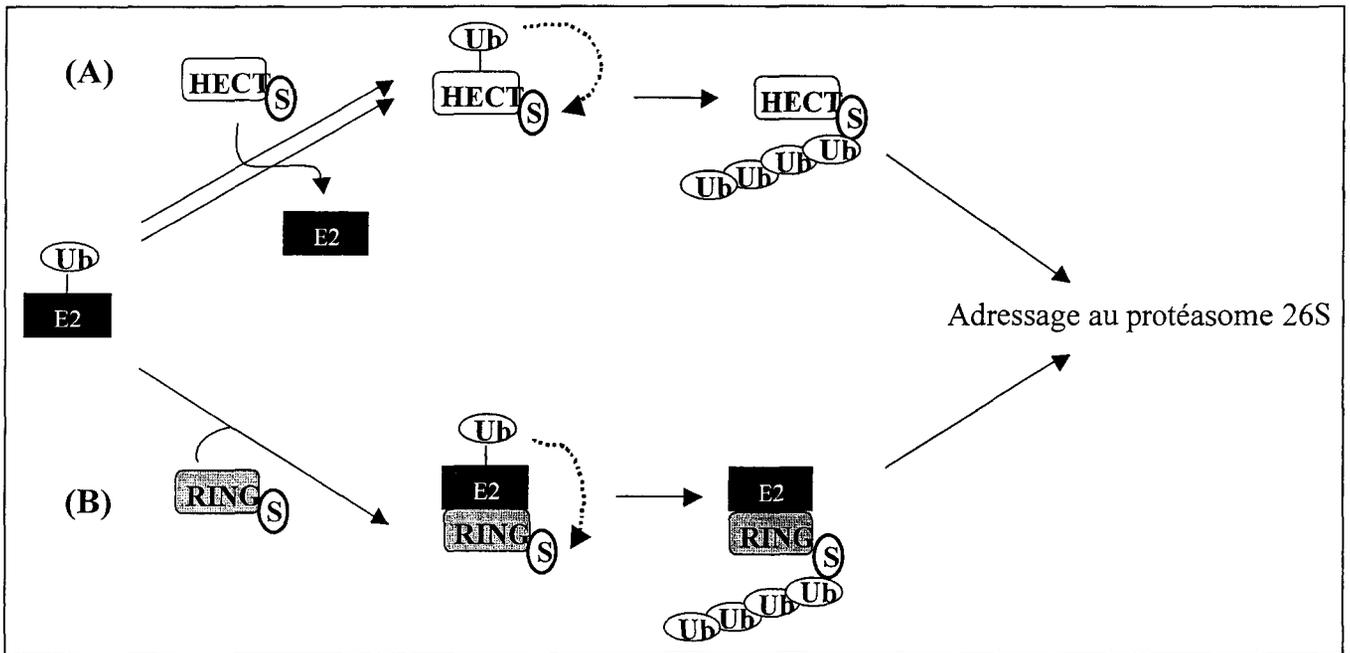


Figure 18 : Mécanismes de transfert de l'ubiquitine par E3/HECT et E3/RING

3.3.γ : E3 avec U-box

U-box est un domaine de 74 acides aminés, similaire au domaine à doigt de zinc. Pourtant il manque le résidu-clef requis pour la chélation du métal. Il a été proposé que ce serait la présence de ponts salins qui permettraient de maintenir cette structure. Ces protéines peuvent agir en tant que E3 ou E4, ceci dépend de la nature des constituants de l'UPS présents et de la nature du substrat. De part leurs similitudes en terme de structure, E3/U-box présentent des modes d'action similaires aux E3/RING en agissant parfois seules et parfois sous la forme d'un complexe.

CHIP est la protéine U-box la mieux caractérisée (Cyr *et al.*, 2002 ; Hatakeyama *et al.*, 2004). Elle a d'abord été caractérisée comme co-chaperonne interagissant avec Hsp70 et Hsp90 au travers de ces motifs TPR présents dans sa partie N-terminale. Elle est impliquée dans le contrôle qualité en permettant soit la remise en conformation de la protéine par les chaperonnes soit la dégradation *via* la voie de l'UPS.

Récemment CHIP a été caractérisée comme étant une E3. Parmi ses substrats connus, on retrouve le CFTR (Meacham *et al.*, 2001), la protéine Tau (Sahara *et al.*, 2005), les récepteurs aux glucocorticoïdes (He *et al.*, 2004). Hsp70 et Hsp90 semblent diriger la spécificité de substrat de CHIP. Analogue aux E3/RING, CHIP interagit avec d'autres protéines contenant une U-box.

En conclusion, les protéines E3, avec la multitude d'associations et leur nécessité de modifications post-traductionnelles et/ou de protéines supplémentaires, assurent l'adressage spatio-temporel précis et la dégradation de substrats dans la cellule.

3.4- E4 : enzyme de la poly-ubiquitination

Une nouvelle famille d'enzyme de conjugaison a été identifiée. Cette famille régule la poly-ubiquitination au niveau de l'élongation de la chaîne d'ubiquitine. Ces enzymes sont capables de catalyser l'extension de la chaîne poly-ubiquitinée en collaborant avec E1, E2 et E3 (Koegl *et al.*, 1999 ; Grossman *et al.*, 2003).

4) Les rôles de l'ubiquitine

4.1- La mono-ubiquitination

Certaines protéines sont modifiées par un seul résidu d'ubiquitine sur un seul ou plusieurs résidus de lysine. Cette mono-ubiquitination peut servir de signal de dégradation lysosomale ou peroxisomale de protéines de la membrane plasmique ou moduler les fonctions des protéines en absence de protéolyse (export nucléaire, régulation des histones). Il faut noter que, bien que l'ubiquitine soit une modification covalente, ce processus est réversible grâce à la présence d'isopeptidases ou d'enzymes dé-ubiquitinantes (Hochstrasser *et al.*, 1996). Ces protéines sont capables de relarguer l'ubiquitine d'elles-mêmes ou de protéines substrats.

4.2- La poly-ubiquitination

Au commencement des recherches sur l'ubiquitination, la poly-ubiquitination des protéines semblait exclusivement dédiée à la dégradation par le protéasome 26S. Mais de récentes études ont montré que le signal de poly-ubiquitination pouvait avoir plusieurs

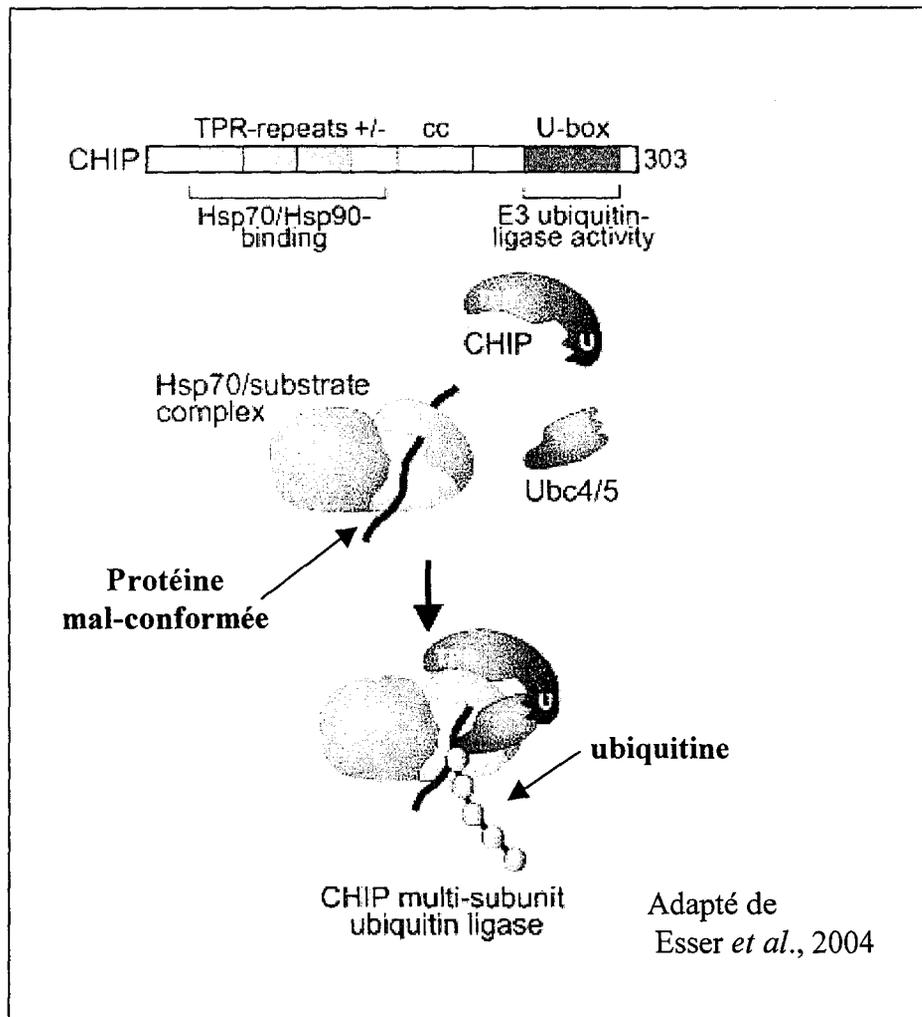


Figure 19 : CHIP interagit avec Hsp70 pour ubiquitiner des protéines mal conformées.

fonctions (réparation de l'ADN et régulation de la transcription), ceci par le fait que différents résidus de lysine de l'ubiquitine sont utilisés pour la formation de chaînes poly-ubiquitinées.

Deux types de chaînes poly-ubiquitinées peuvent être générées :

- des chaînes d'ubiquitine homopolymériques c'est à dire que plusieurs molécules d'ubiquitine sont liées les unes aux autres en utilisant le même résidu de lysine donneur : K48, K63, K6.
- des chaînes d'ubiquitine hétéropolymériques qui contiennent plus d'un type de liaison. Cependant il n'a pas encore été montré de fonction spécifique à ce type de chaînes (Koepl *et al.*, 1999).

Le rôle de ces différents résidus de lysine dans l'assemblage des chaînes a été étudié par des approches génétiques chez la levure (Pickart et Fushman, 2004).

La poly-ubiquitination par les résidus K48, 29 et 11 vont engendrer la dégradation protéasomale des protéines. Les expériences de Pickart et Fushman ont montré que la lysine K48 de l'ubiquitine est essentiel pour la croissance, ceci étant directement lié à son rôle central dans la protéolyse (Pickart et Fushman, 2004).

Dans les cellules eucaryotes, le système UPS est la voie majeure pour l'élimination de protéines mal conformées (Hershko et Ciechanover, 1998). Le fait de bloquer l'UPS pharmacologiquement ou génétiquement inhibe l'élimination des protéines mal conformées et peut éventuellement conduire à la formation d'agrégats intracellulaires. Les chaperons moléculaires sont les facteurs-clefs dans l'adressage des protéines mal conformées au protéasome.

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, les chaperons moléculaires sont capables de reconnaître les protéines mal conformées. Elles vont d'abord les séquestrer pour éviter des interactions toxiques puis essayer de les remettre en conformation de façon à ce qu'elles retrouvent leurs conformations natives et fonctionnelles. Enfin, si le processus de remise en conformation échoue, les chaperons vont promouvoir la dégradation de ces protéines indésirables par une étroite collaboration avec le système UPS. En effet, Hsp70 interagit avec CHIP, une ubiquitine ligase (de la famille E3). Cette interaction se fait via les motifs TPR de CHIP. CHIP possède dans sa partie C-terminale une "U-box" qu'elle utilise pour sa fixation à l'enzyme E2 (figure 19). Il a été montré qu'une augmentation des concentrations cellulaires en CHIP résulte en une augmentation de la dégradation protéasomale des substrats portés par les chaperons (Meacham *et al.*, 2001 ; Connell *et al.*, 2001).

Un autre élément permettant de relier la dégradation protéasomale ubiquitine-dépendante et l'implication des chaperonnes est BAG-1. BAG-1 favorise la fixation du peptide mal

conformé sur Hsp70 et stimule la remise en conformation. BAG-1 possède également un domaine "ubiquitin-like" qui permet de la classer dans une famille appelée UDPs ("ubiquitin domain proteins") (Jentsch et Pyrowolakis, 2000). BAG-1 utilise ce domaine pour sa fixation sur le protéasome. Une interaction directe entre BAG-1 et CHIP a été observée "*in vitro*" et le complexe ternaire entre BAG-1, CHIP et Hsp70 a été isolé chez les mammifères (Demand *et al.*, 2003). Les différentes co-chaperonnes de Hsp70 constituent donc le lien entre les protéines à dégrader et le système UPS.

Cependant les travaux de Flick *et al.* ont démontré que les chaînes d'ubiquitine liées entre elles par la lysine 48 avaient également un rôle indépendant de la protéolyse : la poly-ubiquitination de Met 4 (un activateur transcriptionnel du métabolisme sulfurique) est à l'origine de son activation. Ce facteur de transcription est impliqué dans la biosynthèse d'acides aminés sulfurés. La fixation d'une chaîne de poly-ubiquitination sur Met 4 stabilise la protéine sans induire sa dégradation protéasomale (Flick *et al.*, 2004).

Les résidus de lysine 11 et 29 sont associés indirectement à la dégradation protéasomale car ils permettent l'interaction avec le protéasome et la régulation de la transcription. Il est évident que la dégradation protéasomale de nombreuses protéines va avoir des conséquences sur les fonctions cellulaires. Par exemple, un grand nombre de facteurs de transcription sont dégradés par cette voie (p53, c-jun, c-myc, NF- κ B...). Ceci permet également de coordonner les événements de signalisation du cycle cellulaire par la dégradation des Cdk.

III. Le protéasome

1) Introduction

La deuxième étape majeure dans la voie UPS est la dégradation des protéines poly-ubiquitinées par le protéasome 26S souvent appelé protéasome. Il s'agit d'un complexe enzymatique multi-catalytique présent dans le cytosol et le noyau de toutes les cellules eucaryotes. Comme la dégradation des protéines est irréversible, ce processus devient dévastateur pour la cellule s'il se fait d'une façon incontrôlée. Pour cela, la plupart des enzymes protéolytiques sont régulées par des activateurs et des inhibiteurs de protéases ou sont spatialement séparés de leurs substrats potentiels. Par conséquent, le protéasome forme une chambre hermétique où seules les protéines devant être dégradées seront reconnues par ce complexe. Ce système permet à toutes les cellules eucaryotes, eubactériennes ou certaines

cellules archéales, d'éliminer sélectivement des protéines qui ne sont plus utiles, ceci afin de maintenir l'homéostasie cellulaire.

2) Structure du protéasome

Il existe une grande diversité dans la composition du protéasome étant donné que ce complexe est constitué de nombreux composants différents et de plusieurs sous-unités interchangeables. En effet, le protéasome est composé de deux types de complexe : un complexe régulateur 19S et un complexe catalytique 20S. En fonction de l'association de ces domaines, le protéasome sera différent : les protéasomes 20S, 26S et 30S sont retrouvés dans la cellule (figure 20).

Le protéasome 20S seul n'est pas capable de reconnaître ni de fixer les protéines poly-ubiquitinées : il nécessite la présence du domaine régulateur 19S qui se fixe à un ou deux anneaux α du protéasome 20S pour former les protéasomes 26S ou le 30S respectivement. Dans la cellule eucaryote, la forme la plus courante est le protéasome 26S. On ne sait pas si le protéasome 30S existe *in vivo* où s'il est du à la perte d'un des deux domaines 19S lors de la purification.

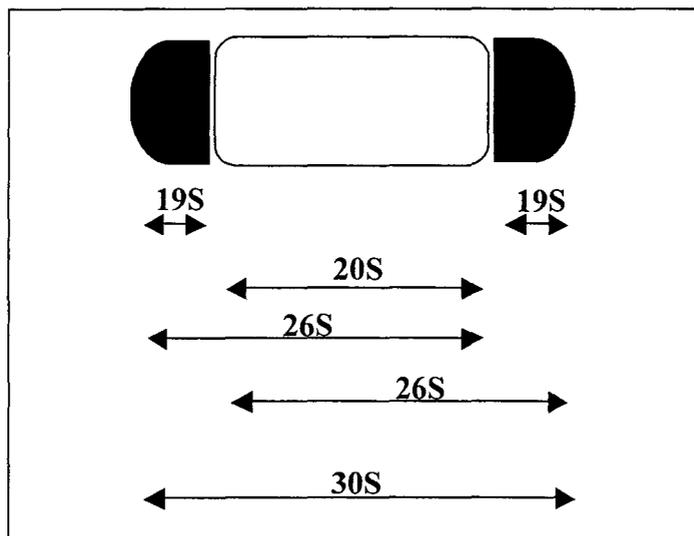


Figure 20 : Les protéasomes 20S, 26S et 30S.

Le protéasome 26S est un complexe de 2,5MDa de taille 11nm \times 15nm qui catalyse la dégradation des protéines poly-ubiquitinées de façon ATP-dépendante (figure 21) (Voges *et al.*, 1999).

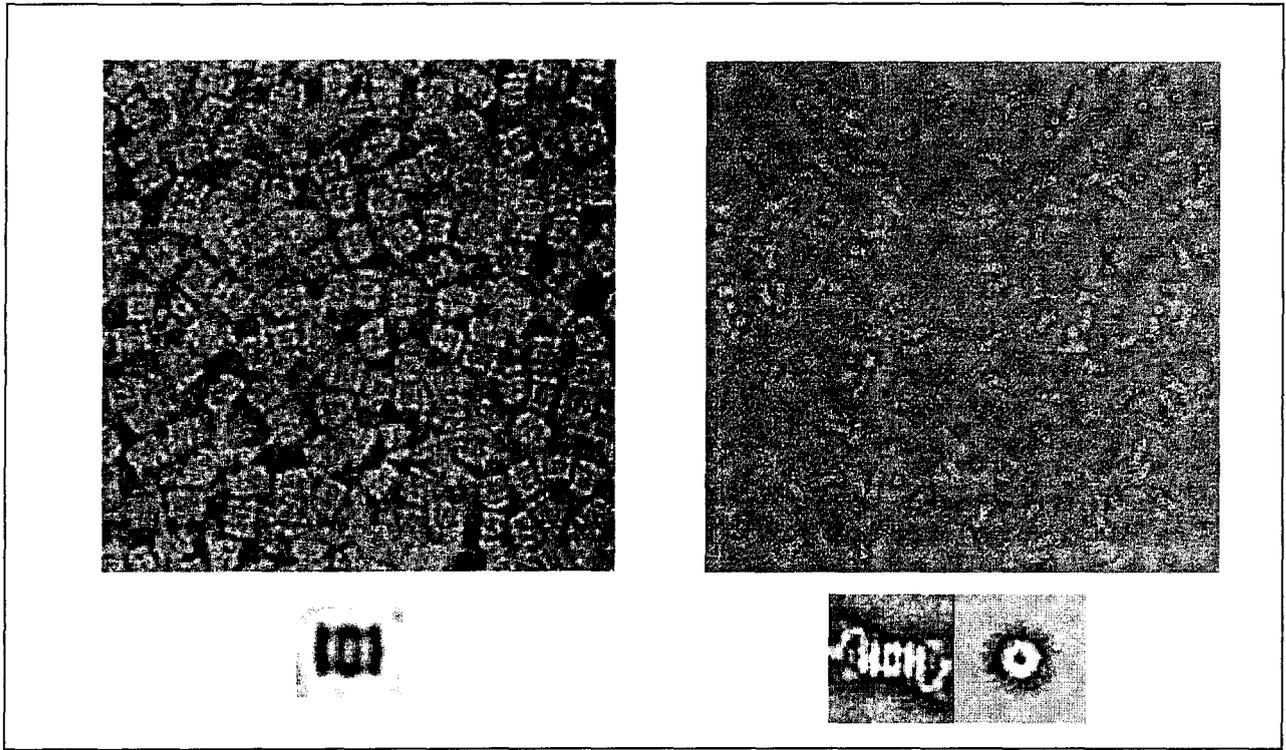


Figure 21 : Protéasome 20S et 26S de *Xenopus laevis*, coloration négative (photos extraites du site <http://www.biochem.mpg.de/baumeister/image/detection.html>).

2.1- Le complexe catalytique : 20S

Le noyau protéolytique du protéasome ou protéasome 20S est un complexe catalytique formé de 28 sous-unités arrangées de façon à former 4 anneaux chacun composé de 7 sous-unités. Les deux anneaux extérieurs sont formés de 7 sous-unités α et les deux anneaux intérieurs sont constitués de 7 sous-unités β ($\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$). 3 des 7 sous-unités de type β présentes dans chaque anneau (soit au total 6 sous-unités) confinent l'activité catalytique au protéasome (figure 22).

Les sous-unités β 1, 2 et 5 possèdent respectivement des activités "peptidylglutamyl-peptide hydrolysing" (PGPH), trypsine-like et chymotrypsine-like (Kissevel *et al.*, 1999). Certains sites régulent de façon allostérique chacune des autres activités. Ceci suggère qu'il y a un mécanisme ordonné, cyclique pour la dégradation protéique : le site chymotrypsine-like commencerait le clivage du polypeptide et stimulerait les autres sites. Leur activation accélérerait la fragmentation des protéines, alors que l'activité chymotrypsine-like serait temporairement inhibée. Quand la coupure par la PGPH serait impossible, le site chymotrypsine-like serait réactivé et le cycle répété (Kisselev *et al.*, 2003). Le confinement de plusieurs sites actifs dans un nano-compartiment a un autre avantage : le protéasome hydrolyse la plupart des liaisons peptidiques et génèrent des peptides qui sont typiquement

longs de 10 à 25 acides aminés et ne conservent donc pas de propriétés biologiques, excepté pour la présentation des peptides antigéniques.

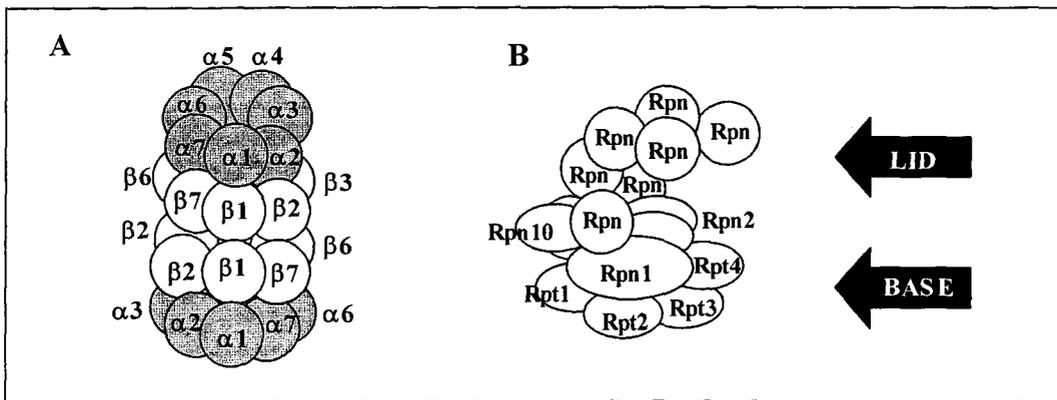


Figure 22 : Organisation des sous-unités du protéasome 20S (A) et 19S (B).

La majeure différence structurale entre les sous-unités α et β se trouve au niveau de leur partie N-terminale : le N-terminal de la sous-unité α forme une superhélice qui remplit la fente entre les deux couches de sous-unités β . Les acides aminés de la partie N-terminale de la sous-unité α forme une barrière qui clôture le pore central à proximité de l'anneau α . Bien que dans les protéasomes 20S des archées ce pore est assez ouvert pour permettre l'entrée des petits peptides substrats mais pas de protéines (Benaroudy *et al.*, 2003), le protéasome 20S eucaryotique libre est inactif vis-à-vis de la dégradation des peptides et des protéines. Cette barrière peut être ouverte *in vitro* par de faibles concentrations en SDS, par de longues chaînes d'acides gras, des peptides hydrophobes (Coux *et al.*, 1996).

Les sous-unités β ne possèdent pas cette hélice en partie N-terminale. Par contre leur résidu de thréonine en position N-terminale est positionné juste à l'ouverture de la fente entre les deux couches de sous-unités β et est exposé à la surface externe de la chambre centrale. Le résidu de thréonine constitue le site actif protéolytique car il sert de nucléophile catalytique et comme accepteur primaire de proton. Par conséquent, le protéasome appartient au groupe des Ntn (N-terminal nucleophile) hydrolases.

Pour atteindre cette activité, le substrat dénaturé doit traverser une distance de 8nm de long du pore α jusqu'à l'antichambre par un mécanisme inconnu. Toutes les sous-unités β 1, 2, 5 contiennent un site actif fonctionnel. Elles utilisent toutes leur résidu de thréonine N-terminal pour une attaque nucléophile sur la liaison peptidique mais la spécificité du substrat est déterminée par des canaux de fixation du peptide différents, contenant des sites de fixation pour les peptides longs de 10 acides aminés. Le protéasome produit donc des fragments longs en moyenne de 10 acides aminés mais ces fragments peuvent atteindre 25 acides aminés.

2.2- Le complexe régulateur : 19S (PA 700)

2.2.α : Constitution

Le complexe régulateur 19S, appelé également "cap" ou "lid", est composé de 17 sous-unités (Voges *et al.*, 1999). Il est subdivisé en deux sub-complexes. Le premier constitue la base et est composé de six protéines présentant une activité ATPasique : ce sont les Rpt1 à Rpt6 (figure 22). Ces protéines appartiennent à une famille constituée de 100 ATPases cellulaires différentes contenant une ou deux copies d'un motif d'acides aminés conservés appelé AAA ("ATPase associated with various cellular activities") (Patel et Latterich, 1998). Rpt1-Rpt6 sont essentiels pour la survie des levures et forme un anneau hexamérique qui s'associe avec les anneaux α externes du protéasome 20S. Deux composés supplémentaires de la base sont des sous-unités non-ATPasiques, Rpn1 et Rpn2, et constituent les protéines les plus grandes du domaine 19S.

Le second sub-complexe appelé "lid" est ajouté sur le haut de la base et est composé de 8 sous-unités différentes non ATPasique (Rpn3, 5-9, 11 et 12). Cette partie est ancrée à la base par Rpn10 (figure 22).

2.2.β : Activité de fixation des peptides

La sous-unité Rpn10 est capable de fixer les protéines poly-ubiquitinées. Les protéines qui escortent les substrats au protéasome doivent avoir deux propriétés essentielles : elles doivent être capables de reconnaître le substrat, par exemple en fixant la poly-ubiquitine *via* un domaine UIM ("ubiquitin-interacting motif") ou UBA ("ubiquitin associated") et doivent être capables de fixer le noyau 19S par un domaine UBL ("ubiquitin like").

Plusieurs protéines interagissant avec le protéasome (protéines qui ne font pas partie de la composition du protéasome 26S ou 30S mais qui sont connues comme interagissant transitoirement avec eux) possèdent des domaines UBA et UBL : ce sont les protéines Rad23, Dsk2 et Ddi1. Ces protéines peuvent apporter le substrat poly-ubiquitiné à la sous-unité 19S par la fixation sur les sous-unités Rpn1 et Rpn2 ou les deux à la fois (Hartmann-Petersen *et al.*, 2003). Un autre site accepteur du 19S est Rpn6 qui interagit par exemple avec le profacteur de la transcription ubiquitiné NF- κ B (p100).

2.2.γ : Dénaturation des substrats et translocation

La dégradation des protéines se fait au niveau de la chambre catalytique. Le substrat doit être dénaturé avant de pouvoir traverser le pore étroit. Il est connu que le protéasome de certaines archées interagit avec le complexe PAN ("proteasome-activating nucleotidase") qui est homologue au PA700 présent dans le complexe 26S (Zwickl *et al.*, 1999). PAN est un complexe oligomérique (650kDa) qui augmente la capacité de dégradation des peptides du protéasome. La fixation du substrat à PAN active son activité nucléotidasique utilisé pour la dénaturation du substrat, pour ouvrir le pore terminal du 20S et pour permettre la translocation de la protéine (Benaroudj *et al.*, 2003). PAN inhibe l'agrégation des protéines et facilite la dénaturation des protéines de façon ATP-dépendante : PAN sert de "chaperonne reverse" (Benaroudj et Golberg, 2000).

2.2.δ : Dé-ubiquitination

Pour de nombreux substrats, la chaîne poly-ubiquitinée sert non seulement de reconnaissance par la sous-unité Rpn10 du 19S mais peut également servir de support lors des processus de dénaturation et de translocation. Les sous-unités Rpn11 du complexe 19S catalysent alors la dé-ubiquitination de la protéine substrat. Rpn11 présente une activité intrinsèque métallo-peptidasique Zn^{2+} dépendante qui hydrolyse la liaison isopeptidique entre le substrat et l'ubiquitine et permet ainsi le relarguage de la chaîne polypeptidique entière. Ce processus est ATP-dépendant (Yao et Cohen, 2002). D'autres enzymes, les DUBs ("deubiquitin-enzyme") comme Ubp6 ("ubiquitine binding protéine 6") et UCH37 ("ubiquitine C-terminal hydrolase 37") peuvent avoir des fonctions similaires et supplémentaires : par exemple, la dé-ubiquitination de certaines protéines conjuguées à l'ubiquitine pour prévenir leur dégradation ou la dépolymérisation des chaînes poly-ubiquitinées relarguées pour régénérer le "pool" d'ubiquitine dans la cellule (Amerik et Hochstrasser, 2004).

Conclusion

Nous venons de voir que trois partenaires sont importants dans la régulation de la demi-vie des protéines : la modification post-traductionnelle *O*-GlcNAc, les chaperons du type Hsp70 et le système UPS. Des relations ont été clairement établies entre Hsp70 et le protéasome et entre le protéasome et la *O*-GlcNAc. Nous nous sommes interrogés sur l'existence, *in vivo*, d'une relation entre les trois partenaires comme le suggère la figure 23.

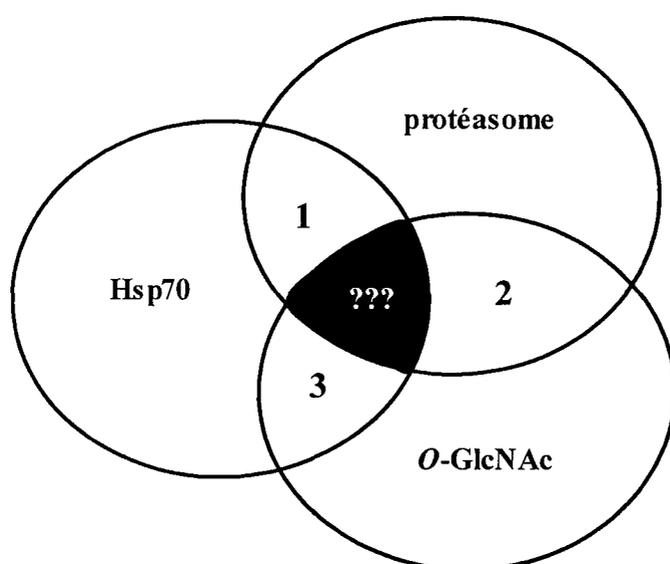


Figure 23 : Inter-relation entre la *O*-GlcNAc, le protéasome et Hsp70.

Partant des relations existantes entre chacun de ces trois domaines (1, 2 et 3), nous avons émis l'hypothèse du rôle protecteur de la *O*-GlcNAc vis-à-vis de la dégradation protéasomale, ceci par l'interaction avec les Hsp70. Un processus similaire à celui observé dans le réticulum endoplasmique avec le cycle gluco/dégluco pourrait avoir lieu dans le cytosol avec la *O*-GlcNAc et Hsp70 (figure 24).

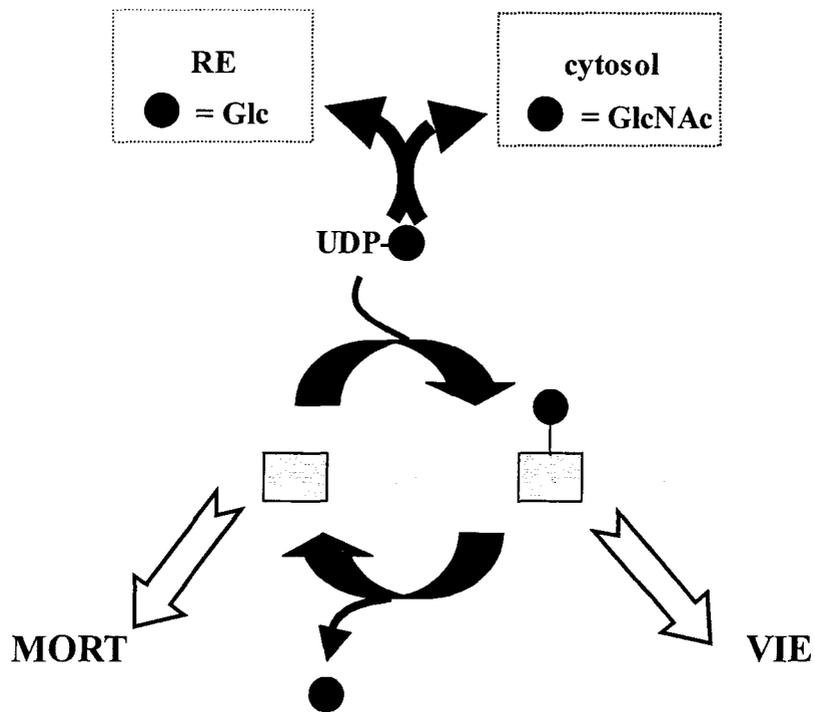


Figure 24 : Le cycle glyco/déglyco : un acteur fondamental dans la destinée des protéines cellulaires.

La glycosylation des protéines, soit par le glucose dans le réticulum endoplasmique soit par la *O*-GlcNAc dans le cytosol, permettrait un contrôle qualité favorisant "la vie" des protéines contrairement à un état non glycosylé.

Travaux personnels

I. Introduction/travaux antérieurs

En 2001, les travaux de l'équipe de Jean-Claude Michalski portaient, entre autres, sur l'impact de la glycosylation des protéines par la *O*-GlcNAc sur leur transport nucléaire. En effet, à cette époque, un des rôles supposés de la *O*-GlcNAc était le transport des protéines modifiées au noyau. La *O*-GlcNAc était peut-être un nouveau signal de transport nucléaire, un nouveau NLS ("nuclear localization signal").

Partant de cette hypothèse, l'idée selon laquelle des transporteurs permettraient de faire la navette entre le cytosol et le noyau pour véhiculer ces protéines *O*-GlcNAc a été émise. Lefebvre *et al.* ont mis en évidence l'existence de telles lectines reconnaissant spécifiquement les résidus de GlcNAc présents sur les protéines par des expériences de chromatographie d'affinité sur GlcNAc immobilisée et de spectrométrie de masse (Lefebvre *et al.*, 2001).

Le passage d'extraits nucléaires et cytosoliques de foie de rat sur colonne de GlcNAc immobilisée a permis de piéger les protéines affines pour ce monosaccharide. L'analyse ultérieure de ces lectines par spectrométrie de masse a permis d'identifier une protéine intéressante : la protéine de choc thermique de 70 kDa, Hsc70. Des expériences supplémentaires ont permis de confirmer que Hsc70 était effectivement une lectine reconnaissant spécifiquement les résidus de GlcNAc présents sur les protéines et qu'elle était elle-même modifiée par la *O*-GlcNAc. Cette observation a été à la base de notre travail expérimental.

II. Résultats

- Nos travaux ont donc d'abord consisté à vérifier si la forme induite, Hsp70, présentait également une activité lectinique vis-à-vis de ces résidus de GlcNAc et si elle était elle-même modifiée par la *O*-GlcNAc. Puisque Hsp70 est une protéine dont l'expression est accrue en cas de stress, notamment en cas d'hyperthermie, et puisque 2 à 5 % du glucose extracellulaire permet la formation de la *O*-GlcNAc, l'étude de l'expression, de la glycosylation et de l'activité biologique de Hsp70 en cas de stress thermique et de carence nutritionnelle notamment en glucose semblait appropriée. Ces résultats ont fait l'objet de la publication suivante :

70-kDa-heat shock protein presents an adjustable lectinic activity towards *O*-linked N-acetylglucosamine.

Céline Guinez, Jérôme Lemoine, Jean-Claude Michalski, and Tony Lefebvre.

2004 *Biochem Biophys Res Commun.* 319(1):21-6.

Voir annexe

Ces travaux ont permis de démontrer que Hsp70 est dotée d'une activité lectinique vis-à-vis des résidus de GlcNAc, à l'instar de la forme constitutive Hsc70.

Hsp70 est également modifiée par la *O*-GlcNAc, allongeant ainsi la liste grandissante des protéines affectées par cette modification post-traductionnelle. L'étude des niveaux de glycosylation des extraits totaux de cellules HepG₂, d'une part, et de Hsp70, d'autre part, a permis de montrer que cette glycosylation est directement corrélée au taux de glucose disponible dans la cellule.

De façon inattendue, nous avons montré que cette diminution des taux de *O*-GlcNAc modifiant les protéines est associée à une très forte activité lectinique des Hsp70. Lorsque la cellule est stressée, plus particulièrement lors d'une carence en glucose, les niveaux de glycosylation diminuent mais l'activité lectinique de Hsp70 est accrue.

Ces données nous ont permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle la *O*-GlcNAc pourrait protéger les protéines de la dégradation protéasomale, d'une part en contrecarrant l'effet pro-dégradatif de la phosphorylation de séquence PEST, mais surtout par l'interaction lectinique avec Hsp70. Les Hsp70 permettraient alors leur remise en conformation et favoriseraient ainsi leur protection vis-à-vis d'une dégradation prématurée par le protéasome (figure 25).

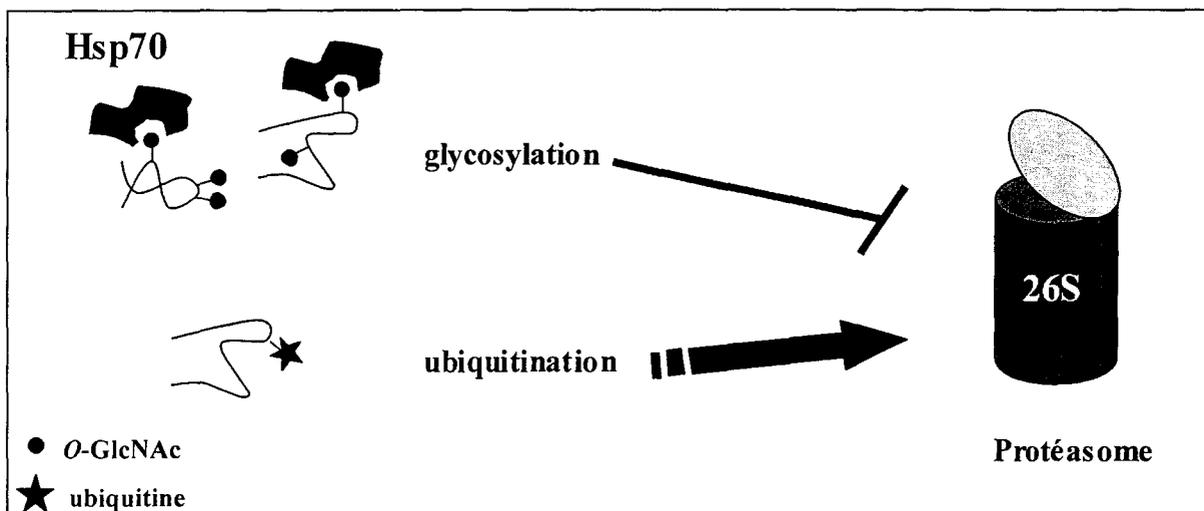


Figure 25 : Hypothèse de la protection des protéines par la *O*-GlcNAc vis-à-vis de la dégradation protéasomale.

- La suite de cette étude consistait à savoir si une relation linéaire existait entre la diminution de l'activité lectinique d'une part et l'augmentation du taux de *O*-GlcNAc d'autre part ou s'il existait un seuil critique en glucose donc en *O*-GlcNAc pour laquelle la réponse de la cellule, en terme d'activité lectinique de Hsp70, était complètement différente.

Hsp70 présentant une très forte activité lectinique lors d'une carence en glucose alors qu'elle est faiblement glycosylée et, au contraire montrant une faible activité lectinique en présence de glucose, alors qu'elle-même est glycosylée, nous avons émis l'hypothèse d'une auto-régulation : l'absence d'activité lectinique en condition normale serait due à une occupation du site lectinique par ses propres résidus de GlcNAc. Cette activité serait alors disponible en absence de glucose par la faible glycosylation de Hsp70 (figure 26).

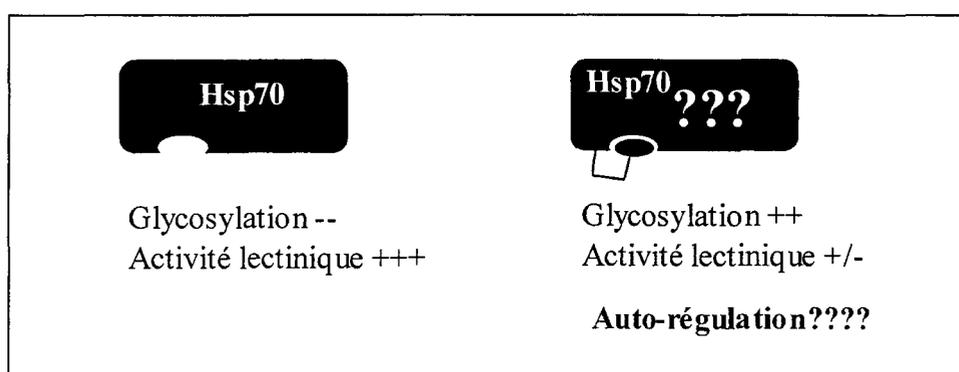


Figure 26 : Hypothèse de l'auto-régulation de l'activité lectinique de Hsp70 par la *O*-GlcNAc.

Ces résultats ont donné lieu à la publication suivante :

Modulation of HSP70 GlcNAc-directed lectin activity by glucose availability and utilization

Céline Guinez, Marie-Estelle Losfeld, René Cacan, Jean-Claude Michalski and Tony Lefebvre.

2006 *Glycobiology*. 16(1):22-28.

Voir annexe

Par cette étude nous avons montré que Hsc70 et Hsp70, bien que très similaires, présentent des comportements différents dans la cellule vis-à-vis du glucose et en terme d'activité lectinique.

En effet, l'activité lectinique de Hsp70 est très forte lors d'une carence en glucose (jusqu'à 5 mM en glucose) et est perdue au delà. Par contre, Hsc70 présente un maximum d'activité à 5 mM en glucose mais possède tout de même une activité plus faible pour des concentrations comprises entre 5 et 12.5 mM. Cette activité est ensuite fortement augmentée à partir de 25 mM en glucose.

Dans les deux cas, la concentration clef est 5 mM, donnée intéressante puisqu'il s'agit de la concentration physiologique sanguine. En dessous de 5 mM en glucose, une diminution des taux de *O*-GlcNAc pourrait donc être compensée par une augmentation de l'activité lectinique des Hsp70. Une hypothèse possible est que la *O*-GlcNAc est un moyen utilisé par la cellule comme réserve de glucose utilisable lorsque la concentration de celui-ci vient à baisser.

La seconde partie de ce travail a permis de démontrer que l'activité lectinique de Hsp70 est directement liée à la carence même en glucose. En effet, l'inhibition soit de l'entrée, soit de l'utilisation du glucose dans la cellule par deux drogues, la cytochalasine B et le 2-déoxyglucose, entraîne une très forte activité lectinique de Hsp70 alors même que la cellule est cultivée en présence de 25 mM de glucose. Par ces expériences, nous avons donc démontré la relation directe entre l'accessibilité du glucose et la réponse de la cellule par l'activité lectinique des Hsp70.

Enfin, des expériences de cinétiques de glycosylation et d'activité lectinique de Hsp70 ont permis de montrer que ces deux paramètres évoluaient de la même façon lors d'un stress thermique, réfutant ainsi l'hypothèse de l'auto-régulation. Ce résultat a été confirmé par l'utilisation de la β -hexosaminidase qui hydrolyse les résidus de GlcNAc terminaux. En condition normale en glucose, l'hydrolyse des résidus de *O*-GlcNAc ne perturbe ni l'expression ni l'activité lectinique de Hsp70.

- Sachant que le stress induit la dégradation des protéines par la voie de l'UPS ("ubiquitin proteasome system"), et partant de notre hypothèse d'une éventuelle protection des protéines *O*-GlcNAc via l'interaction avec Hsp70, nous nous sommes donc posé la question d'une compétition possible entre les deux modifications post-traductionnelles, ubiquitine et *O*-GlcNAc.

Nous avons l'intention de soumettre ces résultats sous le titre suivant:

Crosstalk between *O*-GlcNAc glycosylation, ubiquitination and Hsp70 GlcNAc-binding activity during cell injury.

Céline GUINEZ, René CACAN, Jean-Claude MICHALSKI and Tony LEFEBVRE

voir annexe

Dans ces travaux, nous avons montré que les deux modifications post-traductionnelles, ubiquitine et *O*-GlcNAc, ne sont pas "exclusives", à savoir qu'une protéine *O*-GlcNAc peut également être ubiquitinée. Ces deux modifications augmentent lors d'un stress thermique avec des cinétiques différentes.

Nous avons également montré que la *O*-GlcNAc n'est pas accumulée lors de l'inhibition du protéasome contrairement aux formes ubiquitinées, ce qui suggère que les protéines *O*-GlcNAc ne seraient pas dégradées par le protéasome et par conséquent que la *O*-GlcNAc pourrait être un signal de protection.

A la suite de ces expériences, nous avons émis l'hypothèse que, lors d'un stress, une protéine pourrait être soit *O*-GlcNAc soit ubiquitinée et que la glycosylation assurerait la protection de cette protéine. Puisqu'une protéine *O*-GlcNAc peut être également ubiquitinée, nous avons tenter de comprendre comment elle pourrait être protéger de la dégradation et pourquoi, par la suite, serait elle ubiquitinée et dégradée?

Nous avons montré que l'activité lectinique de Hsp70 était augmentée immédiatement après un stress thermique (2,5 minutes), sans la synthèse *de novo* de Hsp70. Cette activité lectinique diminue par la suite rapidement, ce qui suggère une saturation rapide de Hsp70 par les protéines *O*-GlcNAc.

Pour comprendre comment les protéines peuvent être immédiatement reconnue par l'activité lectinique de Hsp70, nous avons émis l'hypothèse d'une interaction lectinique entre Hsp70 et un facteur inconnu, facteur qui se dissocierait de Hsp70 à la suite d'un stress, ce qui libèrerait le site lectinique de Hsp70 (figure 27). Nous nous sommes penchés sur le cas du facteur de transcription Hsf1, facteur qui permet l'induction des Hsp70 lors d'un stress et dont l'interaction avec Hsp70 est largement connue. Cependant nos expériences ne nous ont pas permis de démontrer que ce facteur était glycosylé.

et à 42°C, contrairement à Hsc70, mais surtout que son activité lectinique augmente avec l'inhibition du protéasome. Cette activité pourrait être engendrée pour éviter une agrégation délétère des protéines.

L'autre lien qui pourrait exister entre la *O*-GlcNAc et le système d'ubiquitination est la glycosylation même des enzymes du processus de l'ubiquitination. En effet, UCH-L1 (ubiquitin carboxyl hydrolase-L1), une enzyme de dé-ubiquitination, est également modifiée par la *O*-GlcNAc (Cole et Hart, 2001). Nous avons montré que E1 est modifiée par la *O*-GlcNAc et que cette glycosylation est dépendante des conditions de culture et de stress. Hsp70 interagit avec E1, interaction qui est également dépendante des conditions de culture et de stress. Nous avons donc émis l'hypothèse que cette interaction pourrait être d'ordre lectinique puisqu'elle est plus importante dans les conditions où E1 est fortement glycosylée. Puisque la glycosylation de E1 par la *O*-GlcNAc et l'interaction avec Hsp70 sont modulées par les conditions de culture et de stress, l'idée d'un contrôle du processus d'ubiquitination par la *O*-GlcNAc est renforcée.

Enfin, la mise en place de la technique d'ARN interférentiel pour réduire l'expression de l'OGT a permis de montrer qu'une diminution des niveaux de *O*-GlcNAc est corrélée à une diminution des niveaux d'ubiquitine et de la viabilité cellulaire. Des expériences d'ARN interférentiel lors d'un stress thermique ont permis de supposer que la *O*-GlcNAc interviendrait directement sur la viabilité des cellules. L'équipe de Zachara *et al.* a obtenue des résultats similaires (Zachara *et al.*, 2004). L'hypothèse de la protection cellulaire par la *O*-GlcNAc est alors renforcée.

- Dans tous ces travaux, nous avons étudié l'expression et l'activité lectinique des Hsp70 lors d'un stress thermique ou nutritionnel. Or ces protéines, appelées autrement protéines de stress, peuvent également être induites par de nombreux autres stimuli.

Naturellement, nous nous sommes proposés d'étudier l'expression mais surtout l'activité lectinique des Hsp70 suite à ces différents stress. Nos travaux ont donc consisté en l'étude de ces divers stress : le choc thermique (HS), éthanolique (EtOH), oxydatif (H₂O₂), osmotique (NaCl), aux métaux lourds (arsenic, AsNa et mercure, HgCl₂) et la carence en glucose (Glc-) sur la fonction lectinique de Hsp70 et sur les niveaux de glycosylation des extraits cellulaires totaux. Cette étude a été réalisée sur deux types cellulaires : les cellules d'hépatocarcinome humain (HepG₂) et les cellules d'adénocarcinome humains (HeLa) afin de savoir si les

différences observées étaient spécifiques au type cellulaire ou non. Nous nous sommes ensuite plus particulièrement focalisés sur deux stress : le stress éthanolique et la carence en glucose. Afin de savoir si les modifications observées étaient liées à une modulation de la charge énergétique, nous avons mis au point une technique de dosage des nucléotides ATP, ADP et AMP, basée sur des méthodes chromatographiques. Cette technique permet également le dosage de l'UDP-GlcNAc permettant d'évaluer les niveaux du nucléotide-sucre donneur nécessaire à la formation de la *O*-GlcNAc. Ce travail a été réalisé en collaboration avec Monsieur Yves Leroy.

Ces résultats sont présentés dans la partie "**Etude de l'activité lectinique des Hsp70 et de la glycosylation des protéines lors de différents stress. Mise en place d'une technique de dosage de l'ATP/ADP/AMP et de l'UDP-GlcNAc**"

Chacun des stress testés entraîne une modification des niveaux de *O*-GlcNAc que ce soit dans les cellules HepG₂ ou HeLa. Cependant, les évolutions ne sont pas les mêmes d'un stress à un autre et, pour un même stress, d'un type cellulaire à un autre. Nous avons montré une augmentation des niveaux de *O*-GlcNAc lors des stress par les métaux lourds pour les cellules HepG₂ et lors des stress éthanolique, osmotique, aux métaux lourds et même lors de la carence en glucose pour les cellules HeLa.

Pour les HepG₂, l'induction de l'activité lectinique des Hsp70 est indépendante de la qualité du stress alors que cette induction est moins évidente dans les cellules HeLa. Dans tous les cas, les viabilités cellulaires restent correctes, ce qui suggère un rôle efficace des Hsp70 lors de ces stress.

L'étude plus précise d'un stress éthanolique a permis d'observer que les cellules HeLa étaient plus résistantes à ce type de stress comparées aux cellules HepG₂ (qui sont peut-être déjà sensibilisées à ce type de stress). Il est d'ailleurs intéressant de noter que, dans ce cas, l'activité lectinique des Hsp70 dans les cellules HeLa est plus importante que dans les cellules HepG₂. Cette activité lectinique pourrait en partie expliquer la meilleure tolérance des cellules HeLa au stress à l'éthanol.

Le calcul des charges énergétiques à la suite des divers stress subi par les HeLa montre qu'il n'y a pas de modification de ces valeurs, suggérant ainsi que l'induction de l'activité lectinique des Hsp70 est directement activée par ces stress et non par une modification de la charge énergétique. Par contre, les niveaux d'UDP-GlcNAc sont modulables en fonction des stress mais la glycosylation des protéines n'évolue pas toujours dans le même sens que ces

valeurs. Cette observation démontre que la seule modulation des niveaux d'UDP-GlcNAc n'est pas suffisante pour moduler l'activité de l'OGT.

En conclusion, ces travaux nous ont permis d'observer des différences au sein de deux types cellulaires. Ceci pourrait expliquer les résultats différents observés par Zachara *et al.* qui démontre une augmentation systématique des niveaux de *O*-GlcNAc quelque soit le stress et le type cellulaire puisque ces stress ont été effectués sur une période de 7 heures et les lignées cellulaires testées ne sont pas les mêmes.

Les cellules sont donc capables de répondre spécifiquement et différemment aux stress, réponse qui se fait en terme de modulation des niveaux d'UDP-GlcNAc modifiant ainsi les niveaux de glycosylation et l'activité lectinique des Hsp70.

- A ce stade de nos recherches, l'hypothèse selon laquelle les protéines *O*-GlcNAc seraient protégées de la dégradation protéasomale lors d'un stress, *via* leur interaction avec la famille des protéines de choc thermique de 70 kDa (HSP70) est renforcée.

Nous avons ensuite entrepris la construction d'un mutant d'Hsc70 ou Hsp70 qui ne soit plus capable de reconnaître les protéines *O*-GlcNAc. Ne connaissant pas la localisation du site d'activité lectinique de HSP70, nous nous sommes orientés vers des expériences de modélisation moléculaire ("docking" entre Hsc70 avec un peptide sérine-*O*-GlcNAc ou thréonine-*O*-GlcNAc) en espérant trouver la région d'interaction de Hsc70 avec ce motif.

Ce travail, effectué en collaboration avec le Pr Gérard Vergoten, a permis l'identification de deux acides aminés (R469 et Y431) potentiellement impliqués dans cette interaction. Ces résultats sont présentés dans la partie "**Mutation du site d'activité lectinique d'Hsc70**".

Ce résultat nous a conduit à la construction de Hsc70 mutée au niveau de ces acides aminés. Ce travail a fait l'objet d'une collaboration avec le Dr Dominique Leprince (UMR 8526 CNRS) de l'Institut de biologie de Lille. Pour assurer l'immuno-détection et l'immuno-purification de la protéine en système cellulaire, nous avons commencé par ajouter un "flag" à l'extrémité N-terminale de la forme sauvage. La construction de Hsc70-Flag ainsi terminée, a permis l'élaboration de la protéine mutée sur l'un des acides aminés potentiellement impliqués dans l'interaction lectinique, l'arginine 469. L'analyse *in vivo* de ces clones a révélée l'implication de cet acide aminé dans l'interaction lectinique de Hsc70.

L'ensemble des travaux de recherche effectués au cours du DEA et de la thèse sont récapitulés en figure 28.

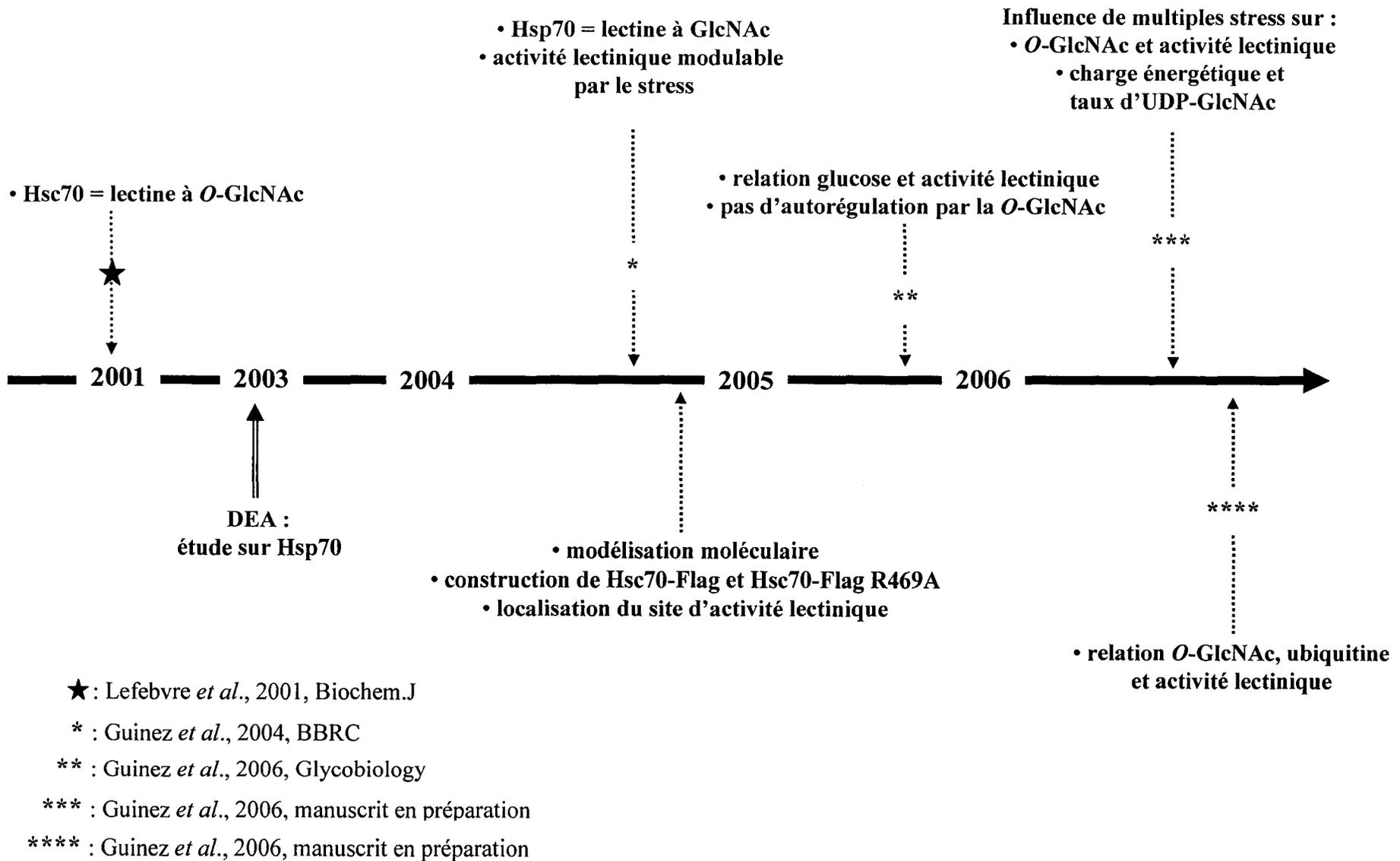


Figure 28 : Vue chronologique des travaux effectués au cours du troisième cycle.

Etude de l'activité lectinique des Hsp70 et de la glycosylation des protéines lors de différents stress.

Mise au point d'une technique de dosage de l'ATP/ADP/AMP et de l'UDP-GlcNAc

A/ Matériels et méthodes

1) Culture cellulaire

Des cellules HepG₂ ou HeLa sont mises en culture dans un milieu Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco) supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (v/v), 2 mM de L-glutamine, 5 IU/ml de pénicilline et 50 µg/ml de streptomycine dans une étuve avec 5 % de CO₂ à 37°C. Les boîtes de Pétri (diamètre 100mm) sont préalablement traitées avec 0.1 % de gélatine porcine (Sigma) pour les HepG₂.

2) Traitements par le stress

Les cellules sont mises en culture 24 heures avant le début du stress. Une fois le milieu renouvelé, les drogues sont ajoutées et les cellules replacées à 37°C. Le stress thermique est induit en plaçant les cellules pendant 24h à 42°C. Pour les autres stress, les cellules sont traitées comme suit : 0 à 4% d'éthanol (v/v), 1 mM de H₂O₂, 75 µM d'arsenite de sodium, 50 µM d'HgCl₂, 100 mM de NaCl, et placées dans un milieu déplété en glucose pour la carence nutritionnelle. Les traitements sont établis pendant 24h ou pendant les périodes de temps indiquées. Les tests de viabilités cellulaires ont été établis en utilisant la méthode d'exclusion au bleu Trypan.

3) Enrichissements sur billes de GlcNAc

Les cellules sont d'abord rincées avec 10 ml de PBS froid et lysées sur la glace avec un « scrapper » dans un tampon hypotonique (10 mM Tris/HCl, 10 mM NaCl, 15 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM MgCl₂ et inhibiteurs de protéases, pH 7.2). Les extraits cellulaires sont ensuite centrifugés à 20,000 g pendant 30 min à 4°C. Pour tester les activités lectiniques, les surnageants sont incubés avec 30 µl de billes de GlcNAc (N-acetyl-D-glucosamine immobilisée sur de l'agarose avec un bras espaceur de cinq carbones, Sigma) à 4°C pendant 1h. Les billes sont ensuite lavées 4 fois avec le tampon « binding buffer » (20 mM Tris/HCl, 200 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ et inhibiteurs de protéases, pH 7.4) et resuspendues dans 50µl de tampon Laemmli et bouillies.



4) SDS-PAGE, western blot et anticorps

Un volume identique de chaque extrait cellulaire est déposé et migré sur SDS-PAGE (gel 10 % de réticulation). L'équicharge est alors vérifiée par une coloration au bleu de Coomassie "Coomassie Brilliant Blue" (CBB). La même quantité de protéines pour chacun des points testés est ensuite à nouveau déposée sur SDS-PAGE. L'électrophorèse est suivie par un transfert sur membrane de nitrocellulose (Amersham Biosciences). Les membranes sont saturées pendant 45 min avec 5 % de lait écrémé dans un tampon TBS-Tween (20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl et 0.05 % Tween (v/v), pH 8.0). L'anticorps monoclonal anti-O-GlcNAc (RL-2) est utilisé à une dilution finale de 1:1,000 et l'anticorps polyclonal anti-Hsp70 (Santa Cruz Biotechnologies) à une dilution finale de 1:30,000. Les membranes sont incubées toute la nuit à 4°C, puis lavées trois fois avec du TBS-Tween pendant 10 min et incubées avec un anticorps secondaire, soit anti-souris, soit anti-lapin, marqué à la peroxydase à une dilution finale de 1:10,000 pendant 1h. Finalement, trois lavages de 10 min chacun sont réalisés avec du TBS-Tween. La détection est effectuée par chimiluminescence (ECL, solution Amersham Biosciences).

5) Mesures des taux d'UDP-GlcNAc, AMP, ADP et ATP par HPAEC (High PH Anion Exchange Chromatography)

Les cellules sont lysées dans 1 mL de tampon hypotonique (10 mM Tris/HCl, 10 mM NaCl, 15 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM MgCl₂ et inhibiteurs de protéases pH 7.2). 50 µL d'une solution de HCl 1M sont ajoutés au lysat. La solution est déposée sur une colonne contenant 1.5 mL de Dowex 50WX2-400 sous une forme H⁺. La colonne est lavée avec 10 mL d'eau mQ (18 méga-ohms). La fraction non retenue et les lavages sont collectés sur la glace et additionnés de 500 µL de Tris/HCl pour obtenir un pH 8.0. 250 µL de cette fraction diluée est injectée en utilisant une colonne ProPAC-PA1 (4X250 mm) et un système HPLC Dionex. Le programme d'élution est le suivant: Tris/HCl 20 mM, pH 9.2 (solution A) pendant 1 minute ; gradient d'élution pendant 29 min avec 85% de A et 15 % de NaCl 2M (solution B) ; puis un plateau de 5 min dans ces conditions ; un gradient d'élution de 10 min jusqu'à 100% de B; un plateau à 100% de B est appliqué pendant 5 min. La colonne est ensuite ré-équilibrée avec 100 % de A. Le débit est de 1 mL.min⁻¹. La détection est réalisée en utilisant un Spectroflow 757 (KRATOS) à une longueur d'onde de 256 nm.

B/ Résultats

- **Les niveaux de *O*-GlcNAc d'une part, et l'activité lectinique de Hsp70 d'autre part, sont différents en fonction du type de stress et du type cellulaire.**

Pour étudier le rôle possible de l'activité lectinique de Hsp70 dans la protection des protéines lors d'un stress, les niveaux de *O*-GlcNAc et les activités lectiniques des Hsp70 ont été déterminés après que les cellules aient été soumises à différentes formes de stress. Les cellules ont été traitées comme suit : aucun traitement (ctrl), en les plaçant pendant 24h à 42°C pour induire un stress thermique (HS), 2 % d'éthanol (v/v) (EtOH), 1 mM H₂O₂ (H₂O₂), 75 μM d'arsenite de sodium (AsNa), 50 μM d' HgCl₂ (HgCl₂), 100 mM de NaCl (NaCl), et placées dans un milieu déplété en glucose pour des traitements de déprivation nutritionnelle (Glc-). Les traitements ont été réalisés pendant 24 h. Nous avons examiné deux types cellulaires, HepG₂ et HeLa, afin de savoir si les cellules répondent de la même façon (figure 29).

La réponse à tous ces agents induisant un stress n'est pas identique : les niveaux de *O*-GlcNAc sont élevés quand les cellules HepG₂ sont traitées à l'arsenic et au mercure (figure 29B, gauche) et quand les cellules HeLa sont traitées à l'éthanol, à l'arsenic, au mercure, au chlorure de sodium et lors d'une déprivation en glucose (figure 29B, droite). Dans tous les autres cas, les niveaux de *O*-GlcNAc sont diminués en comparaison aux conditions contrôles. Les niveaux et les activités lectiniques de Hsp70 ont été également examinés (figure 29C, 29D) et le rapport entre ces deux données a été calculé par des mesures de densitométrie optiques (figure 29E). Tous les stress, en particulier l'hyperthermie, induisent une activité lectinique de Hsp70. Cette activité lectinique est davantage induite dans les cellules HepG₂ comparé aux cellules HeLa.

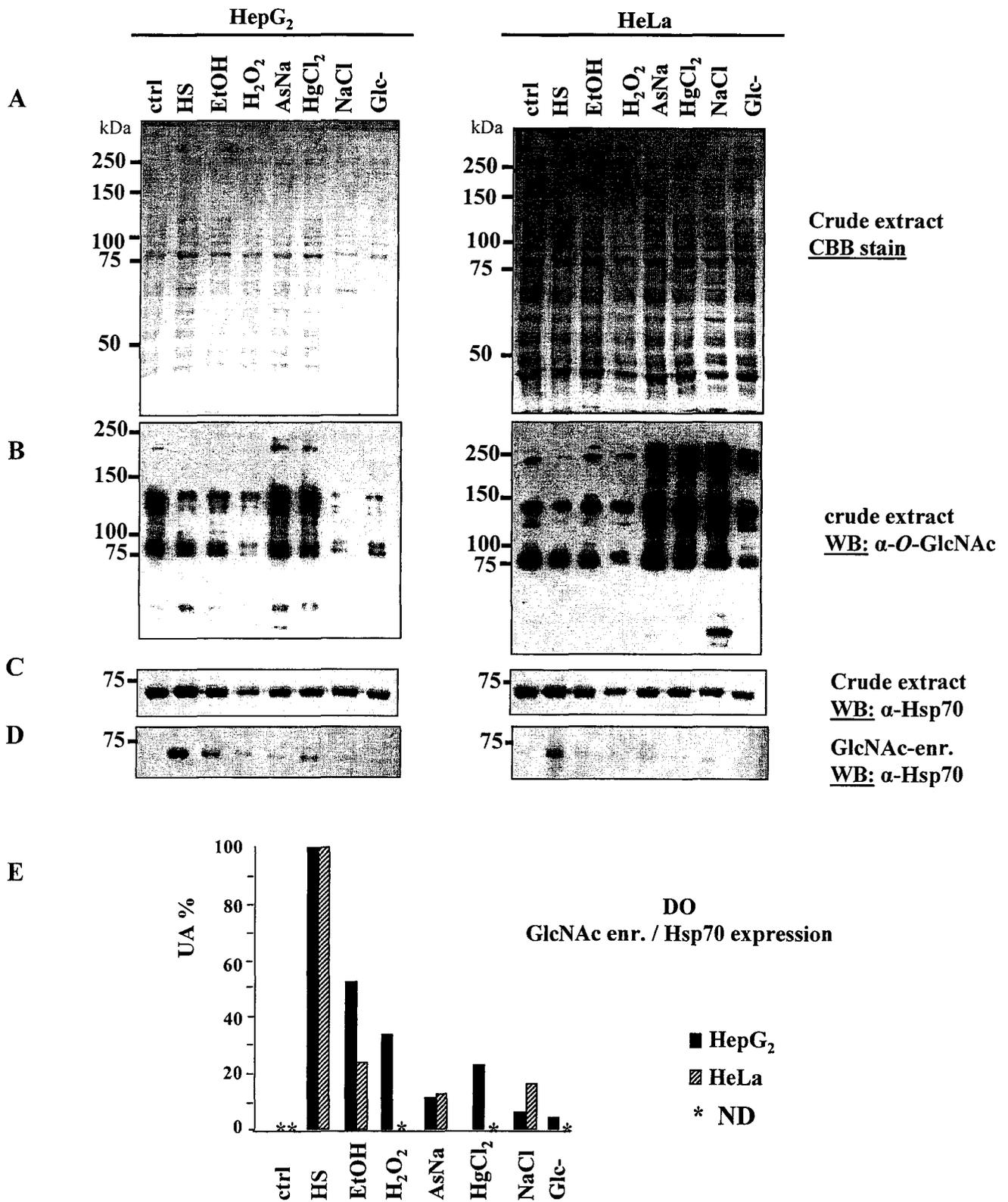


Figure 29 : Les niveaux de *O*-GlcNAc et l'activité lectinique de Hsp70 sont modulables avec le type de stress et le type cellulaire.

▪ **Les cellules HeLa sont plus résistantes au stress comparé aux cellules HepG₂**

Nous avons ensuite déterminé l'effet de différents stress infligés aux cellules pendant 24 heures sur la viabilité cellulaire (figure 30). Les cellules traitées avec chacun des stress ne montrent pas une mortalité dramatique en comparaison aux cellules non stressées. Ceci est particulièrement vrai pour les cellules HeLa qui semblent plus résistantes au stress que les cellules HepG₂. En effet certains stress comme ceux causés par l'arsenic, le mercure, le NaCl ou l'H₂O₂ causent une plus grande mortalité des cellules HepG₂.

Ces viabilités élevées pourraient être corrélées à l'activité lectinique élevée de Hsp70 dans les deux types cellulaires.

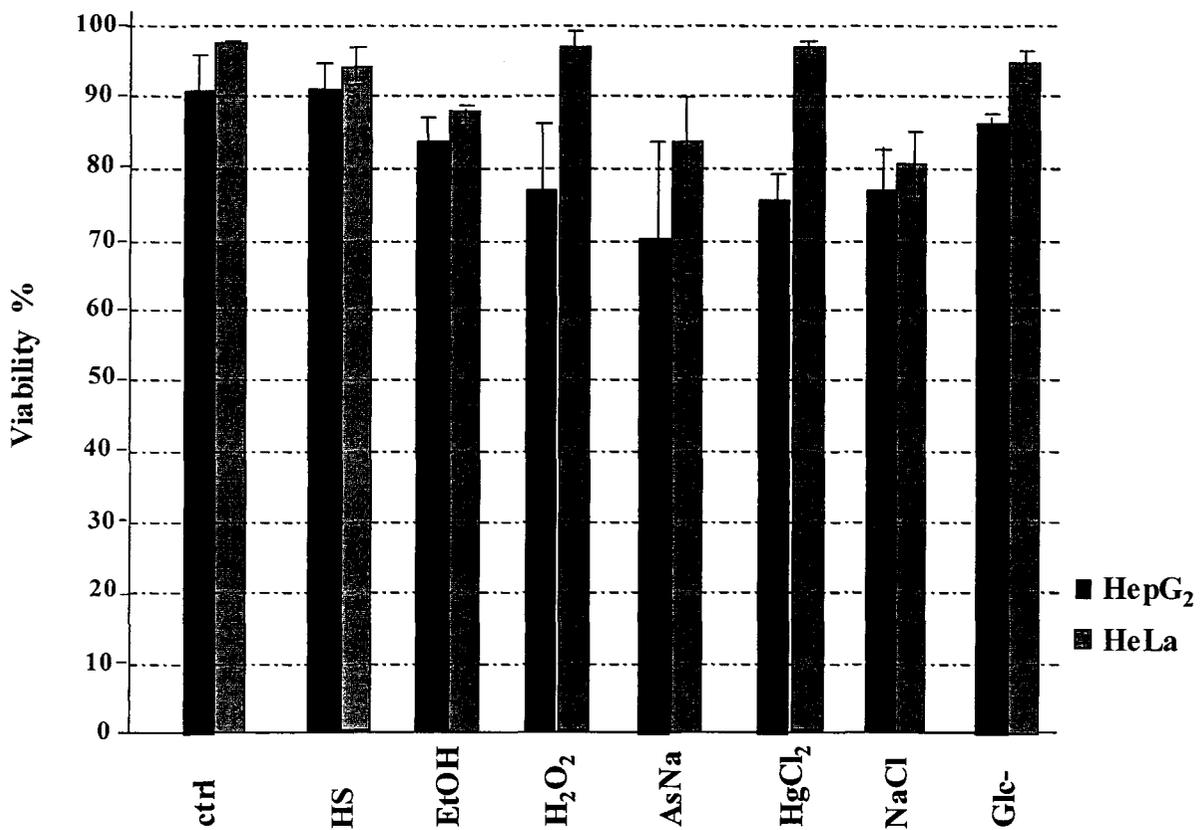


Figure 30 : Les cellules HeLa sont plus résistantes au stress par rapport aux cellules HepG₂.

▪ **Les niveaux de *O*-GlcNAc diminuent et l'activité lectinique des Hsp70 augmente en réponse à des concentrations croissantes en éthanol.**

L'analyse des niveaux de Hsp70 et de leur activité lectinique après culture des cellules avec des concentrations croissantes en éthanol (0 à 4%) pendant 24 heures est représentée en figure 31. Alors que ces concentrations n'augmentent pas vraiment les niveaux de Hsp70 dans les

deux types cellulaires (figure 31A), l'activité lectinique de Hsp70 est induite plus particulièrement dans les cellules HeLa (figure 31B, droite). Nous avons ensuite examiné les niveaux de *O*-GlcNAc dans les deux types de cellules. Les cellules HepG₂ traitées avec des doses croissantes en éthanol montrent une diminution des niveaux de *O*-GlcNAc (figure 31C, gauche) tandis que ces niveaux de *O*-GlcNAc augmentent dans les cellules HeLa excepté à 2 et 4 % en éthanol avec une perte totale de la glycosylation dans le dernier cas (figure 31C, droite) (cette perte n'est pas due à une perte globale de protéines si l'on compare la coloration CBB, figure 31D). 4 % en éthanol semble être un stress trop sévère pour les cellules HepG₂ puisque toutes les cellules sont mortes à cette concentration. Ces données suggèrent que les cellules HepG₂ pourraient être plus sensibles au stress éthanolique par rapport aux cellules HeLa.

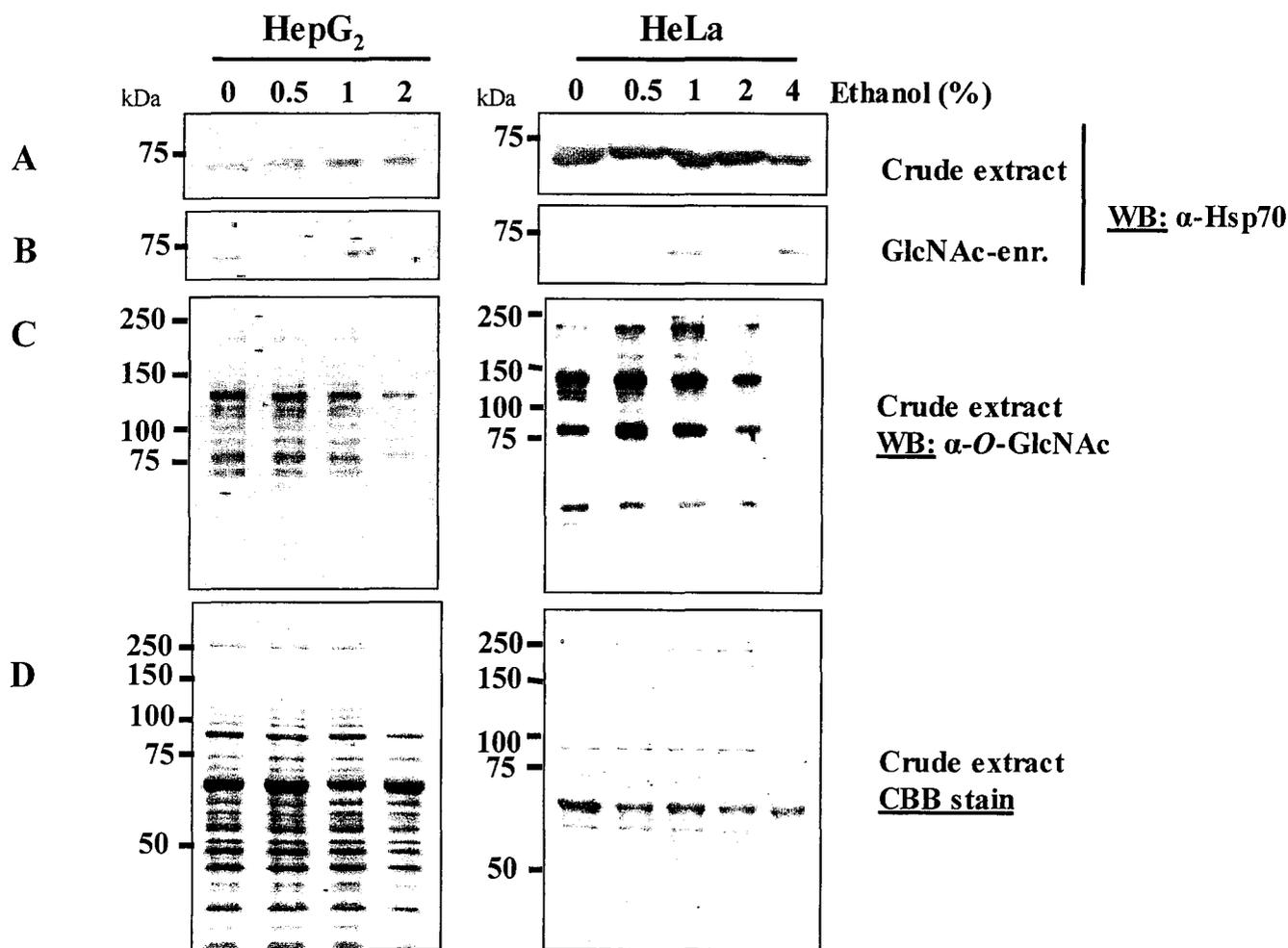


Figure 31 : Effet de l'éthanol sur l'expression et l'activité lectinique de Hsp70 et sur le taux de protéines *O*-GlcNAc.

▪ **Expression et activité lectinique de Hsp70 et niveaux de *O*-GlcNAc lors d'une cinétique de stress par 2 % d'éthanol.**

Sachant que 2 % en éthanol étaient suffisants et nécessaires pour induire des changements des niveaux de *O*-GlcNAc, nous avons traitées les cellules de cette façon mais pendant différents temps, entre 0 et 4 heures. De la même manière, l'expression de Hsp70 n'est pas induite dans les deux types cellulaires et est, au contraire, diminuée à partir de 120 min de stress dans les cellules HepG₂ (figure 32A). Par contre, l'activité lectinique de Hsp70 est induite avec le temps de stress (figure 32B, le manque d'activité lectinique au temps 60 min semble être plutôt un problème de révélation plutôt qu'une réelle absence de celle-ci). Le profil différent des niveaux de *O*-GlcNAc entre les deux types cellulaires est démontré une fois de plus avec cette expérience : les taux de *O*-GlcNAc diminuent au cours de la cinétique de stress à l'éthanol pour les cellules HepG₂ (figure 32C, gauche) tandis qu'ils augmentent dans les cellules HeLa (figure 32C, droite).

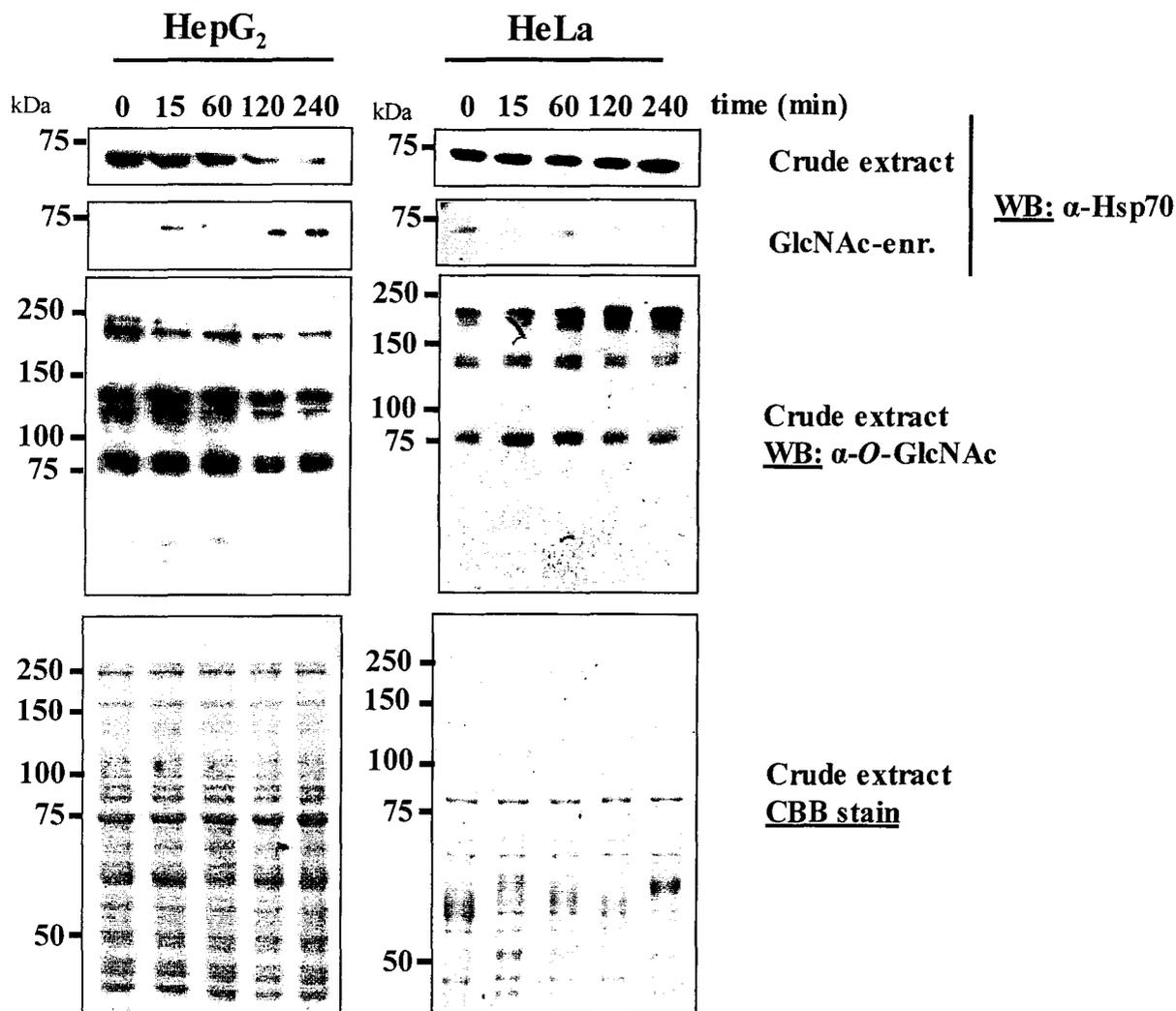


Figure 32 : Expression et activité lectinique des Hsp70 et niveaux de *O*-GlcNAc au cours d'une cinétique de stress à 2 % en éthanol.

▪ **Séparation chromatographique des nucléotides ATP, ADP, AMP et UDP-GlcNAc.**

Pour tenter de comprendre si l'activité lectinique de Hsp70 est induite par une modification de la charge énergétique à la suite d'un stress ou si elle est induite directement par le stress, nous avons mis au point une technique basée sur des méthodes chromatographiques pour séparer les nucléotides (ATP, ADP et AMP) et les glycosyl-nucléotides (UDP-GlcNAc) d'un extrait cellulaire brut. Les nucléotides étant des molécules chargées négativement, l'acidification des protéines en ajoutant 1M de HCl dans l'extrait cellulaire et le passage de cet extrait sur une colonne d'échange anionique permettent de ne pas retenir les nucléotides. Cette fraction épurée contenant les nucléotides a été injectée en utilisant une colonne ProPAC-PA1 (4X250 millimètre) sur un système HPLC Dionex. La figure 33A représente la séparation des standards : 500 nmole de chaque nucléotide ont été mélangés et injectés dans le système. L'extrait brut HeLa a alors été analysé par cette méthode (figure 33B). Cette méthode nous a permis une bonne séparation de l'ATP, l'ADP, l'AMP, et de l'UDP-GlcNAc et d'apprécier leur abondance relative. Selon ces données, les charges énergétiques ont été alors obtenues en calculant le rapport : $([ATP] + 1/2 [ADP]) / ([ATP] + [ADP] + [AMP])$. Lors de conditions normales de croissance cette donnée physiologique est comprise entre 0.7 et 0.8.

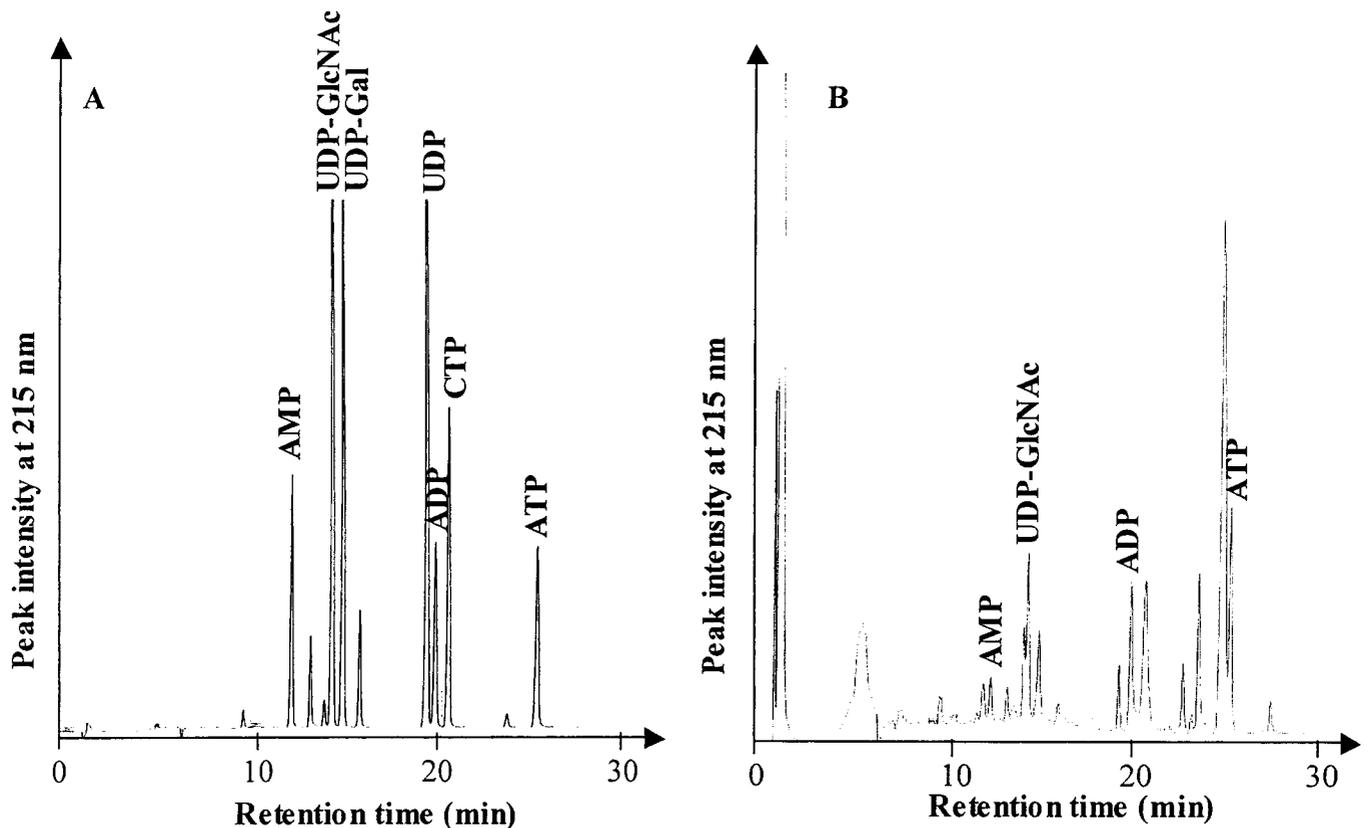


Figure 33 : Séparation de l'ATP, ADP, AMP et UDP-GlcNAc.

- Les stress ne modifient pas la charge énergétique mais modulent les niveaux d'UDP-GlcNAc.

Pour déterminer si le stress induit des changements de charge énergétique, les cellules HeLa ont été traitées avec les multiples agents stressants, les extraits bruts ont été passés sur colonne d'échange anionique et les nucléotides séparés par HPAEC. L'évaluation de toutes les charges énergétiques et les valeurs d'UDP-GlcNAc après chaque stress montre clairement que le stress ne modifie pas significativement la charge énergétique, démontrant ainsi que l'activité lectinique de Hsp70 n'est pas induite par une variation de ce paramètre mais est induite certainement directement par le stress (notamment par la mauvaise conformation des protéines) (figure 34A). Par contre les niveaux d'UDP-GlcNAc sont modulés avec le stress (figure 29B). Or si l'on compare ces niveaux d'UDP-GlcNAc aux niveaux de *O*-GlcNAc des cellules HeLa traitées par les mêmes conditions (figure 29B, droite), on peut remarquer qu'il n'y a pas nécessairement une corrélation entre le taux d'UDP-GlcNAc et la *O*-GlcNAc. Cette observation montre que la modulation seule des niveaux du nucléotide-sucre nécessaire à la formation de la *O*-GlcNAc, n'est pas suffisante pour expliquer les modifications des niveaux de cette glycosylation. L'activité de l'enzyme responsable de sa formation, l'OGT, doit être certainement modulée par d'autres paramètres comme ses modifications post-traductionnelles, ses interactions...

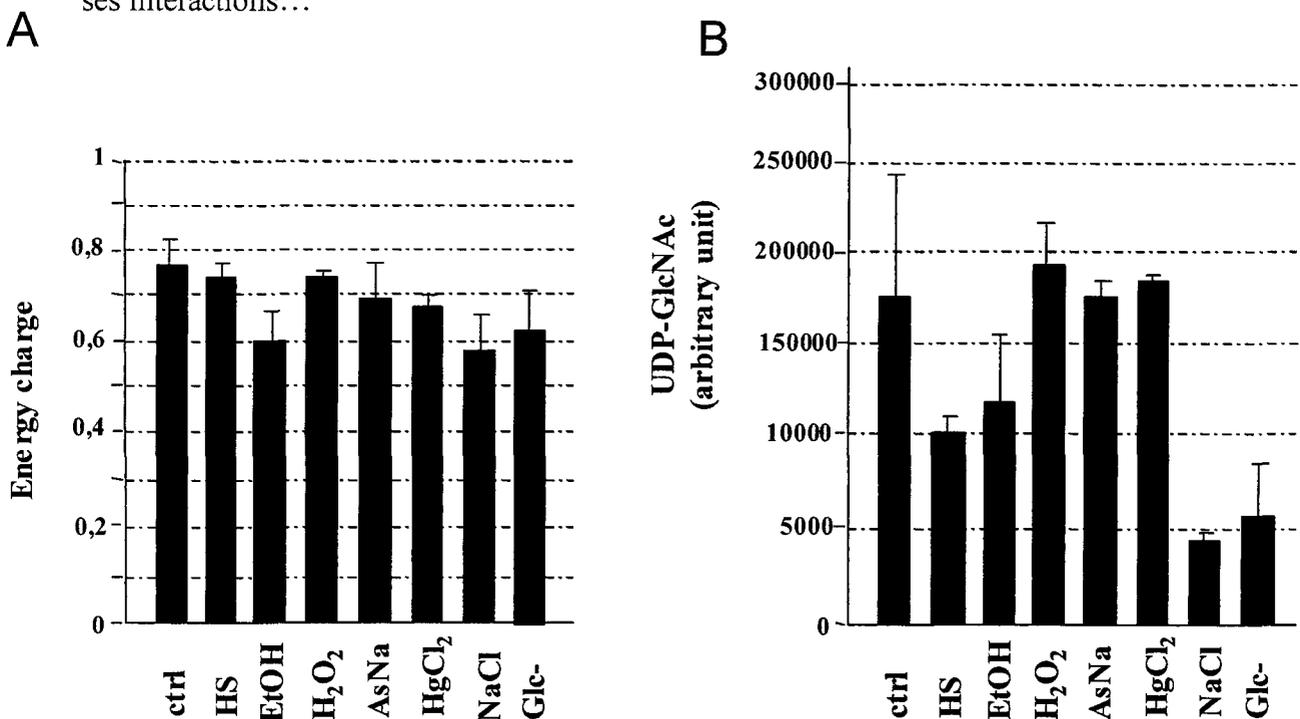


Figure 34 : Dosage des charges énergétiques et des niveaux d'UDP-GlcNAc à la suite de différents stress sur les cellules HeLa.

Mutation du site d'activité lectinique d'Hsc70

I/ Modélisation moléculaire de Hsc70

Dans nos précédents travaux nous avons montré que Hsc70 et Hsp70 possèdent une activité lectinique vis-à-vis des résidus de GlcNAc. L'analyse de ces protéines n'a pas révélé la présence de motifs spécifiques aux classes connues de lectines. Nous sommes donc en présence d'un nouveau type de lectine.

Le but de ce travail était d'évaluer la partie de Hsc70 capable d'interagir avec le monosaccharide GlcNAc par des techniques de modélisation moléculaire. Ces expériences ont donc été réalisées à partir de la séquence de Hsc70 utilisée pour le clonage, plus particulièrement du domaine de fixation des peptides et d'un motif sérine-*O*-GlcNAc ou thréonine-*O*-GlcNAc.

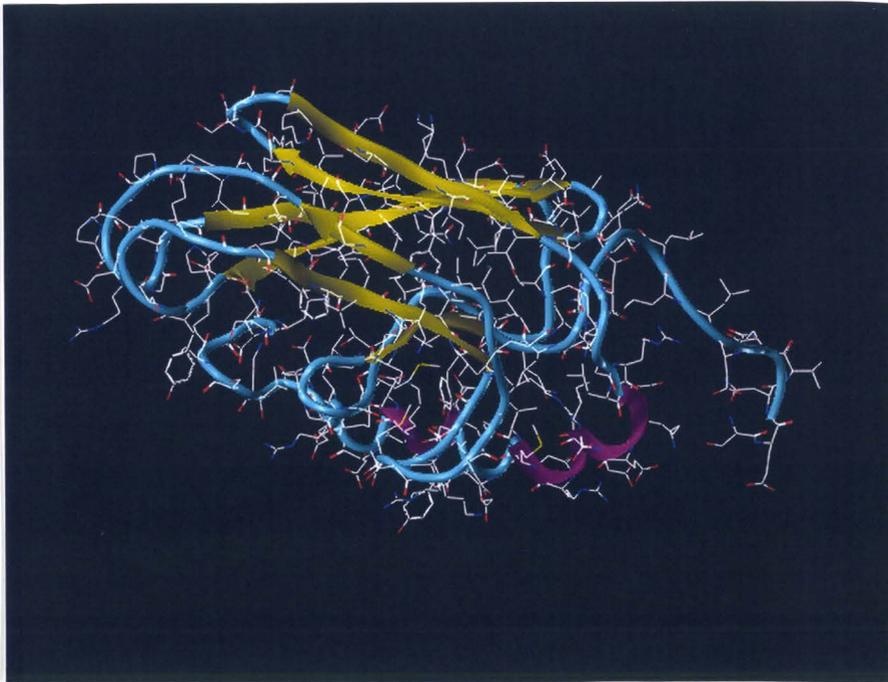


Figure 35 : Modélisation moléculaire du domaine de fixation des peptides de Hsc70 humaine.

Les feuilletts β sont représentés en jaune, les hélices α en rose.

L'étude de la protéine avec le peptide sérine-*O*-GlcNAc a aboutit au modèle présenté sur la figure 36. Les résultats avec le peptide thréonine-*O*-GlcNAc sont similaires.

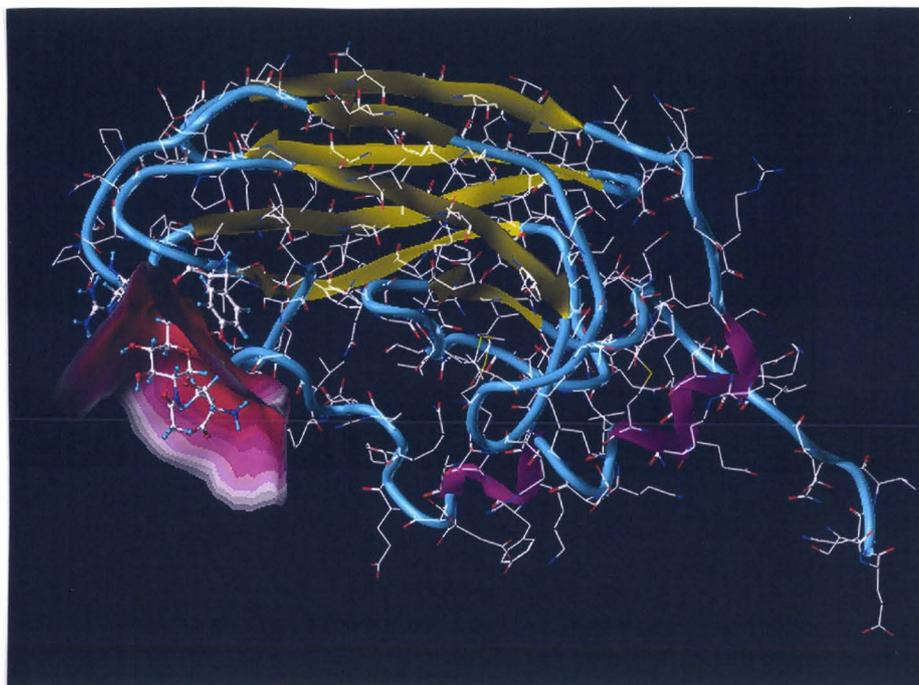


Figure 36 : Modélisation moléculaire du domaine de fixation des peptides de Hsc70 humaine avec le peptide Ser-*O*-GlcNAc.

Ce modèle montre l'existence d'une interaction entre l'arginine 469 d'Hsc70 humaine et le peptide glycosylé (interaction représentée en rose).

II/ Construction de Hsc70 flaggée et mutée

A/ Matériels et méthodes

1) Matériel : Vecteur d'expression et clone Hsc70

Le travail a été réalisé sur Hsc70 humaine dont le numéro d'accèsion NCBI est : NM_006597, HSPA8 (gi 24234684) homo sapiens heat shock 70 kDa protein 8 (2221bp) dont la séquence est donnée en figure 39. Les différents domaines, domaine ATPasique, domaine de fixation des peptides et le domaine C-terminal sont représentés respectivement en bleu, rouge et vert. Les encadrés représentent les deux acides aminés ciblés pour mutation et la séquence conservée EEVD. Ce clone est présent dans le vecteur d'expression pCMV.SPORT6 sous le promoteur Sp6 (invitrogen) (figure 37 et 38).

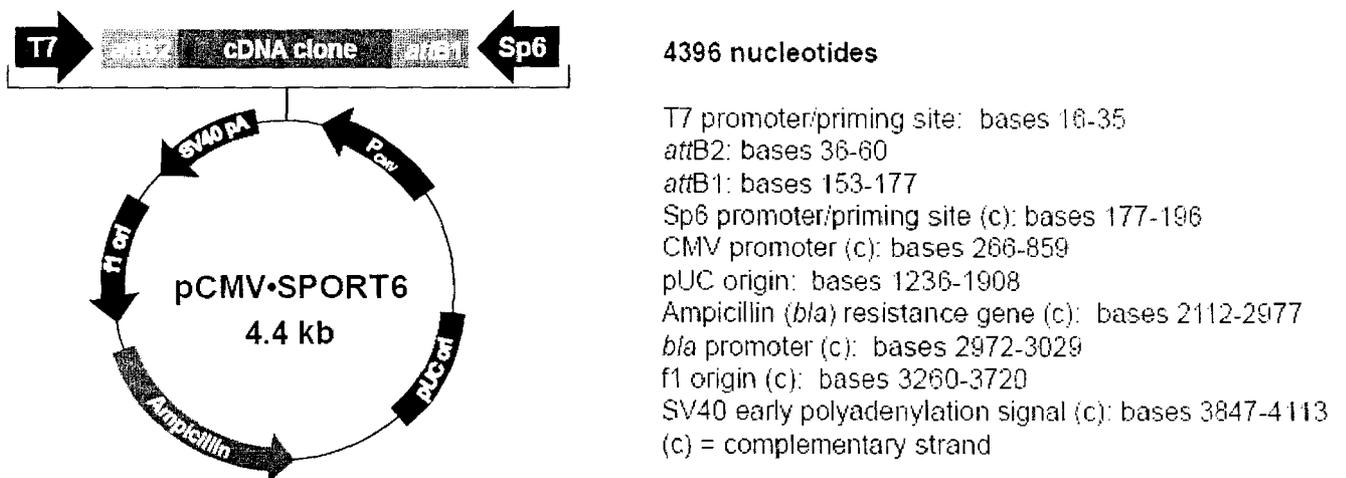


Figure 37: Carte du vecteur d'expression pCMV.SPORT6.

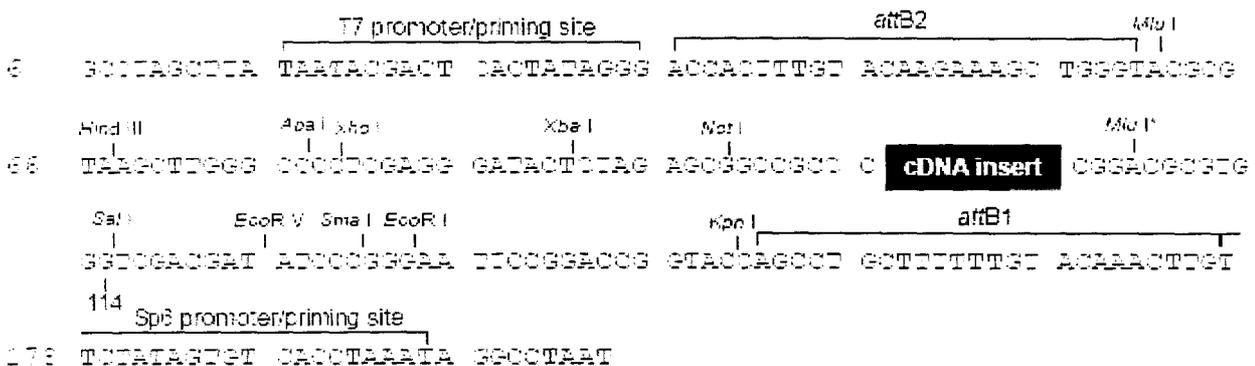


Figure 38 : Site multiple de clonage de pCMV.SPORT6.

ctcattgaactcgctgcagctcttgggttttttgggttccttcgttattggagccaggcctacacccca 72

M S K G P A V G I D L G T T Y S 16
gcaacc ATG TCC AAG GGA CCT GCA GTT GGT ATT GAT CTT GGC ACC ACC TAC TCT 126

C V G V F Q H G K V E I I A N D Q G 34
TGT GTG GGT GTT TTC CAG CAC GGA AAA GTC GAG ATA ATT GCC AAT GAT CAG GGA 180

N R T T P S Y V A F T D T E R L I G 52
AAC CGA ACC ACT CCA AGC TAT GTC GCC TTT ACG GAC ACT GAA CGG TTG ATC GGT 234

D A A K N Q V A M N P T N T V F D A 70
GAT GCC GCA AAG AAT CAA GTT GCA ATG AAC CCC ACC AAC ACA GTT TTT GAT GCC 288

K R L I G R R F D D A V V Q S D M K 88
AAA CGT CTG ATT GGA CGC AGA TTT GAT GAT GCT GTT GTC CAG TCT GAT ATG AAA 342

H W P F M V V N D A G R P K V Q V E 106
CAT TGG CCC TTT ATG GTG GTG AAT GAT GCT GGC AGG CCC AAG GTC CAA GTA GAA 396

Y K G E T K S F Y P E E V S S M V L 124
TAC AAG GGA GAG ACC AAA AGC TTC TAT CCA GAG GAG GTG TCT TCT ATG GTT CTG 450

T K M K E I A E A Y L G K T V T N A 142
ACA AAG ATG AAG GAA ATT GCA GAA GCC TAC CTT GGG AAG ACT GTT ACC AAT GCT 504

V V T V P A Y F N D S Q R Q A T K D 160
GTG GTC ACA GTG CCA GCT TAC TTT AAT GAC TCT CAG CGT CAG GCT ACC AAA GAT 558

A G T I A G L N V L R I I N E P T A 178
GCT GGA ACT ATT GCT GGT CTC AAT GTA CTT AGA ATT ATT AAT GAG CCA ACT GCT 612

A A I A Y G L D K K V G A E R N V L 196
GCT GCT ATT GCT TAC GGC TTA GAC AAA AAG GTT GGA GCA GAA AGA AAC GTG CTC 666

I F D L G G G T F D V S I L T I E D 214
ATC TTT GAC CTG GGA GGT GGC ACT TTT GAT GTG TCA ATC CTC ACT ATT GAG GAT 720

G I F E V K S T A G D T H L G G E D 232
GGA ATC TTT GAG GTC AAG TCT ACA GCT GGA GAC ACC CAC TTG GGT GGA GAA GAT 774

F D N R M V N H F I A E F K R K H K 250
TTT GAC AAC CGA ATG GTC AAC CAT TTT ATT GCT GAG TTT AAG CGC AAG CAT AAG 828

K D I S E N K R A V R R L R T A C E 268
AAG GAC ATC AGT GAG AAC AAG AGA GCT GTA AGA CGC CTC CGT ACT GCT TGT GAA 882

R A K R T L S S S T Q A S I E I D S 286
CGT GCT AAG CGT ACC CTC TCT TCC AGC ACC CAG GCC AGT ATT GAG ATC GAT TCT 936

L Y E G I D F Y T S I T R A R F E E 304
CTC TAT GAA GGA ATC GAC TTC TAT ACC TCC ATT ACC CGT GCC CGA TTT GAA GAA 990

L N A D L F R G T L D P V E K A L R 322
CTG AAT GCT GAC CTG TTC CGT GGC ACC CTG GAC CCA GTA GAG AAA GCC CTT CGA 1044

D A K L D K S Q I H D I V L V G G S 340
GAT GCC AAA CTA GAC AAG TCA CAG ATT CAT GAT ATT GTC CTG GTT GGT GGT TCT 1098

T R I P K I Q K L L Q D F F N G K E 358
 ACT CGT ATC CCC AAG ATT CAG AAG CTT CTC CAA GAC TTC TTC AAT GGA AAA GAA 1152

 L N K S I N P D E A V A Y G A A V Q 376
 CTG AAT AAG AGC ATC AAC CCT GAT GAA GCT GTT GCT TAT GGT GCA GCT GTC CAG 1206

 A A I L S G D K S E N V Q D L L L L 394
 GCA GCC ATC TTG TCT GGA GAC AAG TCT GAG AAT GTT CAA GAT TTG CTG CTC TTG 1260

 D V T P L S L G I E T A G G V M T V 412
 GAT GTC ACT CCT CTT TCC CTT GGT ATT GAA ACT GCT GGT GGA GTC ATG ACT GTC 1314

 L I K R N T T I P T K Q T Q T F T T 430
 CTC ATC AAG CGT AAT ACC ACC ATT CCT ACC AAG CAG ACA CAG ACC TTC ACT ACC 1368

 Y S D N Q P G V L I Q V Y E G E R A 448
 TAT TCT GAC AAC CAG CCT GGT GTG CTT ATT CAG GTT TAT GAA GGC GAG CGT GCC 1422

 M T K D N N L L G K F E L T G I P P 466
 ATG ACA AAG GAT AAC AAC CTG CTT GGC AAG TTT GAA CTC ACA GGC ATA CCT CCT 1476

 A P R G V P Q I E V T F D I D A N G 484
 GCA CCC CGA GGT GTT CCT CAG ATT GAA GTC ACT TTT GAC ATT GAT GCC AAT GGT 1530

 I L N V S A V D K S T G K E N K I T 502
 ATA CTC AAT GTC TCT GCT GTG GAC AAG AGT ACG GGA AAA GAG AAC AAG ATT ACT 1584

 I T N D K G R L S K E D I E R M V Q 520
 ATC ACT AAT GAC AAG GGC CGT TTG AGC AAG GAA GAC ATT GAA CGT ATG GTC CAG 1638

 E A E K Y K A E D E K Q R D K V S S 538
 GAA GCT GAG AAG TAC AAA GCT GAA GAT GAG AAG CAG AGG GAC AAG GTG TCA TCC 1692

 K N S L E S Y A F N M K A T V E D E 556
 AAG AAT TCA CTT GAG TCC TAT GCC TTC AAC ATG AAA GCA ACT GTT GAA GAT GAG 1746

 K L Q G K I N D E D K Q K I L D K C 574
 AAA CTT CAA GGC AAG ATT AAC GAT GAG GAC AAA CAG AAG ATT CTG GAC AAG TGT 1800

 N E I I N W L D K N Q T A E K E E F 592
 AAT GAA ATT ATC AAC TGG CTT GAT AAG AAT CAG ACT GCT GAG AAG GAA GAA TTT 1854

 E H Q Q K E L E K V C N P I I T K L 610
 GAA CAT CAA CAG AAA GAG CTG GAG AAA GTT TGC AAC CCC ATC ATC ACC AAG CTG 1908

 Y Q S A G G M P G G M P G G F P G G 628
 TAC CAG AGT GCA GGA GGC ATG CCA GGA GGA ATG CCT GGG GGA TTT CCT GGT GGT 1962

 G A P P S G G A S S G P T I E E V D 646
 GGA GCT CCT CCC TCT GGT GGT GCT TCC TCA GGG CCC ACC ATT GAA GAG GTT GAT 2016

 * 647
 TAA gccaaccaagtgtagatgtagcattgttccacacattttaaacatttgaaggacctaattcgttagc2086

 aaattctgtggcagttttaaagtttaagctgctatagtaagttactgggcattctcaatacttgaatatgg2158

 aacatatgcacaggggaaggaaataacattgcactttataaacactgtattgtaagtggaaaatgcaatgtc2230

 ttaaataaaactattttaaattggcaccataaaaaaaaaaaaaaaaaa 2276

Figure 39 : Séquence de Hsc70 sauvage humaine.

2) Souches bactériennes et conditions de croissance

2.1- Souches bactériennes

Les clonages ont été effectués dans deux souches d' *Escherichia coli* présentées au tableau V.

Tableau V : Souches de bactéries *E. coli*

Souche	Génotype
DH5 α	F' <i>endA1, hsdR17, (r_K⁻m_K⁺), supE44, thi-1, recA1, gyrA, (Nal1r), relA1, Δ(lacZYA-argF)U169, deoR, (Φ80dlacΔ(lacZ)M15)</i>
XL1-Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1 lac</i> (F', <i>proAB, lac^FZΔM15, Tn10 (Tet^r)</i>)

2.2- Conditions de croissance

Le milieu de culture utilisé pour toutes les souches de bactéries de cette étude se nomme LB (Luria-Bertani). Il est composé de 1 % de bactotryptone, de 0.5 % de NaCl et de 0,5 % d'extrait de levure, ajusté au pH 7.0. Pour un milieu solide, on ajoute de l'agar à une concentration de 1,5 %. Les différentes cultures sont incubées à 37°C et sous agitation pour les bouillons. Le temps d'incubation est habituellement d'une nuit. Les bactéries qui contiennent des plasmides sont sélectionnées grâce à la présence du gène conférant la résistance à l'ampicilline ou à la kanamycine. Pour ce faire, on ajoute 100 μ g/ml de l'un ou l'autre de ces antibiotiques au milieu LB.

3) Transformation bactérienne

3.1- Transformation dans pCR[®]-Blunt II-TOPO[®] ou pCR[®] 2.1-TOPO[®]

Un produit de PCR donnant la bande attendue et pur peut être directement cloné dans pCR[®]-Blunt II-TOPO[®] ou pCR[®] 2.1-TOPO[®] sans extraction du gel au préalable. 1 μ l de solution saline et 1 μ l du vecteur Topo (kit invitrogen) sont ajoutés à 4 μ l de produit de PCR pendant 30 minutes à température ambiante.

3.2- Transformation des bactéries

✓ La souche *E. coli* XL1-Blue

Tout d'abord, 25/50 ml de milieu LB sont inoculés avec 2 ml d'une culture en phase stationnaire. La culture est incubée à 37°C sous agitation rapide jusqu'à l'obtention d'une D.O._{600nm} située entre 0,4 et 0,6. 6 ml de culture sont par la suite centrifugés à 4°C, pendant 5 minutes à 3500 tr/min. Les manipulations sont toujours effectuées avec des solutions stériles et préalablement refroidies sur la glace. Les cellules sont remises en suspension dans 1/10 de volume de TSB soit 600 µl (LB 80%, PEG 10%, Mg²⁺ 20 mM, DMSO 5%) puis maintenues sur la glace ou aliquotées en tube de 100µl et rapidement congelées à -80°C. Elles peuvent être conservées plusieurs mois dans ces conditions.

Lors de la transformation des bactéries, ajouter dans le tube de « topo » 20 µl de KCM 5X (0.5M KCl, 0.15 M CaCl₂, 0.25M MgCl₂), qsp 100 µl H₂O et 100µl de bactéries compétentes. L'incubation se fait pendant 20 minutes sur la glace puis 5 minutes à température ambiante. 300 µl de LB sont ensuite ajoutés et les bactéries sont alors incubées à 37°C sous agitation pendant 45 minutes. Les bactéries sont ensuite étalées sur un milieu LB solide contenant de la kanamycine ou de l'ampicilline à une concentration de 100 µg/ml. Si le plasmide utilisé est pBluescript, on peut sélectionner les colonies blanches en étalant sur le milieu 50 µl de X-gal 2% et 50 µl d'IPTG 100 mM. Les boîtes sont finalement incubées pour 24 heures à 37°C.

✓ La souche DH5α

La souche *E. coli* DH5α a été traitée au chlorure de rubidium et congelée à -80°C (Utermohlen, 1994). Lorsque les bactéries sont décongelées, 2 µl de Topo transformés sont ajoutés et incubés 20 minutes sur la glace puis les bactéries subissent un choc thermique de 45 secondes à 42°C. Les bactéries sont mises à pousser sous agitation à 37°C après l'addition de 500 µl de LB, pendant 1h à 1h30. Les bactéries sont centrifugées puis étalées sur un milieu LB solide contenant de l'ampicilline. Les boîtes sont finalement incubées pour 24 heures à 37°C.

4) Isolement de l'ADN plasmidique

La méthode est celle de la colonne QIAGEN : tous les plasmides utilisés pour les clonages et qui ont été séquencés ont été isolés à l'aide de colonne QIAGEN provenant du QIAprep® Spin Miniprep Kit. Le protocole suivi est celui décrit dans le manuel d'utilisation du manufacturier.

5) Manipulations de l'ADN

5.1- Réaction de PCR

L'amplification de l'ADN a été réalisée avec l'enzyme Pfu (Proméga) qui est une DNA polymérase très fidèle dans la réplication des acides nucléiques. Les réactions sont les suivantes :

Mix	Pour 50µl (1 PCR)
Tp Pfu 10X : 5x	5 µl
DMSO 100 % : 5x	5 µl
DNTP (mix 100 mM) : 0.2x	0.2 µl
BSA (1mg/ml) : 0.5x	0.5 µl
Oligo1 (100 ng/µl) : 1x	1 µl
Oligo2 (100 ng/µl) : 1x	1 µl
Enzyme Pfu : 0.5 à 1x	1 µl
ADN	1 µl
H2O : qsp [50 – volume ADN]x	35.3 µl

Le programme de PCR est donné dans le tableau suivant :

Température (°C)	Temps (minutes)	
95	5	} 40 fois
95	1	
55	1	
72	2	
72	5	

5.2- Electrophorèse de l'ADN sur gel d'agarose

Les produits de PCR sont déposés sur gel d'agarose 1 ou 2 % (p/v) (1 ou 2 g d'agarose + 10 ml tampon TBE (TBE 10X; Tris 0,89 M, acide borique 0,89 M et 0,02 M d'EDTA), qsp 100 ml H₂O). 10 µl de bromure d'éthidium 0,5 µg/ml sont ajoutés à l'agarose juste avant sa solidification afin de visualiser l'ADN sur une plaque UV. Les marqueurs de taille utilisés sont l'ADN du bactériophage λ digéré par les enzymes EcoRI et Hind III et celui du bactériophage pHA digéré par HinfI. La migration se fait à 100V pendant environ 50 minutes. La visualisation des produits de PCR se fait sous une lampe UV (λ_254 nm).

5.3- Isolement d'ADN sur gel d'agarose

La bande d'intérêt est découpée avec un scalpel sous lampe UV et la purification de l'ADN se fait suivant le protocole QIAquick Gel Extraction Kit de QIAGEN.

5.4- Digestion de l'ADN

Au volume d'ADN à digérer, on ajoute 10 µl de tampon approprié à l'enzyme utilisée, 10 µl de BSA, 1 unité de l'enzyme par µg d'ADN à digérer et de l'eau distillée stérile pour un volume total de 100 µl. La digestion s'effectue à 37°C, selon l'enzyme de restriction utilisée pendant une à deux heures. Lors d'une digestion par plus d'une enzyme, il y a digestion séquentielle suivie d'un isolement sur gel afin de s'assurer de la réussite du clonage.

5.5- Ligation

La réaction de ligation demande la présence de quantités équimolaires du fragment inséré et du plasmide (environ 50 à 100 ng d'ADN plasmidique). Il y a donc quantification de l'ADN sur gel d'agarose à l'aide des marqueurs de taille. Par la suite, les fragments et les plasmides sont mis en présence de 1.5 µl du tampon de ligation, de 1 µl de la Fast-Link™ DNA Ligase (epicentre biotechnologies) et d'eau distillée stérile pour un volume total de 15 µl. La réaction se produit 15 minutes à température ambiante puis 15 minutes à 70°C pour dénaturer la ligase. Finalement, 7 µl de cette réaction sont utilisés pour transformer la souche de bactérie voulue.

6) Construction plasmidique/oligonucléotides utilisés

également avoir un contenu en GC de 40% et se terminer par au moins une base G ou C. Les oligonucléotides utilisés pour la mutagenèse dirigée sont présentés ci-dessous :

*NMMutHSCS

5' GCACCTGCAGGTGTTTCCTCAGATTGAAGTC 3'

*NMMutHSCAS

5' CTGAGGAACACCTTGCAGGTGCAGGAGGTATGC 3'

7) Etude de la traduction de la protéine d'intérêt

7.1- Transfection dans les cellules Cos-7

Les cellules sont divisées la veille de la transfection de façon à être à 20 % de confluence. Le plasmide est utilisé à une concentration de 100 ng/μl. Dans un tube à transfection, 2.5 μg de plasmide dilué dans 250 μl final d'eau physiologique sont incubés avec 10 μl de PEI (l'agent transfectant) dilué dans 250 μl final d'eau physiologique. La fixation de l'ADN sur l'agent transfectant se fait à température ambiante pendant 20 minutes. Les cellules sont rincées 2 fois avec 5 ml de milieu opti-MEM (Gibco). Puis 2.5 ml de ce milieu sont ajoutés et les 500 μl de solution à transfecter sont clairsemés sur les cellules. L'incubation dure 6 heures puis 10 ml de milieu normal (DMEM (Gibco)+ 10 %SVF+ 2 mM L-glutamine, 5 IU/ml penicillin, 50 μg/ml streptomycin) sont ajoutés. Après 48 heures, les cellules sont lysées.

7.2- Enrichissement des protéines sur billes de Flag

Les cellules Cos-7 transfectées sont rincées deux fois avec 10 ml de PBS puis lysées avec le tampon IPH de lyse doux suivant (20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0.5% NP-40 (v/v) et inhibiteurs de protéases, pH 8.0). Les extraits cellulaires sont ensuite centrifugés à 20,000 g pendant 30 min à 4°C. Les surnageants sont incubés avec l'anticorps anti-Flag (M2) à une concentration de 1:500 toute la nuit à 4°C puis avec de la protéine G couplée à des billes de Sépharose (Amersham Biosciences) pendant 1h à 4°C. Les billes sont ensuite lavées quatre fois avec le tampon IPH et sont ensuite reprises par 50 μl de tampon Laemmli puis bouillies à 100 °C pendant 10 minutes. Les extraits sont analysés en SDS-PAGE.

7.3- Enrichissement des protéines sur billes de GlcNAc

Les cellules Cos-7 transfectées sont rincées deux fois avec 10 ml de PBS puis lysées avec le tampon de lyse suivant (10 mM Tris/HCl, 10 mM NaCl, 15 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM MgCl₂ et inhibiteurs de protéases, pH 7.2). Les extraits cellulaires sont ensuite centrifugés à 20,000 g pendant 30 min à 4°C. Les surnageants sont incubés avec 30 µL de billes de GlcNAc (N-acétyl-D-glucosamine immobilisée sur agarose avec un bras constitué de carbonnes, Sigma) à 4°C pendant 1h. Les billes sont ensuite lavées quatre fois avec le tampon suivant (20 mM Tris/HCl, 200 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1mM MgCl₂ et inhibiteurs de protéases, pH 7.4). Les billes sont ensuite reprises par 50 µl de tampon Laemmli puis bouillies à 100°C pendant 10 minutes. Les extraits sont analysés en SDS-PAGE.

7.4- SDS-PAGE, western blot et immuno-révélation

L'analyse en SDS-PAGE est réalisée sur un gel à 10 % de réticulation dans le tampon de composition (Gly 0.2 M ; Tris 25 mM ; SDS 4 mM) à ampérage constant (15 mA pour le gel de concentration et 25 mA pour le gel de séparation). Les protéines du gel sont transférées sur membrane de nitrocellulose (Amersham Biosciences) à un ampérage de 200 mA pendant 2h ou une tension de 20V pendant 15h dans le tampon de transfert de composition suivante : Tris 20mM ; Gly 150mM ; MeOH 20% (v/v). L'efficacité du transfert est vérifiée par coloration des protéines totales au rouge ponceau (acide acétique 3% ; rouge ponceau 0.2%). La membrane est ensuite décolorée avec du TBS-Tween (Tris 15mM ; NaCl 140mM ; Tween 0.05%), puis saturée avec une solution de lait écrémé 5% (m/v) dans le TBS-Tween pendant 45min. La membrane est ensuite incubée avec l'anticorps anti-Flag (M2) utilisé à la dilution 1:5000 dans le lait/TBS-tween à 4°C pendant la nuit. La membrane est ensuite lavée par trois fois 10 minutes au TBS-tween et incubée avec un anticorps secondaire anti-souris couplé à la peroxidase à une dilution 1:10000^{ème} dans le lait/TBS-tween 1 heure à température ambiante. La membrane est de nouveau lavée au TBS-tween. Les détections s'effectuent à l'aide du kit ECL (Amersham) et la révélation se fait sur un film photographique (Kodak Biomax MR).

B/ Résultats : Obtention des clones Hsc70-Flag et Hsc70-Flag R469A

La stratégie de clonage est récapitulée sur la figure 40 et a conduit à l'obtention des deux constructions suivantes : Hsc70-Flag (2) et Hc70-Flag R469A (3) à partir du clone sauvage (1).

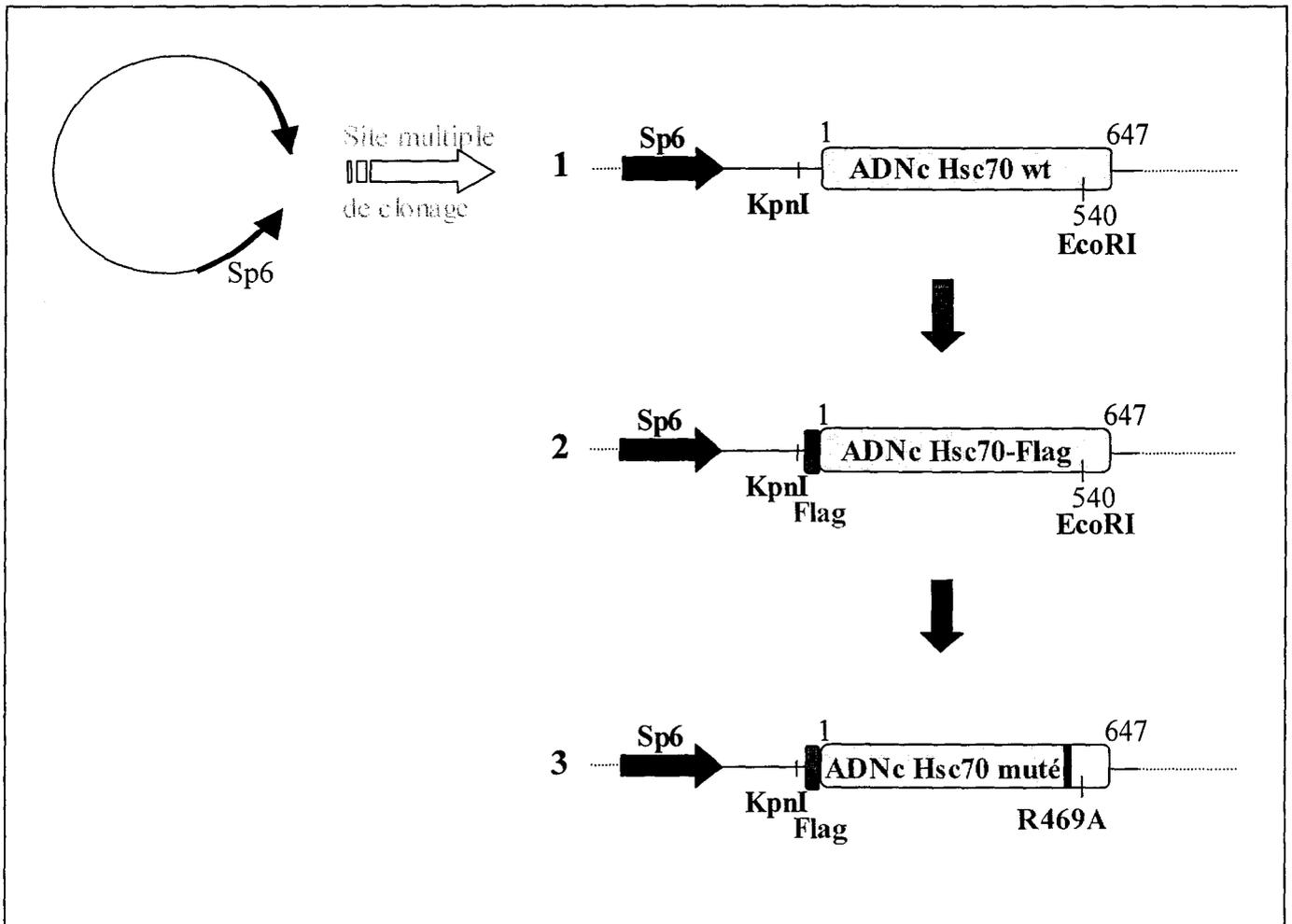
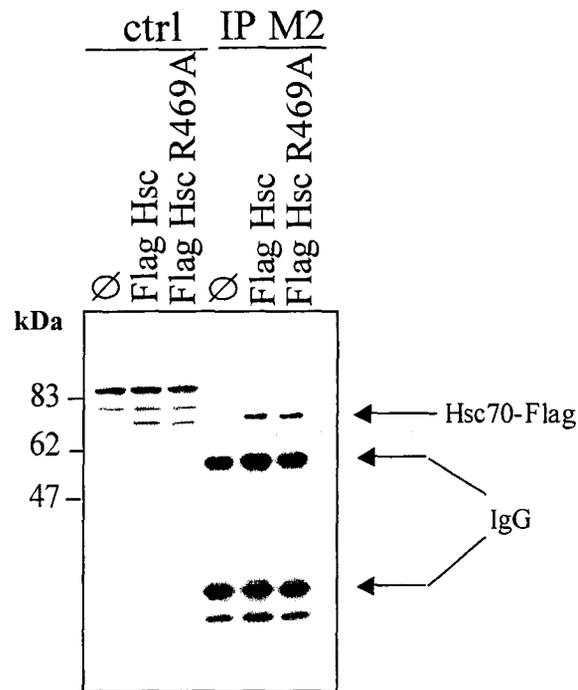


Figure 40 : Stratégie de clonage sur la protéine Hsc70.

C/ Résultats : Analyse de l'activité lectinique des clones de Hsc70 *in vivo*

Le séquençage des deux protéines, Hsc70-Flag et Hsc70-Flag R469A a montré la présence de la mutation R469A uniquement. Nous avons ensuite testé ces deux protéines dans un système cellulaire. La transfection des cellules Cos-7 avec un plasmide vide ou avec le vecteur d'expression contenant Hsc70-Flag ou Hsc70-Flag R469A a permis la purification de

ces deux clones (figure 41). La détection des protéines possédant le flag est visible sur des extraits totaux (ctrl) ou après immuno-précipitation par l'anticorps anti-Flag (IP M2).



WB : Anti-flag (M2)

Figure 41 : Mise en évidence de la protéine "flaggée" produite en Cos-7 par immuno-détection.

Après avoir vérifié la présence du Flag sur Hsc70, nous avons testé leur activité lectinique vis-à-vis des résidus de GlcNAc. Après transfection des cellules Cos-7, les extraits totaux ont été incubés avec des billes de GlcNAc et les protéines retenues sur les billes ont été séparées par SDS-PAGE puis transférées sur membrane. Nous avons testé l'activité lectinique des Hsc70 endogènes provenant de HepG₂ comme contrôle positif.

La révélation avec un anticorps anti-Flag montre une diminution d'activité lectinique de la protéine mutée au niveau du résidu d'arginine 469 (figure 42). Cette diminution a été quantifiée par densitométrie optique (figure 43).

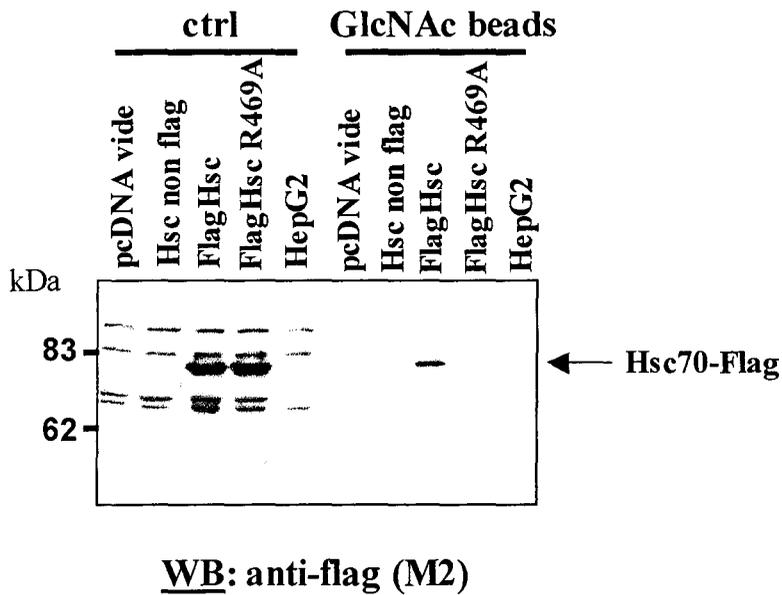


Figure 42 : Activité lectinique des clones de Hsc70.

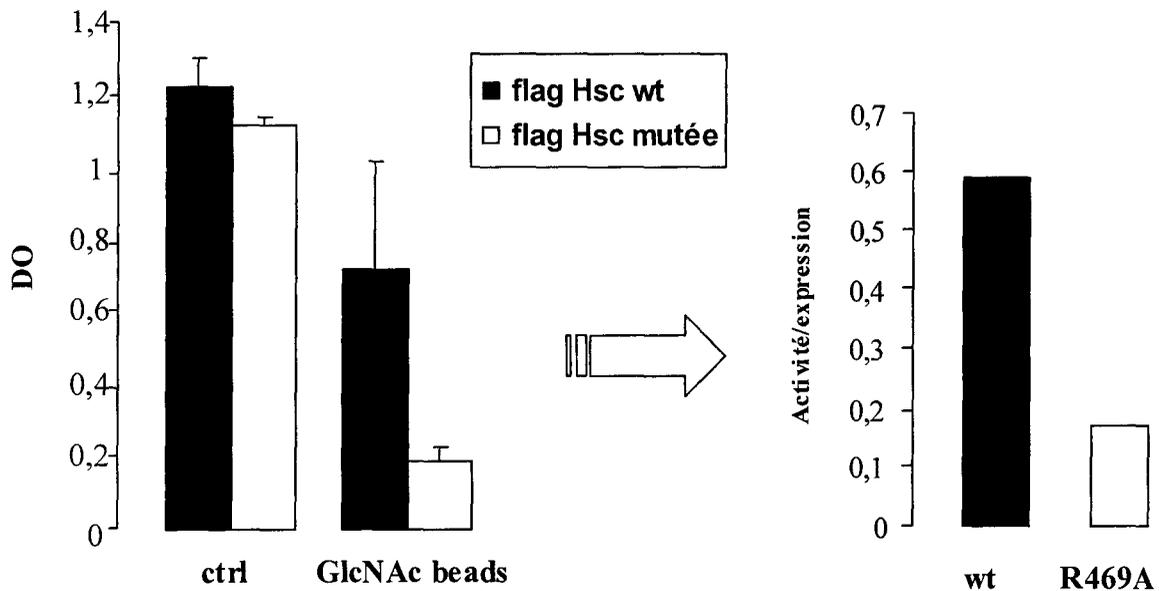


Figure 43 : Mise en évidence de la perte d'activité lectinique de la protéine clonée par mutation. (Données représentatives de trois expériences indépendantes).

Ces expériences montrent une diminution d'environ 70 % de l'activité lectinique de Hsc70-Flag par mutation de l'arginine 469 en alanine.

Conclusion générale

La figure 24 (page 86) résume notre hypothèse de départ c'est-à-dire une analogie entre le glucose et la *O*-GlcNAc dans leur rôle sur la destinée des glycoprotéines. Ce schéma est précisé de nouveau sur la figure 44.

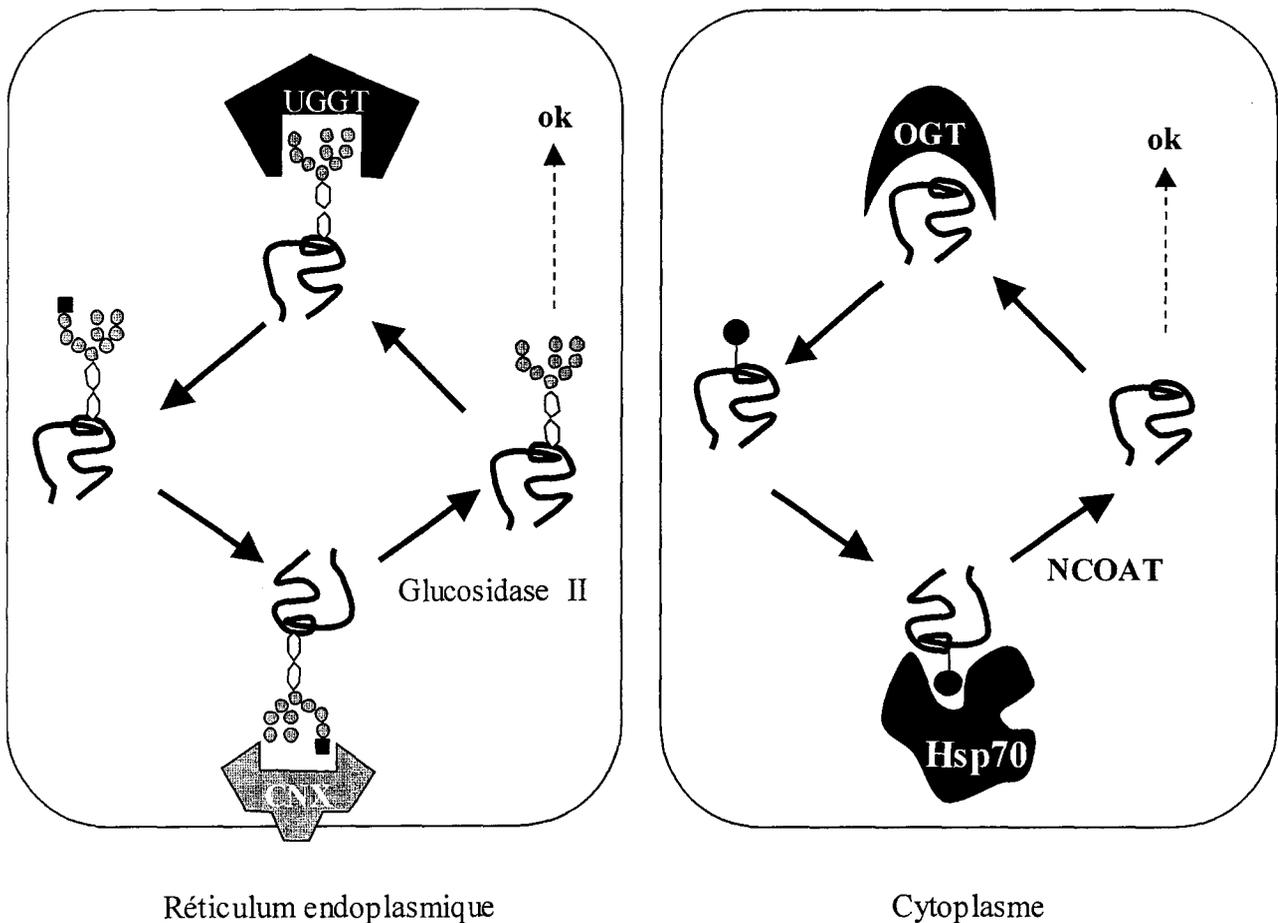


Figure 44 : Parallèle entre le cycle gluco/dégluco du RE et la reconnaissance des protéines *O*-GlcNAc par les Hsp70 dans le cytoplasme.

Nos travaux montrent que ce schéma est plus complexe :

- l'ubiquitine et la *O*-GlcNAc ne s'excluent pas mutuellement,
- Hsp70 est elle-même modifiée par la *O*-GlcNAc (flèche 2 de la figure 45) bien que l'on ne sache pas encore l'importance de cette modification sur son activité,
- le taux de glycosylation est modifié par le stress (flèche 1 de la figure 45),
- Les partenaires de la dégradation sont également modifiés par la *O*-GlcNAc : E1 (flèche 3 de la figure 45) et le protéasome (flèche 4 de la figure 45).

Nos travaux peuvent donc être résumés par le schéma hypothétique suivant (figure 45).

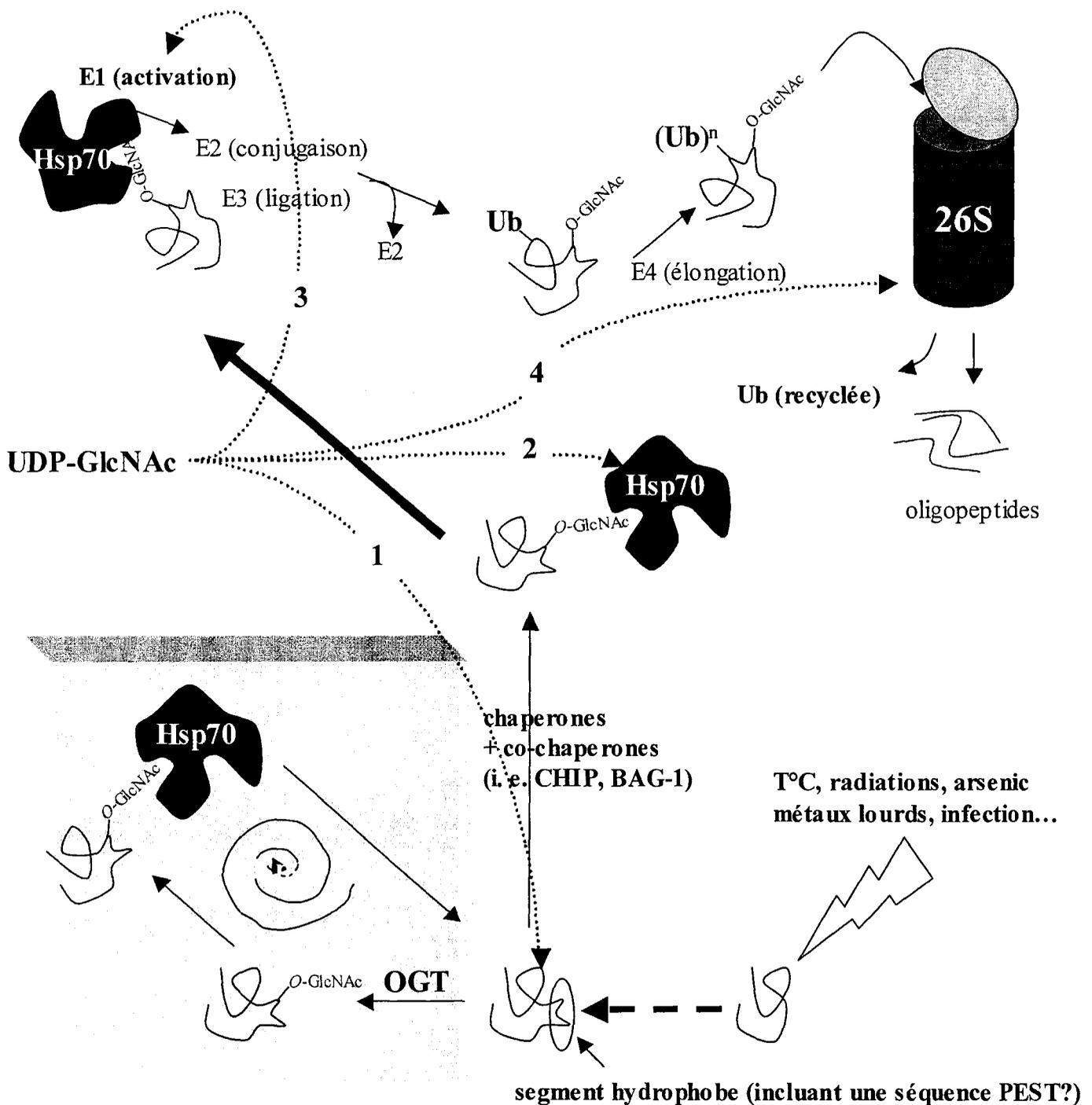


Figure 45 : Schéma hypothétique par lequel la O-GlcNAc protégerait les protéines lors d'un stress via l'interaction avec les Hsp70.

Lors d'un stress thermique, les protéines mal conformées laisseraient apparaître des séquences PEST, qui pourraient être ubiquitinées, dirigeant ainsi la protéine au protéasome. A l'opposé, ces segments hydrophobes pourraient être reconnus par l'OGT, qui d'après Sohn *et*

al., agirait en tant que chaperonne en reconnaissant ces zones et permettrait leur glycosylation, ce qui expliquerait l'augmentation des niveaux de *O*-GlcNAc à la suite d'un stress (Sohn *et al.*, 2004). Dans un même temps, Hsp70 qui était complexée à un facteur inconnu, s'en dissocierait pour reconnaître préférentiellement les protéines mal conformées. Hsp70 tenterait alors de remettre en conformation ces protéines *O*-GlcNAc en collaborant avec des co-chaperonnes comme Hsp40. Si ce processus de remise en conformation est efficace, la protéine retournerait alors dans la voie normale, par contre si ce processus échoue, l'association de Hsp70 avec d'autres co-chaperonnes comme CHIP ou BAG-1 induirait l'ubiquitination de cette protéine *O*-GlcNAc et par la suite sa dégradation par le protéasome.

De nombreux travaux restent à réaliser concernant l'implication de l'activité lectinique des Hsp70 d'une part, et de la glycosylation par la *O*-GlcNAc d'autre part, vis-à-vis de la dégradation protéasomale. Pour cela il apparaît nécessaire de réaliser des tests de dégradation protéasomale *in vitro*. Les comportements de deux peptides issus de séquences PEST, provenant des protéines c-myc et du récepteur aux oestrogènes β , seront étudiés par rapport à leur dégradation par le protéasome 20S purifié. La synthèse des formes non-modifiées ou *O*-GlcNAc de ces séquences PEST, permettra de juger l'impact de la glycosylation sur une telle activité. Une purification sur colonne d'anti-Flag immobilisé de Hsc70-Flag et de sa forme mutée R469A, après transfection et production en cellules Cos-7, permettra d'étudier l'impact de l'activité lectinique de cette protéine de choc thermique dans la protection des protéines *O*-GlcNAc vis-à-vis de la dégradation protéasomale.

La construction du double mutant Hsc70-Flag R469A/Y431A montrera si ce deuxième acide aminé identifié par modélisation moléculaire est également impliqué dans le site lectinique. Si cela est vrai, alors les capacités de fixation de Hsc70 sur billes de GlcNAc devraient être abolies.

Hsc70-Flag et Hsc70-Flag mutées purifiées, seront ensuite utilisées pour des études sur "biosensor" afin de trouver les partenaires de Hsc70. Le passage d'extraits cytosoliques et nucléaires de cellules HepG₂, par exemple, sur Hsc70-Flag immobilisée permettra la fixation des partenaires de Hsc70 et les interactions d'ordre lectinique mettant en jeu le résidu de GlcNAc seront discriminées. La comparaison des interactions lectiniques pour la protéine sauvage avec les protéines mutées sera un moyen de vérifier la pertinence de ces interactions. Cette étude sur BIAcore peut être couplée directement à la spectrométrie de masse permettant ainsi l'identification de ces partenaires. Deux autres moyens pourront être utilisés pour isoler

et identifier les partenaires de Hsc70 : la co-immunoprécipitation (par une identification par analyse protéomique des partenaires associés) et la purification sur colonne (par le passage d'extraits cellulaires sur une colonne de Hsc70-Flag immobilisée). Notre choix se tournerait alors vers un partenaire qui est connu comme étant *O*-GlcNAc et possédant une séquence PEST permettant sa dégradation par le protéasome.

Une fois le partenaire de Hsc70 identifié, l'étude en système cellulaire permettra, par des expériences utilisant la radioactivité, d'estimer la durée de demi-vie de ce partenaire, en conditions normales, en conditions de stress thermique, dans des conditions augmentant ou inhibant sa glycosylation et après transfection des différentes formes de Hsc70. Ainsi, nous espérons montrer que l'activité lectinique des protéines de choc thermique de 70 kDa joue un rôle efficace et primordial dans la prévention de l'agrégation et la protection des protéines *O*-GlcNAc vis-à-vis de leur dégradation protéasomale prématurée en cas de stress ; deux symptômes de nombreuses pathologies.

Bibliographie

A

- ✗ • **Albert T, Urbauer B, Kohlhuber F, Hammersen B, Eick D.** (1994) Ongoing mutations in the N-terminal domain of c-Myc affect transactivation in Burkitt's lymphoma cell lines. *Oncogene*. **9**, 759-763.
- **Amerik AY, Hochstrasser M.** (2004) Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1695**, 189-207.
- **Ananthan J, Goldberg AL, Voellmy R.** (1986) Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes. *Science*. **232**, 522-524.
- **Arnold CS, Johnson GV, Cole RN, Dong DL, Lee M, Hart GW.** (1996) The microtubule-associated protein tau is extensively modified with O-linked N-acetylglucosamine. *J. Biol. Chem.* **271**, 28741-28744.
- ✗ • **Arvanitis DL, Arvanitis LD, Panourias IG, Kitsoulis P, Kanavaros P.** (2005) Mitochondria-rich normal, metaplastic, and neoplastic cells show overexpression of the epitope H recognized by the monoclonal antibody H. *Pathol Res Pract*. **201**, 319-324.

B

- **Bardwell JCA, Craig E.** (1983) Major heat shock gene of *Drosophila* and the *Escherichia coli* heat-inducible *dnaK* gene are homologous. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **83**, 848-852.
- **Benaroudj N, Goldberg AL.** (2000) PAN, the proteasome-activating nucleotidase from archaeobacteria, is a protein-unfolding molecular chaperone. *Nature Cell Biology*. **2**, 833-839.
- **Benaroudj N, Zwickl P, Seemüller E, Baumeister W, Goldberg AL.** (2003) ATP hydrolysis by the proteasome regulatory complex PAN serves multiple functions in protein degradation. *Molecular Cell*. **11**, 69-78.
- **Blake MJ, Fargnoli J, Gershon D, Holbrook NJ.** (1993) Concomitant decline in heat-induced hyperthermia and HSP70 mRNA expression in aged rats. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp Physiol*. **260**, R663-R667.
- **Blake MJ, Gershon D, Fargnoli J, Holbrook NJ.** (1990) Discordant expression of heat shock protein mRNAs in tissues of heat-stressed rats. *J Biol Chem*. **265**, 15275-15279.
- ✗ • **Boehmelt G, Wakeham A, Elia A, Sasaki T, Plyte S, Potter J, Yang Y, Tsang E, Ruland J, Iscove NN, Dennis JW, Mak TW.** (2000) Decreased UDP-GlcNAc levels abrogate proliferation control in EMeg32-deficient cells. *EMBO J*. **19**, 5092-5104.

- **Boice JA, Hightower LE.** (1997) A mutational study of the peptide-binding domain of Hsc70 guided by secondary structure prediction. *J Biol Chem.* **272**, 24825-24831.
- **Bonnycastle LLC, Yu CE, Hunt CR, Trask BJ, Clancy KP, Weber JL, Patterson D, Schellenberg GD.** (1994) Cloning, Sequencing, and Mapping of the Human Chromosome 14 Heat Shock Protein Gene (HSPA2). *Genomics.* **23**, 85-93.
- **Borden KLB, Freemont PS.** (1996) The RING finger domain: a recent example of a sequence-structure family. *Current opinion in structural biology.* **6**, 395-401.
- **Brazzell C, Ingolia TD.** (1984) Stimuli that induce a yeast heat shock gene fused to β -galactosidase. *Molecular and cellular biology.* **4**, 2573-2579.
- **Bukau B, Horwich AL.** (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell.* **92**, 351-366.

C

- **Cao Y, Matsumoto T, Motomura K, Ohtsuru A, Yamashita S, Kosaka M.** (1998) Impaired induction of heat shock protein implicated in decreased thermotolerance in a temperature-sensitive multinucleated cell line. *Eur. J. Physiol.* **437**, 15-20.
- **Carter S, Urbé S, Clague MJ.** (2004) The Met receptor degradation pathway. *J Biol Chem.* **279**, 52835-52839.
- **Cetinbas N, Macauley MS, Stubbs KA, Drapala R, Vocadlo DJ.** (2006) Identification of Asp174 and Asp175 as the key catalytic residues of human *O*-GlcNAcase by functional analysis of site-directed mutants. *Biochemistry.* **45**, 3835-3844.
- **Chappell TG, Konforti BB, Schmid SL, Rothman JE.** (1987) The ATPase core of a clathrin uncoating protein. *J Biol Chem.* **262**, 746-751.
- ✕ **Chen D, Juarez S, Hartweck L, Alamillo JM, Simon-Mateo C, Perez JJ, Fernandez-Fernandez MR, Olszewski NE, Garcia JA.** (2005) Identification of secret agent as the *O*-GlcNAc transferase that participates in Plum pox virus infection. *J Virol.* **79**, 9381-9387.
- **Chen S, Smith DF.** (1998) Hop as an adaptor in the Heat Shock Protein 70 (Hsp70) and Hsp90 chaperone machinery. *J Biol Chem.* **273**, 35194-35200.
- **Chen ZJ, Parent L, Maniatis T.** (1996) Site-specific phosphorylation of I κ B α by a novel ubiquitination-dependent protein kinase activity. *Cell.* **84**, 853-862.
- ✕ **Cheng X, Cole RN, Zaia J, Hart GW.** (2000) Alternative *O*-glycosylation/*O*-phosphorylation of the murine estrogen receptor beta. *Biochemistry.* **39**, 11609-11620.

- **Cheng X, Hart GW.** (1997) Glycosylation of the murine estrogen receptor-alpha. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **75**, 147-158.
- **Cheng X, Hart GW.** (2001) Alternative *O*-glycosylation/*O*-phosphorylation of serine-16 in murine estrogen receptor beta: post-translational regulation of turnover and transactivation activity. *J Biol Chem.* **276**, 10570-10575.
- **Chin DT, Kuehl L, Rechsteiner M.** (1982) Conjugation of ubiquitin to denatures hemoglobin is proportional to the rate of hemoglobin degradation in HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79**, 5857-5861.
- X • **Chou CF, Smith AJ, Omary M.B.** (1992) Characterisation and dynamics of *O*-linked glycosylation of human cytokeratin 8 and 18. *J. Biol. Chem.* **267**, 3901-3906.
- ~~X~~ • **Chou TY, Dang CV, Hart GW.** (1995) Glycosylation of the c-Myc transactivation domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**, 4417-4421.
- **Ciechanover A, Heller H, Elias S, Haas AL, Hershko A.** (1980) ATP-dependent conjugation of reticulocytes proteins with the polypeptide required for protein degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**, 1365-1368.
- **Cieniewski-Bernard C, Bastide B, Lefebvre T, Lemoine J, Mounier Y, Michalski JC.** (2004) Identification of *O*-linked N-acetylglucosamine proteins in rat skeletal muscle using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics.* **3**, 577-585.
- X • **Cole RN, Hart GW.** (1999) Glycosylation sites flank phosphorylation sites on synapsin I: *O*-linked N-acetylglucosamine residues are localized within domains mediating synapsin I interactions. *J. Neuro-Chem.* **73**, 418-428.
- **Cole RN, Hart GW.** (2001) Cytosolic *O*-glycosylation is abundant in nerve terminals. *J. Neurochem.* **79**, 1080-1089.
- **Connell P, Ballinger CA, Jiang J, Wu Y, Thompson LJ, Höhfeld J, Patterson C.** (2001) The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. *Nature Cell Biology.* **3**, 93-96.
- **Cook WJ, Jeffrey LC, Carson M, Chen Z, Pickart CM.** (1992) Structure of a diubiquitin conjugate and a model for interaction with ubiquitin conjugating enzyme (E2). *J Biol Chem.* **267**, 16467-16471.
- **Coux O, Tanaka K, Goldberg AL.** (1996) Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 801-847.

- **Cyr DM, Höhfeld J, Patterson C.** (2002) Protein quality control: U-box-containing E3 ubiquitin ligases join the fold. *TRENDS in biochemical Sciences.* **27**, 368-375.

D

- X • **Datta B, Ray MK, Chakrabarti D, Wylie DE, Gupta NK.** (1989) Glycosylation of eukaryotic peptide chain initiation factor 2 (eIF-2)-associated 67-kDa polypeptide (p67) and its possible role in the inhibition of eIF-2 kinase-catalyzed phosphorylation of the eIF-2 α -subunit. *J Biol Chem.* **264**, 20620-20624.
- **De Jong L, Moreau X, Jean S, Scher O, Thiéry A.** (2006) Expression of the heat shock protein Hsp70 in chloride target cells of mayfly larvae from motorway retention pond: a biomarker of osmotic shock. *Science of the total environment.* Epub ahead of print.
- **Demand J, Lüders J, Höhfeld J.** (1998) The carboxy-terminal domain of Hsc70 provides binding sites for a distinct set of chaperone cofactors. *Molecular and cellular biology.* **18**, 2023-2028.
- **Denisenko O, Yarchuk O.** (1990) Heat shock translational control in cell-free system. *Antonie van Leeuwenhoek.* **58**, 163-168.
- X • **Dieckmann-Schuppert A, Bause E, Schwarz RT.** (1993) Studies on *O*-glycans of *Plasmodium-falciparum*-infected human erythrocytes. Evidence for *O*-GlcNAc and *O*-GlcNAc-transferase in malaria parasites. *Eur J Biochem.* **216**, 779-788.
- **Diehl JA, Zindy F, Sherr CJ.** (1997) Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.* **15**, 957-972.
- X • **Ding M, Vandre DD.** (1996) High molecular weight microtubule-associated proteins contain *O*-linked-N-acetylglucosamine. *J Biol Chem.* **271**, 12555-12561.
- **Ding XZ, Tsokos GC, Kiang JG.** (1998) Overexpression of HSP-70 inhibits the phosphorylation of HSF1 by activating protein phosphatase and inhibiting protein kinase activity. *FASEB J.* **12**, 451-459.
- **Dong DL, Hart GW.** (1994) Purification and characterisation of an *O*-GlcNAc selective *N*-acetyl-beta-D-glucosaminidase from rat spleen cytosol. *J Biol Chem.* **269**, 19321-19330.
- X • **Dong DL, Xu ZS, Chevrier MR, Cotter RJ, Cleveland DW, Hart GW.** (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 DL, Xu ZS, Hart GW, Cleveland DW.** (1996) Cytoplasmic *O*-GlcNAc modification of the head domain and the KSP repeat motif of the neurofilament protein neurofilament-H. *J Biol Chem.* **271**, 20845-20852.

E

- **Eddy EM.** (1998) HSP70-2 heat-shock protein of mouse spermatogenic cells. *J Exp Zool.* **282**, 261-71.
- **Eddy EM.** (1999) Role of heat shock protein HSP70-2 in spermatogenesis. *Rev Reprod.* **4**, 23-30. Review.
- **Ellis RJ, van der Vies SM, Hemmingsen SM.** (1989) The molecular chaperone concept. *Biochem Soc Symp.* **55**, 145-153.
- **Esser C, Alberti S, Höhfeld J.** (2004) Cooperation of a molecular chaperones with the ubiquitin/proteasome system. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1695**, 171-188.

F

- X • **Fang B, Miller MW.** (2001) Use of galactosyltransferase to assess the biological function of *O*-linked *N*-acetyl- β -glucosamine: a potential role for *O*-GlcNAc during cell division. *Experimental Cell Research.* **263**, 243-253.
- **Farook VS, Bogardus C, Prochazka M.** (2002) Analysis of MGEA5 on 10q24.1-q24.3 encoding the beta-*O*-linked *N*-acetylglucosaminidase as a candidate gene for type 2 diabetes mellitus in Pima Indians. *Mol Genet Metab.* **77**, 189-193.
- **Fathallah D, Cherif D, Dellagi K, Arnaout MA.** (1993) Molecular cloning of a novel human Hsp70 from a B cell line and its assignment to chromosome 5. *The journal of immunology.* **151**, 810-813.
- **Fleshner M, Johnson JD.** (2005) Endogenous extra-cellular heat shock protein 72: releasing signal(s) and function. *Int. J. Hyperthermia.* **21**, 457-471.
- **Flick K, Ouni I, Wohlschlegel JA, Capati C, McDonald WH, Yates JR, Kaiser P.** (2004) Proteolysis-independent regulation of the transcription factor Met4 by a single Lys 48-linked ubiquitin chain. *Nature Cell Biology.* **6**, 634-641.
- **Fourie AM, Sambrook JF, Gething MJH.** (1994) Common and divergent peptide binding specificities of Hsp70 molecular chaperones. *J Biol Chem* **269**, 30470-30478.

- **Freeman BC, Myers MP, Schumacher R, Morimoto RI.** (1996) Identification of a regulatory motif in Hsp70 rat affects ATPase activity, substrate binding and interaction with HDJ-1. *The EMBO Journal*. **14**, 2281-2292.

G

- X • **Gandy JC, Rountree AE, Bijur GN.** (2006) Akt1 is dynamically modified with *O*-GlcNAc following treatments with PUGNAc and insulin-like growth factor-1. *FEBS Lett*. **580**, 3051-3058.
- **Gao Y, Wells L, Comer FI, Parker GJ, Hart GW.** (2001) Dynamic *O*-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: cloning and characterization of a neutral, cytosolic beta-N-acetylglucosaminidase from human brain. *J Biol Chem*. **276**, 9838-9845.
- **Gething MJ, Sambrook J.** (1992) Protein folding in the cell. *Nature*. **355**, 33-45.
- **Gewinner C, Hart GW, Zachara N, Cole R, Beisenherz-Huss C, Groner B.** (2004) The coactivator of transcription CREB-binding protein interacts preferentially with the glycosylated form of Stat5. *J Biol Chem* **279**, 3563-3572.
- **Glotzer M, Murray AW, Kirschner MW.** (1991) Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature*. **349**, 100-101.
- **Gottlieb TM, Jackson SP.** (1993) The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell*. **72**, 131-142.
- **Gragerov A, Gottesman ME.** (1994) Different peptide binding specificities of hsp70 family members. *J Mol Biol*. **241**, 133-135.
- **Griffith LS, Mathes M, Schmitz B.** (1995) Beta-amyloid precursor protein is modified with *O*-linked N-acetylglucosamine. *J Neurosci Res*. **41**, 270-278.
- X • **Griffith LS, Schmitz B.** (1999) *O*-linked N-acetylglucosamine levels in cerebellar neurons respond reciprocally to perturbations of phosphorylation. *Eur J Biochem*. **262**, 824-831.
- **Gross BJ, Kraybill BC, Walker S.** (2005) Discovery of *O*-GlcNAc transferase inhibitors. *J Am Chem Soc*. **127**, 14588-14589.
- **Grossman SR, Deato ME, Brignone C, Chan HM, Kung AL, Tagami H, Nakatani Y, Livingston DM.** (2003) Polyubiquitination of p53 by a Ubiquitin Ligase Activity of p300. *The American Association for the Advancement of Science*. **300**, 342-344.
- **Gülow K, Bienert D, Haas IG.** (2002) BiP is feed-back regulated by control of protein translocation efficiency. *Journal of Cell Science*. **115**, 2443-2452.

- **Gyrd-Hansen M, Nylandsted J, Jaattela M.** (2004) Heat shock protein 70 promotes cancer cell viability by safeguarding lysosomal integrity. *Cell Cycle*. **3**, 1484-1485.

H

- ✗ • **Hagmann J, Grob M, Burger MM.** (1992) The cytoskeletal protein talin is *O*-glycosylated. *J Biol Chem*. **267**, 14424-14428.
- **Halladay JT, Craig EA.** (1995) A heat shock transcription factor with reduced activity suppresses a yeast HSP70 mutant. *Molecular and cellular biology*. **15**, 4890-4897.
- **Haltiwanger RS, Blomberg MA, Hart GW.** (1992) Glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins. Purification and characterization of a uridine diphospho-*N*-acetylglucosamine:polypeptide beta-*N*-acetylglucosaminyltransferase. *J Biol Chem*. **267**, 9005-9013.
- **Haltiwanger RS, Grove K, Philipsberg GA.** (1998) Modulation of *O*-linked *N*-acetylglucosamine levels on nuclear and cytoplasmic proteins in vivo using the peptide *O*-GlcNAc-beta-*N*-acetylglucosaminidase inhibitor *O*-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene)amino-*N*-phenylcarbamate. *J Biol Chem*. **273**, 3611-3617.
- ✗ • **Haltiwanger RS, Holt GD, Hart GW.** (1990) Enzymatic addition of *O*-GlcNAc to nuclear and cytoplasmic proteins. Identification of a uridine diphospho-*N*-acetylglucosamine:peptide beta-*N*-acetylglucosaminyltransferase. *J Biol Chem*. **265**, 2563-2568.
- ✗ • **Haltiwanger RS, Philipsberg GA.** (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.
- **Hamman BD, Hendershot LM, Johnson AE.** (1998) BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the luminal end of the translocon pore before and early in translocation. *Cell*. **92**, 747-758.
- **Hammond C, Helenius A.** (1995) Quality control in the secretory pathway. *Current biology*. **7**, 523-529.
- ✗ • **Han I, Kudlow JE.** (1997) Reduced *O* glycosylation of Sp1 is associated with increased proteasome susceptibility. *Mol Cell Biol*. **17**, 2550-2558.
- ✗ • **Hanover JA, Forsythe ME, Hennessey PT, Brodigan TM, Love DC, Ashwell G, Krause M.** (2005) A *Caenorhabditis elegans* model of insulin resistance: altered

macronutrient storage and dauer formation in an OGT-1 knockout. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**, 11266-11271.

- **Hanover JA, Lai Z, Lee G, Lubas WA, Sato SM.** (1999) Elevated *O*-linked *N*-acetylglucosamine metabolism in pancreatic beta-cells. *Arch Biochem Biophys.* **362**, 38-45.
- **Hartmann-Petersen R, Seeger M, Gordon C.** (2003) Transferring substrates to the 26S proteasome. *Trends in Biochemical Sciences.* **28**, 26-31.
- **Hartweck LM, Scott CL, Olszewski NE.** (2002) Two *O*-linked *N*-acetylglucosamine transferase genes of *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. Have overlapping functions necessary for gamete and seed development. *Genetics.* **161**, 1279-1291.
- **Hartwell LH, Kastan MB.** (1994) Cell Cycle Control and Cancer. *Science.* **266**, 1821-1828.
- **Hatakeyama S, Matsumoto M, Yada M, Nakayama KI.** (2004) Interaction of U-box-type ubiquitin-protein ligases (E3s) with molecular chaperones. *Genes to cell.* **9**, 533-548.
- ✗ • **Hatsell S, Medina L, Merola J, Haltiwanger R, Cowin P.** (2003) Plakoglobin is *O*-glycosylated close to the N-terminal destruction box. *J Biol Chem.* **278**, 37745-37752.
- **Haucke V, Horst M, Schatz G, Lithgow T.** (1996) The Mas20p and Mas70p subunits of the protein import receptor of yeast mitochondria interact via the tetratricopeptide repeat motif in Mas20p: evidence for a single hetero-oligomeric receptor. *EMBO J.* **15**, 1231-1237.
- **He B, Bai S, Hna AT, Kalman RI, Minges JT, Patterson C, Wilson EM.** (2004) An androgen receptor NH₂-terminal conserved motif interacts with the COOH terminus of the Hsp70-interacting protein (CHIP). *J Biol Chem.* **279**, 30643-30653.
- **Hebert LF, Daniels MC, Zhou J, Crook ED, Turner RL, Simmons ST, Neidigh JL, Zhu JS, Baron AD, McClain DA.** (1996) Overexpression of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase in transgenic mice leads to insulin resistance. *J. Clin Invest.* **98**, 930-936.
- **Heckel D, Comtesse N, Brass N, Blin N, Zand KD, Meese E.** (1998) Novel immunogenic antigen homologous to hyaluronidase in meningioma. *Hum. Mol. Genet.* **7**, 1859-1872.

- **Hendershot LM, Valentine VA, Lee AS, Morris SW, Shapiro DN.** (1994) Localization of the Gene Encoding Human BiP/GRP78, the Endoplasmic Reticulum Cognate of the HSP70 Family, to Chromosome 9q34. *Genomics* **20**, 281-284.
- **Hershko A, Ciechanover A, Heller H, Haas AL, Rose IA.** (1980) Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of proteins with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**, 1783-1786.
- **Hershko A, Ciechanover A, Rose IA.** (1979) Resolution of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes: a component that interacts with ATP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**, 3107-3110.
- **Hershko A, Ciechanover A.** (1998) The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 425-479.
- **Hershko A, Heller H, Elias S, Ciechanover A.** (1983) Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J Biol Chem* **258**, 8206-8214.
- **Hirano T, Kinoshita N, Morikawa K, Yanagida M.** (1990) Snap helix with knob and hole: essential repeats in *S. pombe* nuclear protein nuc2+. *Cell.* **60**, 319-328.
- **Hochstrasser M.** (1996) Protein degradation or regulation: Ub the judge. *Cell.* **84**, 813-815.
- **Hoj A, Jakobsen BK.** (1994) A short element required for turning off heat shock transcription factor: evidence that phosphorylation enhances deactivation. *The EMBO journal.* **13**, 2617-2624.
- **Holt G.D, Hart GW.** (1986) The subcellular distribution of terminal N-acetylglucosamine moieties. Localization of a novel protein-saccharide linkage, O-linked GlcNAc. *J Biol Chem.* **261**, 8049-8057.
- **Holt GD, Snow CM, Senior A, Haltiwanger RS, Gerace L, Hart GW.** (1987) Nuclear pore complex glycoproteins contain cytoplasmically disposed O-linked N-acetylglucosamine. *J Cell Biol.* **104**, 1157-1164.
- **Huang L, Kinnucan E, Wang G, Beaudenon S, Howley PM, Huibregtse JM, Pavletich NP.** (1999) Structure of an E6AP-UbcH7 Complex: Insights into Ubiquitination by the E2-E3 Enzyme Cascade. *The American Association for the Advancement of Science.* **286**, 1321-1326.

I

- **Ihara Y, Cohen-Doyle MF, Saito Y, Williams DB.** (1999) Calnexin discriminates between protein conformational states and functions as a molecular chaperone in vitro. *Molecular Cell.* **4**, 331-341.
- ✗ • **Inaba M, Maede Y.** (1989) *O*-N-acetyl-D-glucosamine moiety on discrete peptide of multiple protein 4.1 isoforms regulated by alternative pathways. *J Biol Chem.* **264**, 18149-18155.
- ✗ • **Iyer SP, Akimoto Y, Hart GW.** (2003) Identification and cloning of a novel family of coiled-coil domain proteins that interact with *O*-GlcNAc transferase. *J Biol Chem.* **278**, 5399-5409.

J

- ✗ • **Jackson SP, Tjian R.** (1988) *O*-glycosylation of eukaryotic transcription factors : implications for mechanisms of transcriptional regulation. *Cell.* **55**, 125-133.
- **Jacobsen SE, Olszewski NE.** (1993) Mutations at the SPINDLY locus of arabidopsis alter gibberellin signal transduction. *The plant cell.* **5**, 887-896.
- **James LR, Tang D, Ingram A, Ly H, Thai K, Cai L, Scholey JW.** (2002) Flux through the hexosamines pathway is a determinant of nuclear factor kappaB-dependent promoter activation. *Diabetes.* **51**, 1146-1156.
- **Jentsch S, Pyrowolakis G.** (2000) Ubiquitin and its kin: how close are the family ties? *Trends in Cell Biology.* **10**, 335-342.
- **Jiang J, Ballinger CA, Wu Y, Dai Q, Cyr DM, Höhfeld J, Patterson C.** (2001) CHIP is a U-box-dependent E3 ubiquitin ligase. *J Biol Chem.* **276**, 42938-42944.
- **Jiang J, Lafer EM, Sousa R.** (2006) Crystallization of a functionally intact Hsc70 chaperone. *Acta Crystallograph Sect F Struct Biol Cryst Commun.* **62**, 39-43.
- **Jiang J, Prasad K, Lafer EM, Sousa R.** (2005) Structural basis of interdomain communication in the Hsc70 chaperone. *Molecular Cell.* **20**, 513-524.
- ✗ • **Jiang MS, Hart GW.** (1997) A subpopulation of estrogen receptors are modified by *O*-linked *N*-acetylglucosamine. *J Biol Chem.* **272**, 2421-2428.
- **Juang YT, Solomou EE, Rellahan B, Tsokos GC** (2002) Phosphorylation and *O*-linked glycosylation of Elf-1 leads to its translocation to the nucleus and binding to the promoter of the TCR zeta-chain. *J. Immunol.* **168**, 2865-2871.

K

- **Kalchman MA, Graham RK, Xia G, Koide HB, Hodgson JG, Graham KC, Goldberg YP, Gietz RD, Pickart CM, Hayden MR.** (1996) Huntingtin is ubiquitinated and interacts with a specific ubiquitin-conjugating enzyme. *J Biol Chem.* **271**, 19385-19394.
- X • **Kearse KP, Hart GW.** (1991a) Lymphocyte activation induces rapid changes in nuclear and cytoplasmic glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci.* **88**, 1701-1705.
- **Kearse KP, Hart GW.** (1991b) Topology of *O*-linked N-acetylglucosamine in murine lymphocytes. *Arch Biochem Biophys.* **290**, 543-548.
- **Kearse KP, Williams DB, Singer A.** (1994) Persistence of glucose residues on core oligosaccharides prevents association of TCR α and TCR β proteins with calnexin and results specifically in accelerated degradation of nascent TCR α proteins within the endoplasmic reticulum. *The EMBO Journal.* **13**, 3678-3686.
- **Kelley PM, Schlesinger MJ.** (1978) The effect of amino acid analogues and heat shock on gene expression in chicken embryo fibroblasts. *Cell.* **15**, 1277-1286.
- X • **Kelly WG, Dahmus ME, Hart GW.** (1993) RNA polymerase II is a glycoprotein. Modification of the COOH-terminal domain by *O*-GlcNAc. *J Biol Chem.* **268**, 10416-10424.
- X • **Kelly WG, Hart GW.** (1989) Glycosylation of chromosomal proteins: localization of *O*-linked *N*-acetylglucosamine in *Drosophila* chromatin. *Cell.* **57**, 243-251.
- **Kim D, Li GC.** (1999) Proteasome inhibitors lactacystin and MG132 inhibit the dephosphorylation of HSF1 after heat shock and suppress thermal induction of heat shock gene expression. *Bioch. Biophys. Res. Comm.* **264**, 352-358.
- **Kim EJ, Kang DO, Love DC, Hanover JA.** (2006) Enzymatic characterization of *O*-GlcNAcase isoforms using a fluorogenic GlcNAc substrate. *Carbohydr Res.* **341**, 971-982.
- **Kim TK, Maniatis T.** (1996) Regulation of Interferon-gamma-Activated STAT1 by the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *The American Association for the Advancement of Science.* **273**, 1717-1719.
- **King IA, Hounsell EF.** (1989) Cytokeratin 13 contains *O*-glycosidically linked *N*-acetylglucosamine residues. *J Biol Chem.* **264**, 14022-14028.

- **King RW, Glotzer M, Kirschner MW.** (1996) Mutagenic analysis of the destruction signal of mitotic cyclins and structural characterization of ubiquitinated intermediates. *Molecular Biology of the Cell.* **7**, 1343-1357.
- **Kisselev AF, Akopian TN, Woo KM, Goldberg AL.** (1999) The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26S and 20S protéasomes: implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *J Biol Chem* **274**, 3363-3371.
- **Kisselev AF, Garcia-Calvo M, Overkleeft HS, Peterson E, Pennington MW, Ploegh HL, Thornberry NA, Goldberg AL.** (2003) The caspase-like sites of protéasomes: substrate specificity, new inhibitors and substrates, and allosteric interactions with the trypsin-like sites. *J Biol Chem* **278**, 35869-35877.
- ✗ **Kneass ZT, Marchase RB.** (2004) Neutrophils exhibit rapid agonist-induced increases in protein-associated *O*-GlcNAc. *J Biol Chem.* **279**, 45759-45765.
- **Koegl M, Hoppe T, Schlenker S, Ulrich HD, Mayer TU, Jentsch S.** (1999) A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell.* **96**, 635-644.
- **Konrad RJ, Mikolaenko I, Tolar JF, Liu K, Kudlow JE.** (2001) The potential mechanism of the diabetogenic action of streptozotocin: inhibition of pancreatic beta-cell *O*-GlcNAc-selective *N*-acetyl-beta-D-glucosaminidase. *Biochem J.* **356**, 31-41.
- **Kreppel LK, Blomberg MA, Hart GW.** (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**, 9308-1935.
- **Kreppel LK, Hart GW.** (1999) Regulation of a cytosolic and nuclear *O*-GlcNAc transferase. Role of the tetratricopeptide repeats. *J Biol Chem.* **274**, 32015-32022.
- ✗ **Ku NO, Omary MB.** (1995) Identification and mutational analysis of the glycosylation sites of human keratin 18. *J Biol Chem.* **270**, 11820-1187.

L

- **Lamarre-Vincent N, Hsieh-Wilson LC.** (2003) Dynamic glycosylation of the transcription factor CREB : a potential role in gene regulation. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 6612-6613.
- **Lamb JR, Tugendreich S, Hieter P.** (1995) Tetratricopeptide repeat interactions: to TPR or not to TPR? *TIBS.* **20**, 257-259.

- **Lee JS, Seo JS.** (2002) Differential expression of two stress-inducible hsp70 genes by various stressors. *Exp Mol Med* **34**, 131-136.
- **Lefebvre T, Alonso C, Mahboub S, Dupire MJ, Zanetta JP, Caillet-Boudin ML, Michalski JC.** (1999) Effect of okadaic acid on *O*-linked N-acetylglucosamine levels in a neuroblastoma cell line. *Biochim Biophys Acta.* **1472**, 71-81.
- **Lefebvre T, Baert F, Bodart JF, Flament S, Michalski JC, Vilain JP.** (2004) Modulation of *O*-GlcNAc glycosylation during *Xenopus* oocyte maturation. *J Cell Biochem.* **93**, 999-1010.
- **Lefebvre T, Cieniewski C, Lemoine J, Guerardel Y, Leroy Y, Zanetta JP, Michalski JC.** (2001) Identification of N-acetyl-d-glucosamine-specific lectins from rat liver cytosolic and nuclear compartments as heat-shock proteins. *Biochem J.* **360**, 179-188.
- **Lefebvre T, Ferreira S, Dupont-Wallois L, Bussiere T, Dupire MJ, Delacourte A, Michalski JC, Caillet-Boudin ML.** (2003) Evidence of a balance between phosphorylation and *O*-GlcNAc glycosylation of Tau proteins--a role in nuclear localization. *Biochim Biophys Acta.* **1619**, 167-176.
- **Lefebvre T, Pinte S, Guerardel C, Deltour S, Martin-Soudant N, Slomianny MC, Michalski JC, Leprince D.** (2004) The tumor suppressor HIC1 (hypermethylated in cancer 1) is *O*-GlcNAc glycosylated. *Eur J Biochem.* **271**, 3843-3854.
- **Lefebvre T, Planque N, Leleu D, Bailly M, Caillet-Boudin ML, Saule S, Michalski JC.** (2002) *O*-glycosylation of the nuclear forms of Pax-6 products in quail neuroretina cells. *J Cell Biochem.* **85**, 208-128.
- **Leung TK, Hall C, Rajendran M, Spurr NK, Lim L.** (1992) The human heat-shock genes HSPA6 and HSPA7 are both expressed and localize to chromosome 1. *Genomics.* **12**, 74-79.
- **Li GC, Li L, Liu WK, Mak JY, Chen L, Lee WMF.** (1991) Thermal response of rat fibroblasts stably transfected with the human 70-kDa heat shock protein-encoding gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**, 1681-1685.
- **Li GC, Yang SH, Kim D, Mussenweig A, Ouyyang H, Wei J, Burgman P, Li L.** (1995) Suppression of heat-induced hsp70 expression by the 70-kDa subunit of the human Ku autoantigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 4512-4516.

- **Liao WJ, Fan PS, Fu M, Fan XL, Liu YF** (2005) Increased expression of 70 kD heat shock protein in cultured primary human keratinocytes induced by human papillomavirus 16 E6/E7 gene. *Chinese Medical Journal*. **118**, 2058-2062.
- **Lindquist S.** (1986) The heat-shock response. *Ann. Rev. Biochem.* **55**, 1151-1191.
- **Liu FH, Wu SJ, Hu SM, Hsiao CD, Wang C.** (1999) Specific interaction of the 70-kDa heat shock cognate protein with the tetratricopeptides repeats. *J Biol Chem* **274**, 34425-34432.
- **Love DC, Hanover JA.** (2005) The hexosamine signaling pathway: deciphering the "O-GlcNAc code". *Sci STKE*. (312):re13. Review.
- **Lu A, Ran RQ, Clark J, Reilly M, Nee A, Sharp FR.** (2002) 17-beta-estradiol induces heat shock proteins in brain arteries and potentiates ischemic heat shock protein induction in glia and neurons. *J Cereb Blood Flow Metab.* **22**, 183-195.
- **Lubas WA, Frank DW, Krause M, Hanover JA.** (1997) O-linked GlcNAc transferase is a conserved nucleocytoplasmic protein containing tetratricopeptide repeats. *J Biol Chem.* **272**, 9316-9324.
- **Lubas WA, Hanover JA.** (2000) Functional expression of O-linked GlcNAc transferase. Domain structure and substrate specificity. *J Biol Chem.* **275**, 10983-10988.
- **Lüders J, Demand J, Höhfeld J.** (2000) The ubiquitin-related BAG-1 provides a link between the molecular chaperones Hsc70/Hsp70 and the proteasome. *J Biol Chem.* **275**, 4613-4617.
- **Lyman SK, Schekman R** (1997) Binding of secretory precursor polypeptides to a translocon subcomplex is regulated by BiP. *Cell.* **88**, 85-96.

M

- ✕ • **Marshall S, Bacote V, Traxinger RR.** (1991) Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitisation of the glucose transport system. Role of hexosamines biosynthesis in the induction of insulin resistance. *J Biol Chem.* **266**, 4706-4712.
- ✕ • **Mason GGF, Murray RZ, Pappin D, Rivett AJ.** (1998) Phosphorylation of ATPase subunits of the 26S proteasome. *FEBS Letters.* **430**, 269-274.
- **Mayer MP, Bukau B.** (2005) Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell. Mol. Life. Sci.* **62**, 670-684.

- **Meacham GC, Patterson C, Zhang W, Younger JM, Cyr DM.** (2001) The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. *Nature Cell Biology.* **3**, 100-105.
- **Medina L., Grove K, Haltiwanger RS.** (1998) SV40 large T antigen is modified with *O*-linked *N*-acetylglucosamine but not with other forms of glycosylation. *Glycobiology.* **8**, 383-391.
- **Mestril R, Chi SH, Sayen MR, Dillmann WH.** (1994) Isolation of a novel inducible rat heat-shock protein (HSP70) gene and its expression during ischaemia/hypoxia and heat shock. *Biochem. J.* **298**, 561-569.
- **Milarski KL, Morimoto RI.** (1989) Mutational analysis of the human HSP70 protein: distinct domains for nucleolar localization and adenosine triphosphate binding. *The journal of cell biology.* **109**, 1947-1962.
- **Milner CM, Campbell RD.** (1992) Genes, genes and more genes in the human major histocompatibility complex. *Bioessays.* **14**, 565-571.
- **Minami Y, Hohfeld J, Ohtsuka K, Hartl FU.** (1996) Regulation of the heat-shock protein 70 reaction cycle by the mammalian DnaJ homolog, Hsp40. *J Biol Chem.* **271**, 19617-19624.
- **Mivechi NF, Giaccia A.** (1995) Mitogen activated protein kinase acts as a negative regulator of the heat shock response in NTH3T3. *Cancer.* **55**, 5512-5519.
- **Morishima N.** (2005) Control of cell fate by Hsp70: more than an evanescent meeting. *J Biochem.* **137**, 449-453. Review.
- **Morris JA, Dorner AJ, Edwards CA, Hendershot LM, Kaufman RJ.** (1997) Immunoglobulin binding protein (BiP) function is required to protect cells from endoplasmic reticulum stress but is not required for the secretion of selective proteins. *J Biol Chem.* **272**, 4327-4334.
- **Morshauer RC, Hu W, Wang H, Pang Y, Flynn GC, Zuiderweg ERP.** (1999) High-resolution solution structure of the 18kDa substrate-binding domain of the mammalian chaperone protein Hsc70. *J.Mol. Biol.* **289**, 1387-1403.
- **Morshauer RC, Wang H, Flynn GC, Zuiderweg ERP.** (1995) The peptide-binding domain of the chaperone protein Hsc70 has an unusual secondary structure topology. *Biochemistry.* **34**, 6261-6266.

N

- **Nolte D, Muller U.** (2002) Human *O*-GlcNAc transferase (OGT): genomic structure, analysis of splice variants, fine mapping in Xq13.1. *Mamm Genome*. **13**, 62-64.

O

- **O'Donnell N, Zachara NE, Hart GW, Marth JD.** (2004) Ogt-dependent X-chromosome-linked protein glycosylation is a requisite modification in somatic cell function and embryo viability. *Mol Cell Biol*. **24**, 1680-1690.
- **Ou WJ, Bergeron JJM, Li Y, Kang CY, Thomas DY.** (1995) Conformational changes induced in the endoplasmic reticulum luminal domain of calnexine by Mg-ATP and Ca²⁺. *J Biol Chem*. **270**, 18051-18059.

P

- **Parker G, Taylor R, Jones D, McClain D.** (2004) Hyperglycemia and inhibition of glycogen synthase in streptozotocin-treated mice: role of *O*-linked N-acetylglucosamine. *J Biol Chem*. **279**, 20636-20642.
- **Parker GJ, Lund KC, Taylor RP, McClain DA.** (2003) Insulin resistance of glycogen synthase mediated by *O*-linked N-acetylglucosamine. *J Biol Chem*. **278**, 10022-10027.
- **Parsell DA, Lindquist S.** (1993) The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu. Rev. Genet.* **27**, 437-496.
- **Patel S, Latterich M.** (1998) The AAA team: related ATPases with diverse functions. *Trends in Cell Biology*. **8**, 65-71.
- **Peng J, Schwartz D, Elias JE, Thoreen CC, Cheng D, Marsischky G, Roelofs J, Finley D, Gygi SP.** (2003) A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nature biotechnology*. **21**, 921-926.
- **Peterson JR, Ora A, Van PN, Helenius A.** (1995) Transient, lectin-like association of calreticulin with folding intermediates of cellular and viral glycoproteins. *Molecular Biology of Cell*. **6**, 1173-1184.
- **Pickart CM, Fushman D.** (2004) Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Current Opinion in Chemical Biology*. **8**, 610-616.
- **Pol-Rodriguez MM, Schwartz GA, English AW.** (2001) Post-translational phosphorylation of the low/beta myosin heavy chain isoform in adult rabbit masseter muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **22**, 513-519.

- ✗ • **Pulverer BJ, Fisher C, Vousden K, Littlewood T, Evan G, Woodgett JR.** (1994) Site-specific modulation of c-Myc cotransformation by residues phosphorylated in vivo. *Oncogene*. **9**, 59-70.

R

- **Rajagopalan S, Xu Y, Brenner MB.** (1994) Retention of unassembled components of integral membrane proteins by calnexin. *Science*. **263**, 387-390.
- **Ramakrishnan M, Tugizov S, Pereira L, Lee AS.** (1995) Conformation-defective herpes simplex virus 1 glycoprotein B activates the promoter of the grp94 gene that codes for the 94-kD stress protein in the endoplasmic reticulum. *DNA Cell Biol*. **14**, 373-384.
- **Rameau G, Puglia K, Crowe A, Sethy I, Willis I.** (1994) A mutation in the second largest subunit of TFIIC increases a rate-limiting step in transcription by RNA polymerase III. *Mol. Cell. Biol*. **14**, 822-830.
- ✗ • **Ray MK, Datta B, Chakraborty A, Chattopadhyay A, Leza-Keuthen S, Gupta NK.** (1992) The eukaryotic initiation factor 2-associated 67-kDa polypeptide (p⁶⁷) plays a critical role in regulation of protein synthesis initiation in animal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **89**, 539-543.
- **Rechsteiner M, Rogers SW.** (1996) PEST sequences and regulation by proteolysis. *TIBS*. **21**, 267-271.
- **Ritossa FM.**(1962) A new puffing pattern induced by a temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experimenta*. **18**, 571-573.
- **Robertson LA, Moya KL, Breen KC.** (2004) The potential role of tau protein O-glycosylation in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. **6**, 489-495.
- ✗ • **Robinson KA, Weinstein ML, Lindenmayer GE, Buse MG.** (1995) effects of diabetes and hyperglycemia on the hexosamine synthesis pathway in rat muscle and liver. *Diabetes*. **44**, 1438-1446.
- **Rogers S, Wells R, Rechsteiner M.** (1986) Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science*. **17**, 364-368.
- ✗ • **Roos MD, Su K, Baker JR, Kudlow JE.** (1997) O-glycosylation of an Sp1-derived peptide blocks known Sp1 protein interactions. *Mol Cell Biol*. **17**, 6472-6480.
- ✗ • **Roquemore EP, Chevrier MR, Cotter RJ, Hart GW.** (1996) Dynamic O-GlcNAcylation of the small heat shock protein alpha B-crystallin. *Biochemistry*. **35**, 3578-3586.

- ✗ • **Roquemore EP, Dell A, Morris HR, Panico M, Reason AJ, Savoy LA, Wistow GJ, Zigler JS Jr, Earles BJ, Hart GW.** (1992) Vertebrate lens alpha-crystallins are modified by *O*-linked *N*-acetylglucosamine. *J Biol Chem.* **267**, 555-563.

S

- **Sahara N, Murayama M, Mizoroki T, Urushitani M, Imai Y, Takahashi R, Murata S, Tanaka K, Takashima A.** (2005) In vivo evidence of CHIP up-regulation attenuating tau aggregation. *Journal of Neurochemistry.* **94**, 1254-1263.
- **Sargent CA, Dunham I, Trowsdale J, Campbell RD.** (1989) Human major histocompatibility complex contains genes for the major heat shock protein HSP70. *Immunology.* **86**, 1968-1972.
- **Satyal SH, Chen D, Fox SG, Kramer JM, Morimoto RI.** (1998) Negative regulation of the heat shock transcriptional response by HSBP1. *Genes and Dev.* **12**, 1962-1974.
- ✗ • **Schirm M, Kalmokoff M, Aubry A, Thibault P, Sandoz M, Logan SM.** (2004) Flagellin from *Listeria monocytogenes* is glycosylated with β -*O*-linked *N*-acetylglucosamine. *Journal of Bacteriology.* **186**, 6721-6727.
- **Schultz J, Marshall-Carlson L, Carlson M.** (1990) The N-terminal TPR region is the functional domain of SSN6, a nuclear phosphoprotein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 4744-4756.
- **Schultz J, Pils B.** (2002) Prediction of structure and functional residues for *O*-GlcNAcase, a divergent homologue of acetyltransferases. *FEBS Lett.* **529**, 179-182.
- **Schwartz DC, Hochstrasser M.** (2003) A superfamily of protein tags: ubiquitin, SUMO and related modifiers. *Trends in biochemical Sciences.* **28**, 321-328.
- **Sciandra JJ, Subjectk JR.** (1983) The effects of glucose on protein synthesis and thermosensitivity in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* **258**, 12091-12093.
- **Selkoe DJ.** (2001) Presenilin, Notch, and the genesis and treatment of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 11039-11041.
- ✗ • **Shaw P, Freeman J, Bovey R, 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.
- **Shyu WC, Chen CP, Saeki K, Kubosaki A, Matusmoto Y, Onodera T, Ding DC, Chiang MF, Lee YJ, Lin SZ, Li H.** (2005) Hypoglycemia enhances the expression of prion protein and heat-shock protein 70 in a mouse neuroblastoma cell line. *J Neurosci Res.* **80**, 887-894.

- ✗ • **Slawson C, Pidala J, Potter R.** (2001) Increased N-acetyl-beta-glucosaminidase activity in primary breast carcinomas corresponds to a decrease in N-acetylglucosamine containing proteins. *Biochim Biophys Acta.* **1537**, 147-157.
- ✗ • **Slawson C, Shafii S, Amburgey J, Potter R.** (2002) Characterization of the O-GlcNAc protein modification in *Xenopus laevis* oocyte during oogenesis and progesterone-stimulated maturation. *Biochim Biophys Acta.* **1573**, 121-129.
- ✗ • **Slawson C, Zachara NE, Vosseller K, Cheung WD, Lane MD, Hart GW.** (2005) Perturbations in O-linked beta-N-acetylglucosamine protein modification cause severe defects in mitotic progression and cytokinesis. *J Biol Chem.* **280**, 32944-32956.
- **Smith DF.** (2004) Tetratricopeptide repeat cochaperones in steroid receptor complexes. *Cell Stress & chaperones.* **9**, 109-121.
- **Sohn KC, Lee KY, Park JE, Do SI.** (2004) OGT functions as a catalytic chaperone under heat stress response: a unique defense role of OGT in hyperthermia. *Bioch. and Biophys. Res. Comm.* **322**, 1045-1051.
- ✗ • **Sümegei M, Hunyadi-Gulyas E, Medzihradszky KF, Udvardy A.** (2003) 26S proteasome subunits are O-linked N-acetylglucosamine-modified in *Drosophila melanogaster*. *Bioch. Biophys. Res. Comm.* **312**, 1284-1289.
- **Svensson PE, Asea A, Englund MCO, Bausero MA, Jernas M, Wilklund O, Ohlsson B, Carlsson LMS, Carlsson B.** (2006) Major role of HSP70 as a paracrine inducer of cytokine production in human oxidized LDL treated macrophages. *Atherosclerosis.* **185**, 32-38.

T

- **Takayama S, Reed JC.** (2001) Molecular chaperone targeting and regulation by BAG family proteins. *Nat. Cell. Biol.* **3**, E237-E241.
- **Takayama S, Xie Z, Reed JC.** (1999) An evolutionarily conserved family of Hsp70/Hsc70 molecular chaperone regulators. *J Biol Chem.* **274**, 781-786.
- **Takenaka IM, Hightower LE.** (1992) Transforming growth factor-beta 1 rapidly induces Hsp70 and Hsp90 molecular chaperones in cultured chicken embryo cells. *J Cell Physiol.* **152**, 568-577.
- **Takenaka IM, Leung SM, McAndrew SJ, Brown JP, Hightower LE.** (1995) Hsc70-binding peptides selected from a phage display peptide library that resemble organellar targeting sequences. *J Biol Chem.* **270**, 19839-19844.

- **Takumida M, Anniko M.** (2005) Heat shock protein 70 delays gentamicin-induced vestibular hair cell death. *Acta Otolaryngol.* **125**, 23-28.
- **Tavaria M, Gabriele T, Anderson RL, Mirault ME, Baker E, Sutherland G, Kola I.** (1995) Localization of the gene encoding human heat shock cognate protein, HSP73, to chromosome 11. *Genomics.* **29**, 266-268.
- **Thornton TM, Swain SM, Olszewski NE.** (1999) Gibberellin signal transduction presents ellipsis to the SPY who O-GlcNAc'd me. *Trends Plant Sci.* **4**, 424-428.
- **Toleman C, Paterson AJ, Kudlow JE.** (2006) Location and characterization of the O-GlcNAcase active site. *Biochim Biophys Acta.* **1760**, 829-839.
- **Toleman C, Paterson AJ, Shin R, Kudlow JE.** (2006) Streptozotocin inhibits O-GlcNAcase via the production of a transition state analog. *Biochem Biophys Res Commun.* **340**, 526-534.
- **Toleman C, Paterson AJ, Whisenhunt TR, Kudlow JE.** (2004) Characterization of the histone acetyltransferase (HAT) domain of a bifunctional protein with activable O-GlcNAcase and HAT activities. *J Biol Chem.* **279**, 53665-53673.
- ✕ • **Torres CR, Hart GW.** (1984) Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes *J Biol Chem.* **259**, 3308-3317.
- **Townsend PA, Cutress RI, Sharp A, Brimmel M, Packham G.** (2003) BAG-1: a multifunctional regulator of cell growth and survival. *Biochim. Biophys. Acta.* **1603**, 83-89.
- **Trautinger F, Kokesch C, Klosner G, Knobler RM, Kindas-Mugge I.** (1999) Expression of the 72-kD heat shock protein is induced by ultraviolet A radiation in a human fibrosarcoma cell line. *Exp Dermatol.* **8**, 187-192.

U

- **Urano F, Bretolotti A, Ron D.** (2000) IRE1 and efferent signaling from the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Science.* **113**, 3697-3702.

V

- **Varshavsky A.** (1995) The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**, 12142-12149.
- **Vitek MP, Berger EM.** (1984) Steroid and high-temperature induction of the small heat-shock protein genes in *Drosophila*. *J Mol Biol.* **178**, 173-189.

- **Voges D, Zwickl P, Baumeister W.** (1999) The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 1015-1068.
- **Vosseller K, Wells L, Lane MD, Hart GW.** (2002) Elevated nucleocytoplasmic glycosylation by *O*-GlcNAc results in insulin resistance associated with defects in Akt activation in 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**, 5313-5318.

W

- **Walgren JL, Vincent TS, Schey KL, Buse MG.** (2003) High glucose and insulin promote *O*-GlcNAc modification of proteins, including alpha-tubulin. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **284**, E424-E434.
- **Wegele H, Müller L, Buchner J.** (2004) Hsp70 and Hsp90_a relay team for protein folding. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* **151**, 1-44.
- **Wegele H, Wandinger SK, Schmid AB, Reinstein J, Buchner J.** (2005) Substrate transfert from the chaperone Hsp70 to Hsp90. *J. Mol. Biol.* **356**, 802-811.
- **Wells L, Gao Y, Mahoney JA, Vosseller K, Chen C, Rosen A, Hart GW.** (2002a) Dynamic *O*-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: further characterization of the nucleocytoplasmic beta-N-acetylglucosaminidase, *O*-GlcNAcase. *J Biol Chem.* **277**, 1755-1761.
- **Wells L, Kreppel LK, Comer FI, Wadzinski BE, Hart GW.** (2004) *O*-GlcNAc transferase is in a functional complex with protein phosphatase 1 catalytic subunits. *J Biol Chem.* **279**, 38466-38470.
- **Wells L, Vosseller K, Cole RN, Cronshaw JM, Matunis MJ, Hart GW.** (2002b) Mapping sites of *O*-GlcNAc modification using affinity tags for serine and threonine post-translational modifications. *Mol Cell Proteomics.* **1**, 791-804.
- **Whisenhunt TR, Yang X, Bowe DB, Paterson AJ, Van Tine BA, Kudlow JE.** (2006) Disrupting the enzyme complex regulating *O*-GlcNAcylation blocks signaling and development. *Glycobiology.* **16**, 551-563.
- **Won KA, Reed SI.** (1996) Activation of cyclin E/CDK2 is coupled to site-specific autophosphorylation and ubiquitin-dependent degradation of cyclin E. *The EMBO Journal.* **15**, 4182-4193.
- **Worthylake DK, Prakash S, Prakash L, Hill CP.** (1998) Crystal structure of the *Saccharomyces cerevisiae* ubiquitin-conjugating enzyme Rad6 at 2.6 Å resolution. *J Biol Chem.* **273**, 6271-6276.

- **Wrabl JO, Grishin NV.** (2001) Homology between *O*-linked GlcNAc transferases and proteins of the glycogen phosphorylase superfamily. *J. Mol. Biol.* **314**, 365-374.
- **Wu BJ, Kingston RE, Morimoto RI.** (1986) Human HSP70 promoter contains at least two distinct regulatory domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**, 629-633.

Y

- **Yamano H, Gannon J, Hunt T.** (1996) The role of proteolysis in cell cycle progression in *Schizosaccharomyces pombe*. *The EMBO Journal.* **15**, 5268-5279.
- **Yanagisawa M, Planel E, Ishiguro K, Fujita SC.** (1999) Starvation induces tau hyperphosphorylation in mouse brain: implications for Alzheimer's disease. *FEBS Lett.* **461**, 329-333.
- **Yang J, Defranco DB.** (1994) Differential roles of heat shock protein 70 in the in vitro nuclear import of glucocorticoid receptor and simian virus 40 large tumor antigen. *Molecular and Cellular Biology.* **14**, 5088-5098.
- ✗ • **Yang X, Su K, Roos MD, Chang Q, Paterson AJ, Kudlow JE.** (2001) *O*-linkage of N-acetylglucosamine to Sp1 activation domain inhibits its transcriptional capability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**, 6611-6616.
- ✗ • **Yang X, Zhang F, Kudlow JE.** (2002) Recruitment of *O*-GlcNAc transferase to promoters by corepressor mSin3A: coupling protein *O*-GlcNAcylation to transcriptional repression. *Cell.* **110**, 69-80.
- **Yao T, Cohen RE.** (2002) A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature.* **419**, 403-407.
- **Yki-Jarvinen H, Virkamaki A, Daniels MC, McClain D, Gottschalk WK.** (1998) Insulin and glucosamine infusions increase *O*-linked *N*-acetyl-glucosamine in skeletal muscle proteins in vivo. *Metabolism.* **47**, 449-455.
- **Young JC, Agashe VR, Siegers K, Hartl FU.** (2004) Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nature reviews, molecular cell biology.* **5**, 781-791.

Z

- ✗ • **Zachara NE, Hart GW.** (2004) *O*-GlcNAc a sensor of cellular state: the role of nucleocytoplasmic glycosylation in modulating cellular function in response to nutrition and stress. *Biochim Biophys Acta.* **1673**, 13-28.
- ✗ • **Zachara NE, O'Donnell N, Cheung WD, Mercer JJ, Marth JD, Hart GW.** (2004) Dynamic *O*-GlcNAc modification of nucleocytoplasmic proteins in response to stress. A survival response of mammalian cells. *J Biol Chem.* **279**, 30133-30142.

- **Zacksenhaus E, Sheinin R.** (1990) Molecular cloning, primary structure and expression of the human X linked A1S9 gene cDNA which complements the ts A1S9 mouse L cell defect in DNA replication. *The EMBO Journal*. **9**, 2923-2929.
- **Zeiner M, Gebauer M, Gehring U.** (1997) Mammalian protein RAP46: an interaction partner and modulator of 70 kDa heat shock proteins. *EMBO J*. **16**, 5483, 5490.
- ✗ • **Zhang F, Su K, Yang X, Bowe DB, Paterson AJ, Kudlow JE.** (2003) O-GlcNAc modification is an endogenous inhibitor of the proteasome. *Cell*. **115**, 715-725.
- ✗ • **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.
- **Zhao ZG, Shen WL.** (2005) Heat shock protein 70 antisense oligonucleotide inhibits cell growth and induces apoptosis in human gastric cancer cell line SGC-7901. *World J Gastroenterol*. **11**, 73-78.
- **Zheng N, Wang Protéine, Jeffrey PD, Pavletich NP.** (2000) Structure of a c-Cbl-UbcH7 complex: RING domain function in ubiquitin-protein ligases. *Cell*. **102**, 533-539.
- ✗ • **Zhivkov V, Tosheva R, Zhivkova Y.** (1975) Concentration of uridine di-phosphate sugars in various tissues of vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol*. **51B**, 421-424.
- **Zhu W, Leber B, Andrews DW.** (2001) Cytoplasmic O-glycosylation prevents cell surface transport of E-cadherin during apoptosis. *EMBO J*. **20**, 5999-6007.
- **Zhu X, Zhao X, Burkholder WF, Gragerov A, Ogata CM, Gottesman ME, Hendrickson WA.** (1996) Structural Analysis of Substrate Binding by the Molecular Chaperone DnaK. *American Association for the Advancement of Science*. **272**, 1606-1614.
- **Zwickl P, Ng D, Woo KM, Klenkl HP, Goldberg AL.** (1999) An archaeobacterial ATPase, homologous to ATPases in the eukaryotic 26S proteasome, activates protein breakdown by 20S proteasomes. *J. Biol. Chem*. **274**, 26008-26014.

Annexes

ARTICLE 1

**70-kDa-heat shock protein presents an adjustable lectinic activity towards
O-linked N-acetylglucosamine.**

**Céline Guinez, Jérôme Lemoine, Jean-Claude Michalski, and Tony
Lefebvre.**

2004 *Biochem Biophys Res Commun.* 319(1):21-6.



70-kDa-heat shock protein presents an adjustable lectinic activity towards O-linked N-acetylglucosamine

Céline Guinez, Jérôme Lemoine, Jean-Claude Michalski, and Tony Lefebvre*

UMR 8576 du CNRS, IFR 118, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Bâtiment C9, Cité Scientifique, 59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France

Received 21 April 2004

Available online 10 May 2004

Abstract

Numerous works demonstrated that the dynamic O-GlcNAc glycosylation could protect against the proteasomal degradation by modifying the target proteins and the proteasome itself. Considering that Hsp70 is a crucial component in the quality control of protein conformation in the proteasomal pathway, we investigated the possibility that Hsp70 physically interacts with O-GlcNAc proteins through a lectinic activity. First, we demonstrate that in HepG2 cells, Hsp70 can specifically bind to O-GlcNAc residues but also is itself modified by O-GlcNAc. Second, when cells were deprived of glucose (nutrient stress), Hsp70 lectinic activity markedly increased whereas its glycosylation dramatically decreased. On the other hand, a 42°C thermic stress did not affect any of these features. Lastly, the nature of O-GlcNAc modified proteins co-immunoprecipitating with Hsp70 was similar for cells submitted to the thermic and to nutrient stress. These results strongly suggest that O-GlcNAc influences protein stability through specific interaction with 70-kDa-heat shock protein members.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Heat shock proteins; Hsp70; Chaperone; O-GlcNAc; Glucose; Stress

Usually, the proteins targeted to the proteasome present PEST sequences (sequences enriched in proline, glutamic acid, serine, and threonine that direct proteins for rapid degradation [1]) and are modified by poly-ubiquitinylation (for review see reference [2]). Recent reports showed that the dynamic O-GlcNAc glycosylation of proteins within the cytosolic and nuclear compartments of eukaryotes [3], such as Sp1 [4], estrogen receptor- β [5], and more recently plakoglobin [6], was less affected by proteasomal degradation. Consequently, it has been proposed that O-GlcNAc could protect proteins from the proteasomal degradation. Studies performed on Sp1 have shown that in cells cultured in the presence of 5 mM glucosamine, Sp1 became hyperglycosylated whereas in glucose starvation, the glycosylation decreased and Sp1 was rapidly degraded by the proteasome [4]. Treatment of the cells with glucose or glucosamine protects Sp1 from the degradation. This

process seems to be independent of ubiquitinylation process. For the β -estrogen receptor, it has been proposed that the O-GlcNAc glycosylation of the site found within the PEST sequence could block protein degradation and would thus played an opposite role to that play by phosphorylation (which activates degradation at PEST sequences) [5]. Recently, it was shown that plakoglobin, which connects cadherins to cytoskeleton, could be modified with O-GlcNAc in close proximity to the destruction box [6]. Interestingly, many of the well-characterized O-GlcNAc glycosylation sites show high PEST scores, reinforcing the relationship between proteasomal degradation and O-GlcNAc. Two recent studies showed that the 26S proteasome is also modified by O-GlcNAc both in the regulatory and in the catalytic cores [7,8] and that, the O-GlcNAc moiety acts as an inhibitor of the proteolysis function.

In a previous report, we described for the first time the lectinic activity of the Hsc70 protein, a constitutive member of the 70-kDa-heat shock protein family (HSP70) [9]. Heat shock proteins (HSPs) are ubiquitously

* Corresponding author. Fax: +33-3-20-43-65-55.

E-mail address: tony.lefebvre@univ-lille1.fr (T. Lefebvre).

found in all organisms ranging from bacteria to most complex metazoans. They share a conserved structure that suggests a fundamental function in many cellular processes and are distributed in mostly all organelles (for review see [10]). HSP are composed of several families with molecular masses spreading from 20 to 110 kDa. The HSP70 family exhibits 70% base identity among the entire HSP70 eukaryotic family and near 60% with DnaK, its homolog in *Escherichia coli*. HSP70 are mainly localized in the cytosol and the nucleus of eukaryote cells. Their expression is induced by different types of stress (e.g., temperature, irradiation, heavy metals, infection, fever, and inflammation [11]). However, HSP70 are also present at a minimal amount in normal conditions. HSP70 are structured in three main domains [10]: the 44 kDa N-terminal domain involved in ATP hydrolysis, the central domain of 18 kDa that binds hydrophobic peptide sequence, and a 10 kDa glycine–proline rich C-terminal domain with a conserved EEVD tetrapeptide terminal sequence implicated in the mRNA translation. The constitutive form of HSP70, named Hsc70 (Heat shock cognate protein of 70 kDa), is not inducible. Both forms bind and hydrolyse ATP [12]. In conjunction with co-chaperones, heat shock proteins are involved in the protection and in the re-folding of normal and damaged proteins. When the re-folding process is unsuccessful, proteins are directed to the ubiquitin–proteasome system (UPS) for destruction [13].

Here, we have demonstrated the ability of Hsp70 to bind in a specific manner to *O*-GlcNAc residues. These results support a new type of lectinic interaction between *O*-GlcNAc modified proteins and Hsp70, related to protein life and death.

Materials and methods

Cell culture and stress treatments. HepG2 cells were cultured on dishes (diameter 100 mm) treated with 0.1% porcine gelatin (Sigma) in Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco) supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 5 IU/mL penicillin, and 50 µg/mL streptomycin at 37 °C in a 5%-CO₂ enriched atmosphere. For glucose depletion stress cells were rinsed with 10 mL of glucose-free medium before incubation in this culture medium for 24 h. Thermal stress was applied to cells by hyperthermic conditions culturing at 42 °C in a 5%-CO₂ enriched atmosphere.

GlcNAc-beads affinity enrichment, immunoprecipitations, and co-immunoprecipitations. Before lysis, HepG2 cells were washed with cold phosphate-buffered saline (Gibco).

For lectinic activity studies, cells were lysed in a hypotonic buffer (10 mM Tris/HCl, 10 mM NaCl, 15 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, and protease inhibitor, pH 7.2) with a Dounce homogenizer on ice [12]. Extracts were centrifuged at 20,000g for 30 min at 4 °C, and the supernatant was carefully recovered. Thirty microlitres of GlcNAc-labelled beads (*N*-acetyl-D-glucosamine immobilized on 6% beaded agarose with a spacer of five carbons, Sigma) was added to the supernatant and incubated for 1 h at 4 °C. Beads were then gently centrifuged and washed four times in the buffer containing

20 mM Tris/HCl, 200 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, and protease inhibitor, pH 7.4.

For immunoprecipitation, cells were lysed in a lysis buffer (Tris/HCl 10 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 1% (v/v), sodium deoxycholate 0.5% (w/v), sodium dodecyl sulphate 0.1% (w/v), and protease inhibitors, pH 7.4) and centrifugation was performed at 20,000g for 30 min at 4 °C. The RL2 anti-*O*-GlcNAc antibody (Affinity BioReagent) was added to a 1:250 final dilution and the lysates were placed at 4 °C overnight. The bound proteins were recovered after addition of protein G–Sepharose (Amersham) for 1 h at 4 °C. Beads were pelleted and washed, respectively, in: lysis buffer; lysis buffer supplemented with 500 mM NaCl; lysis buffer/TNE (Tris/HCl 10 mM, NaCl 150 mM, and EDTA 1 mM) in equal volume, and finally with TNE alone.

For co-immunoprecipitation with the anti-Hsp70 polyclonal antibody (Stressgen BioReagents) the procedure was the same as described for immunoprecipitation except that HepG2 were lysed in Co-IP buffer (Tris/HCl 50 mM, NaCl 150 mM, NP-40 0.5% (v/v), and protease inhibitors, pH 8.0) and anti-Hsp70 was used at a dilution of 1:200. The bound proteins were recovered by incubation with protein A–Sepharose (Amersham) for 1 h. Four washes were performed in the Co-IP buffer with gentle shaking (four times).

SDS–PAGE and Western blotting. Proteins were separated on 10% SDS–PAGE and electroblotted onto nitrocellulose sheet. Membranes were saturated for 45 min with 5% non-fatty acid milk in TBS–Tween buffer (Tris/HCl 20 mM, NaCl 150 mM, and Tween 0.05% (v/v), pH 8.0). Anti-Hsp70 antibodies were incubated for 1 h at a dilution of 1:150,000, and RL2 anti-*O*-GlcNAc monoclonal antibodies or anti-β-catenin polyclonal antibodies (Santa Cruz Biotechnologies) were incubated overnight at 4 °C at a dilution of 1:1000. Three washes of 10 min each were performed with TBS–Tween. Anti-rabbit and anti-mouse horseradish peroxidase labelled secondary antibodies were used at a dilution of 1:10,000 for 1 h at room temperature. Three washes of 10 min each were performed with TBS–Tween and the detection was carried out using the Western lightning chemiluminescence reagents plus kit (Perkin–Elmer).

Results and discussion

Hsp70 exhibits a lectinic activity towards the O-GlcNAc motif and is itself O-GlcNAc modified

In order to test our hypothesis of a putative lectinic property of the 70-kDa-heat shock protein towards the *O*-GlcNAc motif, GlcNAc-labelled agarose beads were incubated with a protein extract obtained from the HepG2 human hepatocarcinoma cell line cultured at 37 or at 42 °C. A lectinic activity of Hsp70 toward GlcNAc is evident in HepG2 both at 37 and at 42 °C (Fig. 1A, lanes 3 and 4). The quantitative differences of Hsp70 expression at 37 and at 42 °C, both in the control lanes and in the GlcNAc-beads enriched ones, are related to its induction after thermic stress. The specificity of the lectinic property of Hsp70 is illustrated by the less intense binding of Hsp70 to chitobiose (GlcNAc β-1,4-GlcNAc) and the lack of interaction with the mannose residue at 37 °C (Fig. 1B).

We have also examined whether Hsp70 itself might be a substrate for the *O*-GlcNAc transferase (OGT). For this purpose, using the extract from HepG2 grown at 37 °C and 42 °C, *O*-GlcNAc modified proteins were

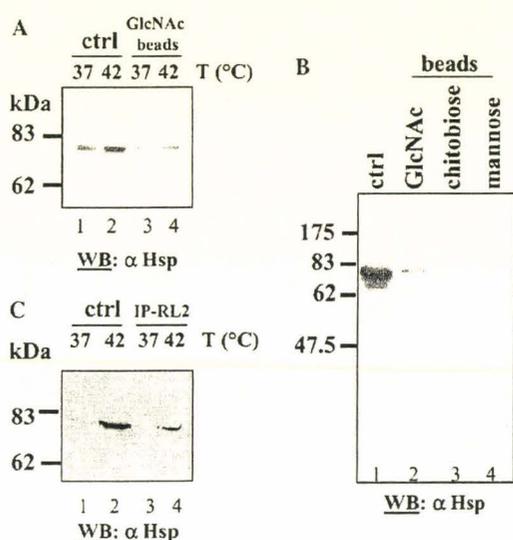


Fig. 1. Hsp70 lectinic activity against *N*-acetylglucosamine residues and *O*-GlcNAc modification of Hsp70. HepG2 cells were cultured either at a temperature of 37°C or at a temperature of 42°C as to induce a thermic stress. After lysis of the cells, cellular extracts were incubated either with GlcNAc-agarose beads (A) or with anti-*O*-GlcNAc monoclonal antibodies (C). The bound proteins were submitted to a 10% SDS-PAGE, electroblotted onto nitrocellulose sheet, and stained with an anti-Hsp70 antibody. The lectinic activity of Hsp70 was also tested on chitobiose beads and on mannanose beads (B). The glycosylation of Hsp70 by *O*-GlcNAc was checked using the anti-*O*-GlcNAc antibody RL2 in immunoprecipitation experiments and an anti-Hsp70 antibody in Western blot (C). Ctrl, control; WB, Western blot.

enriched by immunoprecipitation with an anti-*O*-GlcNAc antibody (RL2). The bound proteins were separated on a 10% SDS-PAGE and stained with anti-Hsp70 antibodies (Fig. 1C). Indeed, Hsp70 was itself modified with *O*-GlcNAc. Only a very faint band of the glycosylated form of Hsp70 at 37°C (Fig. 1C, lane 3) was related to the weak expression of Hsp70 at this temperature (Fig. 1C, lane 1). The increase in the GlcNAc binding and in the *O*-GlcNAc glycosylation on Hsp70 at 42°C is attributed to its induction by the thermic stress; since in both cases the lectinic activity and glycosylation increased following the induction of Hsp70. In conclusion, this set of experiments clearly shows that Hsp70 exerts a lectinic activity towards the *N*-acetylglucosamine residues and that this protein is *O*-GlcNAc modified.

O-GlcNAc level of Hsp70 is sensitive to glucose starvation and influences its binding activity toward *N*-acetylglucosamine residues

UDP-GlcNAc is the sugar donor used by OGT to transfer GlcNAc residues to protein substrates. GlcNAc originates from the conversion of about 3–5% of the glucose entering the cell following the hexosamine biosynthetic pathway (Fig. 2A) [14]. As expected, the level of *O*-GlcNAc modifying proteins in cells cultured in

glucose-depleted medium strongly decreased compared to cells growing in normal-culture medium (4.5 g glucose/L, Fig. 2B). Moreover, the modification of the pattern of glycosylation caused by the glucose starvation appears overall not affected by the thermic stress (Fig. 2B, compare lanes 1–3 and 2–4) except for proteins migrating between 50 and 70 kDa (arrowheads). The *O*-GlcNAc glycosylation of Hsp70 exhibits the same pattern with a similar high decrease of anti-*O*-GlcNAc staining both at 37 and at 42°C (Fig. 2C, lanes 5–8).

Interestingly, the lectinic activity of Hsp70 in glucose-depleted conditions highly increased when cells were cultured in absence of glucose (Fig. 2D, compare lanes 5 and 6 to lanes 1 and 2). As previously shown in Fig. 1, we also observed an increase in the lectinic activity of Hsp70 after thermic stress (42°C) that is in part related to an induction of Hsp70 (Fig. 2, lanes 1, 3, 5, and 7). This is in contrast to glucose-depleted conditions where the dramatic increase in this lectinic activity of Hsp70 is not due to a protein synthesis (Fig. 2, lanes 1, 2, 5, and 6).

These experiments demonstrate that when HepG2 cells are submitted to glucose starvation, the *O*-GlcNAc glycosylation level of Hsp70 decreases similarly to other extracted proteins but, unexpectedly, this decrease is associated with a noticeable higher lectinic affinity.

The results exposed above led us to evaluate the influence of the thermic stress (37 or 42°C), combined with glucose starvation on the propensity of Hsp70 to associate with protein partners through interactions with the *O*-GlcNAc motif. For this experiment, anti-Hsp70 antibodies were used to co-immunoprecipitate proteins from a HepG2 cellular lysate. The co-immunoprecipitated proteins were analysed by Western blot using either the anti-*O*-GlcNAc RL2 monoclonal antibodies (Fig. 3A, top panel) or with an anti- β -catenin polyclonal antibody (Fig. 3A, bottom panel). Mainly, we can see that in the different conditions of culture (Fig. 3A, lanes 5–8), the Hsp70 co-immunoprecipitated *O*-GlcNAc protein patterns are rather similar in terms of representation except for a low molecular mass protein of 30 kDa whose co-immunoprecipitation increased in glucose-depleted conditions (Fig. 3, lanes 6 and 8). It may somewhat be intriguing to note that despite the dramatic drop in the *O*-GlcNAc rate affecting the proteins (Fig. 3A, lanes 1–4), many bands corresponding to co-immunoprecipitated *O*-GlcNAc modified proteins with Hsp70 are still detected (Fig. 3A, lanes 5–8). This phenomenon might be related to the increased affinity of the Hsp70 chaperone towards the *O*-GlcNAc, leading to a compensating behaviour with the decrease in glycosylation (Fig. 3B). When free GlcNAc was added, both to the lysate and to the washing buffer, the relative intensity of the bands of the co-immunoprecipitated proteins was lowered suggesting an obvious *O*-GlcNAc interaction between Hsp70 and these proteins

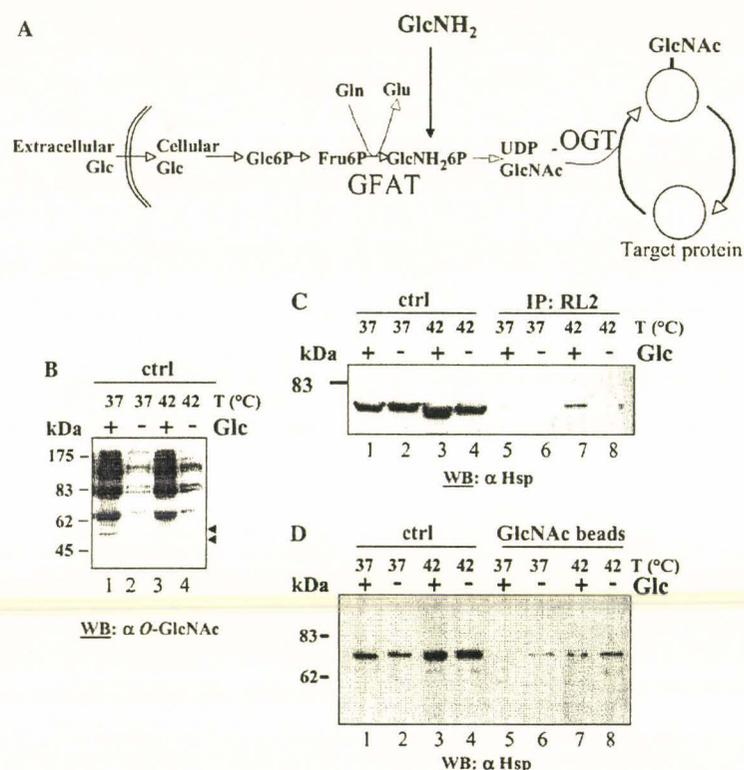


Fig. 2. Hsp70 lectinic activity towards GlcNAc and *O*-GlcNAc level in Hsp70 in HepG2 cells cultured in absence of glucose. (A) The relationship between the *O*-GlcNAc glycosylation and the extracellular glucose is drawn. Glucose enters the cell by a specific transporter, is phosphorylated to glucose 6-phosphate, and is isomerized in fructose 6-phosphate by the phosphoglucose isomerase. At this stage a key-enzyme intervenes: the glutamine-fructose amidotransferase (GFAT). It converts the fructose 6-phosphate to glucosamine 6-phosphate that is in definitive activates as a nucleotide-sugar: the UDP-GlcNAc that is the substrate of the *O*-GlcNAc transferase (OGT). The GFAT could be by-passed by treating cells with glucosamine. (B–D) Two types of stresses were applied to HepG2 cells: a thermic stress and a nutrient stress (glucose deprivation). In both cases, the lectinic activity of Hsp70 (D) and its *O*-GlcNAc glycosylation were studied (C). In the same experiment, the *O*-GlcNAc level of total cellular proteins was looked at (B) as described for Fig. 1. Blots were performed using the anti-Hsp70 antibody after running of the GlcNAc-bound proteins or the *O*-GlcNAc-enriched proteins by a 10% SDS-PAGE. Ctrl, control; T, temperature in degree celsius; IP, immunoprecipitation; and WB, Western blot.

(data not shown). However, this interaction seems to involve also the peptide moiety since free GlcNAc sugar alone is not sufficient to fully abolish this interaction. β -Catenin, that is involved in cell adhesion via interaction with E-cadherin and that plays an essential role in the Wnt/Wingless signalling pathway, has been characterized to be modified by *O*-GlcNAc [15]. Moreover, it has been demonstrated that the turnover of β -catenin is regulated by the ubiquitin–proteasome system [16]. According to the lectinic activity of Hsp70 against *O*-GlcNAc, these observations led us to strongly suppose that this key-protein could interact with Hsp70 via the *O*-GlcNAc moiety. Actually, β -catenin co-immunoprecipitated with Hsp70 (Fig. 3A, bottom panel) and this immunoprecipitation was higher when HepG2 cells were cultured in absence of glucose, i.e., when the lectinic activity of Hsp70 was maximal. In the control samples β -catenin appeared unchanged whatever the stress we applied (thermic or nutrient) and migrated as two bands, but in the co-immunoprecipitated samples, only the upper band was detected suggesting only a protec-

tion of this high molecular form (arrowhead). Other proteins that interact with Hsp70 in an *O*-GlcNAc dependent way are in process of identification in the laboratory.

The question we asked at this stage is the relevance of such an activity for Hsp70. The hypothesis of a protection played by *O*-GlcNAc against the proteasomal degradation seems to be well accepted today. First, numerous proteins were described to be protected by the single *O*-GlcNAc glycosylation, i.e., Sp1 [4], β -estrogen receptor [5] or plakoglobin [6]; second, numerous *O*-GlcNAc sites are localized within PEST sequences usually activated by phosphorylation and we can presume that *O*-GlcNAc could protect proteins against destruction by occupying phosphorylated sites (yin–yang relationship); and third, the proteasome appears to be itself modified and regulated by *O*-GlcNAc [7,8]. Nevertheless, the role of chaperone protein in this protection process was never investigated and could appear as the “missing link.” We attempt to bring a first response by searching a possible lectinic activity in

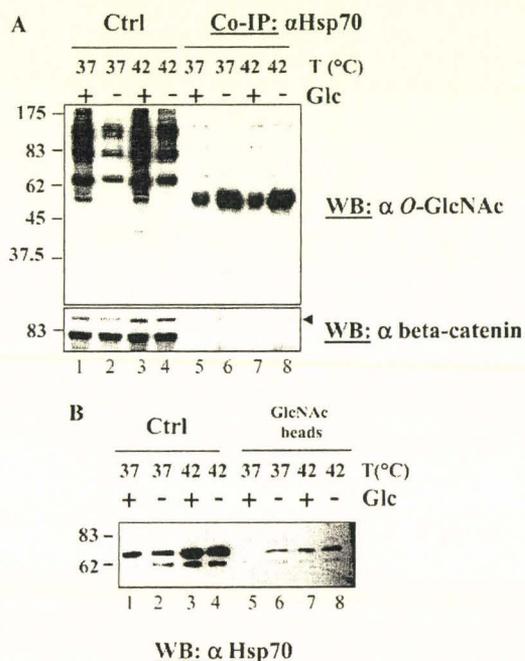


Fig. 3. Different *O*-GlcNAc proteins are associated to Hsp70, but the effect of the thermic and of the nutrient stresses did not profoundly affect their binding. HepG2 cells were cultured in the different conditions of stress (37 or 42 °C with or without glucose). Cells were lysed in a smooth lysate buffer (A, lanes 5–8) and the anti-Hsp70 antibody was added to the extract. After recovering the bound proteins with Sepharose beads-coupled protein A, proteins were run on a 10% SDS-PAGE and stained either with the anti-*O*-GlcNAc RL2 antibody as to detect the *O*-GlcNAc proteins bound to Hsp70 or with anti- β -catenin antibody. (B) The lectinic activity status of Hsp70 (as shown in Fig. 2) during the co-immunoprecipitation experiment. Ctrl, control; T, temperature in degree celsius; Co-IP, co-immunoprecipitation; and WB, Western blot.

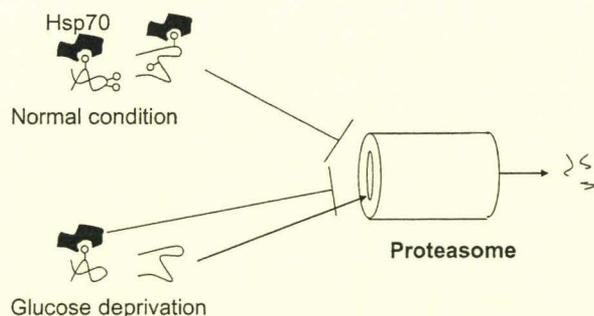


Fig. 4. Proposed mechanism of the protection of *O*-GlcNAc proteins by Hsp70. Using previous data and with the present work we have drawn this hypothesis about the protection of proteins by *O*-GlcNAc. In normal conditions (with glucose) proteins have a certain level of *O*-GlcNAc, and some of these residues are localized within PEST sequences that could be bound by HSP70 via their lectinic domain. When cells are depleted of glucose mainly the *O*-GlcNAc glycosylation decreases and only remnant *O*-GlcNAc residues are preserved, and thus permit the protein to avoid the proteasomal degradation. *O*-GlcNAc residues are represented as a white ball.

Hsp70 and to look at the modulation of this activity during stress. If *O*-GlcNAc is actually a protective signal against proteasomal degradation, chaperone proteins could play their protective role by masking PEST sequences via the glycosylation and thus permit the modified substrate to escape to the proteasomal degradation (Fig. 4).

Concluding remarks

The present work demonstrates the GlcNAc-binding activity of Hsp70 and its *O*-GlcNAc modification. Modulations of these two features in an opposite way were shown when HepG2 cells were cultured in glucose-depleted medium: the lectinic activity toward *O*-GlcNAc greatly increased in a glucose-deprived stress whereas the *O*-GlcNAc glycosylation dramatically decreased. We propose that *O*-GlcNAc proteins could be protected from proteasomal degradation by counteracting the pro-degradative effect of phosphorylation at PEST sequences by interacting with HSP70, thus reinforcing a role of *O*-GlcNAc in protein stability. This paper presents an emerging new concept in protein protection, by describing the lectinic activity of HSP70, and the new visualization of chaperone lectins by corroborating the hypothesis that *O*-GlcNAc is a glycosylation that may permit proteins to stay in life.

Acknowledgments

This work was realized in the Unité Mixte de Recherches n° 8576/ CNRS (director Dr. J.-C. Michalski) of the Institut Fédératif de Recherches No.118 (director Dr. J. Mazurier). We thank Dr. Nathalie Callens for providing HepG2 cells. We are grateful to Pr. Gradimir Misevic and Dr. Yann Guerardel for critical reading of the manuscript. This work was supported in part by the CNRS and the "Génopole of Lille." Céline Guinez is a recipient of a grant from the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur.

References

- [1] M. Rechsteiner, S.C. Rogers, PEST sequences and regulation by proteolysis, *Trends Biochem. Sci.* 21 (1996) 267–276.
- [2] M.H. Glickman, A. Ciechanover, The ubiquitin–proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction, *Physiol. Rev.* 82 (2002) 373–482.
- [3] S.A. Whelan, G.W. Hart, Proteomic approaches to analyze the dynamic relationships between nucleocytoplasmic protein glycosylation and phosphorylation, *Circ. Res.* 93 (2003) 1047–1058.
- [4] I. Han, J.E. Kudlow, Reduced *O*-glycosylation of Sp1 is associated with increased proteasome susceptibility, *Mol. Cell. Biol.* 17 (1997) 2550–2558.
- [5] X. Cheng, R.N. Cole, J. Zaia, G.W. Hart, Alternative *O*-glycosylation/*O*-phosphorylation of the murine estrogen receptor β , *Biochemistry* 39 (2000) 11609–11620.

- [6] S. Hatsell, L. Medina, J. Merola, R. Haltiwanger, P. Cowin, Plakoglobin is O-Glycosylated close to the N-terminal destruction box, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 37745–37752.
- [7] M. Sumegi, E. Hunyadi-Gulyas, K.F. Medzihradsky, A. Udvardy, 26S proteasome subunits are O-linked *N*-acetylglucosamine-modified in *Drosophila melanogaster*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312 (2003) 1284–1289.
- [8] F. Zhang, K. Su, X. Yang, D.B. Bowe, A.J. Paterson, J.E. Kudlow, *O*-GlcNAc modification is an endogenous inhibitor of the proteasome, *Cell* 115 (2003) 715–725.
- [9] T. Lefebvre, C. Cieniewski, J. Lemoine, Y. Guerardel, Y. Leroy, J.P. Zanetta, J.C. Michalski, Identification of *N*-acetyl-D-glucosamine-specific lectins from rat liver cytosolic and nuclear compartments as heat-shock proteins, *Biochem. J.* 360 (2001) 179–188.
- [10] J.C. Kiang, G.C. Tsokos, Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry and physiology, *Pharmacol. Ther.* 2 (1998) 183–201.
- [11] A.G. Pockley, Heat shock proteins as regulators of the immune response, *Lancet* 362 (2003) 469–476.
- [12] F. Beaulieu, R.M. Tanguay, Members of the *Drosophila* HSP70 family share ATP-binding properties, *Eur. J. Biochem.* 172 (1988) 341–347.
- [13] J. Imai, H. Yashiroda, M. Maruya, I. Yahara, K. Tanaka, Proteasomes and molecular chaperones: cellular machinery responsible for folding and destruction of unfolded proteins, *Cell Cycle* 2 (2003) 585–590.
- [14] L. Wells, K. Vosseler, G.W. Hart, A role for *N*-acetylglucosamine as a nutrient sensor and mediator of insulin resistance, *Cell. Mol. Life Sci.* 60 (2003) 222–228.
- [15] W. Zhu, B. Leber, D.W. Andrews, Cytoplasmic *O*-glycosylation prevents cell surface transport of E-cadherin during apoptosis, *EMBO J.* 20 (2001) 5999–6007.
- [16] H. Aberle, A. Bauer, J. Stappert, A. Kispert, R. Kemler, β -catenin is a target for the ubiquitin–proteasome pathway, *EMBO J.* 16 (1997) 3797–3804.

ARTICLE 2

**Modulation of HSP70 GlcNAc-directed lectin activity by glucose
availability and utilization**

**Céline Guinez, Marie-Estelle Losfeld, René Cacan, Jean-Claude Michalski
and Tony Lefebvre.**

2006 *Glycobiology*. 16(1):22-28.

Modulation of HSP70 GlcNAc-directed lectin activity by glucose availability and utilization

Céline Guinez, Marie-Estelle Losfeld, René Cacan, Jean-Claude Michalski, and Tony Lefebvre¹

UMR 8576/CNRS, Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, IFR 118, Bâtiment C9, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

Received on May 4, 2005; revised on September 7, 2005; accepted on September 14, 2005

It is well-accepted that protein quality control (occurring either after protein synthesis or after cell damage) is mainly ensured by HSP, but the mechanism by which HSP decides whether the protein will be degraded or not is poorly understood. Within this framework, it has been hypothesized that *O*-GlcNAc, a cytosolic and nuclear-specific glycosylation whose functions remain unclear, could take a part in the protection of proteins against degradation by modifying both the proteins themselves and the proteasome. Because the synthesis of *O*-GlcNAc is tightly correlated to glucose metabolism and Hsp70 was endowed with GlcNAc-binding property, we studied the relationship between GlcNAc-binding activity of both Hsp70 and Hsc70 (the nucleocytoplasmic forms of HSP70 family) and glucose availability and utilization. We thus demonstrated that low glucose concentration, inhibition of glucose utilization with 2DG, or inhibition of glucose transport with CytB led to an increase of Hsp70 and Hsc70 lectin activities. Interestingly, the response of Hsp70 and Hsc70 lectin activities toward variations of glucose concentration appeared different: Hsp70 lost its lectin activity when glucose concentration was >5 mM (i.e., physiological glucose concentration) in contrast to Hsc70 that exhibited a maximal lectin activity for glucose concentration ~5 mM and at high glucose concentrations. This work also demonstrates that HSP70 does not regulate its GlcNAc-binding properties through its own *O*-GlcNAc glycosylation.

Key words: glucose/heat shock proteins/hexosamine biosynthetic pathway/lectin/*O*-GlcNAc

Introduction

Members of the 70-kDa heat shock proteins family (HSP70) have been demonstrated to be GlcNAc-binding lectins (Lefebvre *et al.*, 2001; Guinez *et al.*, 2004). The new concept of lectin-chaperone has arisen from growing evidences that the cytosolic and nuclear-specific glycosylation *O*-linked *N*-acetylglucosamine (*O*-GlcNAc) could act as a protective signal against proteasomal degradation. Beyond

the myriad of proteins that are *O*-GlcNAc glycosylated, proteasome is itself modified with this atypical glycosylation (Sumegi *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003; Zachara and Hart, 2004) and moreover can be regulated by this post-translational modification (Zhang *et al.*, 2003; Zachara and Hart, 2004). *O*-GlcNAc was first described by Torres and Hart (1984) and, rapidly, it appeared that this glycosylation was enriched in the cytosolic and nuclear compartments and that it was not static (as classical *N*- and *O*-glycosylation) but highly dynamic. Even more, it can counteract the effect of phosphorylation at the same or at adjacent sites in a reciprocal manner (for review, see Kamemura and Hart, 2003). Despite these exciting features, roles of *O*-GlcNAc remain elusive. Nevertheless and as mentioned above, it appears probable that *O*-GlcNAc could act as a protective signal against proteasomal degradation. One of the precursor works in the field was that of Han and Kudlow (1997) showing that when cultured cells were glucose deprived or stimulated by cyclic-adenosine 5'-monophosphate, the transcription factor Sp1 was hypoglycosylated leading to its rapid degradation. This degradation was sensitive to *N*-acetyl-L-leucyl-L-leucyl-L-norleucinal (LLnL) and lactacystin suggesting a proteasomal degradation. Treatment of cells with glucosamine or glucose protected Sp1 against degradation. Later, it has been proposed that *O*-GlcNAc glycosylation of a site found within the PEST sequence of the beta-estrogen receptor could block protein degradation and thus play an opposite role to phosphorylation (in this context, it is well known that PEST sequence phosphorylation could activate degradation) (Cheng *et al.*, 2000). More recently, the cadherins-to-cytoskeleton connecting protein plakoglobin has been shown to be *O*-GlcNAc modified near a destruction box (Hatsell *et al.*, 2003).

Using a wide variety of stresses (hyperthermia, UVB, arsenite, ethanol, etc.), Zachara *et al.* (2004) demonstrated a quick increase of *O*-GlcNAc content in the treated cells. Furthermore, when the level of *O*-GlcNAc was increased by using PUGNAc (an *O*-GlcNAcase inhibitor) or by transfecting COS7 cells with *O*-linked *N*-acetylglucosamine transferase (OGT), the thermo-tolerance of cells was increased in contrast to a reduction or a blockade of *O*-GlcNAc resulting in an increase of the sensitivity of cells to stress.

A few years ago, it has been established that *O*-GlcNAc was intimately linked to glucose metabolism (for review, see Wells *et al.*, 2003). About 2–5% of extracellular glucose could be used for *O*-GlcNAc modification of proteins through the hexosamine biosynthetic pathway (HBP). *O*-GlcNAc has been postulated to be a sensor implicated in insulin resistance and in the decrease of glucose uptake by cells. First, the hypothesis of a negative feedback of glucose

¹To whom correspondence should be addressed; e-mail: tony.lefebvre@univ-lille1.fr

transport regulation by the flux of glucose through HBP was suggested in insulin target cells (Marshall *et al.*, 1991). Second, Robinson *et al.* (1993) have shown that when rat hemidiaphragms were incubated in glucosamine or in high glucose concentrations, glucose uptake decreased. Insulin-resistance effect and, consequently, glucose uptake decrease were correlated with a defect in GLUT4 plasma membrane glucose transporter (Cooksey *et al.*, 1999). It has also been shown that glucosamine-induced insulin resistance was accompanied by an increase of UDP-GlcNAc concentration (Rossetti *et al.*, 1995). Using transgenic overexpression of OGT, McClain *et al.* (2002) showed a type 2 diabetic phenotype. This observation suggested that insulin resistance and *O*-GlcNAc glycosylation are linked. In the same topic, incubation of rat epitrochlearis muscles with PUGNAc induced an increase in the *O*-GlcNAc level of proteins and a reduced glucose transport, suggesting that *O*-GlcNAc glycosylation of proteins can induce insulin resistance (Arias *et al.*, 2004). Taken together, these observations strongly support the pivotal role of *O*-GlcNAc in reduced glucose transport and insulin resistance through HBP. In this field, it must be noted that numerous proteins involved in the metabolism of glucose are themselves *O*-GlcNAc modified: casein-kinase II, glycogen synthase-kinase-3 (Lubas and Hanover, 2000), and insulin-receptor substrate-1 and 2 (Patti *et al.*, 1999).

Starting from the relation between glucose and *O*-GlcNAc and, since *O*-GlcNAc is a putative protector of proteins against proteasomal degradation, we previously demonstrated the existence of HSP70 lectin properties and we showed that 70-kDa heat shock protein (Hsp70), the cytosolic, and nuclear HSP70 induced form were endowed with a GlcNAc-specific lectin activity (Guinez *et al.*, 2004). Intriguingly, this lectin activity increased with stress. We thus hypothesized that HSP70 lectin activity serves as protection of proteins via *O*-GlcNAc residues.

This article demonstrates the close relationship between HSP70 lectin properties and glucose status. Glucose deprivation, glucose transport inhibition, and inability to use glucose strongly modulate lectin activity. Against all expectations, modulation of the lectin property does not depend on a self-regulation of HSP70 by its own *O*-GlcNAc residues, because the addition of glucosamine in a glucose-depleted medium which restored the *O*-GlcNAc glycosylation of HSP70 did not abrogate its lectin activity. This last point was reinforced by the fact that *O*-GlcNAc deglycosylation of cell extract after beta-hexosaminidase treatment did not enhanced Hsp70 lectin property.

Results

Hsp70 and Hsc70 lectin activities are dependent upon glucose concentration

To test the hypothesis of a glucose concentration-dependent Hsp70/70-kDa heat shock cognate (Hsc70) lectin activity, HepG2 cells were grown on dishes in medium-containing various glucose concentrations. First, we used a broad range of glucose concentrations ranging from 0 to 100 mM. After cells lysis, proteins were run on a 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE),

electroblotted onto nitrocellulose, and stained with an anti-Hsp70 antibody either directly (ctrl) or after enrichment on GlcNAc-beads (GlcNAc-beads enr). After revelation by enhanced chemiluminescence (ECL) (Figure 1A, top panel), nitrocellulose sheet was stripped and stained with an anti-Hsc70 antibody (Figure 1A, bottom panel). The two chaperones possessed a lectin activity when cells were depleted in glucose (Glc, 0 mM), and when glucose concentration was increased to 12.5 mM, this lectin activity strongly decreased for both Hsp70 and Hsc70. On the other hand, when glucose concentration was increased from 12.5 to 100 mM, Hsc70 showed a lectin activity which progressively increased starting from 25 mM to be maximal at 75 mM of glucose, whereas Hsp70 did not show such an enhancement. Right panel of Figure 1A represents the *O*-GlcNAc pattern of the crude cellular protein extract for each glucose concentration condition. It should be pointed out that glycosylation was maximal between 50 and 100 mM of glucose. The same experiment was performed with moderate glucose concentrations, that is, between 0 and 12.5 mM

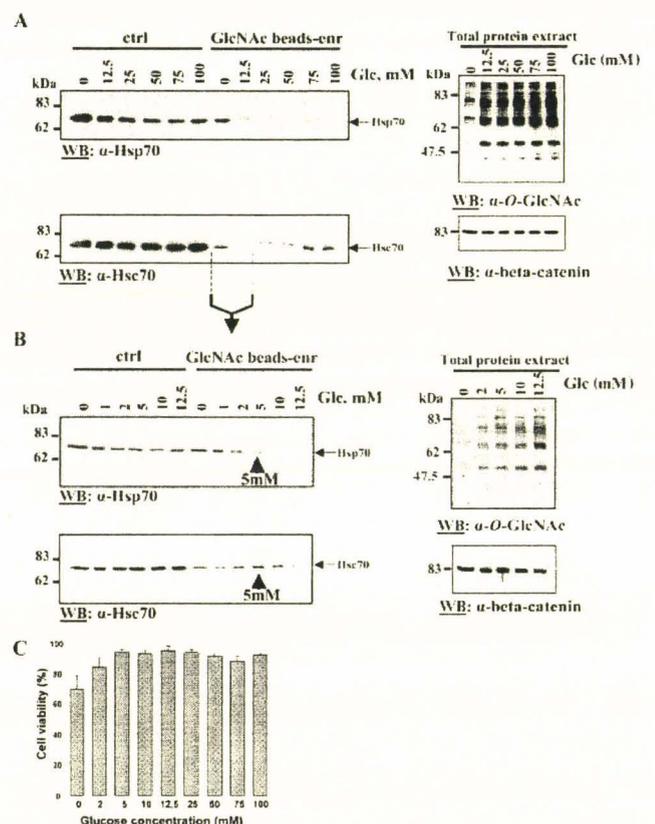


Fig. 1. Hsp70 and Hsc70 lectin activities are both dependent upon glucose concentration. HepG2 cells were cultured in a glucose-free medium with increasing glucose concentrations (0–100 mM in panel A and 0–12.5 mM in panel B). Hsp70 and Hsc70 were tested for their lectin activity against GlcNAc, as described under the *Materials and methods* section. The *O*-GlcNAc status of crude protein extracts is shown at the right of each figure. Anti-beta-catenin staining shows the equality of loading of each lane. Panel C represents cell viability after each condition of treatment (performed in triplicate). Ctrl, control of Hsp70 and Hsc70 proteins levels; WB, western blot.

(Figure 1B). Hsp70 showed a progressive decrease in its lectin activity up to 5 mM glucose (top panel) in contrast to Hsc70 (bottom panel) which showed a maximal activity at 5 mM (i.e., physiological glucose concentration). Figure 1B, right panel, represents an anti-*O*-GlcNAc antibody (RL2) staining of control extracts. A progressive increase in *O*-GlcNAc proteins content can be observed with glucose increase. These first experiments clearly correlate glucose concentration to lectin activity of HSP70 and underline that Hsp70 and Hsc70 lectin activities were expressed in a different manner according to the glucose concentration.

Inhibition of glucose utilization or inhibition of glucose transport leads to an increase in Hsp70 lectin activity

To extend and reinforce the results described above and to strengthen the hypothesis that lectin activity of Hsp70 and Hsc70 are modulated by the glucose concentration, HepG2 cells were cultured either in presence of 2-deoxyglucose (2DG), a glucose analogue that perturbs utilization of glucose by competing interactions with proteins/enzymes using glucose as a substrate, or in presence of cytochalasin B (CytB), a glucose transporter inhibitor. Control experiments performed on total protein extracts showed a decrease in their *O*-GlcNAc content after staining with the anti-*O*-GlcNAc antibody (Figure 2A, for 2DG treatment, and Figure 2B, for CytB treatment, upper panels). In both cases, whatever the culture conditions (with/without glucose, with/without glucosamine, or at 42°C), Hsp70 and Hsc70 shared an increased GlcNAc-binding properties when 2DG or CytB were added to the culture medium (compare lanes 2 and 6 and lanes 10 and 14). These results showed that when glucose transport is inhibited by CytB or when glucose utilization was decreased by 2DG, GlcNAc lectin activities of HSP70 were enhanced, confirming the results presented in Figure 1 and demonstrating that lectin activities of Hsp70 and Hsc70 depend on glucose availability and utilization.

Hsp70 and Hsc70 do not regulate their GlcNAc-binding properties with their own O-GlcNAc glycosylation

Previously reported data suggested an opposite relationship between the *O*-GlcNAc modification of Hsp70 and its capability to recognize exogenous *O*-GlcNAc residues (Guinez *et al.*, 2004). In this report, we showed that in a glucose-free medium, Hsp70 was not *O*-GlcNAc modified but exhibited a high lectin activity toward *O*-GlcNAc, and in contrast in a normal culture medium (Dulbecco's modified Eagle's medium [DMEM] with 4.5 g L⁻¹ of glucose) Hsp70 was glycosylated but was practically devoid of GlcNAc-binding property. Thus, we hypothesized that Hsp70 *O*-GlcNAc modification could occur on the lectin site avoiding subsequent binding on GlcNAc beads. To tentatively answer this question, we artificially increased *O*-GlcNAc level by incubating cells in a glucose-free medium supplemented with 5 mM glucosamine. As mentioned under *Introduction*, glucosamine can directly enter the HBP without the need of glutamine : fructose 6-phosphate amido-transferase (GFAT), the key- and rate-limiting enzyme of HBP. In these conditions, a lectin activity was induced both for Hsp70 (compared with glucose-deprived

conditions but was lower to control, i.e., in presence of glucose) and for Hsc70 (the intensity of binding is more or less the same for the control and for the cell cultured in the presence of glucosamine), whereas the two chaperones were *O*-GlcNAc modified (Figure 3A, left panel for controls and right panel for GlcNAc-enriched and anti-*O*-GlcNAc antibody-enriched samples). This demonstrated that in these conditions, Hsp70 and Hsc70 lectin activities were dependent upon glucose deprivation and not dependent upon their own *O*-GlcNAc level. A second experiment invalidated this later hypothesis. HepG2 cells were exposed to a thermal stress for increasing periods (from 0 to 48 h). After cell lysis, GlcNAc-binding properties and glycosylation of Hsp70/Hsc70 were examined (Figure 3B). Both for Hsp70 and Hsc70, lectin properties and glycosylation reached maximal activities near 20 h: the time progress curves were similar for the lectin activity (left panel) and for the *O*-GlcNAc content (right panel) of Hsp70 and Hsc70. Figure 3C is a control of the *O*-GlcNAc glycosylation of total protein extract. This result reinforces the idea that Hsp70 and Hsc70 lectin properties are not regulated by their own *O*-GlcNAc modification. Finally, treatment of cell extracts with beta-hexosaminidase definitively confirmed these results, because after *O*-GlcNAc hydrolysis with beta-hexosaminidase treatment Hsp70 of cells cultured in normal conditions did not recover GlcNAc-binding property (Figure 4). Taken together, these results confirmed that HSP70 did not self-regulate their GlcNAc-binding properties with their own *O*-GlcNAc glycosylation.

Discussion

The serine/threonine *O*-GlcNAc modification is widely expressed in cytosolic and nuclear compartments of eukaryotes. It modifies numerous proteins implicated in transcriptional processes (including transcription factors and RNA polymerase II) (Yang *et al.*, 2002), metabolic enzymes (Cieniewski-Bernard *et al.*, 2004), nuclear pore proteins (Guinez *et al.*, 2005), and many other proteins. Despite the great interest brought to the study of *O*-GlcNAc, the exact functions played by this simple glycosylation remain unknown. In this work, we focused our interest on the relationship between utilization of glucose and Hsp70/Hsc70 lectin activities.

It has been demonstrated that a nonnegligible part of glucose that enters the cell was converted into UDP-GlcNAc (the donor of GlcNAc for OGT); the question arose to know whether cellular chaperones such as Hsp70 and Hsc70 were affected, particularly by their GlcNAc-binding activity, when glucose was limiting or in excess. To answer this question, HepG2 cells were cultured with increasing glucose concentrations ranging from 0 to 100 mM (4-fold the glucose concentration present in normal culture medium). Surprisingly, Hsp70 and Hsc70 lectin activities were differently affected (Figure 1A). Indeed, Hsp70 bound GlcNAc when cells were deprived in glucose, but lectin activity decreased after addition of glucose. In contrast, Hsc70 bound GlcNAc beads in glucose-deprived conditions but also for higher glucose concentrations (the optimal activity being between 75 and 100 mM of glucose). To

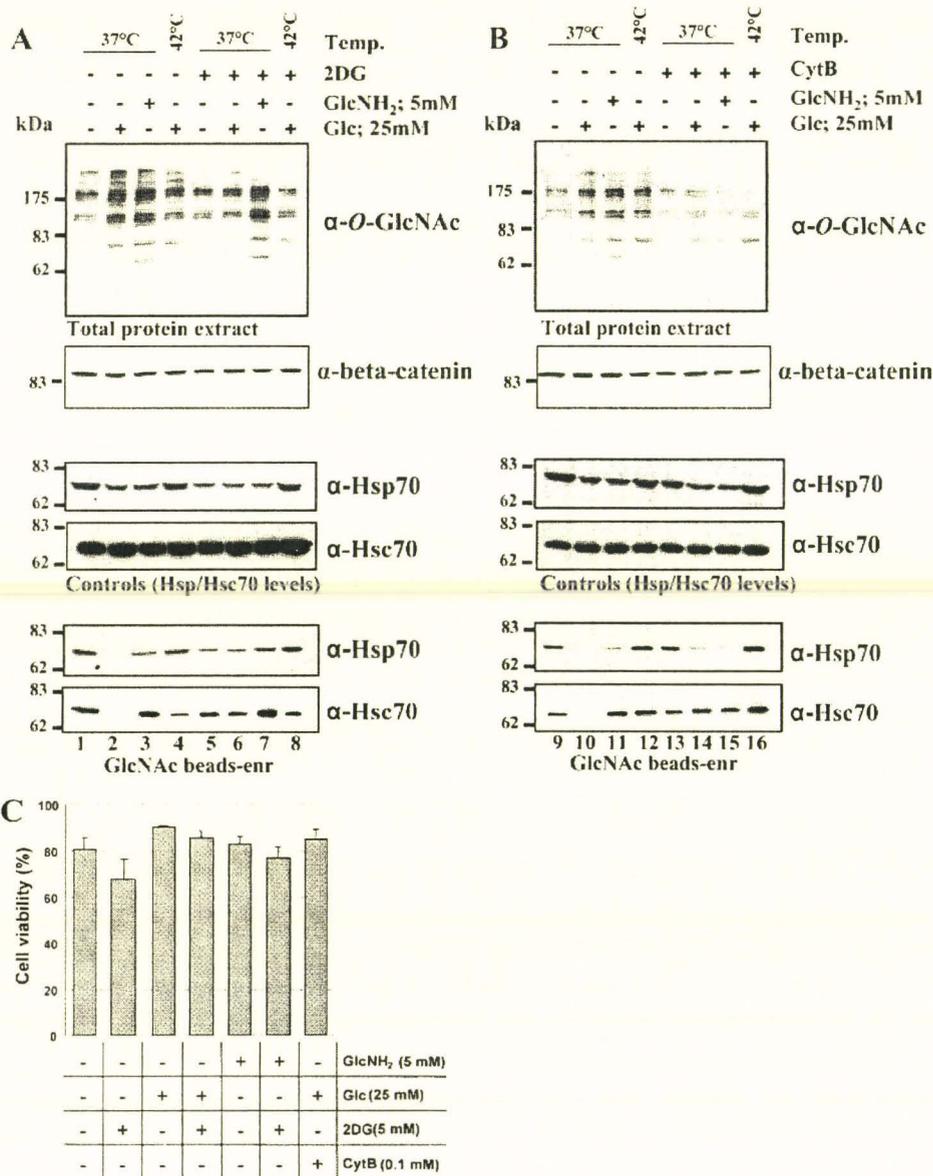


Fig. 2. Inhibition of glucose transport or inhibition of glucose use induce an increase of Hsp70/Hsc70 lectin activity. HepG2 cells were cultured in a classical medium (Dulbecco's modified Eagle's medium [DMEM]) with or without 2DG (5 mM), an inhibitor of glucose utilization and with or without CytB (0.1 mM), an inhibitor of glucose transport. **A** and **B** (top panels) indicate a decrease of *O*-GlcNAc glycosylation of proteins (controlled with the anti-*O*-GlcNAc antibody) with 2DG and CytB, respectively. In the middle panels, controls of Hsp70 and Hsc70 expression are shown. Lectin activities of Hsp70 and Hsc70 toward GlcNAc in the presence of 2DG and CytB are represented on the bottom panels. Anti-beta-catenin staining shows the equality of loading of each lane. Panel **C** represents cell viability after each condition of treatment (performed in triplicate). Panel **A** represents the 2DG experiment, and panel **B** represents the CytB experiment.

be more representative of physiological conditions, lower glucose concentrations were used (from 0 to 12.5 mM, i.e., half-fold the glucose concentration of a normal culture medium). In these conditions, the lectin activities of Hsp70 and Hsc70 were different. In contrast to Hsp70 which bound GlcNAc when glucose concentration was <5 mM, Hsc70 reached a maximal binding activity at 5 mM. In both cases, the key glucose concentration was 5 mM, that is, the physiological glucose concentration. We thus demonstrated that the two chaperones did not work similarly, according

to the glucose concentration. At low glucose concentration (<5 mM) owing to the stress, Hsp70 level and GlcNAc-binding activity are induced. When glucose concentration reaches a physiological or higher values (>5 mM), Hsp70 level decreases, and the lectin activity disappears in contrast to Hsc70 that shows an increasing lectin activity but at a constant protein expression level. Interestingly, the decrease of glucose concentration induced both a decrease in protein *O*-GlcNAc modification and an enhancement of Hsp70 lectin activity (Figure 1B, right panel); so a decrease

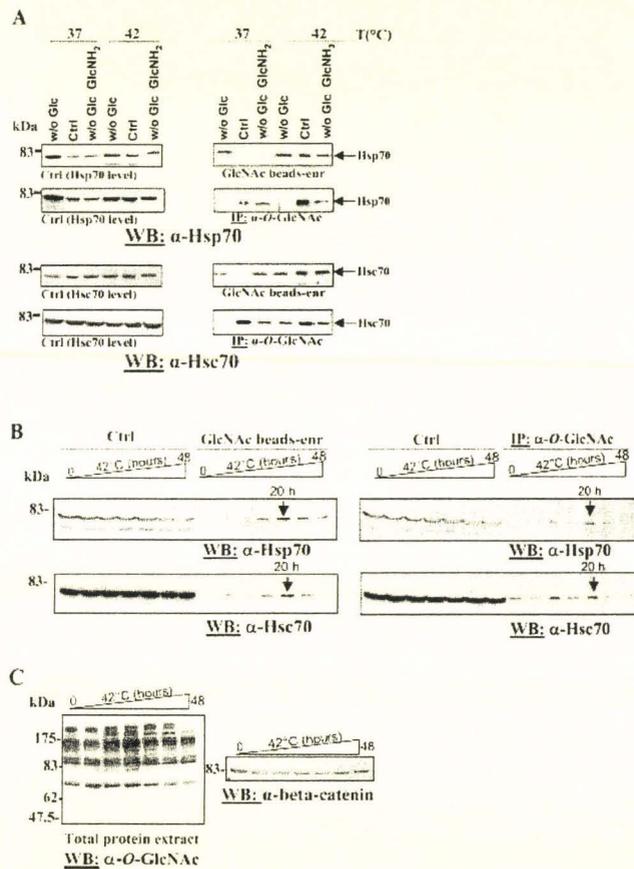


Fig. 3. Neither Hsp70 nor Hsc70 self-regulate their GlcNAc-binding property with their own *O*-GlcNAc glycosylation. HepG2 were cultured in presence of glucose (normal condition) or in absence of glucose, with and without 5 mM glucosamine. The lectin activity and the *O*-GlcNAc glycosylation of Hsp70 and Hsc70 were checked in these three conditions (A, control expression of Hsp70 and Hsc70 are shown in the left panel, and their binding properties and *O*-GlcNAc glycosylation are shown in the right panel). The second approach consisted in kinetic experiments: HepG2 cells were incubated at 42°C for increasing periods (from 0 to 48 h) to induce a thermal stress (panel B). The GlcNAc-binding properties (left panel) and *O*-GlcNAc glycosylation (right panel) of Hsp70 and Hsc70 were tested. The *O*-GlcNAc profile of the total extract protein during thermal stress is shown in panel C. Control of gel loading is shown with the anti-beta-catenin staining. Ctrl, control of Hsp70 and Hsc70 proteins levels; IP, immunoprecipitation; WB, western blot.

in *O*-GlcNAc glycosylation could be compensated by a higher capacity of Hsp70 to recognize *O*-GlcNAc-modified cellular proteins.

To drive further this relationship between glucose and Hsp70/Hsc70 lectin activity, we used two drugs that either enabled glucose utilization or its transport into the cell. In both cases, even in normal conditions, lectin activity of Hsp70 and Hsc70 increased, showing the importance of glucose entry and utilization in the regulation of Hsp70/Hsc70 lectin properties (Figure 2A and B). One explanation for this phenomenon could be that when glucose deprivation occurs, the enhancement of HSP70 lectin activity observed counteracts the decrease of *O*-GlcNAc modification of cellular proteins. This could re-equilibrate the misbalance between *O*-GlcNAc and GlcNAc-binding properties.

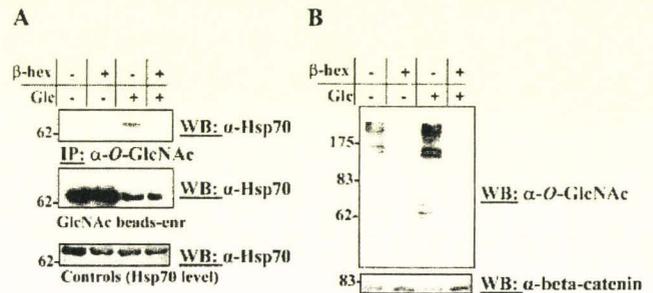


Fig. 4. Deglycosylation of Hsp70 did not induce an enhancement of its lectin activity. HepG2 cells extract were previously treated with beta-hexosaminidase before testing the lectin property of Hsp70. Experiments were performed either with cells cultured in normal medium (containing glucose) or in a glucose-depleted medium. After treatment, Hsp70 were enriched either with RL2 antibody to test their glycosylation or on GlcNAc beads to test their lectin property (panel A). Efficiency of deglycosylation is shown by staining of the total protein extract with the anti-*O*-GlcNAc antibody. Anti-beta-catenin shows the equality of loading of each lane (panel B). β-hex, beta-hexosaminidase; IP, immunoprecipitation; WB, western blot.

The possibility that HSP70 lectin properties are regulated with HSP70 *O*-GlcNAc-glycosylation was tested. It appeared attractive that HSP70 could self-regulate their GlcNAc-binding properties with their own *O*-GlcNAc glycosylation. Three points came to invalidate this hypothesis. First, when HepG2 cells were cultured in absence of glucose but with glucosamine (to by-pass the rate-limiting enzyme of the HBP-GFAT—thus allowing the synthesis of UDP-GlcNAc and the transfer of *O*-GlcNAc residues), Hsp70 and Hsc70 were glycosylated and were endowed with GlcNAc-binding properties. In these conditions, it seems that glucose depletion was critical for activating GlcNAc properties of chaperones independently from their *O*-GlcNAc glycosylation. The second approach was to follow the GlcNAc-binding activity and the glycosylation progression of Hsp70 and Hsc70 during stress. The stress inflicted to cells was a thermal one and not a glucose deprivation to maintain the formation of *O*-GlcNAc. In these conditions, we showed that the two features, that is, the *O*-GlcNAc glycosylation and the GlcNAc-binding property of both Hsp70 and Hsc70 evolved similarly along the stress period. This excludes an autoregulation of the chaperones with their own *O*-GlcNAc. Finally, after treatment of the total protein extract with beta-hexosaminidase, Hsp70 did not modify the lectin capacity. These observations indicate that the regulation of HSP70 lectin activity is mediated by something else than *O*-GlcNAc glycosylation. We can suppose that unidentified partners could modulate this property by interacting with chaperones. In this idea, the intervention of co-chaperones must be considered.

This article demonstrates the close relationship between the level of glucose and the lectin property of Hsp70 and Hsc70 toward GlcNAc residue. This phenomenon could be compared with the existing relationship between *O*-GlcNAc level and glucose concentration. The functions of such lectin activities are without any doubt in the protection of proteins against outer attacks. HSP are the guardian

of the cell integrity, and this new function could be an additive weapon to carry their mission through.

Materials and methods

Cell culture and treatments of cells

HepG2 cells were maintained in DMEM (Gibco, Cergy Pontoise, France) supplemented with 10% fetal calf serum (v/v), 2 mM L-glutamine, 5 IU/mL penicillin, and 50 µg/mL streptomycin at 37°C on a humidified atmosphere enriched with 5% CO₂. Cultures were carried out on dishes (diameter 100 mm) preliminarily treated with 0.1% porcine gelatine (Sigma-Aldrich, Lyon, France).

Before stress, cells were washed with 10 mL of glucose-depleted medium and incubated either in this medium (for the starvation condition) or in this medium supplemented with glucose (cell culture tested, Sigma-Aldrich) at low (1–12.5 mM) or at high (25–100 mM) concentrations. Glucose-free medium was also supplemented with 5 mM glucosamine (cell culture tested, Sigma-Aldrich) for 24 h. 2DG (Sigma-Aldrich) was used at a concentration of 5 mM and CytB (Sigma-Aldrich) at a concentration of 0.1 mM. Thermal stress was induced by incubation of the cells for 24 h at 42°C in a 5% CO₂-enriched atmosphere. For kinetic experiments, HepG2 were grown at 37°C and placed at 42°C from 0 to 48 h. Cell viability was determined by the Trypan blue exclusion method.

GlcNAc-binding proteins and O-GlcNAc-bearing proteins enrichment

HepG2 were first washed with 10 mL of cold phosphate-buffered saline (PBS, Gibco). Cells were lysed with a scraper on ice either with a hypotonic buffer (10 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, 15 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM MgCl₂, and proteases inhibitors, pH 7.2) for lectin activity studies or with a detergent-containing buffer (DB) (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100 (v/v), 0.5% sodium deoxycholate (w/v), 0.1% sodium dodecyl sulfate (w/v), and proteases inhibitors, pH 7.4) for the O-GlcNAc-content studies. Cellular extracts were centrifuged at 20,000 g for 30 min at 4°C. To test the lectin activity, supernatants were incubated with 30 µL of GlcNAc-coupled beads (*N*-acetyl-D-glucosamine immobilized on 6% beaded agarose with a spacer of five carbons, Sigma-Aldrich) at 4°C for 1 h. Beads were washed four times with binding buffer (20 mM Tris-HCl, 200 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, and proteases inhibitor, pH 7.4). Specificity of binding has been tested with different sugar-coupled beads and with free sugar in excess (Guinez *et al.*, 2004) and data not shown (glucose and GlcNAc). To study the O-GlcNAc glycosylation of proteins, immunoprecipitations with the anti-O-GlcNAc antibody (RL-2, Affinity Bioreagents, Golden, CO) were performed. RL-2 was added to a 1:250 final dilution, and cellular extracts were incubated at 4°C overnight. The bound proteins were then recovered after addition of protein G-Sepharose (Amersham Biosciences, Orsay, France) for 1 h at 4°C. Beads were gently centrifuged for 1 min and washed with the following buffers: DB; DB supplemented with 500 mM NaCl, DB/TNE (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, and 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid [EDTA], pH 7.4) in equal volume, and finally with TNE alone.

Beta-hexosaminidase treatment

HepG2 extracts were adjusted to pH 5.2 with 100 mM acetate and incubated with *Escherichia coli* recombinant beta-hexosaminidase (Calbiochem, San Diego, CA) for 24 h at 37°C.

SDS-PAGE, western blotting, and antibody staining

Samples were analyzed by 10% SDS-PAGE under reducing conditions, and proteins were electroblotted onto nitrocellulose sheet (Amersham Biosciences). Membranes were first saturated for 45 min with 5% non-fatty acid milk in Tris-buffered saline (TBS)-Tween buffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, and 0.05% Tween [v/v], pH 8.0). Rabbit anti-Hsp70 polyclonal antibodies were incubated for 1 h at a dilution of 1:150,000 (Stressgen Bioreagents, Victoria, British Columbia). RL-2 anti-O-GlcNAc monoclonal antibodies were incubated overnight at 4°C at a dilution of 1:1000. Membranes were then washed three times with TBS-Tween for 10 min and incubated with either an anti-rabbit or an anti-mouse horseradish peroxidase-labeled secondary antibodies (Amersham Biosciences) at a dilution of 1:10,000 for 1 h. Three washes of 10 min each were performed with TBS-Tween, and the detection was carried out with ECL solution (Amersham Biosciences). Primary and secondary antibodies complexes were removed from the membranes with a stripping buffer (62.5 mM Tris-HCl, 2% SDS, 100 mM 2-mercaptoethanol, pH 6.5) for 30 min at 50°C, abundantly washed with TBS-Tween and reincubated with a rat anti-Hsc70 at a dilution of 1:1000 (Stressgen Bioreagents). Anti-rat secondary antibody labeled with horseradish peroxidase (Amersham Biosciences) was used at a dilution of 1:10,000 for 1 h. Polyclonal anti-beta-catenin was used at a dilution of 1:1000.

Acknowledgments

C.G. is a recipient of a fellowship from the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement. We thank le Centre National de la Recherche Scientifique and the University of Lille I. We are grateful to Dr. Anne Harduin-Lepers for the final reading of the manuscript and for English corrections.

Abbreviations

2DG, 2-deoxyglucose; CytB, cytochalasin B; HBP, hexosamine biosynthetic pathway; Hsc70, 70-kDa heat shock cognate; Hsp70, 70-kDa heat shock protein; HSP70, members of the 70-kDa heat shock proteins family; O-GlcNAc, O-linked *N*-acetylglucosamine; OGT, O-linked *N*-acetylglucosamine transferase; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; SDS, sodium dodecyl sulfate; TBS, Tris-buffered saline.

References

- Arias, E.B., Kim, J., and Cartee, G.D. (2004) Prolonged incubation in PUGNAc results in increased protein O-linked glycosylation and insulin resistance in rat skeletal muscle. *Diabetes*, **53**, 921–930.
- Cheng, X., Cole, R.N., Zaija, J., and Hart, G.W. (2000) Alternative O-glycosylation/O-phosphorylation of the murine estrogen receptor beta. *Biochemistry*, **39**, 11609–11620.

- Cieniewski-Bernard, C., Bastide, B., Lefebvre, T., Lemoine, J., Mounier, Y., and Michalski, J.-C. (2004) Identification of O-linked N-acetylglucosamine proteins in rat skeletal muscle using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics*, **3**, 577–585.
- Cooksey, R.C., Hebert, L.F., Jr., Zhu, J.H., Wofford, P., Garvey, W.T., and McClain, D.A. (1999) Mechanism of hexosamine-induced insulin resistance in transgenic mice overexpressing glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase: decreased glucose transporter GLUT4 translocation and reversal by treatment with thiazolidinedione. *Endocrinology*, **140**, 1151–1157.
- Guinez, C., Lemoine, J., Michalski, J.C., and Lefebvre, T. (2004) 70-kDa-heat shock protein presents an adjustable lectinic activity towards O-linked N-acetylglucosamine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **319**, 21–26.
- Guinez, C., Morelle, W., Michalski, J.-C., and Lefebvre, T. (2005) O-GlcNAc glycosylation: a signal for the nuclear transport of cytosolic proteins? *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, **37**, 765–774.
- Han, I. and Kudlow, J.E. (1997) Reduced O-glycosylation of Sp1 is associated with increased proteasome susceptibility. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 2550–2558.
- Hatsell, S., Medina, L., Merola, J., Haltiwanger, R., and Cowin, P. (2003) Plakoglobin is O-glycosylated close to the N-terminal destruction box. *J. Biol. Chem.*, **278**, 37745–37752.
- Kamemura, K. and Hart, G.W. (2003) Dynamic interplay between O-glycosylation and O-phosphorylation of nucleocytoplasmic proteins: a new paradigm for metabolic control of signal transduction and transcription. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **73**, 107–136.
- Lefebvre, T., Cieniewski, C., Lemoine, J., Guerardel, Y., Leroy, Y., Zanetta, J.P., and Michalski, J.C. (2001) Identification of N-acetyl-d-glucosamine-specific lectins from rat liver cytosolic and nuclear compartments as heat-shock proteins. *Biochem. J.*, **360**, 179–188.
- Lubas, W.A. and Hanover, J.A. (2000) Functional expression of O-linked GlcNAc transferase. Domain structure and substrate specificity. *J. Biol. Chem.*, **275**, 10983–10988.
- Marshall, S., Bacote, V., and Traxinger, R.R. (1991) Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. *J. Biol. Chem.*, **266**, 4706–4712.
- McClain, D.A., Lubas, W.A., Cooksey, R.C., Hazel, M., Parker, G.J., Love, D.C., and Hanover, J.A. (2002) Altered glycan-dependent signaling induces insulin resistance and hyperleptinemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 10695–10699.
- Patti, M.E., Virkamäki, A., Landaker, E.J., Kahn, C.R., and Yki-Järvinen, H. (1999) Activation of the hexosamine pathway by glucosamine in vivo induces insulin resistance of early postreceptor insulin signaling events in skeletal muscle. *Diabetes*, **48**, 1562–1571.
- Robinson, K.A., Sens, D.A., and Buse, M.G. (1993) Pre-exposure to glucosamine induces insulin resistance of glucose transport and glycogen synthesis in isolated rat skeletal muscles. Study of mechanisms in muscle and in rat-1 fibroblasts overexpressing the human insulin receptor. *Diabetes*, **42**, 1333–1346.
- Rossetti, L., Hawkins, M., Chen, W., Gindi, J., and Barzilai, N. (1995) In vivo glucosamine infusion induces insulin resistance in normoglycemic but not in hyperglycemic conscious rats. *J. Clin. Invest.*, **96**, 132–140.
- Sumegi, M., Hunyadi-Gulyas, E., Medzihradzky, K.F., and Udvardy, A. (2003) 26S proteasome subunits are O-linked N-acetylglucosamine-modified in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **312**, 1284–1289.
- Torres, C.R. and Hart, G.W. (1984) Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc. *J. Biol. Chem.*, **259**, 3308–3317.
- Wells, L., Vosseler, K., and Hart, G.W. (2003) A role for N-acetylglucosamine as a nutrient sensor and mediator of insulin resistance. *Cell. Mol. Life Sci.*, **60**, 222–228.
- Yang, X., Zhang, F., and Kudlow, J.E. (2002) Recruitment of O-GlcNAc transferase to promoters by corepressor mSin3A: coupling protein O-GlcNAcylation to transcriptional repression. *Cell*, **110**, 69–80.
- Zachara, N.E. and Hart, G.W. (2004) O-GlcNAc modification: a nutritional sensor that modulates proteasome function. *Trends Cell. Biol.*, **14**, 218–221.
- Zachara, N.E., O'Donnell, N., Cheung, W.D., Mercer, J.J., Marth, J.D., and Hart, G.W. (2004) Dynamic O-GlcNAc modification of nucleocytoplasmic proteins in response to stress. A survival response of mammalian cells. *J. Biol. Chem.*, **279**, 30133–30142.
- Zhang, F., Su, K., Yang, X., Bowe, D.B., Paterson, A.J., and Kudlow, J.E. (2003) O-GlcNAc modification is an endogenous inhibitor of the proteasome. *Cell*, **115**, 715–725.

ARTICLE 3

(manuscript en préparation)

**Crosstalk between *O*-GlcNAc glycosylation, ubiquitination and Hsp70
GlcNAc-binding activity during cell injury.**

**Céline GUINEZ, René CACAN, Jean-Claude MICHALSKI and Tony
LEFEBVRE**

CROSSTALK BETWEEN *O*-GlcNAc GLYCOSYLATION, UBIQUITINATION AND HSP70 GlcNAc-BINDING ACTIVITY DURING CELL INJURY.

Céline GUINEZ, René CACAN, Jean-Claude MICHALSKI and Tony LEFEBVRE
From the UMR 8576/CNRS, laboratoire de chimie-biologique, bâtiment C9, 59655
Villeneuve d'Ascq, France

Running title: *O*-GlcNAc and ubiquitin behaviours after cell stress

Address correspondence to : Tony LEFEBVRE, UMR 8576/CNRS, laboratoire de chimie-biologique, bâtiment C9, 59655 Villeneuve d'Ascq, France Tel : +33 3 20 43 44 30 ; Fax : +33 3 20 43 65 55; E-mail: tony.lefebvre@univ-lille1.fr

Glycosylation of cytosolic and nuclear proteins by *O*-GlcNAc has been intensively studied over the two last past decades. Nevertheless the exact functions of this post-translational modification (PTM) remain to be determined. It has been recently speculated that *O*-GlcNAc (*O*-linked N-acetylglucosamine) could act as a protective signal against proteasomal degradation of proteins, both by modifying target substrates and by inhibiting proteasome itself. We have investigated the putative relationship between *O*-GlcNAc and ubiquitin pathways. After stress both PTM rapidly increased, although their evolution profiles differed. *O*-GlcNAc proteins were not stabilized by proteasome inhibition. The ubiquitin-activating enzyme E1 is *O*-GlcNAc modified and this glycosylation varies according cell culture conditions and stress. E1 interacts with Hsp70 in an *O*-GlcNAc dependent manner suggesting a cross regulation of response to stress between heat shock proteins and enzymes involved in ubiquitination. *O*-GlcNAc transferase (OGT) silencing speculated a regulation of ubiquitination by *O*-GlcNAc. Moreover *O*-GlcNAc is crucial for cell viability since OGT silencing decreased two-fold cell thermotolerance. Hsp70 GlcNAc-binding activity (HGBA) responded in the first minutes to stress and rapidly decreased thereafter. In addition proteasome inhibition with MG132,

epoxomicin or lactacystin led to an activation of HGBA. Finally, this HGBA was also triggered by L-azetidine-2-carboxylic acid-induced protein misfolding demonstrating that change in protein conformation is one of the key-activator of this Hsp70 property. These results show that *O*-GlcNAc and ubiquitin are not strictly opposite PTM and that E1 could be the common denominator of *O*-GlcNAc glycosylation and ubiquitination pathways.

Proteolysis is essential for cellular function and viability. Nucleocytoplasmic-resident proteins and reticulum endoplasmic newly synthesized proteins that do not find their final conformation and that are retrotranslocated to the cytosol are mainly destroyed by the proteasome pathway (1). This process is observed both in healthy cell and when cells are injured. Proteasome is particularly important in the regulation level of short half-lives proteins like cyclins that intervene at a precise moment of the cell cycle (2) and like transcription factors (3). Proteasome also takes charge the elimination of chemically or metabolically damaged proteins that exhibit hydrophobic peptidic segments and that have the propensity to aggregate. Those proteins are toxic for cell homeostasis requiring their rapid degradation by a cellular mechanism known as the ubiquitin-proteasome system (UPS) (4).

It has been recently speculated that *O*-GlcNAc (*O*-linked N-acetylglucosaminylation) could protect proteins against proteasomal degradation

(5-8). *O*-GlcNAc is the major glycosylation type found within the cytosolic and nuclear compartments of eukaryotic cell (9, 10). This glycosylation is based on the attachment of a single N-acetylglucosamine on serine or threonine residues. While *O*-GlcNAc addition does not require strict consensus sequence, *O*-GlcNAc transferase (OGT) needs a specific peptidic environment. Usually *O*-GlcNAc attachment occurs near a proline residue and in regions enriched in serines and threonines. Very interestingly these sequences are similar to PEST (rich in proline, glutamine, serine, and threonine) sequences (11). According to the existing relationship between *O*-GlcNAc and phosphorylation and since activation of PEST can occur after phosphorylation (12), it can be assumed that *O*-GlcNAc counteracts the effect of phosphorylation to protect proteins. *O*-GlcNAc glycosylation of the transcription factor Sp1 renders it less susceptible to proteasomal destruction as demonstrated by culture in high glucose condition or by culture in a medium supplemented with glucosamine, whereas glucose starvation diminishes its half-life (5). Other example that strongly suggests a protective function of *O*-GlcNAc is that of β -estrogen-receptor (β -ER) that bears *O*-GlcNAc motif on a high PEST sequence score. The glycosylated form of β -ER is more resistant to degradation than the unglycosylated one that can be phosphorylated and consequently sensitive for proteasomal degradation (6). It has been also recently demonstrated that the proteasome could be regulated through the *O*-GlcNAc glycosylation of the 19S-regulatory subunit (7). This inhibition by *O*-GlcNAc adds another regulatory level of protein protection by this glycosylation. Recently our lab has demonstrated that the constitutive form of the 70kDa-heat shock protein family (Hsc70) and the inducible one (Hsp70) were endowed of a lectin activity toward *O*-GlcNAc residues (13, 14). This activity was enhanced when cells were stressed (14, 15). One can suppose

that OGT and Hsp70 can act in synergy for protecting proteins against aggregation and destruction first by modifying substrates with *O*-GlcNAc and secondly by Hsp70 binding of the glycosylated proteins.

Since it is assumed that one of the principal functions of ubiquitin is to promote protein destruction by proteasome and that *O*-GlcNAc appears to be protective for proteins, we investigated a putative relation between these two PTM. We showed that after a thermal stress both ubiquitin and *O*-GlcNAc pathways were used. The enhancement of these two PTM presented differences in term of evolution profiles. For a short period after the stress *O*-GlcNAc was insensitive to proteasome inhibition, showing that *O*-GlcNAc proteins resist to proteasomal degradation. E1, an ubiquitin-activating enzyme that begin the process of protein ubiquitination is modified with *O*-GlcNAc. This glycosylation of E1 varied with the conditions of culture (and stress) and moreover is correlated with Hsp70 binding. Finally, we showed that a proline analogue-induced misfolding triggered HGBA, demonstrating the link between the induction of lectin property and the protein misfolding.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell culture and treatments of cells.

HepG₂ and HeLa cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco) supplemented with 10 % fetal calf serum (v/v), 2 mM L-glutamine, 5 IU/ml penicillin, 50 μ g/ml streptomycin at 37°C on a humidified atmosphere enriched with 5 % CO₂. Cultures were carried out on dishes (diameter 100 mm). Dishes were preliminarily treated with 0.1 % porcine gelatine (Sigma) for HepG₂ cells.

For glucose deprivation experiments, cells were rinsed with 10 mL of glucose-depleted medium (supplemented with 10 % FCS) and incubated in this medium only, or in this medium supplemented by 5 mM

glucosamine (Sigma) for 24h (14). Thermal stress was induced by placing cells for 24h at 42°C in a 5%-CO₂ enriched atmosphere. For the kinetic experiments, HepG₂ were grown at 37°C and placed at 42°C for the indicated time periods.

MG132 (N-carbobenzoxyl-Leu-Leu-leucinal) was used at a concentration of 8µM (8 mM stock solution in DMSO at -80°C). Epoxomicin and lactacystin were used at a concentration of 0.1µM (10 mM stock solution in DMSO) and 1µM (10 mM stock solution in DMSO). L-azetidine-2-carboxylic acid was used at a concentration of 5 mM (50 mM stock solution in PBS, phosphate-buffered saline). Anisomycin and cycloheximide were used at a concentration of 15µg.mL⁻¹. Drugs were incubated for 24 h or during indicated time periods.

Protein enrichment on GlcNAc-beads and immunoprecipitation with the anti-O-GlcNAc antibody (RL-2). HepG₂ were first washed with 10 mL of cold PBS. Cells were lysed on ice either with a hypotonic buffer (10 mM Tris/HCl, 10 mM NaCl, 15 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM MgCl₂ and proteases inhibitors, pH 7.2) for GlcNAc-binding studies, either with the lysis buffer (10 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100 (v/v), 0.5 % sodium deoxycholate (w/v), 0.1 % sodium dodecyl sulphate (w/v) and proteases inhibitors, pH 7.4) for O-GlcNAc-bearing proteins enrichment. Cellular extracts were then centrifuged at 20,000 g for 30 min at 4°C. For lectin activity, supernatants were incubated with 30 µL of GlcNAc-labelled beads (N-acetyl-D-glucosamine immobilized on 6% beaded agarose with a spacer of five carbons, Sigma) at 4°C for 1h. The beads were washed four times with the binding buffer (20 mM Tris/HCl, 200 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, and proteases inhibitors, pH 7.4). For O-GlcNAc-bearing proteins enrichment, supernatants were incubated with 2.5 µL of the mouse monoclonal anti-O-GlcNAc antibody (RL-2, Affinity Bioreagents) and placed at 4°C overnight. Bound proteins

were then recovered after addition of 30 µL of Sepharose-labelled protein G (Amersham Biosciences) for 1h at 4°C. Beads were gently centrifuged for 1 min and washed with the following buffers : lysis buffer, lysis buffer supplemented with 500 mM NaCl, lysis buffer/TNE (10 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, and 1mM EDTA, pH 7.4) in equal volume and finally with TNE alone.

Co-immunoprecipitation with anti-Hsp70. For co-immunoprecipitation, cells were lysed on ice in a smooth lysis buffer (20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0.5% NP-40 (v/v) and proteases inhibitors, pH 8.0). Whole cell extracts were centrifuged at 20,000 g for 30min at 4°C and supernatants were collected. Immunoprecipitation with the anti-Hsp70 antibody was carry out at a final concentration of 1:200 overnight at 4°C, followed by an incubation with Sepharose-labelled protein A (Amersham Biosciences) for 1h at 4°C. Beads were gently centrifuged for 1 min and washed four times for five min each under rotation with the smooth lysis buffer. Bound proteins were analysed by western blot with a monoclonal anti-E1 antibody (Sigma) at a final dilution of 1:1,000.

SDS-PAGE, western blotting and antibody staining. Equal amounts of extracted protein were subjected to western blotting. Samples were analysed by 10 % SDS-PAGE under reducing conditions and proteins were electroblotted onto nitrocellulose sheet (Amersham Biosciences). Equal loading was checked using Ponceau red staining. Membranes were first saturated for 45 min with 5 % non-fatty acid milk in TBS-Tween buffer (20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl and 0.05 % Tween (v/v), pH 8.0). Mouse monoclonal anti-O-GlcNAc (RL-2), mouse monoclonal anti-ubiquitin (Sigma), mouse monoclonal anti-E1 (Sigma) antibodies were used at a final dilution of 1:1,000 and rabbit polyclonal anti-Hsp70 antibody at a final dilution of 1:30,000. Rabbit anti-β-catenin was used at a dilution of 1:1,000 ;

rabbit anti-OGT (AL-28) was used at a dilution of 1:2,000 and rabbit anti- β -tubulin antibody was used at a dilution of 1:500. Membranes were incubated overnight at 4°C, then washed three times with TBS-Tween for 10 min and incubated with either an anti-rabbit or an anti-mouse horseradish peroxidase-labelled secondary antibody at a dilution of 1:10,000 for 1h. Finally, three washes of 10min each were performed with TBS-Tween and the detection was carried out with enhanced chemiluminescence (Amersham Biosciences). Primary and secondary antibodies complexes were removed by incubation of the membranes with a stripping buffer (62.5 mM Tris/HCl, 2 % SDS, 100 mM 2-mercaptoethanol, pH 6.5) for 30 min at 50°C, abundantly washed with TBS-Tween and re-incubated with a rat anti-Hsc70 at a dilution of 1:1,000 (Santa Cruz Biotechnologies). Anti-rat horseradish peroxidase labelled secondary antibody was used at a dilution of 1:10,000 for 1 h.

RNA interference (RNAi). RNAi were designed for the human OGT sequence. Oligonucleotides were purchased from Eurogentec. The oligonucleotide (1153) used in this study is the following: GGA-GGC-UAU-UCG-AAU-CAG. 8 μ L of Dreamfect reagent (OZ biosciences) was diluted with serum-free/antibiotic free Opti-MEM medium (Invitrogen) to a final volume of 100 μ L. 2 μ g of RNAi was diluted in 100 μ L final volume with Opti-MEM. The 100 μ L diluted transfection reagent and the 100 μ L diluted RNAi solution were then mixed and incubated for 20 min. The 200 μ L RNAi solution was added to HeLa cells maintained in 1.8 mL of Opti-MEM per well in a 6-wells plate. This procedure was repeated every 24 hours for 4 days. For viability tests, the transfection was performed in a 24-well plate (all volumes and quantities were two-fold divided). After 96 hours of incubation with the oligonucleotide, OGT expression and activity were tested by immunoblotting either with rabbit anti-OGT antibodies

(AL-28) to test OGT level or with RL-2 antibodies to check *O*-GlcNAc levels. Viabilities of HeLa cells were performed using the trypan blue exclusion method (15).

Sambucus nigra Agglutinin (SNA) staining. After OGT silencing, crude cellular extracts were run on a 10% SDS-PAGE, electroblotted and membranes were incubated with the digoxigenin-coupled SNA at a final concentration of 1:1,000 in TBS-Tween for 1h at room temperature. This incubation was followed by three washes of 10 min each with TBS-Tween. The membrane was incubated with an alkaline phosphatase-labelled anti-digoxigenin secondary antibody at a final concentration of 1:1,000 in TBS-Tween for 1h. After three washes of 10 min each with TBS-Tween, revelation was achieved by the addition of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate and nitro blue tetrazolium.

Immunofluorescence experiment. HepG₂ and HeLa cells were grown on coverglasses for 48 h and washed twice with cold PBS. For RNAi experiments, amount of each reactive was adjusted to 6-wells plaque. Cells were fixed in 3% of paraformaldehyde in cold PBS for 15 min and washed with PBS. Excess of paraformaldehyde was destroyed with a solution of 50 mM ammonium chloride for 10 min. After washing with PBS, cells were permeabilised with 0.1% Triton-X100 for 5 min. Non-specific sites were blocked with goat serum. Coverglasses were then incubated with anti-*O*-GlcNAc (RL-2), anti-OGT (AL-28) and with anti-ubiquitin each at a dilution of 1:100 in a 10% goat serum solution (in PBS) for 30 min. After three washes in PBS, FITC and Texas Red-labelled secondary antibodies were incubated on coverglasses (dilution 1:50). Nuclei were specifically stained with DAPI. Cells were visualised using an Axioplan 2 imaging (Zeiss) and an Axio Cam HRC camera (AxioVision).

RESULTS

To tentatively decipher by which mechanism *O*-GlcNAc glycosylation could protect substrates against proteasomal degradation, we investigated the possibility that *O*-GlcNAc and ubiquitin could antagonise one-to-another in a reciprocal interplay. Indeed, ubiquitination is the first step that prepares a damaged protein to be degraded by the proteasomal machinery. It can be assumed that *O*-GlcNAc could block ubiquitination of proteins, leading to a substrate rescue. As discussed in the introduction section, *O*-GlcNAc sites are frequently similar to PEST sequences (11). We can hypothesise that *O*-GlcNAc blocks phosphorylation at PEST sequences, avoiding their subsequent ubiquitination and finally their degradation.

***O*-GlcNAc and ubiquitin are not mutually exclusive**

Proteasomal pathway is the main track by which ubiquitinated-cytosolic and nuclear proteins are destroyed. Evidence of a putative protection of such proteins by *O*-GlcNAc has emerged during the last years. Starting from the role of proteasome targeting played by ubiquitin, we investigated the relation between the two PTM, i.e. *O*-GlcNAc and ubiquitin. The first aim was to visualize the putative relationship/interplay between ubiquitin and *O*-GlcNAc at the cellular and at the molecular levels. *O*-GlcNAc glycosylation was modulated in HepG₂ cells after stabilization of ubiquitinated proteins with MG132, a reversible proteasome inhibitor. This was achieved either using glucose deprivation or forskolin (an activator of adenylate cyclase) to down-express *O*-GlcNAc or using glucosamine to enhance *O*-GlcNAc level through the hexosamine biosynthetic pathway. Intriguingly, after hyperthermia, ubiquitin and *O*-GlcNAc evolved in the same way (but not at the

same level) suspecting a common regulation of the two PTM (Fig. 1A).

Nuclear and cytosolic distribution of *O*-GlcNAc and ubiquitinated proteins has been examined using a monoclonal anti-*O*-GlcNAc antibody (in conjunction with a FITC-coupled secondary antibody) and a polyclonal anti-ubiquitin antibody (in conjunction with a Texas Red-coupled secondary antibody) by immunofluorescence microscopy (Fig. 1B). Ubiquitin (Red) was exclusively present in the cytosolic compartment as demonstrated by the non-superposition of Ub-proteins distribution and DAPI staining (Blue, specific of nucleus). In counterpart, *O*-GlcNAc glycosylation (Green) is more particularly localized in the nucleus (superposition with DAPI staining) and weaker in the cytoplasm (diffuse green). Superposition of ubiquitin staining and *O*-GlcNAc staining showed a co-localisation of the two modifications only in the cytoplasm (orange).

To check the hypothesis that some *O*-GlcNAc proteins could also be ubiquitinated or on the contrary if these two PTM exclude mutually, immunoprecipitation experiments were performed on HepG₂ cells extracts with the anti-*O*-GlcNAc antibody and revealed with the anti-*O*-GlcNAc antibody (Fig. 1C, left panel) or the anti-ubiquitin antibody (right panel). We clearly see that proteins, but not all, can be *O*-GlcNAc glycosylated and also modified with ubiquitin: the two PTM may co-exist on the same proteins. Note that for both PTM, the molecular weight range of the most representative modified proteins is the same, i.e. between 50 kDa to the highest molecular weight. Experiments in which ubiquitinated-proteins were enriched using anti-ubiquitin were also done. Western blot of the bound proteins with anti-*O*-GlcNAc antibodies confirmed the co-existence of both PTM on some proteins (data not shown).

Time dependence of O-GlcNAc and ubiquitin levels after heat shock. Since we demonstrated that *O*-GlcNAc and ubiquitin

could be both presents on a same protein, we asked about the evolution scheme of each PTM after heat shock. For that purpose we investigated the modification of proteins with ubiquitin and *O*-GlcNAc after HepG₂ cells were exposed to a thermal stress for increasing time periods at 42°C with or without MG132 (Fig. 2). The level of expression of Hsp70 and its lectin activity toward GlcNAc residues were also investigated. For this experiment, whole extract were incubated with GlcNAc-labelled agarose and bound proteins were examined with an anti-Hsp70 antibody by western blot. The content in *O*-GlcNAc and ubiquitin was also followed by western blot. Both ubiquitin and *O*-GlcNAc increased immediately after the stress (near 2.5 to 5 min post-stress) but ubiquitin showed a maximal level at 10 min post-stress (for short times) whereas *O*-GlcNAc increased all along the kinetic (compare lanes 1 to 14). This result is consistent with data published by Zachara *et al.* (16) that showed that *O*-GlcNAc levels rapidly increased in response to a large variety of stress. Intriguingly, *O*-GlcNAc response was insensitive to proteasome inhibition contrary to ubiquitin content. This indicates that *O*-GlcNAc-bearing proteins are not degraded by the proteasome pathway. When the time post-stress was longer (between 60 to 240 min) ubiquitin began to re-enhance, but *O*-GlcNAc-modified proteins were stabilized by MG132 contrary to ubiquitin (lanes 15 to 20). Markedly, when the time post-stress was of 24 or 48 hours, *O*-GlcNAc modified proteins were stabilized by MG132 showing that contrary to shorter times *O*-GlcNAc proteins could be degraded by the proteasome (lanes 21 to 24). The second point of these experiments showed that whereas the 2.5 min time period of stress was too short to induce an increase in Hsp70 level (Hsp70 is induced after a time period of stress of about 2-4 hours, lanes 17 to 20), GlcNAc-directed Hsp70 lectin activity was induced

immediately after stress (compare lanes 1 and 3). This GlcNAc-binding activity was rapidly cancelled after about 10 min post-stress. This activity was significantly recovered after 4 to 24 hours post-stress and especially when proteasome was inhibited (compare lane 19 to 20 and lane 21 to 22). These results demonstrate that ubiquitination and *O*-GlcNAc both respond to stress by accumulation but ubiquitination and *O*-GlcNAc are chronologically shifted. We also showed that for a short time after the stress, HGBA intervene before the appearance of newly synthesized Hsp70. Furthermore it is interesting to note that in non-heat shocked control cells, HGBA is triggered by proteasome inhibition (lanes 1 and 2; lanes 21 and 22).

Hsp70 GlcNAc-binding activity is activated by proteasome inhibition.

Proteasome inhibition on HGBA has been studied thoroughly. Cells were exposed to different conditions for 24 hours: unstressed conditions (Ctrl), glucose-deprivation with or without glucosamine and thermal stress (Fig. 3A). As expected, MG132 triggered Hsp70 increase whatever the conditions and more interestingly HGBA was greatly induced. Same experiment were realized with Hsc70 (70kDa-Heat shock cognate), but Hsc70 expression (lower panel) and Hsc70 GlcNAc-binding properties were different from that of Hsp70 (data not shown). Control of MG132 proteasomal inhibition was performed using an anti-ubiquitin antibody. As expected, treatment with MG132 stabilized ubiquitinated proteins. Confirmation of the proteasomal inhibition on Hsp70 lectin activity was achieved using two other proteasome inhibitors, i.e. epoxomicin and lactacystin (Fig. 3B) that are irreversible inhibitors unlike MG132 that is reversible. Like MG132, but at a lower degree, epoxomicin and lactacystin activated HGBA. Thermal stress was used as a positive control of the lectin activity and normal condition (at 37°C without any proteasome inhibitors) was used as a

negative control (compare the expression of Hsp70, Fig.3B upper panel, to the lectin property of Hsp70, lower panel). Control of proteasome inhibition has been performed as in Fig. 3A using anti-ubiquitin staining (not shown).

Taken together, these experiments confirm that HGBA could be triggered by proteasomal inhibition.

E1/Hsp70 interaction correlates with E1 O-GlcNAc status

According to the common features existing between ubiquitination and *O*-GlcNAc we hypothesized that ubiquitination process can be regulated by *O*-GlcNAc. We then looked at the putative *O*-GlcNAc glycosylation of E1, an ubiquitin activating enzyme that initiates ubiquitination process. HepG₂ cells were cultured either in normal conditions (with 25 mM of glucose, Ctrl), heat-shocked at 42°C, cultured without glucose or without glucose but supplemented with 5 mM glucosamine. After lysis, cellular extracts were immunopurified with the anti-*O*-GlcNAc antibody. E1 is slightly *O*-GlcNAc modified in control cells (Fig. 4A), whereas in stress conditions, i.e. without glucose and at 42°C, the glycosylation was totally abrogated except when cells were cultured with glucosamine. Interestingly, the interaction of E1 with Hsp70 (co-immunoprecipitation experiments exposed in Fig. 4B) correlated with *O*-GlcNAc glycosylation of E1: the interaction was maximal when cells were cultured in presence of glucosamine, i.e. when E1 was highly glycosylated and weaker in normal conditions and in the stress conditions. We can assume that the interaction between E1 and Hsp70 was in part *O*-GlcNAc-dependent. Since E1 *O*-GlcNAc glycosylation and its interaction with Hsp70 are modulated by cell culture conditions and stress, the idea of a control of ubiquitination process by *O*-GlcNAc is reinforced.

OGT silencing impairs ubiquitination and decreases cell viability. OGT level was reduced using RNA interference

technology. HeLa cells were transfected with oligonucleotides (noted 1153) and incubated at 37°C for 96 h. Heat-shock was induced by incubation of HeLa at 42°C for the last 24 h. OGT silencing was controlled by measurement of OGT level and *O*-GlcNAc-bearing proteins level (Fig. 5 A, left panel). Anti-beta-tubulin was used for the loading control. A staining with *Sambucus nigra* Agglutinin (SNA), a lectin that specifically binds sialic acid linked in $\alpha(2-6)$ to a galactose residue demonstrated that OGT silencing did not perturb other glycosylations types (Fig. 5A, right panel). Effectiveness of OGT silencing on OGT expression and *O*-GlcNAc level was also checked using immunofluorescent microscopy (Fig. 5B). The top and middle panels of figure 5B show that OGT silencing (1153) impaired OGT expression, *O*-GlcNAc and ubiquitin levels. The bottom panel shows that ubiquitinated proteins more particularly localised to the cytosolic compartment (as shown for HepG₂, Fig. 1B) and that OGT is both distributed to the nuclear and cytosolic compartments as attested by the co-staining with DAPI. According to results exposed above and since *O*-GlcNAc glycosylation of E1 depends on cell culture conditions, E1 glycosylation and ubiquitination rates were examined after OGT silencing (Fig. 5C). OGT silencing was correlated to a decrease in ubiquitinated proteins (as shown in Fig 5B) confirming a regulation of ubiquitination process by *O*-GlcNAc, presumably in part through E1 glycosylation. We also observed a decrease in the β -catenin level, an *O*-GlcNAc protein (17) containing PEST sequences: after heat shock beta-catenin was reduced and OGT silencing completely abolished its expression (Fig. 5C, lower panel). Tolerance of HeLa cells to heat shock was determined using trypan blue exclusion (Fig.5D). Cells transfected with oligonucleotides 1153 were less viable both at 37°C and at 42°C demonstrating that *O*-GlcNAc is an essential PTM for cell viability and is

necessary for cells to resist to stress. Similar results were obtained by Zachara *et al.* (16) since they showed that a reduction or a blockade in *O*-GlcNAc had repercussions on cell viability.

Protein misfolding induces Hsp70 lectin activity. HGBA was tested after HepG₂ cells were cultured for 24 hours in presence of L-azetidine-2-carboxylic acid, a proline analogue (Fig. 6A). L-azetidine-2-carboxylic acid induces protein misfolding by enhancing constraints when incorporated during translation. HGBA was greatly enhanced when protein misfolding was provoked by L-azetidine-2-carboxylic acid (Fig. 6B). In order to consolidate this result and to demonstrate that L-azetidine-2-carboxylic acid induced HGBA by incorporation into newly synthesized proteins, we counteracted L-azetidine-2-carboxylic acid effect by inhibiting protein translation. For this purpose, cells were treated with L-azetidine-2-carboxylic acid in conjunction with cycloheximide or anisomycin, two translation inhibitors, at a concentration of 15 µg.mL⁻¹ during 24h (Fig 6B). Effect of cycloheximide and anisomycin on cell viability has been checked (data not shown) and results demonstrated that in the conditions used the two drugs did not affect cell viability. Inhibition of protein translation and consequently prevention of L-azetidine-2-carboxylic acid incorporation abrogate the effect of L-azetidine-2-carboxylic acid on HGBA.

DISCUSSION

O-GlcNAc modifies numerous nucleocytoplasmic proteins that belong to diverse families including metabolic enzymes, transcription factors, heat shock proteins, architectural proteins (18). One of the characteristic features of *O*-GlcNAc is that it is highly dynamic and that it can sometimes counteract phosphorylation at the same site or at an adjacent site (19, 20). While the list of proteins modified by this glycosylation does not cease to increase,

functions played by *O*-GlcNAc remain to be elucidated.

Although, based on observations made by different groups it has been hypothesized that *O*-GlcNAc could stabilize proteins by preventing proteasomal degradation (5, 6). This protection can be triggered by inhibition of proteasome itself by modifying the 19S-regulatory subunit (7, 8) and by protection of protein-substrates directly. In this last idea, experiments have shown that a wide variety of stress (UV, hyperthermia, H₂O₂...) inflicted to cells provoked an increase of *O*-GlcNAc content on a large panel of proteins (18). Similar results were obtained by Sohn *et al.* (21) since they showed that hyperthermia was followed by an increase in *O*-GlcNAc modification. Moreover the same authors demonstrated that cells over-expressing OGT better support stress. They built an attractive hypothesis in which they considered that OGT behave as a chaperone by modifying, and so by protecting, unfolded hydrophobic peptide segment exposed after cell injury (Fig. 7). Finally, our group showed in a previous report the GlcNAc-binding properties of Hsp70 (14). This lectin activity is unmasked after thermal or nutrient stresses (14, 15). The hypothesis is that *O*-GlcNAc glycosylation of damaged proteins and Hsp70-GlcNAc binding properties act together and in synergy to protect target proteins against proteasome activity by binding *O*-GlcNAc-exposed motif to Hsp70 (Fig. 7). Despite these exciting observations, the function of *O*-GlcNAc in protein protection is far to be deciphered.

In the paper, we were interested in the putative relation between *O*-GlcNAc and ubiquitin: the first modification being presumably a signal against protein degradation and the second one being a well-described pro-degradative PTM. Intriguingly, it appeared quickly that in opposition to the reciprocal relationship between *O*-GlcNAc and phosphorylation, no reciprocity between *O*-GlcNAc and ubiquitination exist: when a thermal stress

occurred both PTM increased (Fig. 2). Nevertheless the kinetic of each PTM were quite different. For the fifteen first minutes post-stress the increase in *O*-GlcNAc was continue and regular. For ubiquitination, the progression was stopped near ten minutes and ubiquitination diminished. For longer time periods of stress, ubiquitination was newly triggered with a maximum near 24 hours post-stress. *O*-GlcNAc glycosylation was not stabilized by MG132, unlike ubiquitination, suggesting that *O*-GlcNAc proteins were not degraded by proteasome until four hours post-stress. For longer times post-stress, *O*-GlcNAc proteins were no longer protected against proteasomal degradation and the profile was similar to that of ubiquitin. We hypothesized according to these observations that after stress, proteins could be either modified with *O*-GlcNAc or ubiquitin. The first PTM permit the protection of the modified protein whereas the second one targets the protein to the proteasome. While the stress was continuously applied to cells, proteins that can not recover their native conformation and functionality are both *O*-GlcNAc modified and ubiquitinated, leading to their destruction. Interestingly, ubiquitination seems to be slighter for short time than for longer times suggesting an increased degradation rate for longer periods of stress. Moreover, and reinforcing the capacity of ubiquitin and *O*-GlcNAc to work in concert, immunoprecipitation experiments have shown that *O*-GlcNAc and ubiquitin can co-exist on the same protein (Fig. 1). So it appeared that the couple ubiquitin and *O*-GlcNAc could decide for protein destruction or repairing. We then investigated that ubiquitination process could be itself regulated by *O*-GlcNAc. In this idea we showed that the ubiquitin activating enzyme E1 was itself *O*-GlcNAc glycosylated. This modification was modulated by cell culture conditions and stress. In the same field, Cole and Hart have demonstrated that the enzyme of de-ubiquitylation (ubiquitin

carboxyl hydrolase-L1; UCH-L1) was *O*-GlcNAc modified in the synaptosome (22). Effect of *O*-GlcNAc on such enzyme is not known but it can be assumed that it directly regulates its activity.

Hsp70 acts as a molecular chaperone that helps nascent proteins to acquire their correct folding and permits repairing and renaturation of damaged proteins (23). When folding or renaturation failed, Hsp70 targets undesirable proteins to the ubiquitin proteasomal pathway (UPS) (4, 24). Hsp70 (and Hsc70) is endowed of a lectin activity towards GlcNAc residues. According to precedent and current studies, we expect that immediately after cell damage, Hsp70 binds *O*-GlcNAc bearing proteins thus avoiding their aggregation and thereafter to tentatively refold them. In regard of our thermal kinetic experiment and of Zachara' experiments (16), we can see that after a stress occurs the response in *O*-GlcNAc was extremely rapid, and only a few minutes is sufficient for Hsp70 to exhibit its binding toward GlcNAc whereas its rate only increases after several hours. We speculated that after cell shocking, an unknown Hsp70 GlcNAc-binding partner dissociates from Hsp70 unmasking its GlcNAc binding capacities. We have tested the possibility that this factor could be Hsf-1 (Heat shock factor-1) that bind Hsp70 in unstressed conditions and that is released after stress. Unfortunately and unexpectedly Hsf-1 was not shown to be *O*-GlcNAc modified. The identity of this putative interacting factor had to be determined. As also shown in figure 2, HGBA was quickly diminished suggesting a rapid saturation of Hsp70 by *O*-GlcNAc damaged proteins. This activity reappeared after a long period when Hsp70 level was increased.

This paper also demonstrates the activation of HGBA by proteasome inhibition. We speculated that this increase could be considered as a cell response against protein aggregation: since the flux of misfolded proteins (considered as 30% of the newly synthesised proteins, (25)) could

not be destroyed by the 26S proteasome, Hsp70 exhibit lectin property to avoid their aggregation.

The last teaching of this work concerns the triggering of GlcNAc-binding activity of Hsp70 by proline analogue-induced misfolding. The incubation of HepG₂ with 2-carboxy L-azetidine indubitably demonstrates that HGBA could be triggered by protein misfolding. These results are in correlation with works performed by Sohn *et al.* (21) suggesting that after cell damage, OGT would modify exposed hydrophobic peptides. These segments could be subsequently recognized by Hsp70 via their lectin domain.

At this stage it appears evident that more work and study had to be done for the comprehension of the exact function of *O*-GlcNAc in proteasomal processing. But at present it seems clear that it has a protective effect in protein stability and the comparison can be drawn between the quality control function played by calreticulin and calnexin in the endoplasmic reticulum via the gluco/degluco cycle on the one hand (26, 27) and Hsp70 via the *O*-GlcNAc/de-*O*-GlcNAc cycle in the other hand (Fig. 7).

References

1. Pines, J., and Lindon, C. (2005) *Nat. Cell Biol.* **7**, 731-735.
2. Zhang, Z., Wang, H., Li, M., Agrawal, S., Chen, X., and Zhang, R. (2004) *J. Biol. Chem.* **16**, 16000-16006.
3. Minegishi, N., Suzuki, N., Kawatani, Y., Shimizu, R., and Yamamoto, M. (2005) *Genes Cells* **10**, 693-704.
4. Mayer, R. J. & Layfield eds. (2005) *Essays in Biochemistry: The Ubiquitin-Proteasome System*. Portland Press Ltd; London, U.K. + 222 pp.
5. Han, I., and Kudlow, J.I., (1997) *Mol Cell Biol.* **17**, 2550-2558.
6. Cheng, X., and Hart, G.W. (2001) *J. Biol Chem.* **276**, 10570-10575.
7. Zhang, F., Su, K., Yang, X., Bowe, D.B., Paterson, A.J., and Kudlow, J.E. (2003) *Cell* **115**, 715-725.
8. Zachara, N.E., and Hart, G.W. (2004) *Trends Cell. Biol.* **14**, 218-221.
9. Love, D.C., and Hanover, J.A. (2005) *Sci. STKE* **312**, re13.
10. Vosseller, K., Sakabe, K., Wells, L., and Hart, G.W. (2002) *Curr. Opin. Chem. Biol.* **6**, 851-857.
11. Rechsteiner, M., and Rogers, S.C. (1996) *Trends Biochem. Sci.* **21**, 267-276.
12. Martinez, L.O., Agerholm-Larsen, B., Wang, N., Chen, W., and Tall, A.R. (2003) *J. Biol Chem.* **278**, 37368-74.
13. Lefebvre, T. Cieniewski, C. Lemoine, J. Guerardel, Y. Leroy, Y. Zanetta, J.P., and Michalski, J.C. (2001) *Biochem. J.* **360**, 179-188.
14. Guinez, C., Lemoine, J., Michalski, J.C., and Lefebvre T. (2004) *Biochem Biophys Res Commun.* **319**, 21-26.
15. Guinez, C., Losfeld, M.E., Cacan, R., Michalski, J. C., and Lefebvre, T. (2006) *Glycobiology* **16**, 22-28.
16. Zachara, N.E., O' Donnell, N., Cheung, W.D., Mercer, J.J., Marth, J.D., and Hart, G.W. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 30133-30142.
17. Zhu W., Leber B., and Andrews D.W. (2001) *EMBO J.* **20**, 5999-6007.
18. Zachara, N.E., and Hart, G.W. (2004) *Biochim. Biophys. Acta.* **1673**, 13-28.
19. Comer, F.I., and Hart, G.W. (2001) *Biochemistry.* **40**, 7845-7852.
20. Kamemura, K., Hayes, B.K., Comer, F.I., and Hart, G.W. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 19229-19235.
21. Sohn, K.C., Lee, K.Y., Park, J.E., and Do, S.I. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Com.* **322**, 1045-1051.
22. Cole, R.N. & Hart, G.W. (2001) *J. Neurochem.* **79**, 1080-1089.
23. Sherman, M.Y., and Goldberg A.M. (2001) *Neuron.* **29**, 15-32.
24. Schwartz, A.L., and Ciechanover, A. (1999) *Annu. Rev. Med.* **50**, 57-74.
25. Shubert, U., Anton, L.C., Gibbs, J., Norbury, C.C., Yewdell, J.W., and Bennink, J.R. (2000) *Nature* **404**, 770-774.
26. Parodi, A.J. (2000) *Annu Rev Biochem.* **69**, 69-93.
27. Cacan R., Duvet S., Kmiecik D., Labiau O., Mir A.M., and Verbert A. (1998) *Biochimie* **80**, 59-68.

FOOTNOTES

Acknowledgements: CG is a recipient of a fellowship from the “Ministère de la Recherche et de l'Enseignement”. We thank “le Centre National de la Recherche Scientifique” and the University of Lille I. We are indebted to Pr. Gerald W. Hart for the generous gift of the anti-OGT antibody (AL28).

Abbreviations used in the text: *O*-GlcNAc, *O*-linked N-acetylglucosamine ; OGT, *O*-GlcNAc transferase ; PTM, post-translational modification ; Hsp70, 70-kDa Heat shock protein ; Hsc70, 70-kDa Heat shock cognate ; HGBA, Hsp70 GlcNAc-binding activity ; MG132 (N-carbobenzoxyl-Leu-Leu-leucinal) ; PBS, Phosphate-Buffered Saline ; TBS, Tris-Buffered Saline.

Figure legends

Figure 1- Ubiquitin and *O*-GlcNAc are not mutually exclusive.

A- HepG₂ cells were cultured without glucose (w/o Glc), without glucose but with glucosamine (w/o Glc + GlcNH₂), in presence of forskolin (Forsk.) or in normal condition (Ctrl) to modulate *O*-GlcNAc levels. Crude extracts proteins were analyzed by western blot for their *O*-GlcNAc (left panel) and ubiquitin (right panel) contents. Loading control was performed using an anti-Hsc70 antibody.

B- HepG₂ cells were analyzed according to their ubiquitinated proteins and *O*-GlcNAc proteins content using indirect immunofluorescent microscopy. Ubiquitin was localized using a polyclonal anti-ubiquitin antibody in conjunction with a Texas Red-labelled secondary antibody (Red staining). *O*-GlcNAc was localized with a monoclonal anti-*O*-GlcNAc antibody in conjunction with a FITC-labelled secondary antibody. DAPI was used for nucleus staining (Blue).

C- To check the concomitant presence of *O*-GlcNAc and ubiquitin on the same proteins, immunoprecipitation experiments were performed on HepG₂ cells extracts with an anti-*O*-GlcNAc antibody. Bound proteins were analyzed by western blot for their *O*-GlcNAc content (left panel) or their ubiquitin content (right panel).

Protein mass markers are indicated at the left (kDa).

Ub, ubiquitinated proteins ; Ig, immunoglobulins ; WB, Western blot.

Figure 2- Time course of *O*-GlcNAc and ubiquitin levels after thermal stress.

HepG₂ cells were incubated for increasing time periods at 42°C to induce thermal stress with or without the reversible proteasome inhibitor MG132 (8 μM). The ubiquitin and *O*-GlcNAc contents were analyzed by western blot using an anti-ubiquitin antibody (α-Ub.) or an anti-*O*-GlcNAc antibody. Hsp70 expression was followed using an anti-Hsp70 antibody and HGBA was studied by enrichment of protein crude extract on immobilized GlcNAc-beads and by analysis of the bound proteins with the anti-Hsp70 antibody. Loading charge control was checked using an anti Hsc70 antibody.

Protein mass markers are indicated at the left (kDa).

WB, Western blot ; GlcNAc-enr., proteins enriched on GlcNAc-beads ; min, minutes ; h, hours

Figure 3- Proteasome inhibition triggers Hsp70 GlcNAc-binding activity

A- HepG₂ cells were cultured without glucose (w/o Glc), without glucose but with glucosamine (w/o Glc + GlcNH₂), in unstress conditions (Ctrl) or in hyperthermal conditions (42°C). Cells were incubated with MG132 at a concentration of 8 μM to inhibit proteasomal degradation. HGBA was then analyzed by enrichment of crude extract on GlcNAc-beads and by analysis of the bound protein by western blot with an anti-Hsp70 antibody. Proteasome inhibition was checked using an anti-ubiquitin antibody. Loading control was checked using an anti-Hsc70 antibody.

B- The procedure was the same as described in A, except that proteasome inhibition was also provoked by two irreversible inhibitors, namely epoxomycin (E) and lactacystin (L).

Protein mass markers are indicated at the left (kDa).

∅, no inhibitor ; M, MG132 ; WB, Western blot ; GlcNAc-enr., proteins enriched on GlcNAc-beads.

Figure 4- E1 is *O*-GlcNAc modified and variations in these glycosylation levels correlate with E1/Hsp70 interaction.

HepG₂ were cultured in normal DMEM (Ctrl), in glucose-depleted medium with or without 5 mM glucosamine or at 42°C for 24h. After lysis of the cells, extracts were immunoprecipitated with an anti-*O*-GlcNAc antibody. The immunoprecipitated were run on a 10% SDS-PAGE, electroblotted and stained with an anti-E1 antibody (panel A). An anti-ubiquitin has been performed on crude extracts.

Co-immunoprecipitation experiments were performed with an anti-Hsp70. The presence of E1 in Hsp70-enriched fractions was checked by western blotting using an anti-E1 antibody (panel B).

Equal loading were confirmed using anti-E1 antibody on crude extracts.

Protein mass markers are indicated at the left (kDa).

IP, immunoprecipitation ; Co-IP, co-immunoprecipitation ; WB, Western blot ; Ig, immunoglobulins.

Figure 5- OGT silencing using RNA interference leads to a decrease in *O*-GlcNAc, ubiquitination and cell viability.

OGT silencing was carried out using the RNA interference technology. Oligonucleotides were transfected in HeLa cells during 96 h and incubated at 42°C for the last 24 hours to induce thermal stress.

A- Effectiveness of RNAi on OGT silencing was checked by looking at OGT and *O*-GlcNAc levels. Control of loading was achieved using anti- β -tubulin antibody. To control that OGT silencing did not affect other type of glycosylation, an SNA staining was performed.

Protein mass markers are indicated at the left (kDa).

B- Effectiveness of OGT silencing was also checked using indirect immunofluorescence microscopy.

Top panel: use of an anti-OGT antibody (AL-28) with a secondary antibody coupled to Texas Red. Nuclei were stained with DAPI.

Middle panel: the decrease in *O*-GlcNAc level induced by RNAi was visualized using an anti-*O*-GlcNAc antibody (RL-2) in conjunction with a FITC-coupled anti-mouse secondary antibody. Decrease in ubiquitin content was visualised using an anti-ubiquitin antibody in conjunction with a Texas Red-coupled anti-rabbit secondary antibody.

Bottom panel: localisation of OGT and ubiquitinated proteins using polyclonal AL-28 antibody (anti-OGT) and polyclonal anti-ubiquitin. Nuclei were stained with DAPI.

C- E1 glycosylation was checked by immunoprecipitation of crude extracts with anti-*O*-GlcNAc antibody and by staining bound-proteins with an anti-E1 antibody. Ubiquitinated proteins were revealed with an anti-ubiquitin antibody. Level of β -catenin was measured after OGT silencing using an anti- β -catenin antibody. Loading control was performed with the anti-E1-antibody

D- Effect of OGT silencing on cell viability after thermal stress was assessed using the blue trypan method.

Ctrl, control cells ; 1153, OGT silencing ; WB, Western blot ; IP, immunoprecipitation.

Figure 6- Induced-protein misfolding triggers Hsp70-GlcNAc binding activity.

A- Comparative structures of L-azetidine-2-carboxylic acid and L-proline.

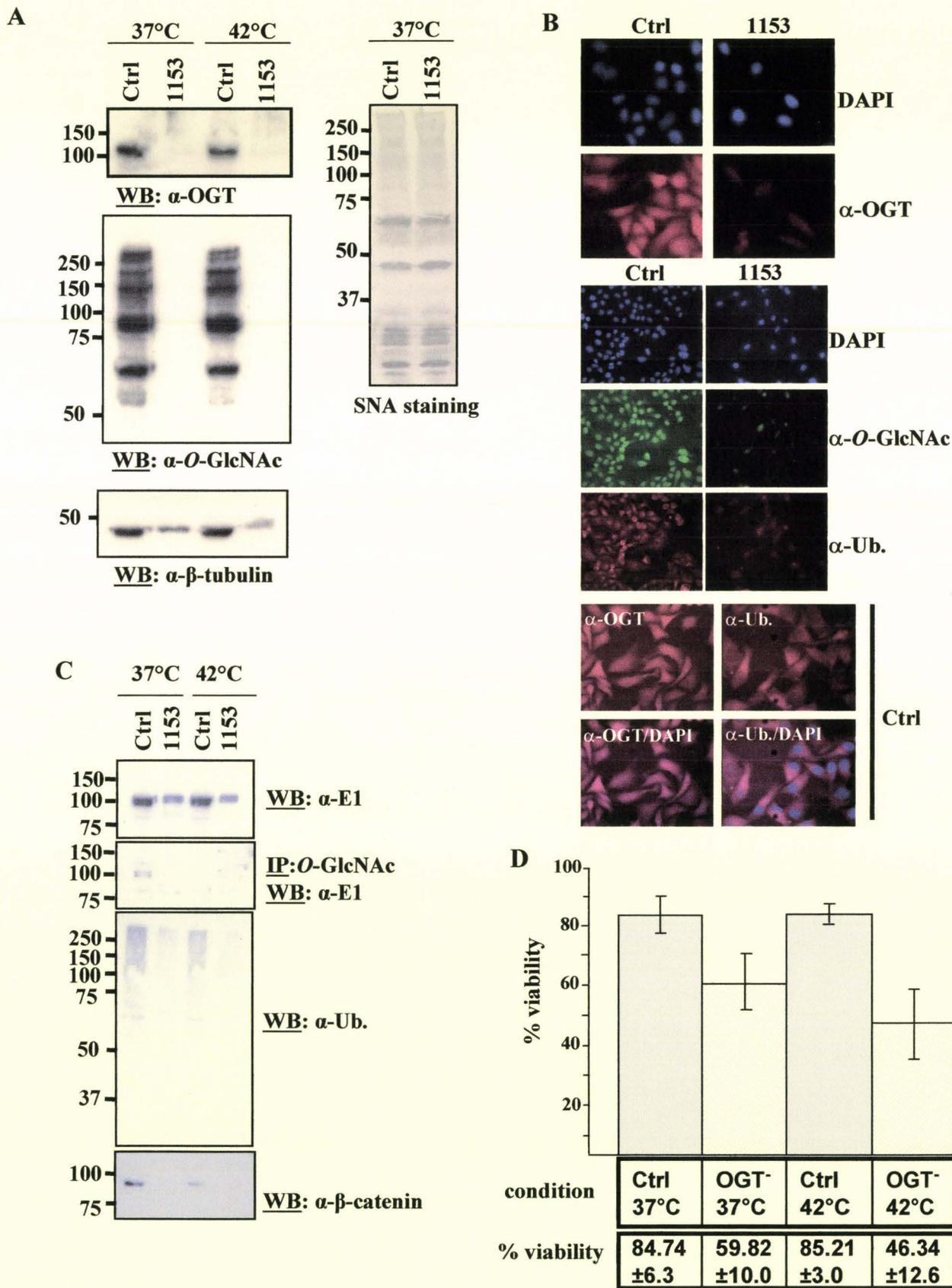
B- Hsp70 levels and HGBA were studied after culturing HepG₂ cells with 5 mM L-azetidine-2-carboxylic acid for 24h. Control of induced-HGBA by L-azetidine-2-carboxylic acid incorporation was checked by translation inhibition using cycloheximide (CHX) or anisomycin (aniso). Loading control was performed using anti-Hsc70 antibody staining.

Protein mass markers are indicated at the left (kDa).

WB, Western blot ; GlcNAc-enr., proteins enriched on GlcNAc-beads.

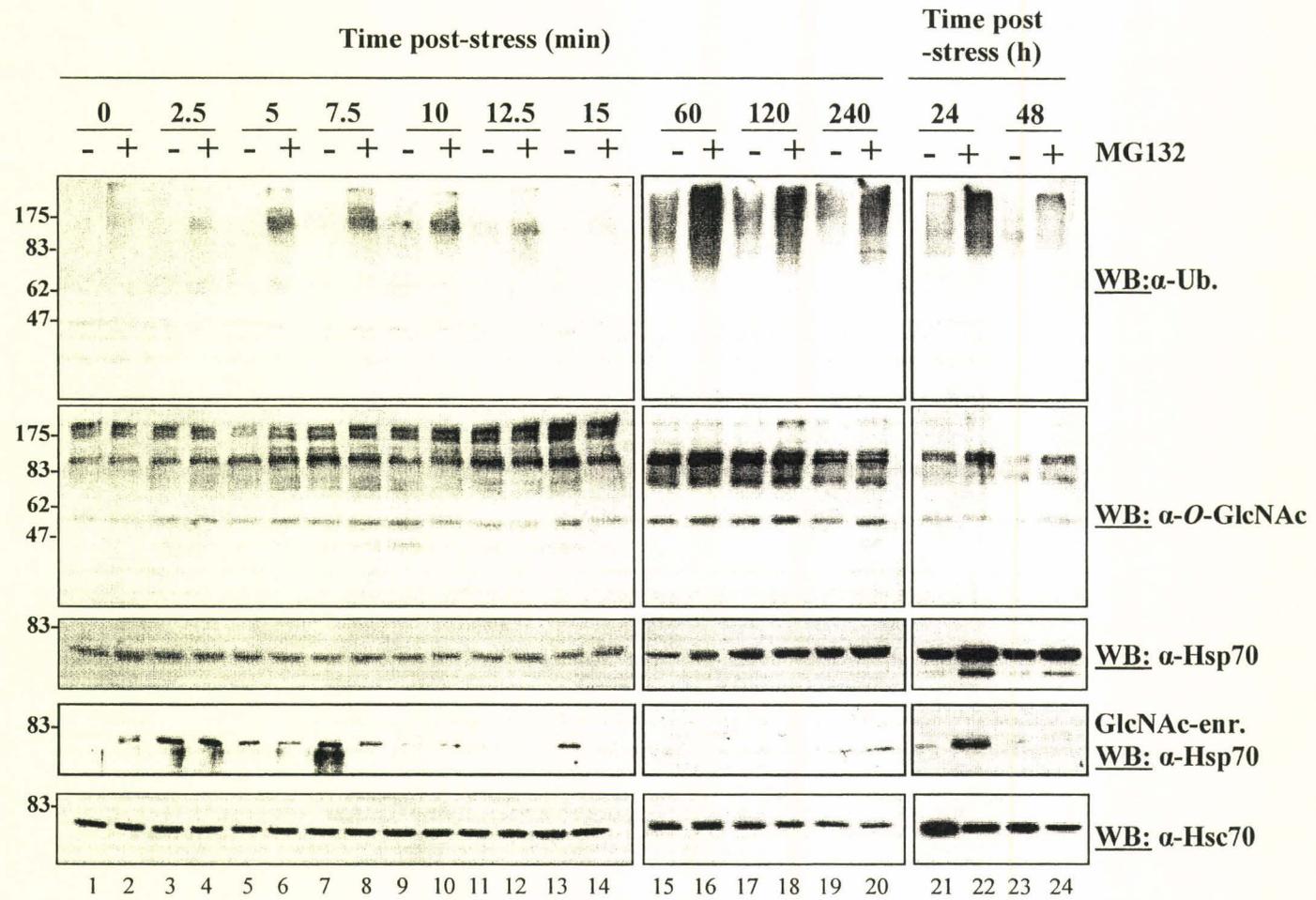
Figure 7- Hypothetical model by which *O*-GlcNAc could contribute to increase protein stability through lectin interactions with Hsp70.

Intracellular proteins could be damaged after a stress occurred. Hydrophobic segments including PEST sequences appear at the protein surface and can be subsequently recognized by OGT that modifies them with *O*-GlcNAc residues (21). These *O*-GlcNAc-bearing proteins could be then bound by Hsp70 through a lectin interaction. If the damage caused to the protein can be repaired, Hsp70 and Hsp40 work together to tentatively refold the protein (left part of the scheme). In this case E1 and the proteasome are inhibited by *O*-GlcNAc glycosylation. On the contrary, if the damage can not be reversed by the refolding machinery (right part the scheme), Hsp70 intervenes in cooperation with other co-chaperones like CHIP or Bag-1: E1 is activated, allowing *O*-GlcNAc-bearing proteins to be polyubiquitinated and to be targeted to proteasome (itself activated) for destruction. Proteins are cleaved in small peptides and ubiquitin is recycled.

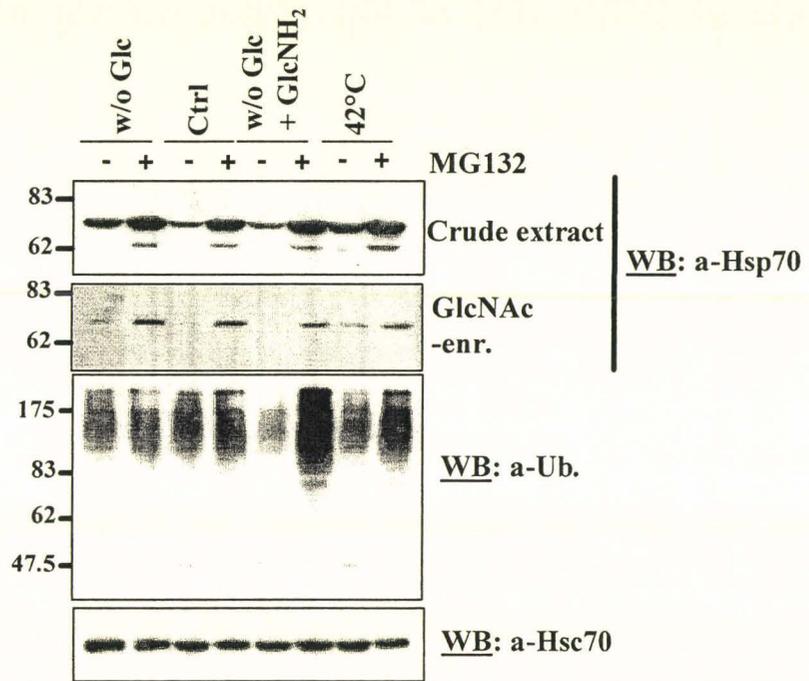


Guinez et al., 2006 Figure 5

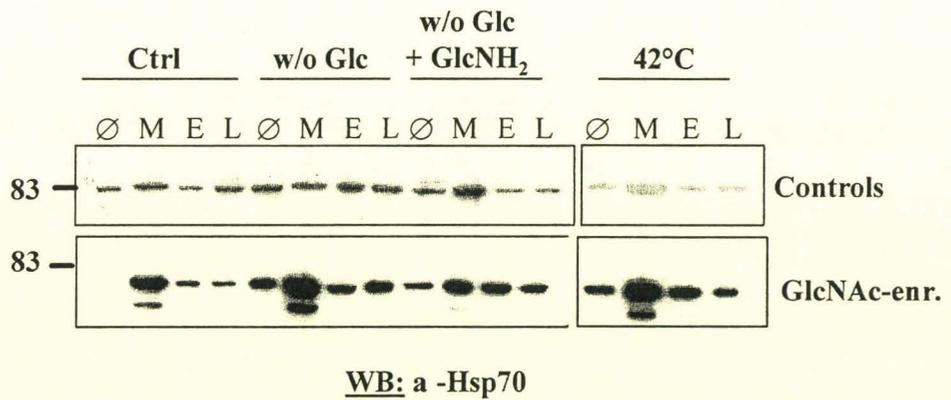
Guinez et al., 2006 Figure 2



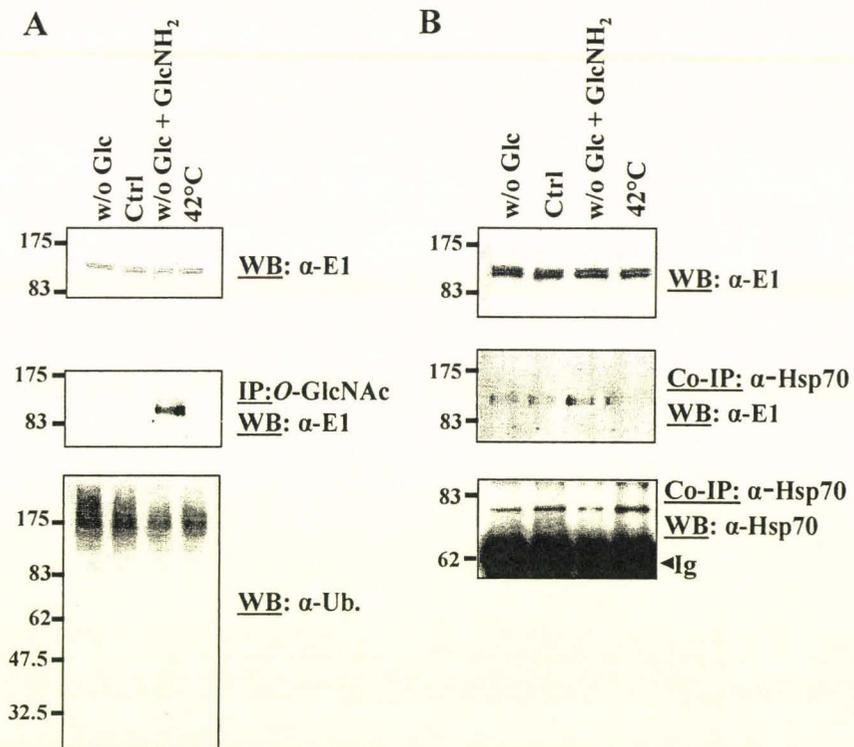
A



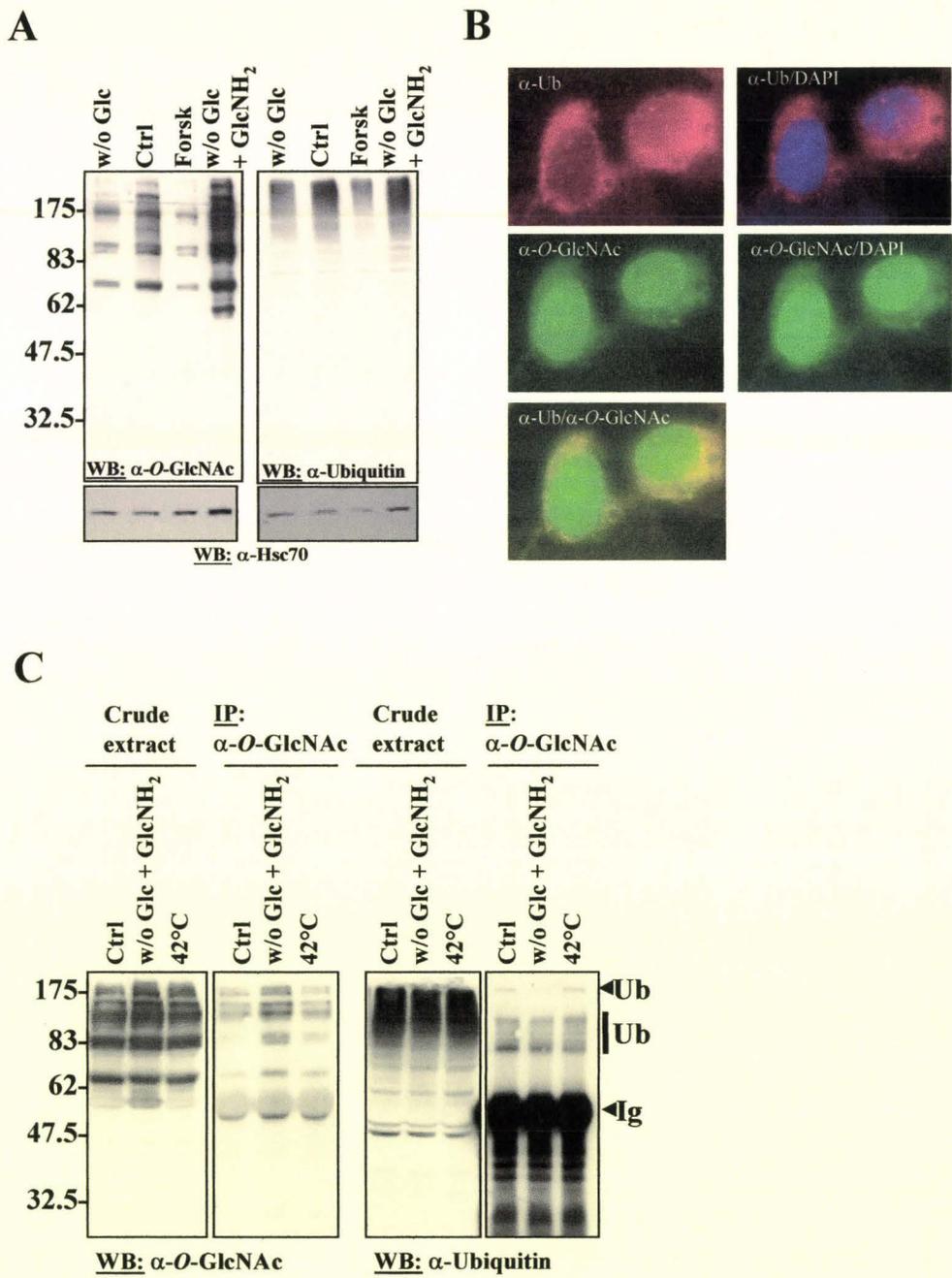
B



Guinez et al., 2006-Figure 3

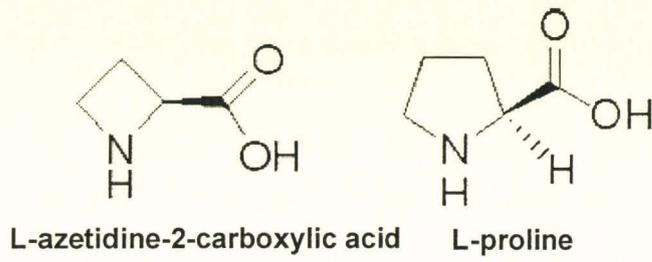


Guinez et al., 2006 Figure 4

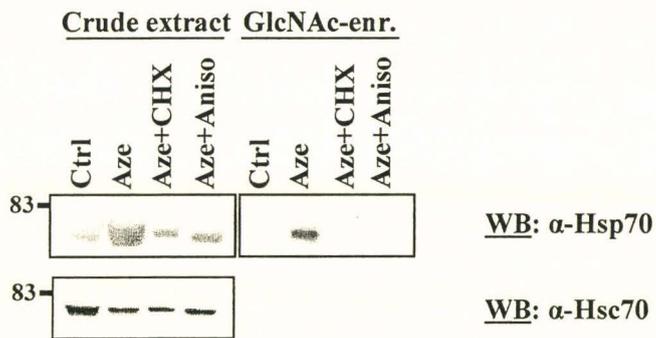


Guinez et al., 2006 Figure 1

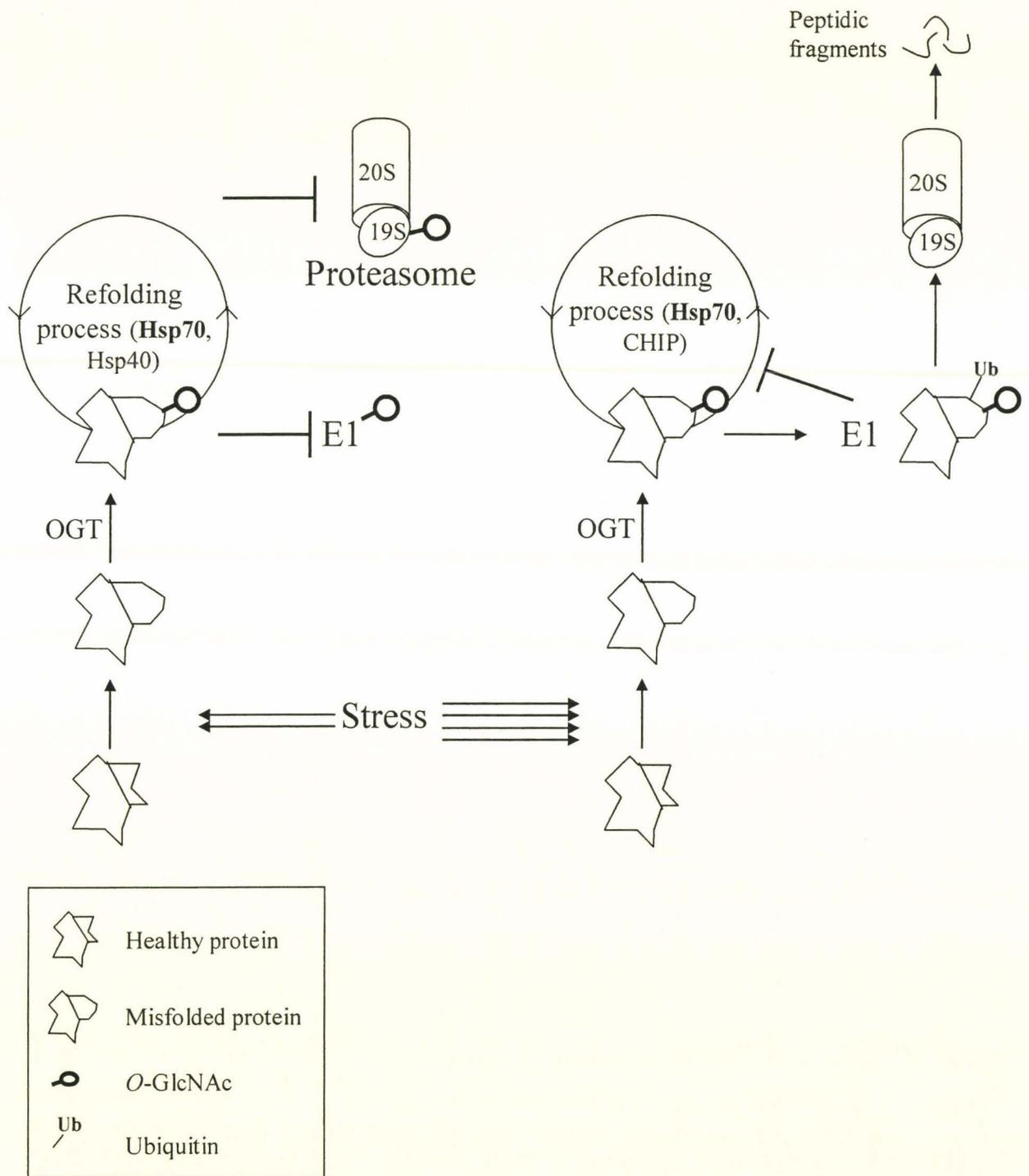
A



B



Guinez et al., 2006 Figure 6



Guinez et al., 2006 Figure 7

ARTICLE 4

Revue

"O-GlcNAc glycosylation: a signal for the nuclear transport of cytosolic proteins?"

Céline Guinez, Willy Morelle, Jean-Claude Michalski and Tony Lefebvre

***Int J. Biochem. Cell. Biol.* 2005; 37(4):765-74.**



Review

O-GlcNAc glycosylation: a signal for the nuclear transport of cytosolic proteins?

Céline Guinez, Willy Morelle, Jean-Claude Michalski, Tony Lefebvre*

Unité Mixte de Recherches 8576 du CNRS, Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, IFR 118, USTL, Bâtiment C9, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

Received 24 August 2004

Abstract

Year 2004 marks the 20th anniversary of the discovery of *O*-linked *N*-acetylglucosamine (*O*-GlcNAc) by Gerald W. Hart. Despite interest for *O*-GlcNAc, the functions played by this single monosaccharide remain poorly understood, though numerous roles have been suggested, among which is the involvement of *O*-GlcNAc in the nuclear transport of cytosolic proteins. This idea was first sustained by studies on bovine serum albumin that showed that the protein could be actively carried to the nucleus when it was modified with sugars. In this paper, we will review data on this puzzling problem. We will first describe the well-established nuclear localisation signal (NLS)-dependent nuclear transport by presenting the different factors involved, and then, we will examine where and how *O*-GlcNAc could be involved in nuclear transport. Whereas it has been suggested that *O*-GlcNAc could interfere at two levels in the nuclear transport both by modifying proteins to be translocated to the nucleus and by modifying the nucleoporins of the nuclear pore complex, according to us, this second idea seems unlikely. Part of this study will also be dedicated to a relatively new concept in the nuclear transport: the role of the 70-kDa heat shock proteins (HSP70). The action of the chaperone in nuclear translocation was put forward 10 years ago, but new findings suggest that this mechanism could be linked to *O*-GlcNAc glycosylation.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Nuclear transport; *O*-GlcNAc; Heat shock proteins; HSP70

Contents

1. Introduction	766
2. Nuclear transport	767
2.1. Nucleo-cytoplasmic exchanges and nuclear pore complex	767
2.2. The NLS pathway	767

* Corresponding author. Tel.: +33 3 20 43 41 55; fax: +33 3 20 43 65 55.
E-mail address: tony.lefebvre@univ-lille1.fr (T. Lefebvre).

3.	Glycosylation: an alternative for the transport of proteins to the nucleus?	767
3.1.	Sugar-modified bovine serum albumin is translocated to the nucleus	767
3.2.	The nuclear pore is <i>O</i> -GlcNAc modified	768
3.3.	<i>O</i> -GlcNAc and phosphorylation balance: a way to regulate nuclear transport?	769
3.3.1.	Phosphorylation and nuclear transport	769
3.3.2.	The example of Tau	769
4.	<i>O</i> -GlcNAc and the nuclear localisation of transcription factors	770
4.1.	Elf-1	770
4.2.	Pax6	770
4.3.	Stat5	770
5.	Heat shock proteins and nuclear transport	771
6.	Concluding remarks	772
	References	772

1. Introduction

O-Linked *N*-acetylglucosamine (*O*-GlcNAc) glycosylation is the modification of proteins by a single residue of *N*-acetylglucosamine on serine and threonine groups. Usually, this monosaccharide is neither epimerized nor elongated. *O*-GlcNAc was first evidenced on the surface of intact lymphocytes using bovine milk galactosyltransferase as an impermeant probe (Torres & Hart, 1984). After much investigation, it appeared that the finding of *O*-GlcNAc constituted a major breakthrough in glycobiology, and that it challenged two dogmas in our understanding of glycosylation: for the first time, a glycosylation type was found to have a high content in the cytosolic and nuclear compartments of eukaryota, whereas, until that date, glycosylation had been confined in the lumen of the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus or to membranous proteins and secretory pathways; and secondly, the versatility of *O*-GlcNAc demonstrated that a glycosylation could not be always static (like *N*-glycans or classical *O*-glycans). As was mentioned above, one of the main features of *O*-GlcNAc is its versatility, since it is often compared to phosphorylation (Hart et al., 1995; Whelan & Hart, 2003). Like phosphorylation–dephosphorylation processes, that are regulated by a set of kinases and phosphatases, the glyco–deglyco process is also

controlled by two cytosolic and nuclear distributed enzymes (Iyer & Hart, 2003a), i.e. the *O*-GlcNAc transferase (OGT) that transfers the monosaccharide from UDP–GlcNAc to the protein (Iyer & Hart, 2003b) and glucosaminidase that hydrolyses the sugar (Wells et al., 2002). Moreover, *O*-GlcNAc could compete with phosphorylation at the same site or in the vicinity, causing mutual exclusion (Comer & Hart, 2001; Slawson & Hart, 2003). *O*-GlcNAc is found in the cytosolic and nuclear compartments on a high number of proteins that are part of structural proteins (Cieniewski-Bernard et al., 2004); the transcriptional machinery including transcription factors as Sp1 (Yang et al., 2001) and Stat5 (Gewinner et al., 2004), RNA polymerase II (Comer & Hart, 2001); heat shock proteins (Guinez, Lemoine, Michalski, & Lefebvre, 2004; Walgren, Vincent, Schey, & Buse, 2003).

Despite its abundance, functions played by glycosylation remain unclear even though many roles have been put forward. Among them, *O*-GlcNAc could have a crucial importance in the transcriptional activity (Comer & Hart, 2001; Yang et al., 2001), in enzymatic activity (Cieniewski-Bernard et al., 2004), in the protection against proteasome (Guinez et al., 2004; Zachara et al., 2004) and in intracellular transport, especially in nuclear transport, since a few years ago, it was potentially presented as an alternate nuclear transport signal to the traditional nuclear localisation sig-

nal (NLS) controlled by *O*-GlcNAc (Duverger, Roche, & Monsigny, 1996).

2. Nuclear transport

2.1. Nucleo-cytoplasmic exchanges and nuclear pore complex

One of the features of eukaryotic cells is the segregation of RNA synthesis and DNA replication – that are nuclear – with respect to the protein synthesis that is cytosolic, via a compartmentation with the double nuclear membrane. This implies precise and efficient bi-directional exchanges (hundreds of molecules are transported through one pore each second) between the cytoplasm and nucleus and vice-versa: nuclear proteins are imported to the nucleus, and RNAs that are synthesised in the nucleus are exported to the cytoplasm. These bi-directional exchanges are ensured by supramolecular structures of 125×10^6 Da, called nuclear pores complexes (NPC), that are anchored in the nuclear envelope (Allen, Cronshaw, Bagley, Kiseleva, & Goldberg, 2000; Fahrenkrog, Koser, & Aebi, 2004). The nuclear compartment is a structure delineated by a nuclear envelope constituted of a double bi-layer membrane. The outer lipid bi-layer (outer nuclear membrane) follows the endoplasmic reticulum membrane and the inner membrane is mainly covered with lamina, a set of proteins forming a network that ensures the integrity of the nuclear membrane structure (Goldberg & Allen, 1995). The formation of the NPC is ensured by the fusion of the inner and the outer membranes of the nucleus and is composed of 200 proteins. Its architecture is conserved from yeast to higher eukaryotes, with minor differences in the linear dimensions, and it has a diameter of 120 nm and a height of 70 nm. NPC are so large and sophisticated that they are considered as organelles.

2.2. The NLS pathway

In order to enter the nucleus, proteins that share a molecular mass below 40 kDa could cross the NPC via passive diffusion, whereas the transport of proteins with a molecular mass above 40 kDa requires energy and travel must be made through the NPC, by presenting a NLS that consists of sequences with a

high content of basic amino-acids (the first described NLS was that of the large-T antigen) (Görlich & Matraj, 1996; Yoneda, 1997). Many factors are also required for the transport to the nucleus: pore targeting complex (PTAC) 58, PTAC 97, GTPase Ran and p10/NTF2 (nuclear transport factor, NTF) (Moore & Blobel, 1992; Stewart et al., 2001). NLS-dependent nuclear transport is divided into two main steps (Fig. 1). The first step involves NLS and is ATP-dependent. Proteins that translocate to the nucleus anchor on the cytoplasmic face of the NPC. This first stage in the transport, called “docking”, could be sub-divided into two parts: PTAC formation (500 kDa) in the cytoplasm with the NLS-containing protein, and the complex anchoring on the NPC. The second step is ATP-independent and consists of the translocation of proteins to the nucleus. This second step, called “translocation”, involves GTPase Ran and p10/NTF2, which is combined with Ran-GDP/PTAC 58 and 97 and nucleoporins peptidic sequences. The assumed involvement of *O*-GlcNAc or any other glycosylation type in this NLS-nuclear transport process has never been described.

3. Glycosylation: an alternative for the transport of proteins to the nucleus?

3.1. Sugar-modified bovine serum albumin is translocated to the nucleus

Glycosylation-dependent nuclear transport was first supported by studies which assumed that sugar residues could act as a nuclear targeting signal (Hubert, Seve, Facy, & Monsigny, 1989). More precisely, 10 years ago, Duverger et al. described a mechanism in which fluorescein-coupled bovine serum albumin (BSA), which was either electroporated or using digitonin-permeabilized cells, and was substituted to sugars, could reach the nucleus (Duverger, Carpentier, Roche, & Monsigny, 1993; Duverger, Pellerin-Mendes, Mayer, Roche, & Monsigny, 1995; Duverger et al., 1996). As control, un-substituted BSA did not enter the nucleus. This transport was shown to be sugar-, time- and temperature-dependent (Duverger et al., 1995). More interestingly, these authors showed that in digitonin-permeabilized cells, sugar-dependent nuclear transport was NLS-independent, since *N*-ethylmaleimide, an alkylating agent that modifies NLS,

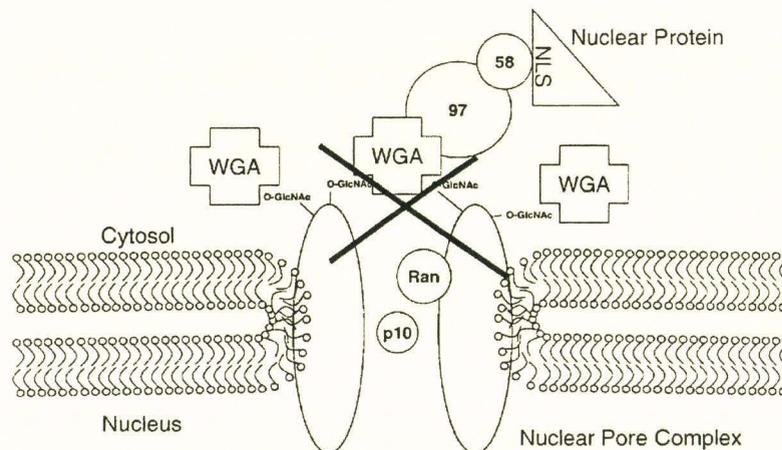


Fig. 1. Traditional nuclear transport. Traditionally, it is well known that a protein to be transported to the nucleus must possess stretches of basic amino-acids; the nuclear localisation signal, NLS is recognized by cytosolic components as forming the pore targeting complex and it docks at the nuclear pore complex and it is translocated to the nucleus where Ran-GTP dissociates the complex. The *O*-GlcNAc residues on the cytoplasmic face of the NPC are represented. WGA certainly inhibited nuclear transport by forming a screen at the surface of the nuclear pore, leading to an obstruction of it.

did not disrupt transport. The absence of nuclear transport when cells were incubated at 4 °C clearly suggested that sugar-dependent nuclear transport was energy-dependent like traditional NLS-dependent nuclear transport. This was confirmed by the destruction of ATP with apyrase. Later, it was shown that β -di-*N*-acetylchitobiose-modified BSA-dependent transport was independent in contrast with the free-sugar NLS-substituted BSA (Duverger et al., 1996). Oddly enough, *N*-acetylglucosamine-substituted BSA was not carried to the nucleus. The authors argued that contrary to chitobiose, GlcNAc was not accessible for the putative receptor due to a steric constraint. Moreover, di-*N*-acetylchitobiose shares a similar structure with GlcNAc linked to serine or threonine residue. These two points could explain why β -di-*N*-acetylchitobiose-modified BSA was efficiently carried to the nucleus. This last finding was a good argument for a direct involvement of *N*-acetylglucosamine in nuclear transport. Recently, Rondanino, Bousser, Monsigny, and Roche (2003) explored the difference that may exist between NLS-mediated nuclear transport and sugar-dependent nuclear transport. The strategy used was different from that described above, since nuclear transport was tested after a cytosolic microinjection of NLS-BSA or Glc-BSA. The advantage of this technique is its less destructive effect compared to

electroporation and digitonin-permeabilization that induce cellular death. The main finding was that sugar-dependent transport of BSA into the nucleus was cell-cycle dependent. Glucose-dependent nuclear transport was more efficient during the G1/S transition and S phases, whereas NLS-BSA transport did not sustain any difference during any stage cycle except a slight decrease for the G2 phase.

It has been assumed that the transport of glycosylated proteins to the nucleus could be achieved using intracellular components that act like a shuttle between the cytosol and nucleus. For this purpose, numerous nuclear lectins have been characterized (Monsigny, Rondanino, Duverger, Fajac, & Roche, 2004). They include CBP-35 (carbohydrate-binding protein, CBP) or galectin-3 (Moutsatsos, Wade, Schindler, & Wang, 1987), CBP-67 (Schröder et al., 1992), CBP-70 (Sève et al., 1993) and HSP70 (Guinez et al., 2004; Lefebvre et al., 2001) (discussed below).

3.2. The nuclear pore is *O*-GlcNAc modified

Numerous nuclear pore proteins located on the periphery of NPC are modified with *O*-GlcNAc. Among them, we find a group of eight proteins with molecular weights of 45, 54, 58, 62, 100, 145, 180 and 210 kDa (Holt et al., 1987). They all contain many degenerated peptides such as FXFG and GLFG, whose function re-

mains unknown. P62, p58 and p54 are crucial for the NPC formation and are directly involved in the nuclear transport process (Finlay, Meier, Bradley, Horecka, & Forbes, 1991). In this way, such protein-depleted NPCs from *Xenopus* eggs are unable to carry proteins across the channel. Nuclear transport experiments performed on fluorescently labelled nucleoplasmin, a protein that is regularly used to study nuclear transport, showed that wheat germ agglutinin (WGA, a lectin extracted from *Triticum vulgare*) inhibited nuclear transport by binding to the *O*-GlcNAc glycosylation of nucleoporins, whereas no other lectin (i.e. ConA, PNA or UEA) did (Finlay, Newmeyer, Price, & Forbes, 1987).

Nuclear transport inhibition was not observed when the lectin was co-incubated with free GlcNAc, which demonstrates the specificity of inhibition. Other studies performed on *Xenopus* eggs demonstrated the importance of *O*-GlcNAc nucleoporins in nuclear transport. Moreover, WGA inhibited the nuclear transport of NLS-coupled phycoerythrin, but did not alter the transport of dextran (Wolff, Willingham, & Hanover, 1988). One of the characteristics of the NPC of *Xenopus* eggs is that it could be disassembled and reassembled to form functional NPCs in nuclear transport. This phenomenon is met in each cell division, where the NPC completely breaks down and re-forms. Miller and Hanover (1994) have depleted *Xenopus* egg NPC of their *O*-GlcNAc nucleoporins with insolubilised WGA. In this case, nuclear transport was impaired. Transport could be restored with the addition of rat glycosylated nucleoporins again. In the same way, Finlay and Forbes (1990) have demonstrated that nuclei reformed after depletion of their cytosolic WGA-binding proteins impaired the protein import, although the structure of the NPC appeared unchanged. These studies clearly demonstrated that *O*-GlcNAc nucleoporins are indispensable for nuclear transport. Conversely, the modification of the *O*-GlcNAc residues via a capping operation with galactose, using galactosyltransferase, did not change the assembly of the NPC or nuclear transport. On the basis of this finding, Miller and Hanover postulated that the glycosylation of nucleoporins was not required for nuclear transport and argued against the involvement of lectin-like shuttle between the cytosol and nucleus. In addition, it seemed that the mechanism through which WGA blocked nuclear transport consisted in obstructing the channel in a steric manner (Fig. 1). Such a phenomenon has been ob-

served on the inhibition of nucleoplasmin transport when nucleoporins-directed antibodies were injected in *Xenopus* oocytes (Featherstone, Darby, & Gerace, 1988). Interestingly, WGA also inhibited the nuclear export of ribosomal subunits to the cytoplasm (Bataille, Helser, & Fried, 1990); we can suppose this was also done by blocking the aqueous channel.

3.3. *O*-GlcNAc and phosphorylation balance: a way to regulate nuclear transport?

3.3.1. Phosphorylation and nuclear transport

Duverger et al. (1996) have suggested that one of the mechanisms through which GlcNAc could act as a nuclear localisation signal was by counteracting the function of phosphorylation. This post-translational modification is known for controlling the regulation of the nuclear transport of cytosolic proteins (Kaffman & O'Shea, 1999). For example, the phosphorylation of five serine residues on yeast transcription factor Pho 4 implies a cytosolic localisation of this protein, whereas its dephosphorylation induces its nuclear localisation (Kaffman, Rank, & O'Shea, 1998). Another example, during *Xenopus laevis* oocytes maturation, nucleolin (the major nucleoli component) is phosphorylated by p34^{cdc2} kinase and is found within the cytosol. After fertilisation, dephosphorylation of the nucleolin occurs and the protein accumulates in the nucleus (Schwab & Dreyer, 1997). Lastly, transcription factor v-Jun accumulates in the nucleus, when NLS-adjacent Ser (Ser²⁴⁸) is under-phosphorylated, whereas its phosphorylation inhibits nuclear translocation both in vivo and in vitro (Tagawa, Kuroki, & Chida, 1995). In these three different examples, the role of phosphorylation in nuclear localisation is well defined, but on none of these proteins a relationship between *O*-GlcNAc and phosphorylation in nuclear transport has been described.

3.3.2. The example of Tau

Tau proteins belong to the family of brain microtubule-associated proteins involved in the polymerisation and stability of neuronal microtubules (Delacourte & Buee, 2000). Six different Tau isoforms are present in the adult brain and arise from an alternative splicing of a common primary transcript. In contrast to another Tau protein of 26–30 kDa apparent molecular mass that is found in the nucleus of neurob-

lastoma cells, Tau proteins are exclusively located in the cytosol. Tau protein is abundantly modified with phosphorylation and this post-translational modification is known for controlling microtubules polymerisation. In pathological conditions such as Alzheimer's disease, abnormal phosphorylation of Tau occurs and leads to the accumulation of neurofibrillary tangles. Tau is also *O*-GlcNAc modified (Arnold et al., 1996) but unlike phosphorylation, the function of the glycosylation on Tau is unknown. In a recent study, our group has demonstrated that a competition between phosphorylation and *O*-GlcNAc on Tau could have an impact on its nuclear location (Lefebvre et al., 2003). For this purpose, we used a stable clone expressing the long Tau isoform (Tau 441), so as to ensure a high level expression of the Tau protein. The first finding of the work was used to demonstrate that a competition between phosphorylation and *O*-GlcNAc exists on Tau protein. To generate hyperphosphorylated Tau, okadaic acid, a broad spectrum phosphatase inhibitor that mimics the hyperphosphorylation of Tau in Alzheimer's disease, was used in cultured cells. 2D electrophoresis clearly showed that after okadaic acid treatment, Tau 441 isoforms were shifted to the acidic pH values and that these isoforms were less *O*-GlcNAc modified than in normal conditions. More interestingly, this increase in phosphorylation and consequently the decrease in *O*-GlcNAc glycosylation correlated with a decrease in nuclear transport. Such an observation was previously made by Tanaka, Iqbal, Trenkner, Liu, and Grundke-Iqbal (1995) who showed that un-phosphorylated Tau accumulated to the nucleus. Thus, it appears that the phosphorylation–*O*-GlcNAc relationship could regulate the nuclear localisation of a protein. Unfortunately, the mechanism through which transport is regulated remains unknown.

4. *O*-GlcNAc and the nuclear localisation of transcription factors

4.1. *Elf-1*

Elf-1 is a member of the Ets transcription factor family and is expressed in hematopoietic cells. Elf-1 mediates the induction of different groups of genes including genes for the blk and lyn kinases or for surface membrane proteins such as TCR- ζ -chain, IL-2R

α -chain (Tsokos, Nambiar, & Juang, 2003). According to its primary sequence, Elf-1 has a molecular mass of 68 kDa, but Juang, Solomou, Rellahan, and Tsokos (2002) have demonstrated that it has a molecular mass of 98 kDa in the nucleus and 80 kDa in the cytoplasm. These authors assumed that post-translational modifications were responsible for this increase in the molecular mass (80 and 98 kDa) and they showed that Elf-1 was both phosphorylated and glycosylated with *O*-GlcNAc, partly excluding any balance between phosphorylation and *O*-GlcNAc. The conversion of the 80 kDa form to the 98 kDa one through a modification with phosphorylation and *O*-GlcNAc makes possible the definition of a location where it binds to the promoter of the TCR- ζ -chain gene.

4.2. *Pax6*

Pax6 is a master control gene for eye morphogenesis in both invertebrates and vertebrates. Its quail homolog encodes five proteins through an alternative splicing and internal initiations. Three proteins of 48, 46 and 43 kDa contain the paired domain (DNA-binding domain) and two proteins of 33 and 32 kDa are devoid of this domain. The *O*-GlcNAc glycosylation of Pax6 proteins rather occurs on the 48 and 46 kDa isoforms that are strictly distributed into the nucleus, whereas glycosylation is not detected, either on the 43 kDa one or on the 33 and 32 kDa forms that are located both in the cytosol and in the nucleus (Lefebvre et al., 2002). This result could be interpreted with the role of *O*-GlcNAc, which is to maintain glycosylated forms of Pax6 in the nucleus, rather than acting as a nuclear localisation signal.

4.3. *Stat5*

Stat5 is part of the signal transducer and activator of transcription (Stat) gene family, that are latent cytoplasmic transcription factors. These transcription factors mediate cellular responses to different cytokines, hormones and growth factors and they have diverse biological functions in cell differentiation, development, proliferation, apoptosis and inflammation. The activation of Stat could be triggered by the binding of extracellular ligands to transmembrane receptors that cause the phosphorylation of Stat via tyrosine kinases, leading to a dimerisation and nuclear translocation of the

transcription factor. Recently, it was shown that Stat5 was modified with *O*-GlcNAc and interestingly, as for Pax6, nuclear forms only are glycosylated (Gewinner et al., 2004). The treatment of HC11 cells with glucose or glucosamine increased the glycosylation of Stat5 but did not have any impact on its nuclear localisation, which strongly suggests that the glycosylation of Stat5 is not involved in its nuclear translocation. However, the authors showed that the glycosylated form of Stat5 only could bind co-activator CBP that is essential for the Stat5-mediated gene transcription.

5. Heat shock proteins and nuclear transport

The search for intracellular lectins that could specifically bind *O*-GlcNAc residues showed that 70-kDa heat shock proteins (HSP70) were GlcNAc-binding proteins (Lefebvre et al., 2001). The initial hypothesis was the following: if *O*-GlcNAc was actually a signal for nuclear transport of cytosolic proteins, there should be proteins acting as a shuttle between the nucleus and the cytosol. In addition, even if the precise function of nucleoporins in nuclear transport remains unknown, nucleoporins are key components in this mechanism,

since, as was discussed above, (i) WGA inhibits nuclear transport by binding GlcNAc residues of nucleoporins (Finlay et al., 1987), (ii) depletion of the *O*-GlcNAc proteins inhibits transport (Finlay & Forbes, 1990), and (iii) nucleoporins interact with cytosolic factors that are required for nuclear transport. In consideration of this last aspect, it seemed likely that cytosolic lectins acting like a shuttle could play an active part in sugar-dependent nuclear transport. The idea was that multimeric lectins with many lectinic-sites could bridge an *O*-GlcNAc protein that had to be carried to the nucleus with *O*-GlcNAc nucleoporins (Fig. 2). The involvement of heat shock proteins in nuclear transport was still reported. Using a permeabilized cell system, Shi and Thomas (1992) showed that after the depletion of Hsc70 and HSP70, using either ATP-agarose chromatography or antibodies, nuclear transport was lost. This transport is not only performed by heat shock proteins, since other cytosolic components are necessary. The same results were obtained after depletion of Hsc70 on the nuclear transport of the SV40 large-T antigen NLS-conjugated BSA (Okuno, Imamoto, & Yoneda, 1993). This transport is cytosolic extract, energy and temperature-dependent and was inhibited by WGA. This last finding was another solid argument

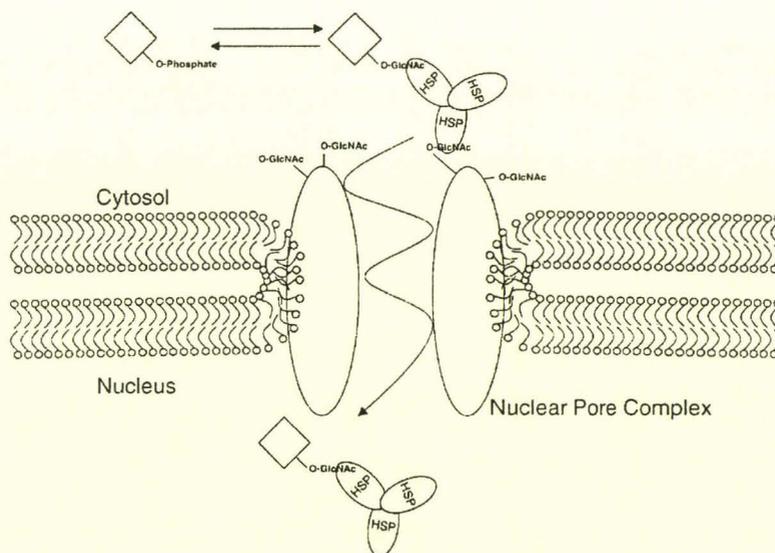


Fig. 2. Hypothetic mechanism by which intracellular lectins and more precisely HSP70 could operate for *O*-GlcNAc-mediated nuclear transport. Lectins could form complexes (Lefebvre et al., 2001): one lectinic site is available to make a possible binding of the protein to be translocated to the nucleus; a second one is used for bridging to the cytosolic face of the NPC via their *O*-GlcNAc residues. This spatial closeness makes it possible for unknown factors to translocate the complex to the nucleus. This phenomenon could be extended to the phospho-*O*-GlcNAc balance, leading the transport of the glycosylated form of the protein only, the phosphorylated form being held in the cytosol. It could be the case of Tau.

supporting the hypothesis of a GlcNAc-dependent heat shock protein nuclear transport. On this basis, we performed co-immunoprecipitation experiments so as to test the putative interaction between Hsc70 or HSP70 with p62 (Guinez, C., Michalski, J. C., & Lefebvre, T., unpublished data). In this way, if HSP70 actually acts as a shuttle between the cytosol and nucleus for the translocation of karyophilic proteins, and if *O*-GlcNAc nucleoporins interfere into this operation, then an interaction between HSP70 or Hsc70 with p62 could exist. Unfortunately, no such interaction was detected, either between Hsc70 and p62 or between HSP70 and p62. Recently, using an Hsc70 inhibitor, it was demonstrated that the glyco-dependent nuclear import of neoglycoproteins was inefficient (Monsigny et al., 2004). So though HSP70 is involved, particularly, though Hsc70 is an interesting candidate for the shuttling of cytosolic proteins to the nuclear compartment, the transport mechanism remains unknown. The function of HSP70 in nuclear transport seems to be indisputable, but either this mechanism does not involve *O*-GlcNAc nucleoporins or perhaps other cytosolic factors exist and need to be identified so as to clarify this NLS-independent nuclear transport.

6. Concluding remarks

Despite the intensive study of *O*-GlcNAc, the functions of this monosaccharide remain elusive. Conversely to NLS-dependent nuclear transport that is clearly understood, the putative involvement of *O*-GlcNAc in nuclear translocation is poorly understood. At the moment, it is difficult to draw a parallel between the two systems: do they have components in common (i.e. Ran, PTAC, HSP70, ...)? And do they operate together or individually? Are they complementary? These questions remain to be answered. Though, if we want concrete examples, it seems rather clear that *O*-GlcNAc is involved in nuclear transport (e.g. Tau protein), especially through the balance between *O*-GlcNAc and phosphorylation, in striking contrast, works performed on other proteins like Stat5 clearly demonstrate that sugar is not a requisite for its nuclear transport. On the basis of these observations, *O*-GlcNAc could rather be considered as a signal for nuclear residence, than as a nuclear localisation signal. However, it is well known that in science, general cases

are not the rule, and perhaps each protein needs to be considered as a particular case—the *O*-GlcNAc glycosylation playing a different role according to the protein.

Even if nucleoporins are crucial for nuclear transport, it seems that their *O*-GlcNAc glycosylation did not take an active part in the nuclear translocation process, and that the function of *O*-GlcNAc on nucleoporins certainly is structural (to make sure that there is a contact between nucleoporins). So, *O*-GlcNAc should directly operate, modifying the protein to be translocated to the nucleus. In consideration of this idea, the involvement of HSP70 in the nuclear transport of *O*-GlcNAc proteins had to be seriously considered. Even though no interaction was found between HSP70 and Hsc70 with p62, other studies strongly suggested that Hsc70 was needed for the nuclear transport of glycosylated proteins, and the cooperation of unknown factors is put forward. As a conclusion, the function of these chaperones in nuclear transport is unknown and more investigations need to be performed to understand this nuclear transport mechanism. Beyond this problem of nuclear transport, the lectinic activity of HSP70 could be involved in other processes, the proteasomal protection of substrates by *O*-GlcNAc being a very puzzling possible option.

References

- Allen, T. D., Cronshaw, J. M., Bagley, S., Kiseleva, E., & Goldberg, M. W. (2000). The nuclear pore complex: Mediator of translocation between nucleus and cytoplasm. *Journal of Cell Science*, *113*, 1651–1659.
- 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. *Journal of Biological Chemistry*, *271*, 28741–28744.
- Bataille, N., Helser, T., & Fried, H. M. (1990). Cytoplasmic transport of ribosomal subunits microinjected into the *Xenopus laevis* oocyte nucleus: A generalized, facilitated process. *Journal of Cellular Biology*, *111*, 1571–1582.
- Cieniewski-Bernard, C., Bastide, B., Lefebvre, T., Lemoine, J., Mounier, Y., & Michalski, J. C. (2004). Identification of *O*-linked *N*-acetylglucosamine proteins in rat skeletal muscle using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Molecular and Cellular Proteomics*, *3*, 577–585.
- Comer, F. I., & Hart, G. W. (2001). Reciprocity between *O*-GlcNAc and *O*-phosphate on the carboxyl terminal domain of RNA polymerase II. *Biochemistry*, *40*, 7845–7852.

- Delacourte, A., & Buee, L. (2000). Tau pathology: A marker of neurodegenerative disorders. *Current Opinion in Neurology*, *13*, 371–376.
- 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.
- Duverger, E., Pellerin-Mendes, C., Mayer, R., Roche, A. C., & Monsigny, M. (1995). Nuclear import of glycoconjugates is distinct from the classical NLS pathway. *Journal of Cell Science*, *108*, 1325–1332.
- Duverger, E., Roche, A. C., & Monsigny, M. (1996). *N*-Acetylglucosamine-dependent nuclear import of neoglycoproteins. *Glycobiology*, *6*, 381–386.
- Fahrenkrog, B., Koser, J., & Aebi, U. (2004). The nuclear pore complex: A jack of all trades? *Trends in Biochemical Sciences*, *29*, 175–182.
- Featherstone, C., Darby, M. K., & Gerace, L. (1988). A monoclonal antibody against the nuclear pore complex inhibits nucleocytoplasmic transport of protein and RNA in vivo. *Journal of Cellular Biology*, *107*, 1289–1297.
- Finlay, D. R., & Forbes, D. J. (1990). Reconstitution of biochemically altered nuclear pores: Transport can be eliminated and restored. *Cell*, *60*, 17–29.
- Finlay, D. R., Meier, E., Bradley, P., Horecka, J., & Forbes, D. J. (1991). A complex of nuclear pore proteins required for pore function. *Journal of Cellular Biology*, *114*, 169–183.
- 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. *Journal of Cellular Biology*, *104*, 189–200.
- Gewinner, C., Hart, G., Zachara, N., Cole, R., Beisenherz-Huss, C., & Groner, B. (2004). The coactivator of transcription CREB-binding protein interacts preferentially with the glycosylated form of Stat5. *Journal of Biological Chemistry*, *279*, 3563–3572.
- Goldberg, M. W., & Allen, T. D. (1995). Structural and functional organization of the nuclear envelope. *Current Opinion in Cellular Biology*, *7*, 301–309.
- Görllich, D., & Mattaj, L. (1996). Nucleocytoplasmic transport. *Science*, *271*, 1513–1518.
- Guinez, C., Lemoine, J., Michalski, J. C., & Lefebvre, T. (2004). 70-kDa-heat shock protein presents an adjustable lectinic activity towards *O*-linked *N*-acetylglucosamine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *319*, 21–26.
- Hart, G. W., Greis, K. D., Dong, L. Y., Blomberg, M. A., Chou, T. Y., Jiang, M. S., et al. (1995). *O*-Linked *N*-acetylglucosamine: The “yin-yang” of Ser/Thr phosphorylation? Nuclear and cytoplasmic glycosylation. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *376*, 115–123.
- Holt, G. D., 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. *Journal of Cell Biology*, *104*, 1157–1164.
- Hubert, J., Seve, A. P., Facy, P., & Monsigny, M. (1989). Are nuclear lectins and nuclear glycoproteins involved in the modulation of nuclear functions? *Cell Differentiation and Development*, *27*, 69–81.
- Iyer, S. P., & Hart, G. W. (2003a). Dynamic nuclear and cytoplasmic glycosylation: Enzymes of *O*-GlcNAc cycling. *Biochemistry*, *42*, 2493–2499.
- Iyer, S. P., & Hart, G. W. (2003b). Roles of the tetratricopeptide repeat domain in *O*-GlcNAc transferase targeting and protein substrate specificity. *Journal of Biological Chemistry*, *278*, 24608–24616.
- Juang, Y. T., Solomou, E. E., Rellahan, B., & Tsokos, G. C. (2002). Phosphorylation and *O*-linked glycosylation of Elf-1 leads to its translocation to the nucleus and binding to the promoter of the TCR zeta-chain. *Journal of Immunology*, *168*, 2865–2871.
- Kaffman, A., & O’Shea, E. K. (1999). Regulation of nuclear localization: A key to a door. *Annual Review of Cellular and Developmental Biology*, *15*, 291–339.
- 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.
- Lefebvre, T., Cieniewski, C., Lemoine, J., Guerardel, Y., Leroy, Y., Zanetta, J. P., et al. (2001). Identification of *N*-acetyl-D-glucosamine-specific lectins from rat liver cytosolic and nuclear compartments as heat-shock proteins. *Biochemical Journal*, *360*, 179–188.
- Lefebvre, T., Ferreira, S., Dupont-Wallois, L., Bussiere, T., Dupire, M. J., Delacourte, A., et al. (2003). Evidence of a balance between phosphorylation and *O*-GlcNAc glycosylation of Tau proteins—A role in nuclear localization. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1619*, 167–176.
- Lefebvre, T., Planque, N., Leleu, D., Bailly, M., Caillet-Boudin, M. L., Saule, S., et al. (2002). *O*-Glycosylation of the nuclear forms of Pax-6 products in quail neuroretina cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, *85*, 208–218.
- Miller, D. J., & Hanover, J. A. (1994). Functional nuclear pores reconstituted with beta 1-4 galactose-modified *O*-linked *N*-acetylglucosamine glycoproteins. *Journal of Biological Chemistry*, *269*, 9289–9297.
- Monsigny, M., Rondanino, C., Duverger, E., Fajac, I., & Roche, A. C. (2004). Glyco-dependent nuclear import of glycoproteins, glyco-complexes and glycosylated plasmids. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1673*, 94–103.
- 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.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *84*, 6452–6456.
- Okuno, Y., Imamoto, N., & Yoneda, Y. (1993). 70-kDa heat-shock cognate protein colocalizes with karyophilic proteins into the nucleus during their transport in vitro. *Experimental Cell Research*, *206*, 134–142.
- Rondanino, C., Bousser, M. T., Monsigny, M., & Roche, A. C. (2003). Sugar-dependent nuclear import of glycosylated proteins in living cells. *Glycobiology*, *13*, 509–519.
- Schröder, H. C., Facy, P., Monsigny, M., Pfeifer, K., Bek, A., & Müller, W. E. (1992). Purification of a glucose-binding protein from rat liver nuclei. Evidence for a role in targeting of nuclear

- mRNP to nuclear pore complex. *European Journal of Biochemistry*, 205, 1017–1025.
- Schwab, M., & Dreyer, C. (1997). Protein phosphorylation sites regulate the function of the bipartite NLS of nucleolin. *European Journal of Cellular Biology*, 73, 287–297.
- Sève, A. P., Felin, M., Doyennette-Moyne, M. A., Sahraoui, T., Aubery, M., & Hubert, J. (1993). Evidence for a lactose-mediated association between two nuclear carbohydrate binding proteins. *Glycobiology*, 3, 23–30.
- Shi, Y., & Thomas, J. O. (1992). The transport of proteins into the nucleus requires the 70-kilodalton heat shock protein or its cytosolic cognate. *Molecular and Cellular Biology*, 12, 2186–2192.
- Slawson, C., & Hart, G. W. (2003). Dynamic interplay between O-GlcNAc and O-phosphate: The sweet side of protein regulation. *Current Opinion in Structural Biology*, 13, 631–636.
- Stewart, M., Baker, R. P., Bayliss, R., Clayton, L., Grant, R. P., Littlewood, T., et al. (2001). Molecular mechanism of translocation through nuclear pore complexes during nuclear protein import. *FEBS Letters*, 498, 145–149.
- Tagawa, T., Kuroki, T., & Chida, K. (1995). The cell cycle-dependent nuclear import of v-jun is regulated by phosphorylation of a serine adjacent to the nuclear localization signal. *Journal of Cellular Biology*, 130, 255–263.
- Tanaka, T., Iqbal, K., Trenkner, E., Liu, D. J., & Grundke-Iqbal, I. (1995). Abnormally phosphorylated tau in SY5Y human neuroblastoma cells. *FEBS Letters*, 360, 5–9.
- Torres, C. R., & Hart, G. W. (1984). Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc. *Journal of Biological Chemistry*, 259, 3308–3317.
- Tsokos, G. C., Nambiar, M. P., & Juang, Y. T. (2003). Activation of the Ets transcription factor Elf-1 requires phosphorylation and glycosylation: Defective expression of activated Elf-1 is involved in the decreased TCR zeta chain gene expression in patients with systemic lupus erythematosus. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 987, 240–245.
- Walgren, J. L., Vincent, T. S., Schey, K. L., & Buse, M. G. (2003). High glucose and insulin promote O-GlcNAc modification of proteins, including alpha-tubulin. *American Journal of Physiology and Endocrinology Metabolism*, 284, E424–E434.
- Wells, L., Gao, Y., Mahoney, J. A., Vosseller, K., Chen, C., Rosen, A., et al. (2002). Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: Further characterization of the nucleocytoplasmic beta-N-acetylglucosaminidase, O-GlcNAcase. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 1755–1761.
- Whelan, S. A., & Hart, G. W. (2003). Proteomic approaches to analyze the dynamic relationships between nucleocytoplasmic protein glycosylation and phosphorylation. *Circulation Research*, 93, 1047–1058.
- Wolff, B., Willingham, M. C., & Hanover, J. A. (1988). Nuclear protein import: Specificity for transport across the nuclear pore. *Journal of Biological Chemistry*, 265, 2563–2568.
- Yang, X., Su, K., Roos, M. D., Chang, Q., Paterson, A. J., & Kudlow, J. E. (2001). O-Linkage of N-acetylglucosamine to Sp1 activation domain inhibits its transcriptional capability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 6611–6616.
- Yoneda, Y. (1997). How proteins are transported from cytoplasm to the nucleus. *Journal of Biochemistry*, 121, 811–817.
- Zachara, N. E., O'Donnell, N., Cheung, W. D., Mercer, J. J., Marth, J. D., & Hart, G. W. (2004). Dynamic O-GlcNAc modification of nucleocytoplasmic proteins in response to stress. A survival response of mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 30133–30142.

