

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**IMPACT DES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DE
TYPE O-N-ACETYLGLUCOSAMINE LORS DE L'APOPTOSE DES
LYMPHOCYTES T**

Par
Bruno Johnson

Thèse présentée
pour l'obtention du grade de *Magister Scientiae* (M.Sc.)
en sciences expérimentales de la santé

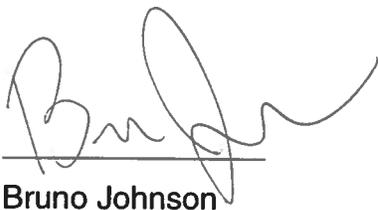
Jury d'évaluation

Examineur interne	Dr Cathy Vaillancourt INRS-Institut Armand-Frappier
Examineur externe	Dr Michel J. Tremblay Université Laval
Directeur de recherche	Dr Jacques Bernier INRS-Institut Armand-Frappier

RÉSUMÉ

L'objectif principal de notre projet de recherche était de démontrer l'importance des modifications post-traductionnelles de type O-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) dans la régulation de l'apoptose des lymphocytes T. Les effets de ce type de glycosylation demeurent relativement peu étudiés, bien qu'il soit en compétition avec la phosphorylation pour la modification des résidus sérines et thréonines et pourrait affecter l'activation de diverses voies apoptotiques contrôlées par des sérines/thréonines kinases. Lors de l'O-GlcNAcylation, l'enzyme O-N-acetylglucosamine transférase (OGT) catalyse l'ajout du monosaccharide O-GlcNAc, tandis que l'enzyme O-N-acetylglucosaminidase (OGA) catalyse le retrait de la modification. L'inhibition d'OGT avec l'inhibiteur O-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene) amino-N-phenylcarbamate (PUGNAc) diminuerait la fragmentation de l'ADN des thymocytes humains HPB-ALL suite à leur exposition au tributylétain (TBT), tel que démontré par l'analyse du cycle cellulaire en cytométrie de flux et par la visualisation de la fragmentation de l'ADN sur gel d'agarose. Une augmentation de l'O-GlcNAcylation a été observée suite à l'exposition des cellules au TBT. De plus, ce projet de recherche a permis de déterminer que le complexe de fragmentation de l'ADN (DFF) pouvait être régulé par l'O-GlcNAcylation. L'immunoprécipitation des protéines O-GlcNAcylées à l'aide de la forme succinylée de l'agglutinine du germe de blé (sWGA), suivi d'immunobuvardages de type Western ont permis de déterminer que l'O-glycosylation du DFF45 protégerait la protéine de son clivage par la caspase-3 lors de l'apoptose. Le DFF45 est l'inhibiteur du DFF40, l'endonucléase majoritairement responsable de la fragmentation internucléosomale de l'ADN lors de l'apoptose. Les résultats de ce projet de recherche auront permis de démontrer pour la première fois l'implication de l'ajout d'O-GlcNAc dans la régulation de l'apoptose nucléaire.

Mots clefs : apoptose, O-GlcNAc, OGT, PUGNAc, TBT, DFF et DFF45.



Bruno Johnson

Étudiant



Dr Jacques Bernier

Directeur de recherche

ABSTRACT

The principal objective of our research project was to demonstrate the importance of O-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) post-translational modifications on the regulation of apoptosis in T cells. The effects of O-GlcNAcylation are still relatively unknown, but could play a major role in different signalisation pathways because of its competition with phosphorylation on serine and threonine residues. The enzyme O-N-acetylglucosamine transferase (OGT) catalyses the addition of O-GlcNAc monosaccharide, while O-N-acetylglucosaminidase (OGA) removes the modification. The inhibition of OGT with inhibitor O-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene) amino-N-phenylcarbamate (PUGNAc) protected human T-lymphoblastics cells HPB-ALL exposed to tributyltin (TBT). The inhibition of apoptosis in cells exposed to PUGNAc was proven by analysis of the cell cycle by flow cytometry and visualization of DNA fragmentation on agarose gel. Western blots analysis showed an increase in O-GlcNAcylated proteins following TBT exposure. Also, this research project contributed to identify the DNA fragmentation factor complex (DFF) as being regulated by O-GlcNAc. Immunoprecipitation of O-GlcNAcylated proteins with the succinylated form of wheat germ agglutinin (sWGA), followed by western blots showed that O-GlcNAc modification of DFF45 protected the protein from its cleavage by caspase-3 during apoptosis. DFF45 is the inhibitor of DFF40, the endonuclease majorly responsible of internucleosomal DNA fragmentation during apoptosis. Results from this research program revealed for the first time a role of O-GlcNAc modification in the regulation of nuclear apoptosis.

Keywords : apoptosis, O-GlcNAc, OGT, PUGNAc, TBT, DFF and DFF45.

REMERCIEMENTS

Je voudrais d'abord remercier ma copine Catherine pour ses judicieux conseils et le soutien qu'elle m'a offert lors de cette maîtrise. J'aimerais également remercier mes parents Jean-Pierre et Jocelyne, ainsi que mon frère Samuel, pour leurs encouragements tout au long de mon cheminement scolaire.

J'aimerais également profiter de cette occasion pour souligner l'excellent travail de mon directeur de recherche, le Dr Jacques Bernier. Une bonne maîtrise débute par un bon projet de recherche, c'est-à-dire par un projet bien défini et visant à confirmer une hypothèse logique. J'ai eu la chance de travailler sur un projet répondant à ces critères grâce au travail rigoureux du Dr Bernier.

Finalement, merci à mes collègues de l'institut Armand-Frappier pour avoir rendu ce séjour agréable. Un merci particulier à Geneviève pour son mentorat à mes débuts et pour m'avoir transmis son intérêt pour le projet. Un grand merci également à Guillaume, Marlyse, Debbie et Hind pour leur aide précieuse et leur patience.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	1
SECTION 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE	3
1.1 Introduction.....	4
1.2 Les différents types de modifications post-traductionnelles	9
1.2.1 Implication d'un changement structurel	9
1.2.2 Modifications impliquant l'ajout d'un peptide :.....	10
1.2.3 Modifications chimiques sans enzymes impliquées :.....	11
1.2.4 Ajout enzymatique d'un groupement chimique :.....	14
1.3 Les modifications post-traductionnelles de type O-N-acetylglucosamine	22
1.3.1 Introduction	22
1.3.2 L'enzyme O-N-acetylglucosamine transférase	25
1.3.3 L'enzyme O-N-acetylglucosaminidase	31
1.3.4 Méthodes de détection des protéines O-GlcNAcylées.....	33
1.3.5 Régulation de la localisation cellulaire et de l'activité de facteurs de transcription	38
1.3.6 Pathologies liées à l'O-GlcNAcylation	39
1.3.7 O-GlcNAc, apoptose et cancer.....	40
2.1 Introduction	42
2.2 Voie intrinsèque	43
2.2.1 Initiation et décision	43
2.2.2 Activation du complexe DFF et apoptose nucléaire	49
2.3 Voie des récepteurs de mort	51
2.3.1 Voie FADD-dépendante.....	52
2.3.2 Voie TRADD-dépendante	53
2.4 Voie du réticulum endoplasmique	57
SECTION 2 : ARTICLE SCIENTIFIQUE	62
DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION	85
RÉFÉRENCES	90

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A β	Peptide amyloïde- β
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGE	Produits avancés de glycation
AhR	Récepteur des hydrocarbures aryliques
AICD	Domaine intracellulaire d'APP
AIF	Facteur inducteur de l'apoptose
Akt	Sérine/thréonine protéine kinase (protéine kinase B)
APAF-1	Facteur 1 d'activation de peptidase apoptotique
APP	Protéine précurseur de l'amyloïde
ARN	Acide ribonucléique
Bcl	Lymphome des cellules B
CAD	Désoxyribonucléase activée par les caspases
Caspase	Protéases cystéiniques spécifiques à l'aspartate
DD	Domaine de mort
DED	Domaine effecteur de mort
DFF35	Facteur de fragmentation de l'ADN de 35 kDa
DFF40	Facteur de fragmentation de l'ADN de 40 kDa
DFF45	Facteur de fragmentation de l'ADN de 45 kDa
DIABLO	Protéine liant l'IAP et ayant un point isoélectrique faible
DNase	Désoxyribonucléase
Ebp1	Protéine liant ErbB3-1
FADD	Protéine associée à Fas avec un domaine de mort
FLIP	Protéine inhibitrice de FLICE
HDAC	Histone désacétylase
HeLa	Lignée cellulaire de carcinomes d'épithélium humain
HMGB-1/2	Groupe de protéines à boîte de mobilité élevée 1/2
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance (ou pression)
IAP	Protéines inhibitrices de l'apoptose
ICAD	Inhibiteur de CAD
ISG-15	Protéine de 15 kDa codé par un gène stimulé par l'interféron
JAK	Janus kinase

JNK	Kinase c-Jun N-terminale
kDa	Kilo Dalton
kbp	Kilo paires de bases
MAPK	Protéine kinase activée par des mitogènes
mOGT	Isoforme mitochondrial d'OGT de 103 kDa
ncOGT	Isoforme nucléocytoplasmique de 116 kDa d'OGT
NF- κ B	Facteur nucléaire- κ B
OGA	O-N-acetylglucosaminidase
O-GlcNAc Ser/Thr.	monosaccharide <i>N</i> -acetylglucosamine lié à l'oxygène d'un résidu
O-GlcNAcylation	Transfert d'un monosaccharide O-GlcNAc
OGT	O-N-acetylglucosamine transférase
p53	Protéine tumorale 53
PI3K	Phosphatidylinositol-3 kinase
PTP	Pore de transition de perméabilité
PP1- β	Protéine phosphatase 1- β
RAGE	Récepteur des produits avancés de glycation
RMT	Répétitions multiples de tétratricopeptides
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
sAPP	Peptide sécrété à partir d'APP
Ser	Acide amine sérine
SLN	Séquence de localisation nucléaire
STAT	Protéines transductrices et activatrices du signal de transcription
sOGT	Isoforme petite d'OGT de 78 kDa
SUMO	Petite protéines modificatrice semblable à l'ubiquitine
TBT	Tributylétain
Thr	Acide amine threonine
TNF	Facteur tumoral de nécrose
TNFR	Récepteur du facteur tumoral de nécrose
UDP	Uridine diphosphate
UV	Rayonnement ultraviolet
VDAC	Canal anionique voltage-dépendant

LISTES DES FIGURES

Figure 1 : Traduction de l'ARNm en protéines au niveau du ribosome.	6
Figure 2 : Réaction de Maillard permettant la formation des produits d'Amadori, suite à la réorganisation d'une base de Schiff.	13
Figure 3 : Transfert d'un groupement phosphate sur un résidu sérine.	16
Figure 4 : Compétition entre différents types de modifications post-traductionnelles pour un même acide aminé.	18
Figure 5 : Compétition entre la phosphorylation et l'O-glycosylation pour un même acide aminé ou pour un site adjacent.	20
Figure 6 : Formation de l'UDP-GlcNAc via la voie de biosynthèse des hexosamines.	23
Figure 7 : Représentation schématique des trois isoformes de l'enzyme OGT	26
Figure 8 : Implication des domaines RMT dans la régulation de l'enzyme OGT.	29
Figure 9 : Membres de la famille Bcl-2 regroupés selon leurs fonctions physiologiques et leurs domaines d'homologie.	45
Figure 10 : Principales étapes de l'apoptose par la voie intrinsèque.	48
Figure 11 : Voies FADD-dépendante et TRADD-dépendante d'induction de l'apoptose suite à la liaison des récepteurs de mort par leurs ligands respectifs.	56
Figure 12 : Enzymes et facteurs de transcription impliqués dans la régulation du stress du réticulum endoplasmique.	58

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Types de modifications post-traductionnelles et exemples pour chacun.	8
Tableau 2 : Récepteurs de mort, leurs principaux ligands et leurs protéines adaptatrices.	52

INTRODUCTION

Les modifications post-traductionnelles correspondent à tous changements affectant une protéine suite à sa synthèse au niveau du ribosome. Ces mécanismes sont notamment impliqués dans les processus de maturation protéique, d'activation/inactivation enzymatique, de régulation de la localisation cellulaire et dans la dégradation protéasomale des protéines mal-repliées ou non-désirables. L'ajout de monosaccharides d'acétylglucosamine (O-GlcNAc) est un type de modifications post-traductionnelle réversible affectant les protéines nucléocytoplasmiques et pouvant compétitionner avec la phosphorylation sur les résidus sérines et thréonines. L'enzyme O-N-acetylglucosamine transferase (OGT) catalyse le transfert du groupe O-N-acetylglucosamine aux résidus sérines et thréonines des protéines cibles, tandis que l'enzyme O-N-acetylglucosaminidase (OGA) catalyse le retrait de la modification. Il s'agit d'un processus d'O-glycosylation, puisque le monosaccharide est ajouté sur le groupement hydroxyle (-OH) de la chaîne latérale des résidus sérines et thréonines de la protéine cible. On estime que l'O-GlcNAcylation serait une modification très répandue dans l'ensemble du protéome, bien qu'à peine un millier de protéines O-GlcNAcylées aient été identifiées jusqu'à présent. Plusieurs protéines fortement impliquées dans le processus de d'apoptose se sont révélées être modifiées par O-GlcNAc.

L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée nécessaire à l'élimination des cellules sénescents ou endommagées. Un défaut dans ce processus peut mener au cancer, de même qu'à diverses maladies auto-immunes et dégénératives. Différents types de stress tel l'exposition à des substances toxiques ou aux rayons UV peuvent induire une perturbation au niveau des mitochondries. Dans la voie intrinsèque de l'apoptose, ce stress provoque une transition du potentiel membranaire mitochondriale menant à la libération du cytochrome C et du facteur inducteur de l'apoptose (AIF) dans le cytoplasme. Le cytochrome C se lie ensuite à la protéine APAF-1 et ce complexe ira ensuite recruter la pro-caspase 9 pour former l'apoptosome. Ce dernier active par la suite la caspase 9 en clivant sa pro-enzyme. La caspase 9 active les caspases effectrices 3 et 7, lesquelles activent ensuite différentes cibles pro-apoptotiques. Lors de l'apoptose nucléaire, les caspases effectrices transloquent du cytoplasme vers le noyau et clivent la protéine DFF45. Cette dernière est l'inhibiteur de l'endonucléase DFF40, laquelle est majoritairement responsable de la

fragmentation internucléosomale de l'ADN durant l'apoptose. Une fois son inhibiteur clivé, le DFF40 forme des oligomères limités représentant la forme active de l'endonucléase. Cette dernière clive ensuite l'ADN en fragments d'environ 200 paires de bases, initiant les étapes caractéristiques de l'apoptose nucléaire, soit la condensation de la chromatine et la formation de corps apoptotiques.

Un résultat secondaire d'un article visant à l'identification de protéine O-GlcNAcylées a permis d'identifier le DFF45 parmi les protéines modifiées chez les cellules épithéliales humaines HeLa (Nandi et al. 2005). Cependant, l'effet de cette modification sur l'activation du complexe DFF lors de l'apoptose n'a pas été étudié à ce jour. D'autres protéines impliqués dans des voies pro et anti-apoptotiques se sont révélées être régulées par l'ajout d'O-GlcNAc, tels p53, NF- κ B, Akt et p38. Une augmentation de l'O-GlcNAcylation corrèlerait avec une diminution de l'apoptose chez les cardiomyocytes murins, tandis qu'un effet contraire serait observé chez les cellules β pancréatiques de rats. La régulation de l'apoptose des lymphocytes T par les modifications de type O-GlcNAc n'a pas encore été étudiée.

À la suite de ces observations, le but de la présente étude était d'abord d'évaluer l'impact de ces modifications chez les thymocytes. Le second objectif était de déterminer de quelle manière l'O-GlcNAcylation régulait l'activité du complexe DFF. Ces objectifs visaient à améliorer l'état des connaissances actuelles sur ce sujet. Cette revue de la littérature est séparée en deux chapitres traitant des modifications post-traductionnelles de type O-GlcNAc et de l'apoptose. La seconde section du mémoire contient un article scientifique à soumettre présentant les principaux résultats obtenus lors de ma maîtrise. Cet article est précédé d'un résumé en français et est suivi d'une discussion analysant l'ensemble des résultats obtenus.

SECTION 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE

CHAPITRE 1

LES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES

1.1 Introduction

Les modifications post-traductionnelles (MPT) surviennent après la traduction de l'acide ribonucléique messager (ARNm) en une séquence d'acides aminés formant la protéine. Ces MPT permettent de diversifier l'étendue des groupements fonctionnels pouvant se retrouver à la surface protéique. Il était estimé en 2006 qu'environ trente milles protéines seraient traduites à partir de l'ARNm humain, mais que de trois-cent-mille à un million de protéines étaient présentes dans notre organisme en raison de la grande diversité apportée par les MPT (Walsh, 2006). Ces données démontrent l'importance de l'amélioration des connaissances concernant ces modifications et du développement de techniques permettant leur identification, dans l'optique de comprendre le rôle et la régulation des protéines modifiées.

Pour faire un bref rappel des étapes initiales de la synthèse protéique, l'acide désoxyribonucléique (ADN) est transcrit en acide ribonucléique (ARN), lequel quittera ensuite le noyau pour rejoindre le complexe ribosomal, lequel est formé d'une grande (60s) et d'une petite (40s) sous-unité ayant des rôles distincts. Les ribosomes sont localisés dans le cytosol, les mitochondries et à la surface externe de la membrane du réticulum endoplasmique. Les ribosomes du cytosol sont responsables de la traduction des protéines cytosoliques, nucléaires, péroxisomiques et d'une fraction des protéines mitochondriales. Les ribosomes du réticulum endoplasmique sont impliqués dans la traduction des protéines destinées aux voies sécrétoires et d'endocytose (Hebert & Molinari 2007). Tel qu'illustré dans la figure 1, la petite sous-unité est impliquée dans la lecture de l'ARNm, en appariant les codons de trois nucléotides aux anti-codons des ARN de transferts (ARNt) correspondants. La grande sous-unité permet la synthèse des protéines en créant des liens peptidiques entre les acides aminés situés à l'autre extrémité des ARNt. Lors de l'étape d'initiation de la traduction, la petite sous-unité ribosomale parcourt l'ARNm jusqu'à rencontrer le codon d'initiation AUG, codant pour une méthionine qui se retrouve ainsi en N-terminal de toutes les protéines naissantes.

Lors de l'étape d'élongation, le ribosome se déplace le long de l'ARNm et assemble une chaîne polypeptidique, jusqu'à la rencontre d'un codon stop (UAA, UGA et UAG). Toute l'information nécessaire au repliement adéquat d'une protéine est inscrite dans sa séquence d'acides aminés. Ce processus est cependant délicat en condition physiologique étant donné la forte quantité de protéines occupant l'espace intracellulaires et la forte activité s'y déroulant en permanence. Les protéines chaperonnes peuvent se lier aux protéines immatures afin de les stabiliser lors de leur repliement. Cette catégorie inclut les protéines de choc thermique (heat shock protein ou hsp) hsp70 et hsp90, qui ont d'abord été découvertes en raison de leur surexpression en situation de stress (Haas 1995).

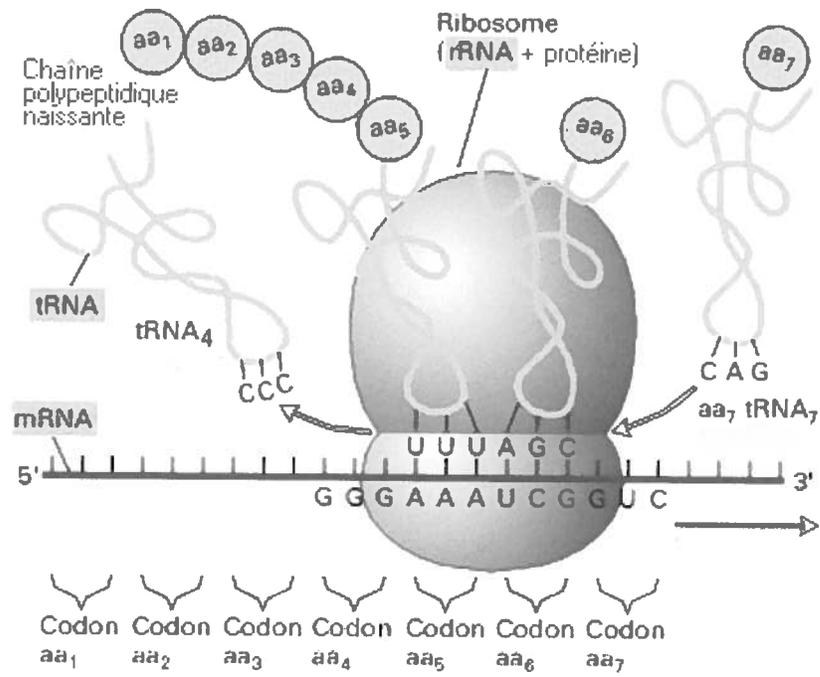


Figure 1 : Traduction de l'ARNm en protéines au niveau du ribosome (Lodish et al, 2000).

La protéine naissante correctement repliée est ensuite relâchée par le ribosome et elle amorce son processus de maturation (Lodish et al, 2000). La majorité des protéines nécessitent certaines MPT avant de pouvoir assurer leurs fonctions physiologiques. Ces changements peuvent être classés en cinq catégories, tel qu'indiqué dans le tableau 1. Les modifications principales seront décrites dans les sections suivantes, en débutant par celles impliquant des changements structurels, puis celles correspondant à l'ajout d'un peptide. Les modifications impliquant l'ajout d'un groupement chimique seront décrites plus en détails dans les sections 1.2.3 et 1.2.4. Une attention plus particulière sera accordée à deux types de MPT appartenant à cette catégorie. La première est la phosphorylation, qui est une modification enzymatique caractérisé par l'ajout d'un groupement phosphate par les sérines/thréonines et tyrosines kinases. Il s'agit d'un processus réversible puisque les enzymes phosphatases catalysent le retrait de la modification. La seconde modification est l'ajout de monosaccharide O-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) aux résidus sérines et thréonines par une des trois isoformes de l'enzyme O-N-acetylglucosamine transférase (OGT). Cette modification est également réversible, puisque l'enzyme β -D-N-acetylglucosaminidase (OGA) catalyse le retrait du groupement chimique. Puisque l'O-GlcNAcylation est le sujet principal du présent ouvrage, la section 1.3 sera entièrement consacrée à cette MPT.

Tableau 1 : Types de modifications post-traductionnelles et exemples pour chacun.

Type de modification	Nom	Fonction
Ajout d'un groupement chimique par une enzyme	Acetylation	Ajout d'un groupe acetyl
	Phosphorylation	Ajout d'un phosphate
	Glycosylation	Ajout d'un glycosyl
	Alkylation	Ajout d'un groupe alkyl
Modification chimique sans enzyme impliquée	Glycation	Ajout d'un sucre
Ajout d'une protéine	Ubiquitination	Liaison covalente de l'ubiquitine
	ISGylation	Liaison covalente à ISG15
	SUMOylation	Liaison covalente de la protéine
Modifications impliquant un changement au niveau de la structure	Pont disulfure	Liaison de deux cystéines
	Clivage protéolytique	Clivage d'une liaison peptidique
	Racémisation de la	Conversion d'un énantiomère
Modification de la composition chimique d'un acide aminé	citrullination	Conversion de l'arginine en citrulline
	déamidation	Conversion de la glutamine en

1.2 Les différents types de modifications post-traductionnelles

1.2.1 Implication d'un changement structurel

La séquence en acides aminés d'une protéine naissante n'est pas toujours celle qui caractérisera sa forme mature. Certaines subissent d'abord le retrait de leur méthionine en N-terminal par la méthionine aminopeptidase. Cette enzyme catalyse le clivage protéolytique du peptide entre la méthionine et l'acide aminé suivant (Gigliione et al. 2004). La cellule a élaboré plusieurs stratégies permettant de réagir aux stress environnants en activant certains mécanismes de survie. Certaines protéines sont synthétisées sous la forme de pro-protéines inactives pouvant être activées par clivage protéolytique. La famille des protéines convertases comprend au moins neuf endoprotéases responsables de l'activation d'un grand nombre de protéines sécrétées hors de l'espace intracellulaire. La protéine convertase la plus étudiée à ce jour est sans doute la furine, une sérine endoprotéase responsable du clivage protéolytique de plusieurs précurseurs à la séquence consensus Arg-X-Lys/Arg-Arg (Leduc et al. 1992). Ses substrats incluent l'albumine, le TNF- α , les sécrétases α et β et le facteur de transformation de croissance bêta (TGF- β). Le pro-domaine des protéines sécrétées contient habituellement un domaine de localisation ciblant la translocation des protéines du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi. La furine est principalement présente dans ce compartiment, où elle clive les pro-protéines avant leur sécrétion par la voie constitutive (Mayer et al. 2004).

En plus du clivage protéolytique, d'autres MPT permettent de modifier la structure tridimensionnelle d'une protéine. Par exemple, la disulfide isomérase catalyse l'oxydation des groupes sulfhydryl (-SH) de deux cystéines afin de créer un pont disulfure (-S-S-) entre celles-ci (Petsko et al, 2008). La peptidyl-prolyl *cis-trans* isomérase permet l'isomérisation des résidus prolines, ceux-ci étant synthétisés exclusivement sous la forme *trans* au niveau ribosomal. L'orientation des prolines est déterminante dans la structure tridimensionnelle protéique, puisqu'elles ne peuvent être incluses dans des hélices alpha ou des feuillets bêta en raison de leur structure cyclique (Hebert & Molinari 2007).

1.2.2 Modifications impliquant l'ajout d'un peptide :

Les chaînes latérales des acides aminés possèdent des groupes fonctionnels permettant leur modification ou l'ajout de certaines structures. L'ubiquitine est un polypeptide de soixante-seize acides aminés qui est ajouté aux résidus lysines par une ligase lors du processus d'ubiquitination. Il s'agit d'un mécanisme essentiel à l'homéostasie cellulaire, puisqu'il permet un équilibre entre la synthèse des protéines et leur dégradation protéasomale. La présence d'une chaîne d'au moins quatre ubiquitines (polyubiquitination) recrute le protéasome 26s, lequel utilise l'ATP pour dérouler la protéine cible et la transloquer au centre du complexe où elle sera digérée par des protéases (Pickart 2004). La voie ubiquitine-protéasome est majoritairement impliquée dans l'élimination des protéines ayant une courte demi-vie (Pickart 2004). L'ubiquitination est également impliquée dans la régulation de voies de signalisation cellulaire. Chez une cellule non-stimulée, le facteur nucléaire kappa B (NF- κ B) existe sous la forme d'un complexe inactif avec son inhibiteur I κ B. Des cytokines extracellulaires tel le facteur tumoral de nécrose- α (TNF- α) se lient à leurs récepteurs et activent la voie, ce qui mène à la phosphorylation du complexe de kinases IKK. Les kinases sont des enzymes catalysant l'ajout d'un groupement phosphate aux résidus sérines, thréonines ou tyrosines de leurs protéines cibles. Cette MPT importante sera décrite de manière plus détaillée dans la section 1.5. Le complexe IKK activé phosphoryle ensuite I κ B, ce qui active un signal menant à l'ubiquitination de l'inhibiteur, puis à sa dégradation protéasomale. L'inhibition de NF- κ B est levée et le facteur transloque vers le noyau afin d'activer la transcription de ses gènes cibles (Pineda et al. 2007). La régulation d'I κ B par phosphorylation et ubiquitination est un des nombreux exemples de co-régulation entre deux modifications enzymatiques, un processus qui sera décrit dans la section 1.5.1.

D'autres protéines peuvent être transférées de manière post-traductionnelle lors des processus de SUMOylation et d'ISGylation. La petite protéine similaire à l'ubiquitine (SUMO, de l'anglais Small Ubiquitin-like Modifier) est une petite protéine de 12 kDa, présentant dix-huit pourcent d'homologie avec l'ubiquitine. Quatre isomères de la protéine (SUMO1-2-3 et 4) ont été identifiés à ce jour (Bettermann et al. 2011). Le processus de SUMOylation compétitionne avec celui d'ubiquitination pour la mono ou la poly-modification des résidus lysines (Wilson 2010). Bien que ces deux MPT

s'apparentent par leur mécanisme, la SUMOylation ne recrute pas le protéasome. La modification est réversible, puisque des protéases spécifiques à SUMO/Sentrine (SENP) catalysent son retrait (Dou et al. 2011). La SUMOylation est fortement impliquée dans les processus de réparation de l'ADN, de régulation de l'activité transcriptionnelle et de prolifération cellulaire (Bettermann et al. 2011; Dou et al. 2011). La protéine traduite du gène 15 stimulé par l'interféron (ISG15) est transféré aux lysines lors du processus d'ISGylation. Tout comme SUMO, elle appartient à la famille des protéines semblables à l'ubiquitine. Cette modification régule l'activité de plusieurs protéines impliqués dans les voies de signalisation de l'interféron de type I (IFN-1), tels JAK1 et STAT1, démontrant le rôle de l'ISGylation dans la médiation de la réponse immunitaire innée (Jeon et al. 2010). Le gène ISG15 est d'ailleurs l'un des plus fortement induit suite à une infection virale ou une stimulation de l'IFN-1 (Blomstrom et al. 1986; Malakhova et al. 2003). Il a d'ailleurs été démontré que des souris n'exprimant pas la protéine UBP43, responsable du retrait de la modification, étaient hypersensible à l'IFN-1 (Malakhova et al. 2003).

1.2.3 Modifications chimiques sans enzymes impliquées :

Les MPT décrites précédemment sont toutes catalysées par des enzymes contrairement à la glycation, laquelle a été décrite pour la première fois par Maillard en 1912 (Maillard 1913). Cette modification est bien connue dans l'industrie alimentaire, puisqu'elle est responsable du brunissement des aliments lors de la cuisson ou lors de leur vieillissement (Nursten 2005). Elles sont également importantes *in vivo*, puisqu'elles entraînent l'apparition des produits avancés de glycation (AGE pour advanced glycation end-products) impliqués dans le processus de vieillissement physiologique, de même qu'au niveau de certaines pathologies chroniques, tel le diabète de type 2 (Tessier 2011). En raison de la grande stabilité de sa forme cyclique, le glucose intracellulaire est peu réactif. Par contre, certains métabolites tels le glucose-6-phosphate et le dihydrocyacétone phosphate sont majoritairement impliqués lors des processus de glycation *in vivo*.

La glycation se déroule en trois étapes et débute par une réaction de Maillard entre un sucre et une amine, permettant de former une base de Schiff

(voir figure 2). Le groupe fonctionnel cétime (R-CH=NH-R) peut se réorganiser pour former un produit d'Amadori. La seconde étape est la caramélisation, processus par lequel les sucres réagissent entre eux et se déshydratent afin de créer de nouveaux composés. Ce processus est hautement complexe et difficilement prédictible. Par exemple, la réaction du glucose et de la glycine donnent plus de vingt-quatre composés différents, issus de différentes voies de synthèse.

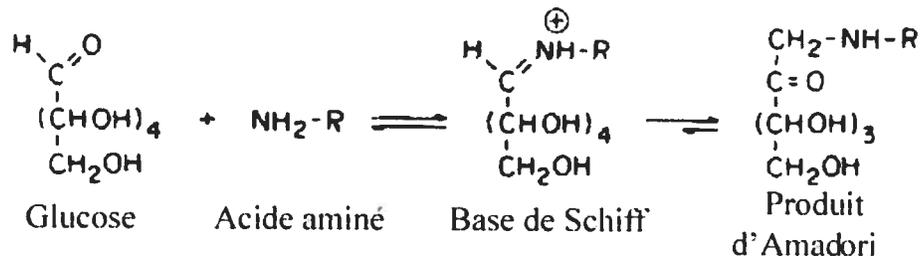


Figure 2: Réaction de Maillard permettant la formation des produits d'Amadori, suite à la réorganisation d'une base de Schiff (Moussard 2006).

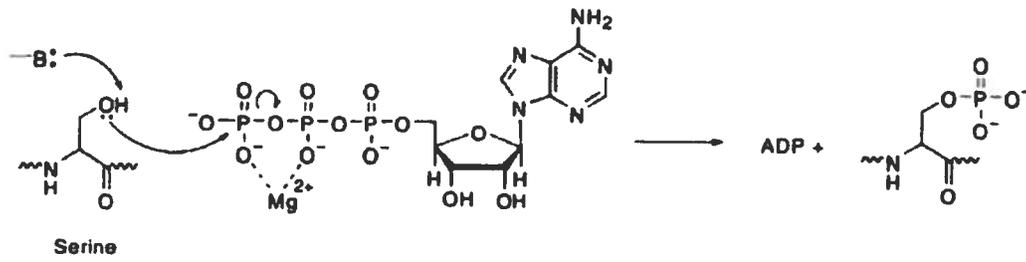
Étant non-enzymatique, la glycation des protéines extra-cellulaires est proportionnelle à la concentration glycémique du milieu. Cette corrélation ne s'applique pas toujours aux protéines intracellulaires en raison des mécanismes de régulation du transport du glucose à travers la membrane cytoplasmique (Tessier 2011). La glycation cible principalement les protéines aux longues durées de vie tels le collagène, l'élastine et l'hémoglobine HbA1C, ceux-ci comptant parmi les premiers AGE détectés (Leslie & Cohen 2009). L'accumulation de ces AGE est impliquée dans la rigidité artériolaire survenant lors du vieillissement et en cas de diabète (Sell & Monnier 2011). Le récepteur des produits avancés de glycation (RAGE) a été identifié en 1992, par Neeper et collaborateurs (Neeper et al. 1992). Il s'agit d'une protéine transmembranaire de 35 kDa appartenant à la superfamille des immunoglobulines. Il reconnaît des séquences au niveau de divers produits des réactions de Maillard, de même qu'au niveau de fibrilles amyloïdes, de la protéine B1 du groupe de haute mobilité (HMGB1) et des protéines S100. Il est impliqué dans l'inflammation, puisqu'il favorise le recrutement de leucocytes pro-inflammatoires suite à son activation (Lin et al. 2009).

1.2.4 Ajout enzymatique d'un groupement chimique :

Contrairement au processus aléatoire de glycation, d'autres MPT permettent de modifier les groupements chimiques des chaînes latérales des acides aminés par des mécanismes enzymatiques étroitement régulés. Les principales modifications de cette catégorie sont la phosphorylation, la glycosylation, l'acétylation et l'alkylation. Certaines de ces modifications sont réversibles et peuvent servir de commutateur permettant d'activer ou d'inactiver une protéine. Ce mécanisme permet à la cellule de répondre à un stimulus en ordonnant l'activation de protéines effectrices, lesquelles pourront ensuite être désactivées afin de rétablir l'homéostasie cellulaire. Ces MPT permettent également de réguler le transport de leurs protéines cibles, notamment lorsque le site de modification est situé à proximité d'un signal de localisation cellulaire (Harreman et al. 2004)

La MPT enzymatique la plus fréquente est la phosphorylation, pour laquelle plus de cinq cents types de kinases peuvent catalyser l'ajout d'un groupement phosphate à la chaîne latérale des acides aminés tyrosines, sérines et thréonines (voir figure 3). Le

retrait de la modification est effectué par les phosphatases, dont il existe plus de cent-cinquante types (Walsh, 2006). Il est estimé que près de trente pourcent des protéines humaines sont liées par un groupement phosphate et qu'entre un à deux pourcent du génome est dédié aux enzymes impliquées dans la phosphorylation (Cohen 2001). La phosphorylation est responsable de la transduction des signaux intracellulaires permettant à la cellule de répondre aux informations qu'elle reçoit. Le signal se propage en empruntant des voies de signalisation activées sous formes de cascades enzymatiques. C'est le cas de la voie des kinases activées par un mitogène (MAPK), qui implique une suite de kinases s'activant par transfert d'un groupe phosphate. Chacune des enzymes demeure inactive tant que la protéine située en amont ne lui a pas transféré la modification.



Serine

Figure 3 : Transfert d'un groupement phosphate sur un résidu sérine (Walsh 2006).

La phosphorylation permet également de réguler la localisation cellulaire de certaines protéines cibles. La présence d'une séquence de localisation nucléaire (SLN) permet aux protéines d'être reconnues par les importines α , puis d'être transporté à travers les pores nucléaires avec l'aide des importines β . De nombreux SLN sont situés à proximité d'un site de phosphorylation permettant de réguler la liaison aux importines α (Jans & Hubner 1996; Harreman et al. 2004). C'est le cas du récepteur de l'aryl-hydrocarbure (AhR), pour lequel la phosphorylation des sérines 12 et 36 inhiberait sa translocation dans le noyau. Le SLN du récepteur est situé entre les acides aminés 13-39 et il a été démontré qu'une substitution de ces deux sérines par l'aspartate favorisait le transport nucléaire de la protéine (Ikuta et al. 2004). La phosphorylation est également impliquée dans certaines pathologies. L'hyperphosphorylation de la protéine Tau provoque son accumulation dans les cellules neuronales pouvant mener à certaines maladies neurodégénératives, tel l'Alzheimer et le Parkinson (Ross & Poirier 2004). Des mutations dans les gènes de nombreuses kinases et phosphatases peuvent provoquer différentes pathologies, incluant notamment les lymphomes non-Hodgkiniens (kinase Alk), le diabète (kinase du récepteur de l'insuline), l'immunodéficience sévère et combinée liée au chromosome X (kinase JAK3) et la dystrophie musculaire myotonique (kinase de la myotonine) (Cohen 2001).

Le processus d'activation en série par phosphorylation permet l'établissement de points de contrôle à certains embranchements d'une voie de signalisation, servant à interrompre la transmission du signal en cas de suractivation. Afin d'exercer différents niveaux de contrôle, plusieurs protéines situées à ces embranchements sont régulées par plus d'un type de modifications. Les MPT peuvent compétitionner pour un site d'une protéine, voir pour un même acide aminé (voir figure 4).

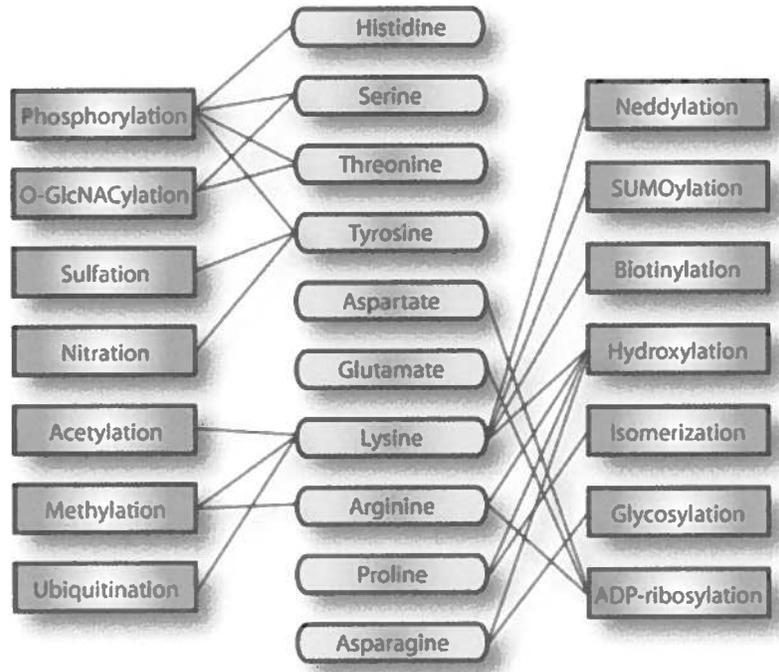


Figure 4 : Compétition entre différents types de modifications post-traductionnelles pour un même acide aminé (Vidal, 2010).

Ce processus d'inter-régulation a lieu entre des MPT réversibles comme la phosphorylation, l'acétylation et l'O-N-acétylglucosaminylation (O-GlcNAcylation). Ces modifications sont réversibles car les enzymes kinases/phosphatases (phosphorylation), acétyltransférases/acétyldésacétylases (acétylation) et O-N-acétylglucosamine transférase/O-N-acétylglucosaminidase (O-GlcNAcylation), permettent respectivement d'ajouter et retirer la modification. La compétition entre la phosphorylation et l'O-GlcNAcylation sur les résidus sérines et thréonines sera décrite en profondeur dans le présent document, puisque ces deux MPT co-régulent différentes voies impliquées dans la mort cellulaire par apoptose (voir figure 5). Par exemple, la protéine Akt1 peut être phosphorylée aux sites Ser473 et Thr308 ou O-GlcNAcylée sur le résidu Ser473. Il y a donc compétition entre ces deux MPT pour la Ser473, indépendamment de la phosphorylation de Thr308 (Gandy et al. 2006; Kang et al. 2008). Les protéines Akt contrôlent une importante voie de survie cellulaire et il a été démontré qu'une augmentation de l'O-GlcNAcylation de la sérine 473 à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques, provoquait une inhibition de la phosphorylation à ce site qui corrèlerait avec une augmentation de la mort cellulaire par apoptose (Kang et al. 2008).

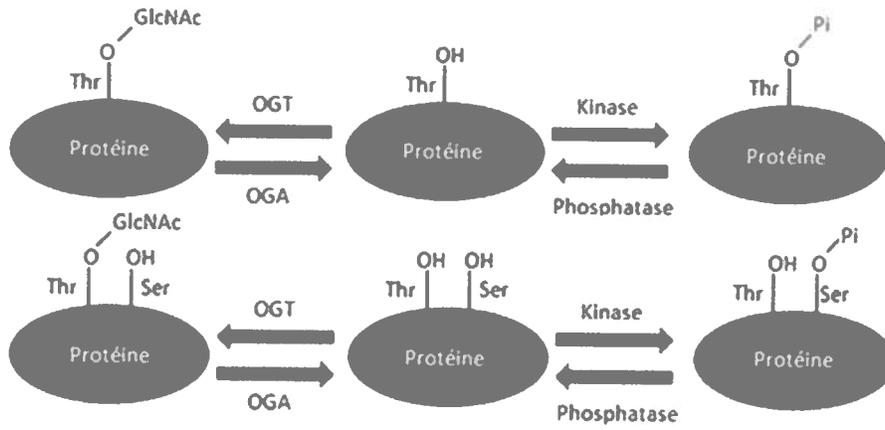


Figure 5 : Compétition entre la phosphorylation et l'O-glycosylation pour un même acide aminé ou pour un site adjacent (© droits réservés de Bruno Johnson, Mai 2012).

Un déséquilibre entre deux MPT ciblant une même protéine peut être à l'origine de certaines pathologies. C'est le cas de la protéine précurseur de l'amyloïde β (APP) qui est impliquée dans l'étiologie de la maladie d'Alzheimer (Griffith et al, 1995). APP possède des sites de phosphorylation, de glycosylation, de SUMOylation et de clivage protéolytique, lesquels inter-régulent la sécrétion et l'agrégation des protéines APP. Leur clivage peut entraîner la formation du peptide amyloïde- β ($A\beta$), lequel peut s'agréger en fibrilles amyloïdes et former les plaques séniles retrouvées chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Goodger et al, 2009). La protéine est clivée par les β - et γ -sécrétases selon deux voies (Jacobson & Iverfeldt, 2010). Dans la voie non-amyloïdogénique, APP est clivée en un fragment sAPP α sécrétée et en un domaine intracellulaire APP soluble (AICD). Dans la voie amyloïdogénique, le fragment sAPP β sécrété est libéré, de même que le domaine AICD et le peptide $A\beta$. Une hyperphosphorylation d'APP est reconnue comme étant un facteur clef dans l'activation de son clivage par la voie amyloïdogénique. Notamment, il a été déterminé que la phosphorylation du résidu Thr 668 par la C-jun N-terminal kinase (JNK) était requise à la formation du peptide $A\beta$ par les β -sécrétases (Mazzitelli et al. 2011). Une augmentation de l'O-GlcNAcylation d'APP corrèlerait avec une augmentation de la sécrétion de sAPP α et avec une diminution de la sécrétion du peptide $A\beta$. L'ajout d'O-GlcNAc empêcherait la phosphorylation des résidus Ser/Thr et favoriserait la sécrétion d'APP par la voie non-amyloïdogénique (Jacobson & Iverfeldt, 2010).

L'O-GlcNAcylation offre donc un effet protecteur face à l'induction de la maladie d'Alzheimer, tandis qu'une hyperphosphorylation aurait un effet contraire. Cet exemple démontre l'importance de comprendre les mécanismes d'inter-régulations entre les différentes modifications post-traductionnelles. Parmi celles-ci, un intérêt spécial sera porté à l'ajout d'O-GlcNAc en raison de la découverte relativement récente de cette MPT et de son importance dans diverses fonctions cellulaires en raison de sa compétition avec la phosphorylation. Cette modification sera décrite dans la section 1.3 et son impact sur le processus d'apoptose, dans la section 2.

1.3 Les modifications post-traductionnelles de type O-N-acetylglucosamine

1.3.1 Introduction

L'ajout de monosaccharides β -D-N-acetylglucosamine (O-GlcNAcylation) est un type de modification post-traductionnelle représentant également un mécanisme de détection et captation des nutriments intracellulaires (Lazarus et al. 2011). Lors de son métabolisme, entre deux à cinq pourcent du glucose absorbé est transféré dans la voie de biosynthèse des hexosamines pour mener à la formation d'uridine-diphosphate-N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) (voir figure 6) (Copeland et al. 2008). L'enzyme OGT catalyse le transfert du groupe O-N-acetylglucosamine aux résidus sérines et thréonines des protéines cibles. Il s'agit d'un processus d'O-glycosylation, puisque le monosaccharide est ajoutés sur le groupement hydroxyle (-OH) de la chaîne latérale des résidus sérines et thréonines de la protéine cible. Une comparaison entre les différents substrats d'OGT n'a pas permis de déterminer une séquence consensus d'O-GlcNAcylation. Cependant, l'enzyme semble préférer les sérines et thréonines situées à proximité d'acides aminés favorisant l'expansion de la structure tridimensionnelle. C'est le cas de la proline et des résidus impliqués dans les ramifications- β , telles les thréonines, la valine et l'isoleucine. En plus du glucose, la voie de biosynthèse des hexosamines est régulée par la concentration de glucosamine et de glutamine (voir figure 6). Contrairement à la N-glycosylation, un seul glycan est attaché lors de l'O-glycosylation. Elle ne mène donc pas la formation de structures oligosaccharidiques complexes.

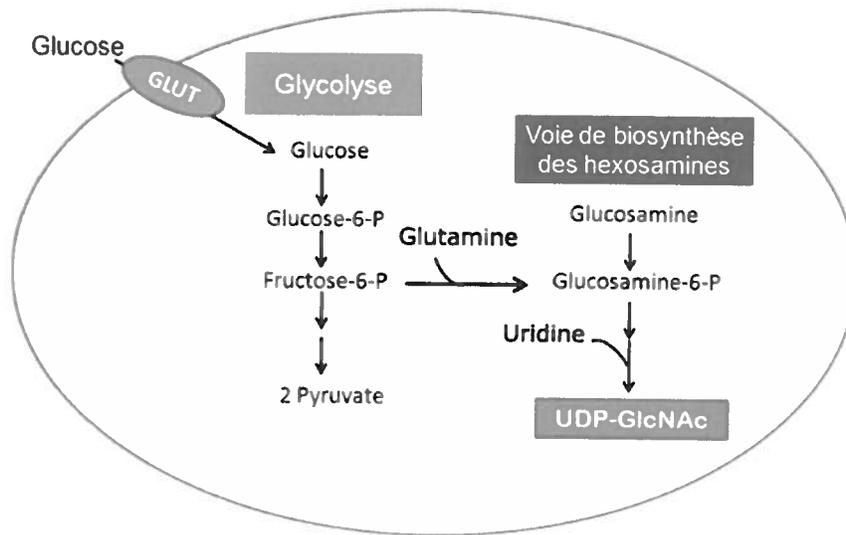


Figure 6 : formation de l'UDP-GlcNAc via la voie de biosynthèse des hexosamines (© droits réservés de Bruno Johnson, Mai 2012).

Le mode de fonctionnement de l'O-GlcNAcylation s'apparente d'avantage à la phosphorylation en raison de sa réversibilité, puisque le glycan peut être retiré par l'enzyme OGA (Les enzymes OGT et OGA seront décrites en détails dans les sections suivantes). Il existe d'ailleurs une forme de compétition entre l'ajout d'O-GlcNAc et la phosphorylation pour les résidus sérines et thréonines. Il a été présumé que toutes les protéines O-GlcNAcylées pourraient également être phosphorylées et que le passage d'un état à l'autre pourrait servir de commutateur pouvant activer ou désactiver certaines voies de signalisation cellulaire. On nomme ce processus *effet Ying/Yang* (Wells et al. 2004; Copeland et al. 2008; Butkinaree et al. 2010). Cette MPT peut survenir tout au long de la durée de vie d'une protéine et n'est pas localisée au complexe Golgi-réticulum endoplasmique. En plus de réguler la quantité de nutriments intracellulaires, la modification peut affecter l'activité, la conformation tri-dimensionnelle, la localisation cellulaire et la demi-vie des protéines nucléaires et cytoplasmiques (Torres & Hart 1984). Le niveau d'O-GlcNAcylation dépend également dépendant du niveau de stress affectant la cellule. Un article de 2004, de Zachara et collaborateurs, avait révélé que l'O-GlcNAcylation étaient fortement augmenté lorsque les cellules étaient soumises à différents types de stress incluant l'exposition aux rayons UVB, à un choc thermique, à l'éthanol, à l'iodoacetamide ou à l'arsenic de sodium (Zachara et al. 2004). Ce mécanisme semble être généralisé, puisque plusieurs types de lignées cellulaires ont réagi de façons similaires à ces stress, incluant les cellules COS-7 (cellules rénales provenant du singe), HeLa (cellules épithéliales de carcinome humain), CHO (cellules d'ovaires de hamster chinois), HCAEC (cellules endothéliales d'artères coronariennes humaines), MEF (fibroblastes d'embryons murins), Neuro-2A (cellules de neuroblastomes murins) et HEK293 (cellules rénales embryonnaires humaines). Ces cellules ont répondu à ces différentes formes de stress en activant l'O-GlcNAcylation de protéines impliquées dans les voies de régulation ciblées (Zachara et al. 2004). Par compétition avec la phosphorylation, ce processus permettrait d'inactiver la transmission de signaux menant à la mort cellulaire.

On estime que l'O-GlcNAcylation serait une modification très répandue dans l'ensemble du protéome, bien qu'à peine un millier de protéines O-GlcNAcylées aient été identifiées jusqu'à présent (Hart et al, 2011). Le manque de connaissances sur le sujet n'est pas un signe évocateur de son manque d'importance au niveau de la

régulation cellulaire, mais témoigne davantage de la difficulté à détecter cette modification post-traductionnelle par les méthodes d'électrophorèse et de chromatographie classiques. L'ajout d'un seul monosaccharide N-acetylglucosamine n'affecte pas de manière observable la distance de migration d'une protéine sur gel d'agarose, de même que son point isoélectrique lors d'analyse en gel bidimensionnel (Whelen & Hart, 2003). De plus, le résidu O-GlcNAc est habituellement retiré par l'enzyme OGA lors des traitements de purification nécessaire à la préparation des échantillons pour analyse par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Cela explique pourquoi ce type de MPT est demeuré indétecté jusqu'en 1983 (Torres & Hart 1984). Heureusement, des méthodes d'analyses précises ont été développées lors de la dernière décennie et de nouvelles protéines régulées par l'ajout d'O-GlcNAc sont découvertes régulièrement. Ces techniques seront décrites dans la section 1.3.4.

1.3.2 L'enzyme O-N-acetylglucosamine transférase

Chez l'humain, le gène OGT est localisé sur le chromosome X et contient 23 exons codant. Il serait fortement conservé, allant jusqu'à quatre-vingt pourcent d'homologie entre différents type d'eucaryotes analysé dans une étude de 1997 par Kreppel et collègues (Kreppel et al. 1997). L'épissage alternatif du gène mène à la traduction des isoformes ncOGT (116 kDa), mOGT (103 kDa) et sOGT (78 kDa) (Hanover et al. 2003; Lazarus et al. 2006). La transcription des 23 exons mène à la formation de la plus grande isoforme, laquelle a été nommée ncOGT en raison de sa localisation nucléocytoplasmique. Les exons 5 à 23 codent pour l'isoforme intermédiaire mOGT, qui contient une séquence de localisation mitochondriale en N-terminale. L'isoforme sOGT est codée par les exons 10 à 23 et a été nommée ainsi en raison de sa petite taille (short). Tout comme ncOGT, sOGT a été retrouvée ubiquitairement au sein de la cellule (Hanover et al. 2003) (Lazarus et al. 2006). Des analyses de mutagenèse dirigée ont permis de déterminer que le site catalytique de l'enzyme se trouve en C-terminale (a.a. 504 à 1046) et est constitué des domaines CD1 et CD2 (Lubas & Hanover 2000; Lazarus et al. 2005). Les isoformes d'OGT possèdent tous ce site catalytique, mais diffèrent en leur domaine N-terminal (voir figure 5).

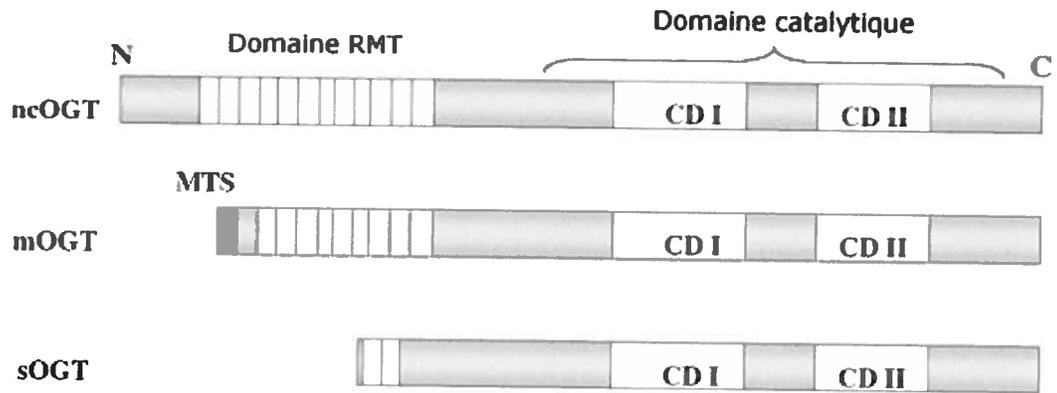


Figure 7. Représentation schématique des trois isoformes de l'enzyme OGT (modifié de Lazarus et al. 2006).

Il est étonnant qu'une seule enzyme catalyse l'ajout de résidus O-GlcNAc sur les protéines visées par cette modification, contrairement à la forte variété de kinases impliquées dans la phosphorylation. Ce phénomène serait dû à la présence de répétitions multiples de tétratricopeptides (RMTm) dans la région N-terminal des différentes isoformes (voir figure 8). Il s'agit de séquences dégénérées de trente-quatre acides aminés se retrouvant habituellement dans une même région chez une protéine. La structure tridimensionnelle de ces motifs a révélée la présence de deux hélices alpha anti-parallèles qui, lorsqu'aligné à d'autres RMT se trouvant à proximité, forment un canal amphipatique pouvant accueillir la région complémentaire d'une protéine cible tel qu'illustré dans la figure 8 (Kreppel et al. 1997; Blatch & Lässle 1999). Les isoformes OGT ont été comparés à l'importine- α en raison de la similarité de leur domaine RMT. Il est intéressant de constater que cette dernière, tout comme OGT, se caractérise par sa capacité à lier une pléiade de substrats et permettre leur transport à travers la paroi nucléaire (Jinek et al. 2004).

Une structure cristallisée du domaine N-terminal de ncOGT a révélée la présence de 11,5 RMT. Le domaine N-terminal de mOGT serait constitué d'un signal de localisation mitochondrial et de 9 RMT, tandis que sOGT en contiendrait deux seulement (Hanover et al. 2003) (Lazarus et al. 2011). Il a été déterminé par mutagénèse dirigée que la délétion des trois premiers motifs diminuait fortement la quantité de protéines pouvant être lié par l'enzyme, mais n'affectait pas la liaison à certains substrats. La délétion des six premiers motifs augmenterait fortement l'autoglycosylation de l'enzyme, ce qui démontre que ceux-ci ne sont pas nécessaires à son activité (Lubas & Hanover 2000). La structure cristalline du complexe OGT-UDP-CKII a été déterminée récemment, permettant de mieux comprendre le fonctionnement d'OGT. L'accès des protéines substrats au site catalytique serait régulé par le domaine RMT. Une courte région hélicoïdale située entre les RMT et le domaine catalytique permettrait un large pivot qui assurerait l'exposition du site actif (Lazarus et al. 2006; Lazarus et al. 2011). Le mécanisme de glycosylation accepté à ce jour est que le résidu H498 de l'enzyme servirait de base permettant de retirer l'hydrogène de la fonction alcool du résidu Ser/Thr cible. L'oxygène chargé négativement attaquerait ensuite le saccharide N-GlcNAc en expulsant le groupe UDP. La lysine 842 d'OGT serait nécessaire à la stabilisation de l'UDP-GlcNAc précédant le transfert. L'affinité des trois isoformes pour les protéines caséine kinase II (CKII), Tau, Yes kinase, α -synucléine et β -synucléine a été testé afin de mieux comprendre l'importance des domaines RMT (Lazarus et al. 2006). Ces

résultats ont démontrés que ncOGT pouvait glycosyler CKII et Tau. L'isoforme mOGT pouvait modifier la kinase Yes et CKII, tandis que sOGT ne pouvait glycosyler aucuns des substrats. Davantage de substrats devront être testés avec cette dernière isoforme afin de déterminer si elles possèdent un rôle catalytique ou régulateur.

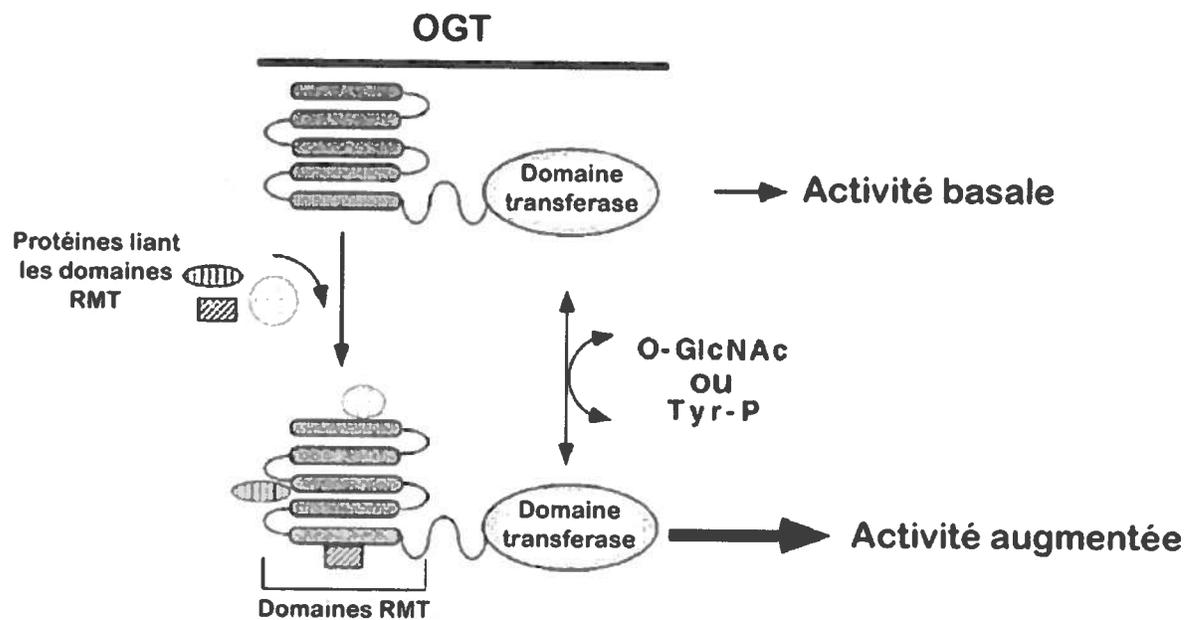


Figure 8 : Implication des domaines RMT dans la régulation de l'enzyme OGT (Kreppel et al. 1997).

Les domaines RMT d'OGT permettent son interaction avec ses substrats, mais également sa liaison au sein de différents complexes régulateurs. Il a été démontré *In vivo*, chez le rat, que l'enzyme pouvait lier les sérines/thréonines phosphatases PP1 β et PP1 γ pour former un complexe permettant de retirer le groupement phosphate d'une protéine et d'ajouter la modification O-GlcNAc (Wells et al. 2004). L'existence d'un tel complexe permet de mieux comprendre comment l'effet *Ying/Yang* entre la phosphorylation et l'O-GlcNAcylation est possible. De plus, ce complexe a permis de confirmer les observations précédentes reliant une hausse des modifications de type O-GlcNAc lors d'insulino-résistance, puisque PP1 β est la phosphatase la plus impliquée dans les voies de signalisations dépendantes de l'insuline.

Il a également été démontré qu'OGT pouvait contribuer à la régulation de la transcription génique par interaction avec les histones. En plus de réguler la localisation cellulaire et l'activation de plusieurs facteurs de transcription, l'enzyme peut lier le corépresseur mSin3A à l'intérieur d'un complexe contenant également des histones désacétylases (HDAC). Le mécanisme de fonctionnement exact de ce complexe n'est pas connu, mais il a été suggéré qu'une désacétylation des histones combiné à l'O-GlcNAcylation de la polymérase II et de facteurs de transcriptions était requise à l'inactivation de la transcription de certains gènes (Yang et al. 2002). Il a été démontré précédemment que la plus grande sous-unité de l'ARN polymérase II était O-GlcNAcylée à son extrémité C-terminale. Ce domaine de l'enzyme est constitué de cinquante-deux répétitions en tandem de la séquence Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser et il est fortement phosphorylé lors de la phase de transition précédant l'étape d'élongation de l'ARN immature (Kelly et al. 1993; Phatnani & Greenleaf 2006). Le degré de phosphorylation du domaine C-terminal de l'ARN polymérase II régule sa liaison à certains facteurs et est déterminant dans l'initiation de la phase d'élongation. Il a été observé que ce domaine existait sous trois formes : non-modifié, phosphorylé ou O-GlcNAcylé. L'O-Glycosylation peut ainsi réguler la transcription de certains gènes en inactivant l'ARN polymérase II (Kelly et al. 1993).

Étant donné son implication dans toutes les formes de régulations susmentionnées, il n'est pas étonnant de constater que l'enzyme OGT possède elle-même plusieurs sites de MPT permettant de contrôler ses fonctions. L'importance des toutes ces modifications n'a pas encore été démontré, mais il a été démontré que la

phosphorylation de la tyrosine 989 par CaMKIV (calcium/calmodulin-dependent protein kinase) activerait OGT lors de la dépolarisation induite par le chlorure de potassium chez les cellules NG-108-15 (Kreppel et al. 1997; Song et al. 2008). Trois études d'identification massive de substrats de kinases par spectrométrie de masse ont également permis de déterminer que les résidus S20 et T857 étaient phosphorylés. Ces études ne spécifiaient pas quelles isoformes d'OGT étaient modifiées, mais la sérine 20 n'est présente que sur ncOGT, tandis que la tyrosine 857 est présente chez les trois isoformes. Le site d'autoglycosylation d'OGT demeure inconnu, mais le résidu T857 pourrait représenter un site potentiel puisque c'est la seule sérine ou thréonine phosphorylée située dans le site catalytique (Dephoure et al. 2008; Olsen et al. 2010; Hsu et al. 2011). L'enzyme de déglycosylation OGA possède également plusieurs isoformes, lesquelles seront décrites dans la section suivante.

1.3.3 L'enzyme O-N-acetylglucosaminidase

L'enzyme β -N-acetylglucosaminidase (OGA) catalyse le retrait du monosaccharide O-GlcNAc. Elle a été purifiée et caractérisée en 1994 à partir du cytosol d'hépatocytes de rat (Dong & Hart 1994). Elle aurait été retrouvée chez tous les eucaryotes, mais serait cependant absente du protéome des procaryotes et des levures (Gao et al. 2001). Tout comme pour la transférase, l'OGA se retrouve tant au niveau du cytoplasme que du noyau et elle a été détectée dans tous les tissus analysés. Des analyses par PCR ont révélées que le gène OGA était davantage exprimé dans le cerveau, suivi du placenta. Il serait plus faiblement exprimé dans les poumons et le foie (Gao et al. 2001). Les premières études sur l'enzyme ont permis de démontrer qu'elle possédait une activité fortement plus élevée que les autres hexosaminidases pour le retrait des monosaccharides O-GlcNAc et n'était notamment pas impliquée dans l'O-galactosaminylation (O-GalNAcylation), puisque son activité n'est pas inhibée par la présence de galactosamine dans le milieu (Dong & Hart 1994). Le pH optimal de l'enzyme se situe entre 5,7 et 7,0 (Gao et al. 2001).

Le gène MGEA5 (Meningioma expressed antigen 5) code pour l'enzyme et est localisé sur le locus 10q24. Des polymorphismes d'un seul nucléotide dans cette région se sont révélés être associés avec le diabète de type 2 et la maladie d'Alzheimer

(Heckel et al. 1998; Lehman et al. 2005). L'isoforme OGA de taille complète traduite à partir de MGEA5 est composé de 916 acides aminés et possède un poids moléculaire de 130 kDa. Cette isoforme longue ($_{L}OGA$) est caractérisée par la présence d'un domaine histone acétyltransférase (HAT) en C-terminal (Toleman et al. 2004; Kim et al. 2006). L'implication de la présence de domaine d'interaction aux histones des enzymes OGT et $_{L}OGA$ sera décrite dans la section 1.3.5.

$_{L}OGA$ possède également un site de clivage par la protéase cystéine-dépendante spécifique à l'aspartate de type 3 (caspase-3) lors de la mort cellulaire par apoptose. L'enzyme serait clivée en aval du résidu Asp-413, libérant un fragment en N-terminal conservant le domaine catalytique O-GlcNAcase un fragment en C-terminal contenant le domaine HAT (Butkinaree et al. 2008). Il a également été démontré *in vivo* que $_{L}OGA$ conserve son activité suite à son clivage par les caspases. Le domaine N-terminal est inactif lorsqu'exprimé seul, mais conserve son activité lorsque co-exprimé avec la portion C-terminal. Il est possible que les deux parties d'OGA demeurent associée ou se réassocie suite au clivage. D'autres études seront nécessaires afin de comprendre quelles fonctions de $_{L}OGA$ sont régulées lors de l'apoptose (Butkinaree et al. 2008).

Il existe également une isoforme de 677 acides aminés d'OGA ($_{S}OGA$), auquel manque environ un tiers des acides aminés de l'isoforme longue en N-Terminal et qui possède un poids moléculaire de 75 kDa. Cette isoforme a d'abord été localisée spécifiquement à l'intérieur du noyau de glioblastomes humains (Comtesse et al. 2001). Récemment, il a été déterminé que $_{S}OGA$ s'accumulait également avec la périlipine-2 à la surface des gouttelettes lipidiques (GL) en formation (Keembiyehetty et al. 2011). Les GL sont des organelles cytosoliques de stockage ayant d'abord été considérés en tant qu'agrégats lipidiques inertes et statiques. Il est maintenant connu que leur fonctionnement est dynamique et qu'elles sont impliquées dans divers processus. Elles contiennent un centre hydrophobe constitué de lipides non-chargés, tels les triglycérides. Cette région est entourée d'une membrane comprenant une seule couche de phospholipides orientés de façon à exposer leurs têtes polaires vers l'extérieur de la vésicule (Digel et al. 2010). Les protéines de la famille périlipine sont insérées entre les phospholipides et forment environ quinze pourcent de la surface des GL (Londos et al. 1999). Ils forment des lieux de dépôts lipidiques qui pourront par la suite être mobilisé pour générer de l'énergie par β -oxydation. Ils sont également impliqués dans le transport

des lipides membranaires (Digel et al. 2010). Les GL peuvent également servir de vésicules de stockage et de transport pour certaines protéines (Welte 2007). Parmi la douzaine de ces protéines découvertes à ce jour, les histones H2A, H2Av et H2B ont été retrouvées dans les GL d'embryons de drosophiles (Cermelli et al. 2006). Ce phénomène disparaîtrait lors des étapes ultérieures de développement de l'organisme. Il a été avancé que les GL pourraient servir de lieu de stockage aux protéines auxquels manquent leurs partenaires de liaison intracellulaires habituels. Les vésicules lipidiques pourraient ainsi permettre une stratégie de traitement des protéines en excès. Cette théorie est appuyée par le fait qu'une diminution de l'expression des protéines Périlipine-2 et α OGA provoquerait une inhibition globale du protéasome entraînant une accumulation des protéines ubiquitylées (Keembiyehetty et al. 2011). Ces données laissent présumer un lien entre α OGA et la régulation de la dégradation protéasomale. Malheureusement, les formes cristallisées de β OGA et de α OGA n'ont pas encore été déterminées, lesquels permettront de mieux élucider le fonctionnement de ces enzymes. Malgré ce manque relatif d'informations concernant les enzymes OGT et OGA, diverses méthodes de détection des protéines O-GlcNAcylées ont été développées, lesquelles seront décrites dans la section suivante.

1.3.4 Méthodes de détection des protéines O-GlcNAcylées

Une excellente revue des principales méthodes de détection et d'analyse de ce type de modification post-traductionnelle a été publiée en 2011 (Zachara et al, 2011). On y traite tout d'abord des différentes techniques permettant d'augmenter l'O-GlcNAcylation en inhibant l'enzyme OGA. Ces méthodes permettent d'augmenter les chances de détection en augmentant la quantité globale de protéines modifiées. De plus, elles permettent d'éviter le retrait de la modification par l'enzyme lors de la purification et de l'analyse.

En 1998, Haltiwanger et collaborateurs publiaient le premier article étudiant l'effet de l'inhibition de cette enzyme. Ils avaient utilisé le composé O-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene) amino-N-phenylcarbamate (PUGNAc), dont l'efficacité à inhiber OGA avait été caractérisée en 1991 (Horsch et al. 1991). Le PUGNAc permet de doubler le taux d'O-Glycosylation à des doses non-cytotoxiques. Il n'a pas d'effet sur l'activité d'OGT et le niveau d'UDP-GlcNAc, ce qui confirme l'inhibition direct d'OGA avec le

PUGNAc (Haltiwanger et al. 1998). Cet effet a été confirmé chez les lignées de cancer du côlon HT29, chez les cellules rénales du singe vert CV-1 et chez les embryons de souris NIH 3T3. Cependant, l'efficacité du PUGNAc s'est révélée très faible chez les cellules épithéliales humaines HeLa et il a été démontré qu'il pouvait inhiber faiblement d'autres types d'hexosaminidases (Haltiwanger et al. 1998; Macauley et al. 2005). Malgré ces défauts, le PUGNAc demeure l'un des inhibiteurs les plus efficaces pour augmenter le niveau d'O-GlcNAcylation à des doses non-cytotoxiques. Il est cependant nécessaire d'éliminer le biais provenant des autres hexosaminidases en comparant les résultats à des témoins adéquats.

Le streptozotocin (STZ) est un autre inhibiteur pharmacologique d'OGA ayant été utilisé avec succès pour augmenter le niveau d'O-GlcNAc (Kawauchi et al. 2009; Lim & Chang 2010). Il a été démontré que le STZ pouvait lier le site actif d'OGA et être transformé en un composé intermédiaire thermodynamiquement stable et capable de bloquer la liaison de l'enzyme aux résidus O-GlcNAc (Toleman et al. 2006). Le STZ appartient à la famille des 2-deoxyglucopyranose et peut être absorbé par la cellule via le transporteur GLUT2. Il n'est donc pas efficace chez les cellules dépourvues de ce transporteur. Il a été démontré que le STZ avait une forte toxicité chez les lymphocytes B pancréatique, un phénomène résultant possiblement de la forte expression d'OGT et de GLUT2 chez ces cellules (Liu et al. 2000). Cet effet pourrait ne pas être uniquement causé par une hausse de l'O-glycosylation, puisque d'autres études ont révélées que le STZ pouvait également être causé par une augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) pouvant entraîner des dommages à l'ADN (Turk et al. 1993; Kaneto et al. 1995). Le STZ peut donc être utilisé pour l'identification de protéines ayant subies la modification, mais n'est pas recommandé pour des études de fonctions cellulaires.

Le Thiamet-G est un inhibiteur d'OGA ayant été caractérisé en 2008 (Yuzwa et al. 2008). Il a été utilisé avec succès *in vivo* afin d'inhiber la déglycosylation de la protéine Tau et ainsi bloquer sa phosphorylation. Il a également été utilisé *in vitro* chez les cellules mésangiales glomérulaires afin de démontrer que l'O-GlcNAcylation d'AKT régulaait l'activation des protéines de la voie de la MAPK p38 (Goldberg et al. 2011). À ce jour, l'inhibiteur n'est pas reconnu pour avoir des effets non-spécifiques à l'inhibition de l'enzyme OGA. Cependant, seulement deux études citant son utilisation ont été publiées à ce jour selon nos connaissances et aucune d'elle ne démontrait la non-toxicité de l'inhibiteur par les tests courants.

Les GlcNAcstatins sont une famille d'inhibiteurs d'OGA dont le potentiel semble prometteur. Il s'agit de dérivés du PUGNAc ayant été synthétisé afin de lier spécifiquement le site actif de l'enzyme et éviter la liaison aux autres hexosaminidases. Leur efficacité s'est révélée être cent-mille fois supérieure pour OGA que pour les HexA/B, les hexosaminidases les plus similaires structurellement et pouvant être inhibée par le PUGNAc (Dorfmueller et al. 2006). Tout comme le PUGNAc, il se sont révélés efficaces à l'échelle du picomolaire pour augmenter la O-GlcNAcylation protéique chez les neuroblastomes SH-SY5Y, chez les cellules humaines embryonnaires HEK293, chez les cellules épithéliales HeLa, chez les fibrosarcomes HT-1080, de même que chez les ostéoblastes U-2 OS (Dorfmueller et al. 2006; Dorfmueller et al. 2009). D'autres analogues du PUGNAc ont été synthétisés dans le but de réduire son affinité pour HexA/B. Cependant, ceux-ci se sont révélés être moins efficace que le PUGNAc et les GlcNAcstatins pour inhiber OGA (Macauley & Vocadlo 2009).

En plus de ces inhibiteurs pharmacologiques d'OGA, il est également possible d'augmenter stoechiométriquement l'O-glycosylation protéique en augmentant l'approvisionnement de la voie de biosynthèse des hexosamines (voir figure 4). La méthode la plus efficace est d'ajouter de la glucosamine au milieu de culture, laquelle sera modifié en UDP-acetylglucosamine : le substrat de l'enzyme OGT. Certaines études ont également utilisées le glucose, puisqu'environ cinq pourcent de ce sucre est transféré dans la voie de biosynthèse des hexosamines lors de son métabolisme (Zachara et al. 2011). La glutamine peut également être utilisé, puisque son groupement amine (-NH₂) peut être transféré par l'enzyme fructose-6-phosphate amidotransférase (GFAT) au fructose-6-phosphate pour former la glucosamine-6-phosphate (Zachara et al. 2011).

Des inhibiteurs de l'enzyme OGT sont également disponibles, mais les informations disponibles à ce jour ne sont pas suffisantes pour attester de leur efficacité *in vivo* (Gross et al, 2005). L'inhibiteur TT04 a cependant eu des effets concluant pour inhiber OGT chez les cardiomyocytes de souris néonatales (Ngoh et al. 2008). Des petits ARN interférents (siARN) inhibant la traduction du gène OGT sont également disponibles commercialement et ont été utilisés avec succès dans diverses études (Hamiel et al. 2007; Robinson et al. 2007; Daou et al. 2011).

Des anticorps spécifiques à la modification O-GlcNAc ont été développés, dont plusieurs sont disponibles sur le commerce. Le plus utilisé est le CTD110.6, un anticorps

murin d'isotype IgM (Comer et al. 2001). Cet anticorps était fortement recommandé lors de la dernière décennie en raison de sa forte spécificité pour l'O-GlcNAcylation. Cependant, un article récent a révélé que le CTD110.6 pouvait également détecter les protéines ayant subies l'ajout de monosaccharides N-GlcNAc(2) (Isono 2011). Il est donc nécessaire de s'assurer de la spécificité de la méthode de détection en incorporant des témoins positifs ou négatifs lors de l'expérimentation. Par exemple, une bande détectée faiblement à l'aide du CTD110.6 dans un lysat cellulaire non traitée, mais apparaissant fortement dans le lysat de cellule traitée avec de la glucosamine sera jugé comme correspondant spécifiquement à une protéine O-GlcNAcyliées. De la même façon, une bande disparaissant chez des cellules traitée à l'aide de siARN ciblant OGT correspondra également à une protéine modifiée par O-GlcNAc (Zachara et al. 2011).

L'agglutinine du germe de blé (WGA) est une lectine pouvant lier différents types de cellules animales (Aub et al. 1963). Cette agglutination est inhibée par la présence de N-GlcNAc et d'oligomères de protéines beta(1-4). Il a été démontré que la lectine pouvait lier les protéines O-GlcNAcyliées, de même que celles conjuguées à l'acide sialique (Monsigny et al. 1980). La succinylation de la lectine (sWGA) réduit son affinité pour les sialoglycoconjugués et augmente fortement sa spécificité pour les résidus GlcNAc (Zachara et al. 2011). La lectine sWGA a été utilisée avec succès afin d'immunoprécipiter les protéines O-GlcNAcyliées, de même que pour les détecter par immunoblot. Cependant, la succinylation de la lectine réduit son affinité pour les résidus O-GlcNAc. Il est recommandé d'utiliser la WGA pour l'immunoprécipitation et la sWGA pour la détection afin d'éviter qu'une partie des protéines O-GlcNAcyliées soient perdues lors de la purification (Zachara et al. 2011).

Il est également possible de détecter les protéines O-GlcNAcyliées par marquage radioactif. L'enzyme Beta-1,4-galactosyltransférase est utilisée afin de lier un monosaccharide Galactose (Gal) aux résidus GlcNAc terminaux. Du [6-3H]Gal radioactif est ajouté au milieu pour mener au marquage [3 H]-BetaGal1-4BetaGlcNAc. Les protéines marquées peuvent ensuite être détecté par migration sur gel SDS-PAGE, transfert sur membrane et exposition au rayon X sur film (Roquemore et al. 1992). Cette technique a également été conjuguée à la spectrométrie de masse en tandem afin d'identifier les sites d'O-glycosylation de diverses protéines (Greis et al. 1996). Suite au marquage, les protéines [3H]-galactosylées sont séparées du UDP-[3H] non-incorporée par chromatographie sur colonne Sephadex G-50. Les protéines N-glycosylées sont par

la suite clivées par l'enzyme PNGase F, puis les protéines O-glycosylées sont isolées par beta-élimination. Ces dernières sont par la suite séparées par chromatographie d'exclusion sur colonne Bio-Gel P4. Afin d'identifier les sites de modifications, les fractions radioactives sont par la suite soumises à une digestion enzymatique suivie d'une analyse par chromatographie. Cette étape pose certaines difficultés, puisque la modification O-GlcNAc est hautement instable et est perdue dans la plupart des procédures de spectrométrie de masse classiques (Zachara et al. 2011). Les techniques spectrométriques de dissociation par capture d'électrons (ECD) et de dissociation par transfert d'électrons (ETD) sont recommandées en raison de la meilleure stabilité du lien O-glycosidique dans ces conditions (Wang et al. 2007).

Des hexosaminidases pouvant retirer les résidus O-GlcNAc, comme la Beta-D-N-Acetylhexosaminidase (V-Labs), sont disponibles commercialement. Elles peuvent être utilisées comme témoins négatifs afin de s'assurer de la spécificité de la méthode de détection utilisée. Il faut cependant noter que ces hexosaminidases peuvent également retirer la modification O-N-acetylgalactosamine, de même que les résidus O-GlcNAc retrouvés à l'extrémité des chaînes oligosacchariques issues de la N-glycosylation. Ces hexosaminidases doivent donc être utilisées comme témoin négatif en combinaisons avec des techniques ne présentant pas les mêmes problèmes de spécificité. Par exemple, un lysat cellulaire peut être divisé en deux et être mis en présence ou non de la Beta-D-N-Acetylhexosaminidase. Les protéines O-GlcNAcylées peuvent ensuite être immunoprécipitées avec la lectine sWGA, pour ensuite être identifiées par immunoblot avec l'anticorps CTD110.6. Les bandes disparaissant dans la fraction traitée aux hexosaminidases correspondront aux protéines modifiées par O-GlcNAc, les autres seront jugées non-spécifiques.

Les méthodes de détection des protéines O-GlcNAcylées décrites ci-dessus ont permis de caractériser leur importance lors de divers mécanismes intracellulaires, de même que dans l'induction de certaines pathologies. Ces sujets seront abordés dans les prochaines sections.

1.3.5 Régulation de la localisation cellulaire et de l'activité de facteurs de transcription

L'ajout d'O-GlcNAc est impliqué dans la régulation de plusieurs facteurs de transcriptions dont NF- κ B, SP1, Pax6, p53, STAT5a, FOXO4 et la lectoferrine (Lefebvre et al. 2002; Nanashima et al. 2005; Yang et al. 2008; Housley et al. 2009; Hardiville et al. 2010). Ce phénomène s'explique d'abord par le fait que les enzymes OGT et α -OGA peuvent être localisés dans des complexes de régulation liés aux histones, tel que mentionné dans les sections 1.3.1 et 1.3.2.

Au niveau des histones, les HAT et HDAC agissent compétitivement à l'intérieur de vastes complexes multiprotéiques permettant l'activation ou la suppression de l'expression de la transcription de certains gènes (Toleman et al. 2004). OGT possède un site de liaison au corépresseur mSin3A, lequel peut recruter certaines HDAC. Il a également été démontré *in vitro* que α -OGA pouvait désacétyler directement certaines histones libres ou nucléosomales via son propre domaine HAT. Ainsi, les enzymes OGT et OGA (NCOAT) sont toutes deux impliqués dans des complexes régulateurs des histones. La littérature à ce sujet n'est pas fortement étendue jusqu'à présent, mais permet de présumer que l'O-glycosylation joue un rôle déterminant au niveau de l'expression génique. La localisation cellulaire de certains facteurs de transcription est régulée par O-GlcNAc. C'est le cas de SP1, dont l'O-GlcNAcylation favorise la translocation vers le noyau, mais qui doit être déglycosylé et phosphorylé pour se lier à l'ADN correctement et être activé (Dauphinee et al. 2005; Lim & Chang 2010). La portion p65 du facteur de transcription NF- κ B pourrait être soumise à la même forme de régulation. Il a été déterminé qu'une augmentation de l'O-GlcNAcylation de p65 en condition hyperglycémique diminuait son interaction avec l'inhibiteur $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ en plus de favoriser sa localisation cellulaire (Yang et al. 2008). Cependant, il a été déterminé *in vivo* que l'O-GlcNAcylation de la sérine 536 de p65 inhibait la liaison de NF- κ B à l'ADN et que la phosphorylation du même résidu activait le facteur de transcription (Xing et al. 2011). D'autres facteurs se sont révélés être O-GlcNAcylés tels la lactoferrine, STAT5a, FOXO4 et Pax6 (Lefebvre et al. 2002; Nanashima et al. 2005; Housley et al. 2009; Hardiville et al. 2010).

L'effet Ying/Yang entre la phosphorylation et l'O-glycosylation représente donc un mécanisme répandu de régulation des facteurs de transcription. La localisation

nucléocytoplasmique des kinases, phosphatases, OGT et OGA permettent l'établissement d'une chaîne d'événements lors desquels le groupement phosphate d'une protéine est retiré par une phosphatase au niveau du cytoplasme, pour être remplacé par un monosaccharide O-GlcNAc par l'enzyme ncOGT. Le facteur de transcription transloquera ensuite au noyau ou elle sera déglycosylé par le complexe NCOAT-mSin3A-HDAC, puis activé par une kinase (Toleman et al. 2004; Özcan et al. 2010).

1.3.6 Pathologies liées à l'O-GlcNAcylation

Les premiers travaux publiés sur l'O-GlcNAcylation portaient sur leur impact en lien avec le diabète de type II. Il a été démontré par Marshall et collaborateurs que l'inhibition de la voie de biosynthèse des hexosamines, à l'aide d'analogues de la glutamine (tel le 6-diazo-5-oxonorleucine ou DON), empêchait le développement de la résistance à l'insuline en milieu hyperglycémique (Marshall et al. 1991). Ceci confirmait que cette voie menant à l'O-glycosylation des protéines était impliquée dans le développement du phénomène de résistance à l'insuline à l'origine de la maladie. De plus, il a été démontré chez le rat que la glucosamine inhibait la translocation du transporteur GLUT 4 suite à la liaison de l'insuline à son récepteur. Cela entraînerait une résistance à l'insuline menant à une accumulation du glucose dans le sang (Baron et al. 1995; Rossetti et al. 1995). Il a été démontré que ce phénomène serait en partie dû à une augmentation de la O-glycosylation, puisque la présence de glucosamine mène à la formation d'UDP-GlcNAc. L'O-GlcNAcylation de la protéine Akt inhiberait sa phosphorylation par compétition sur le résidu Thr-308 (Vosseller et al. 2002). L'inactivation d'Akt empêcherait la phosphorylation de l'une de ses cibles, la protéine AS160, dont l'activation serait nécessaire à la translocation du récepteur GLUT 4 (Karlsson et al. 2005). Il a également été démontré qu'un polymorphisme d'un seul nucléotide (SNP) au sein du gène MGEA5 codant pour l'enzyme de déglycosylation OGA serait fortement associé avec l'induction du diabète de type II chez une population latino-américaine (Lehman et al. 2005). Ce SNP provoquerait la création d'un codon stop lors de la transcription du gène MGEA5, ce qui aurait pour effet de causer une augmentation de l'O-GlcNAcylation. En plus d'être impliqué dans l'étiologie du diabète, l'O-GlcNAcylation est associées à certaines maladies neurodégénératives.

La relation entre ces maladies et ce type de modifications post-traductionnelles a été décrite dans diverses revues lors des dernières années (Lazarus et al, 2010; Lefebvre et al, 2005; Rexach et al, 2008). Le gène codant pour l'enzyme OGT est localisée sur le chromosome X à la position XQ13.1. Une mutation à proximité de ce site serait responsable du syndrome de Dystonie-Parkinson (Haberhausen et al, 1995). L'enzyme OGA est situé sur le chromosome 10 au site 10.q.24.1, un locus lié à la maladie d'Alzheimer à début tardif (Bertram et al, 2000). L'enzyme OGT est fortement exprimée au niveau des neurones et plusieurs protéines impliquées dans l'étiologie de maladies neurodégénératives sont O-GlcNAcylées (Akimoto et al, 2003). C'est le cas de Tau, une protéine associée aux microtubules et nécessaires à la stabilité de ces derniers au niveau neuronal. Une hyperphosphorylation de Tau entraîne son agrégation en neurofibrilles. Ces derniers vont s'accumuler, provoquer une perte de fonction neuronale et entraîner la maladie d'Alzheimer. L'O-GlcNAcylation régule la phosphorylation de la protéine Tau par compétition sur les sites Ser-199, Thr-212, Thr-217, Ser-262, Ser-396 et Ser-422 (Liu et al, 2003).

Une hyperphosphorylation des protéines APP peut également entraîner l'agrégation de fibrilles amyloïdes et provoquer une toxicité neuronale à l'origine de la maladie d'Alzheimer. Tel que mentionné dans la section 1.2, une augmentation de l'O-GlcNAcylation d'APP peut inhiber la formation de fibrilles en bloquant certains sites de phosphorylation (Lazarus et al. 2009). De plus, l'absorption et le métabolisme du glucose est dérégulée à la baisse au niveau des neurones de patients atteints d'Alzheimer. Cette diminution de la glycolyse corrèle également avec une diminution globale de l'O-GlcNAcylation neuronale (Liu et al, 2003). Cette diminution de l'O-GlcNAc pourrait ainsi libérer les sérines et thréonines cibles des protéines Tau et APP et entraîner leur hyperphosphorylation.

1.3.7 O-GlcNAc, apoptose et cancer

De plus, l'ajout du monosaccharide O-GlcNAc est impliqué dans certains processus liés au cancer. Le métabolisme du glucose est anormalement élevé chez la majorité des types de cellules cancéreuses, en raison de la surexpression de ses transporteurs et d'enzymes glycolytiques. Ce phénomène est confirmé quotidiennement par l'utilisation de l'analogue fluorodeoxyglucose (FDG) pour la localisation de tumeurs

en tomographie par émission de positrons (TEP) (Cao et al. 2007; Almuhaideb et al. 2011). Ce métabolisme élevé du glucose peut avoir un impact sur l'efficacité des agents chimiothérapeutiques à induire l'apoptose des cellules tumorales. Notamment, une forte glycolyse entraîne une hausse de l'O-GlcNAcylation des protéines en activant la voie de biosynthèse des hexosamines. Tel que mentionné précédemment, il existe un mécanisme global de protection cellulaire face au stress impliquant une augmentation de l'O-GlcNAcylation (Zachara et al. 2004). Il a été démontré que ce processus permettait de protéger des lignées cellulaires cancéreuses faces à divers stress, ce qui laisse présumer que le niveau d'O-GlcNAc pourrait être un facteur clef dans l'efficacité chimiothérapeutique. Celles-ci visent à déclencher la mort des cellules cancéreuses par un processus nommé apoptose. Plusieurs protéines clefs impliquées dans les différentes voies de signalisation pro- et anti-apoptotiques se sont révélés être O-GlcNAcylées tels NF- κ B, Akt, p53 et p38. L'apoptose et son lien avec l'ajout post-traductionnel du monosaccharide O-GlcNAc seront décrits dans la section 2.

CHAPITRE 2

LA MORT CELLULAIRE PAR APOPTOSE

2.1 Introduction

Notre organisme est en constante régénération, puisque plus de dix milliards de nos cellules sont remplacés chaque jour par mitose (Sinha et Bhattacharaya, 2006). Les cellules sont éliminées parce qu'elles sont sénescents et défectueuses, parce qu'elles sont en surplus et ne sont plus nécessaires à la fonction du tissu ou parce qu'elles sont endommagées. Il existe deux formes de mort cellulaire : l'apoptose et la nécrose. La nécrose survient lorsqu'une cellule est soumise à une source intolérable de stress externe. S'ensuit une dégénérescence généralisée caractérisée par un gonflement cellulaire, une lyse du noyau, une destruction des membranes cytoplasmiques et nucléaires, puis une désintégration des organelles (Hughes et Mehmet, 2003). Contrairement à la nécrose, l'apoptose est un processus dynamique nécessitant la transcription et la traduction de gènes spécifiques, de même que l'activation de voies de signalisations cellulaires spécifiques (Hughes et Mehmet, 2003).

Chez les grecs, le terme apoptose désignait la chute des feuilles : *pro* signifiant provenant et *ptose* référant à l'action de tomber (Cohen, 2000). La mort cellulaire est un phénomène connue depuis le 19^{ème} siècle, bien que la majorité des connaissances sur le sujet proviennent d'études réalisées dans les dernières décennies. Ce phénomène a d'abord été observé par l'allemand Carl Vogt en 1842, lorsqu'il nota la présence de cellules aux formes irrégulières dans les zones de différenciation des nageoires d'amphibiens. La mort cellulaire programmée représente également le mécanisme principale d'élimination des tissus non-nécessaires lors du développement embryonnaire, par exemple l'élimination de la peau entre les doigts (Rodés, 2007). L'apoptose est caractérisée par une diminution du volume cellulaire, par une acidification du liquide intracellulaire, par la formation de corps apoptotiques, par la fragmentation de l'ADN en fragments de haut poids moléculaire. Dès les premières étapes de l'apoptose, il y a une perte de l'asymétrie au niveau de la membrane cytoplasmique entraînant une exposition des phosphatidylsérines à la surface de la cellule. D'autres molécules étant normalement confiné à l'espace interne, telles l'annexine et la calréticuline, sont exposées lors de ces perturbations. Des motifs

spécifiques peuvent alors être reconnus par certaines cellules phagocytaires, tels les macrophages, entraînant l'ingestion et la dégradation des corps apoptotiques. Ce processus fait en sorte que l'élimination des cellules apoptotiques provoque peu d'inflammation par rapport à la mort par nécrose (Erwig & Henson 2007).

Les cellules réagissent à divers signaux internes ou à des stimuli externes par l'enclenchement de la machinerie apoptotique. Les rayons UV, les composés chimiques toxiques, les virus et les ligands des récepteurs de morts sont des exemples de stimuli pouvant entraîner l'apoptose d'une cellule. Le programme de mort programmée est caractérisé par l'activation de cascades protéolytiques via les trois voies d'apoptose. La voie intrinsèque, ou de la mitochondrie, est enclenchée lorsqu'un stress mitochondrial provoque une dépolarisation de la membrane de cette organelle. La voie des récepteurs de morts est enclenchée lorsque ces derniers sont liés par leurs ligands pro-apoptotiques. Finalement, l'apoptose a lieu via la voie du réticulum endoplasmique lorsque des protéines mal repliées s'amassent dans cette organelle ou que survient une déplétion de son calcium interne. Les mécanismes caractérisant ces trois voies seront décrites plus en détails dans les prochaines sections. Il est cependant important de ne pas voir ces dernières comme étant isolées les unes des autres. Un même agent toxique peut bien entendu induire l'apoptose via les trois voies susmentionnées, de même que celles-ci peuvent se réguler entre-elles.

2.2 Voie intrinsèque

2.2.1 Initiation et décision

La voie de la mitochondrie est aussi appelée voie classique puisqu'elle fut la première à être caractérisée et qu'elle demeure à ce jour la mieux caractérisée. Cette organelle a été observée pour la première fois en 1850 à l'intérieur de muscles striés d'insectes, par Kolliker qui les nomma sarcosomes. Elles furent par la suite nommées bioplastes par Altmann en 1890, avant de se faire baptiser mitochondries (mitos = filament, chondrion = granule) sept ans plus tard par Benda (Cohen, 2000; Sinha, 2004). Ses trois principales fonctions sont de générer l'énergie nécessaire à la cellule sous forme d'ATP, de produire des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de réguler

l'apoptose (Cohen, 2000). La mort cellulaire programmée se déroule en trois étapes. Il y a d'abord l'étape d'*initiation*, lors de laquelle la cellule reçoit certains signaux pro-apoptotiques. Dans la voie intrinsèque, ces signaux proviennent de la cellule même et convergent vers la mitochondrie. Il peut s'agir notamment de dommages à l'ADN provoquée par une irradiation, d'un choc thermique, d'hypoxie, de la présence de toxines chimiques ou d'une perte de contact avec la matrice extracellulaire (Los & Gibson, 2005). Vient ensuite l'étape de *décision*, au cours de laquelle interviennent différents facteurs de régulation pro-apoptotiques et anti-apoptotiques.

Les protéines de la famille Bcl-2 contrôlent principalement le sort de la cellule à ce niveau. Ces protéines partagent certains domaines d'homologie Bcl-2 (BH) qui les caractérisent (voir figure 9). Les protéines pro-apoptotiques BAX et BAK, de même que les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-X_L et MCL-1 possèdent plusieurs domaines BH. Les protéines pro-apoptotiques BAD, BID, BIM et PUMA n'ont que le domaine BH3 (BH3-only) en communs entre eux et avec les autres membres de la famille Bcl-2 (Hetz, 2010).

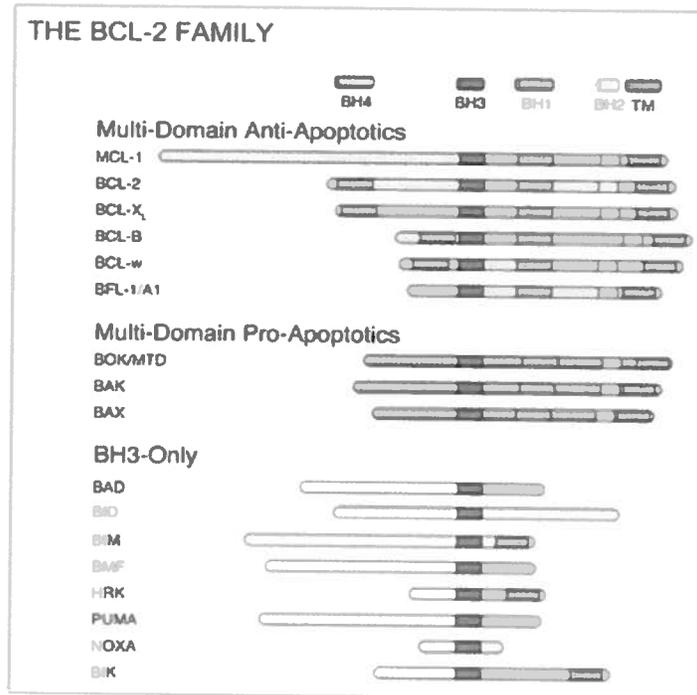


Figure 9 : Membres de la famille Bcl-2 regroupés selon leurs fonctions physiologiques et leurs domaines d'homologie (Hetz, 2010).

Ces protéines contrôlent l'ouverture du canal VDAC. VDAC1 (Voltage-dépendant anion channel 1) est une protéine se retrouvant très abondamment dans la membrane externe des mitochondries où elle forme des pores. Il agit comme canal ionique permettant notamment le passage du Ca^{2+} (Gincel et al, 2001). De plus, les VDAC1 situés aux points de contact entre la membrane externe et interne mitochondriale forment des complexes impliquant certaines protéines dont le transporteur des adénines-nucléotides (ANT) et la cyclophiline D. Ces complexes sont nommés pores de transition de perméabilité (PTP) et permettent le transport des molécules entre le cytoplasme et la matrice mitochondriale. La formation de ROS, de même qu'une hausse de la concentration en calcium mitochondrial serait en mesure de provoquer l'ouverture du PTP (Shimada et al. 2009). Cela entraînerait une perméabilisation de la membrane mitochondriale menant à la sortie du cytochrome C à travers VDAC. La famille de protéines bcl-2 régulerait ce dernier phénomène, puisque Bcl-XL entraînerait la fermeture de VDAC en s'y fixant. Bax et Bak modulerait un changement de conformation du pore qui augmenterait sa taille et permettrait la sortie du cytochrome C (Roy et al, 1999). Les protéines BH3-only nécessitent la présence de Bax et Bak pour assurer leur fonction pro-apoptotiques. Elles peuvent activer celles-ci selon un mécanisme direct ou indirect. Dans le premier cas, des protéines telles Bim, Bid et Puma activent Bax et Bak en s'y liant directement. Dans le second cas, des protéines BH3-only lient les protéines Bcl-2 anti-apoptotiques et les inactivent (Azmi et al. 2011). Lorsque les facteurs pro-apoptotiques sont plus importants, l'étape de *dégradation* de l'apoptose est enclenchée. Le canal VDAC est ouvert, ce qui entraîne une perméabilisation de la membrane mitochondriale.

Par la suite, le cytochrome C est expulsé dans le cytosol, où il se combine à APAF-1 (apoptotic protease activating factor 1) et à du dATP ou de l'ATP pour former l'apoptosome (voir figure 10). APAF-1 contient un domaine N-terminal CARD de recrutement des caspases, un domaine de fixation aux nucléotides (Voet & Voet, 2005). L'apoptosome recrute les procaspases-9 grâce au domaine CARD d'APAF-1, puis facilite l'auto-activation par protéolyse de la caspase-9 (Cagnol et al. 2010). Le terme caspase est l'acronyme de protéase cystéine-dépendante spécifique à l'aspartate. Ces protéases contiennent un résidu cystéine au sein de leur site actif et elles clivent les régions contenant des résidus aspartates (Salvesen & Riedl 2007). La propagation du signal pro-apoptotique entraîne une cascade d'activation des caspases, au cours de

laquelle une cascade initiatrice préalablement activée forme un dimère et clive une caspase cible par clivage protéolytique. Une fois activée, la caspase-9 active les caspases effectrices 3 et 7. Ces dernières clivent ensuite leurs nombreux substrats pour mener à la mort cellulaire lors de l'étape finale de l'apoptose : la phase nucléaire (Voet & Voet 2005).

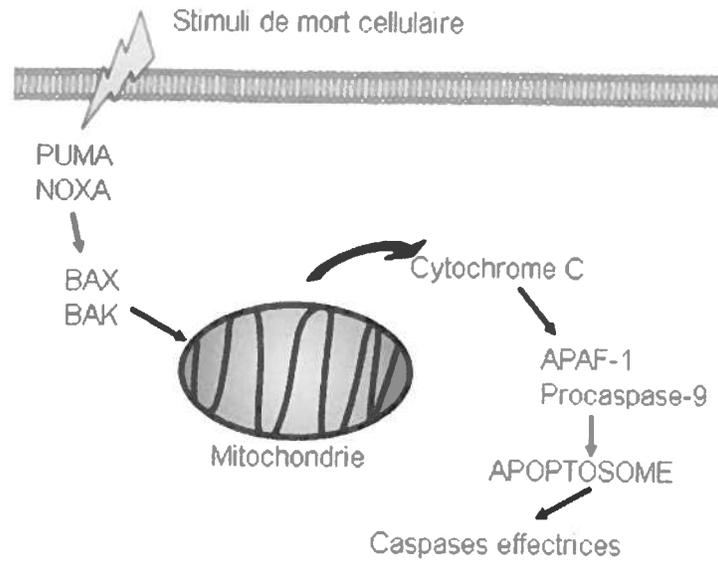


Figure 10 : Principales étapes de la voie intrinsèque (modifié de Vasquez-Nin et al, 2011).

2.2.2 Activation du complexe DFF et apoptose nucléaire

L'étape finale de la mort programmée est l'apoptose nucléaire, caractérisée par la condensation de la chromatine, l'activation d'endonucléases, le clivage de l'ADN et la formation de corps apoptotiques. Lors de l'apoptose, la membrane cytoplasmique se retourne et expose ses résidus phosphatidylsérines (PS) à sa surface. Les macrophages et les cellules dendritiques vont phagocyter les corps apoptotiques suite à leur reconnaissance des PS exposés (Voet & Voet 2005).

La fragmentation de l'ADN chromosomal s'effectue en plusieurs étapes débutant par un clivage précoce en fragments de cinquante à trois-cent kilobases, pour ensuite être réduit en fragments internucléosomals d'environ deux-cent paires de bases (Oberhammer et al. 1993; Nagata et al. 2003). Cette dernière étape est principalement réalisée par le facteur de fragmentation de l'ADN (DFF), lequel est également impliqué lors du clivage précoce (Liu et al. 1997; Widlak et al. 2000). Chez une cellule saine, le DFF est lié à l'ADN sous la forme d'un complexe hétérodimérique inactif composé de deux endonucléases de 40 kDa (DFF40/CAD) et de deux inhibiteurs de 45 kDa (DFF45/ICAD) (Lechardeur et al. 2005). Suite à leur activation lors de l'apoptose, les caspases effectrices 3 et 7 migrent vers le noyau et clivent le DFF45 à deux sites, ce qui libère le DFF40 de son inhibition. Ce dernier forme ensuite des oligomères d'environ 160 à 190 kDa, ce qui représente sa forme active (Lechardeur et al. 2005). L'endonucléase induit ensuite la fragmentation internucléosomale de l'ADN décrites ci-dessus (Liu et al. 1997)

Le site catalytique du DFF40 est situé entre les acides aminés 290 à 345, à l'intérieur du domaine C-terminal (Inohara et al. 1999). Les deux protéines du DFF possèdent un domaine N-terminal fortement conservé jouant un rôle dans la régulation de l'hétérodimérisation du complexe (Lechardeur et al. 2005). Ce domaine est situé entre les résidus 1 à 83 et est nommé CIDE-N (Zhou et al. 2001). Une séquence de localisation nucléaire (NLS) se retrouve au niveau de la région C-terminal des deux protéines, permettant leur reconnaissance par les importines α/β et leur translocation dans le noyau (Neimanis et al. 2007). L'épissage alternatif du gène DFF45 mène à la traduction de l'isoforme longue de 45 kDa DFF45 (345 a.a.) et à une isoforme de taille courte DFF35 (268 a.a) (Chen et al. 2000). Les protéines DFF45, Hsc70 et Hsp40 agissent en tant que molécules chaperonnes permettant le repliement adéquat du

DFF40 lors de sa synthèse. Le DFF35 peut inhiber le DFF40, mais ne peut assurer le rôle de chaperonne en raison de l'absence de son domaine C-terminal (Gu et al. 1999; Sakahira & Nagata 2002). L'épissage alternatif du gène du DFF40 mène à la traduction des protéines effectrices de l'apoptose semblables au DFF45 (CIDE-A/B/C). Celles-ci possèdent un domaine CIDE en N-terminal homologue à celui des protéines du DFF. CIDE-B peut lier le domaine CIDE-N du DFF45 et entraîner la libération du DFF40. CIDE-C serait également pro-apoptotique (Bayascas et al. 2004).

D'autres protéines peuvent stimuler l'activité du DFF40, dont HSP70 qui peut le lier et stabiliser sa structure (Liu et al. 2003). L'histone H1 et les protéines B-1/2 du groupe de haute mobilité (HMGB-1/-2) recrutent le DFF40 aux régions internucléosomales de l'ADN et augmentent la capacité de l'endonucléase à s'y lier (Liu et al. 1998; Widlak et al. 2005). L'expression de la topoisomérase II contribue également à l'activité du DFF40 en étant impliquée dans le clivage précoce de l'ADN (Widlak et al. 2000). La phosphorylation de l'histone H2AX est également nécessaire à la fragmentation de l'ADN par le DFF40 (Lu et al. 2006). L'environnement ionique de l'endonucléase joue un rôle dans la régulation de son activité. Chez les thymocytes, il a été démontré que l'absence de la tyrosine kinase membranaire CD45 entraînait une diminution de la phosphorylation des canaux calciques lors de l'apoptose, provoquant une diminution de la concentration en ions $[Ca^{2+}]$ intracellulaires pouvant inhiber l'activité du DFF40 (Dupéré-Minier et al. 2004). Elle nécessiterait la présence de Mg^{2+} et serait inhibé par les ions Zn^{2+} et Cu^{2+} . La charge ionique du milieu intracellulaire représente un mécanisme de régulation permettant d'empêcher l'activation indésirable de l'enzyme chez une cellule saine, puisque son activité est environ cent fois supérieure aux concentrations en ions $[K^+]$ retrouvés chez les cellules apoptotiques (50 à 125 mM) (Widlak & Garrard 2001). L'ADN simple brin et l'ARN compétitionnent avec l'ADN double brin et inhibent sa fragmentation par le DFF40. D'autres poly-anions tels l'acide polyglutamique et l'héparine l'inhibent également (Widlak & Garrard 2006).

Les modifications post-traductionnelles pouvant réguler l'activation du DFF ne sont pas bien connues. Dans sa thèse de 2009, Geneviève Dupéré-Minier a étudié l'impact de l'expression de la tyrosine kinase CD45 sur la phosphorylation des tyrosines et l'acétylation des protéines du DFF (Dupéré-Minier 2009). Ses travaux ont démontré que le DFF40 n'était acétylé que chez les thymocytes HPB45.0 (CD45-). Le DFF45 serait phosphorylé sur des résidus tyrosines chez les cellules HPB-ALL (CD45+)

seulement, mais serait acétylé dans les deux lignées. Ces différences pourraient jouer un rôle dans l'activation du complexe, puisque le DFF40 n'est pas actif lors de l'apoptose des cellules HPB45.0 CD45-, tel que démontré par l'absence de fragmentation de l'ADN chez ces cellules (Desharnais et al. 2008). De plus, ses travaux ont démontrés que l'oligomérisation du DFF40 était différent chez les deux lignées. L'endonucléase formerait exclusivement de larges complexes supérieurs à 150 kDa chez les cellules CD45-. En plus de ces oligomères, elle aurait la capacité de former des structures variant entre 75 et 150 kDa chez les cellules CD45+, celles-ci pouvant correspondre aux formes homodimériques et homotétramériques. L'auteure présumait que ces variations pourraient être provoquées par des différences post-traductionnelles citées en début de paragraphe. Elle n'a pas vérifié si les protéines du DFF étaient O-GlcNAcylées. Une étude d'identification de masse de protéines portant la modification O-GlcNAc a permis d'identifier le DFF45 parmi les substrats de l'enzyme OGT (Nandi et al. 2005). De plus, la protéine CIDE-A est O-GlcNAcylée, celle-ci présentant un domaine N-terminal homologue aux protéines du DFF. Sa déglycosylation inhiberait l'apoptose induite par le TGF- β 1 chez la lignée de cellules mammaires cancéreuses MCF-7 (Iwahana et al. 2006). Ces données révèlent que l'O-GlcNAcylation pourraient réguler l'activité du DFF et que des travaux pouvant vérifier cette hypothèse seraient requis. Un article à soumettre traitant de l'impact de l'O-GlcNAcylation des protéines du DFF lors de l'apoptose des lymphocytes T HPB-ALL est inclus dans la section deux du présent mémoire. D'autres voies que celle de la mitochondrie peuvent mener à l'activation du complexe DFF et à l'apoptose. La voie des récepteurs de mort sera décrite dans la section suivante.

2.3 Voie des récepteurs de mort

Les organismes complexes ont élaborés des mécanismes leur permettant l'élimination rapide et efficace des cellules indésirables par l'activation de voies apoptotiques activées par des ligands. Cette voie est également appelée *voie extrinsèque*, puisque les signaux qui l'activent proviennent de l'extérieur de la cellule. Les ligands sont reconnus par des récepteurs de morts (DR) présents à la surface des cellules, ce qui enclenche la cascade apoptotique. Les DRs appartiennent à la superfamille des récepteurs du facteur de nécrose tumoral (TNFR) et sont souvent classés en fonction de leur principal ligand (voir tableau 2) (Wilson et al. 2009). La

plupart de ces récepteurs sont impliqués dans d'autres fonctions, notamment au niveau de la prolifération, de la différenciation, de la régulation de la réponse immune et de l'expression génique (Lavin & Watters, 1999).

Récepteurs de mort	Ligands	Protéines adaptatrices
TNFR1	TNF, LT α	TRADD
CD95 (FAS)	CD95L, FASL	FADD
DR3	TL1A	TRADD
DR4	Apo2L/TRAIL	FADD
DR5	Apo2L/TRAIL	FADD
DR6	?	TRADD ?

Tableau 2: Récepteurs de morts, leurs principaux ligands et leurs protéines adaptatrices.

Les ligands les plus connus sont ceux du récepteur CD95 (CD95L/FasL), le TNF- α et le ligand inducteur d'apoptose apparenté au TNF (TRAIL). (Vasquez-Nin et al, 2011). Les récepteurs de mort sont constitués d'une région extracellulaire contenant des domaines riches en cystéines (CRD) nécessaires à leur liaison par des ligands spécifiques et une région intracellulaire contenant un domaine de mort (DD) (Los & Gobson, 2005). Suite à leur liaison, les DR recrutent des molécules adaptatrices contenant également un domaine DD, tels TRADD et FADD. Ces protéines contiennent également un domaine effecteur de mort (DED) permettant leur interaction avec les caspases initiatrices. Les voies apoptotiques enclenchées suite à la liaison du récepteur de mort par son ligand diffèrent en fonction de l'adaptateur recruté.

2.3.1 Voie FADD-dépendante

Les lymphocytes T cytotoxiques (CD8+) et les cellules NK (*natural killer*) expriment à leur surface les ligands pro-apoptotiques FASL et TRAIL. Ces cellules tueuses ont la capacité d'éliminer les cellules indésirables exprimant les récepteurs CD95, DR4 et DR5. Ces derniers peuvent lier directement l'adaptateur FADD, puisque leurs DD

respectifs sont compatibles. Les caspases-8 et -10 sont ensuite recrutées via le domaine DED de FADD, afin de former le complexe signalétique inducteur de mort (DISC) (Los & Gobson, 2005). Ce complexe peut ensuite activer les caspases-8 et -10 par autoprotolyse. Celles-ci activent les caspases effectrices -3-6-7 pour mener à la mort de la cellule lors de la phase ultime de l'apoptose, tel que vu dans la section 2.2 (Wilson et al. 2009). Cette voie est soumise à une étroite régulation par la protéine inhibitrice semblable à FLICE (c-FLIP). Comme les caspases initiatrices, celle-ci est constituée de deux domaines DED en tandem en N-terminal permettant sa liaison à FADD. Elle est également constituée d'une région fortement analogue au domaine catalytique des caspases, mais auquel manque un résidu cystéine important. Il existe des isoformes de c-FLIP issus de l'épissage alternatif de son gène. Les isoformes de petites tailles (c-FLIP_S et c-FLIP_R) inhibent l'apoptose en compétitionnant avec les caspases pour se lier à FADD. L'isoforme de grande taille c-FLIP_L peut inhiber le recrutement des caspases au DISC, lorsqu'il est présent en grande quantité (Wilson et al. 2009).

Chez certains types de cellules (type II), notamment les lymphocytes B, l'activation des caspases-8 et -10 n'est pas suffisante à l'induction de l'apoptose. Une amplification au niveau de la mitochondrie est requise pour compléter l'activation de la machinerie apoptotique. Pour se faire, la caspase-8 active la protéine Bid en sa forme active t-Bid (Kim et al. 2004). Celle-ci est un membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2, de la sous-catégorie BH3-only. Une fois tronqué, la partie N-terminale de Bid (t-Bid) est transloquée vers la mitochondrie, où elle induirait une réorganisation des crêtes mitochondriales, l'homo-oligomérisation de BAK, la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe et le relâchement du cytochrome C dans le cytoplasme. Il y aurait ensuite formation de l'apoptosome et amplification des événements pro-apoptotiques amorcés suite à l'activation des caspases-8 et -10, ce qui entraînera la destruction de la cellule (Scorrano et al. 2002).

2.3.2 Voie TRADD-dépendante

Suite à leur activation par leur ligands respectifs (voir tableau 2), les récepteurs TNFR1, DR3 et potentiellement DR6 forment des homotrimères pouvant lier l'adaptateur TRADD. La protéine interagissant aux récepteur-1 (RIP1) et le facteur associé au récepteur-2 (TRAF2) sont ensuite recrutées pour mener à la formation du complexe I

(voir figure 11). Ce dernier contrôle l'activation de deux voies de signalisation importante : celles du facteur nucléaire de transcription *kappa beta* (NF- κ B) et des kinases activées par un agent mitogène (MAPK) (Wilson et al. 2009).

Au sein du complexe I, les ligases TRAF2 et TRAF5 peuvent catalyser l'ajout d'une longue chaîne d'ubiquitine (polyubiquitination) à la protéine RIP1. Ce processus nécessiterait la présence de l'enzyme de conjugaison à l'ubiquitine Ubch13, de même que des protéines c-IAP1 et c-IAP2 (Wilson et al. 2009). Les protéines de la famille IAP sont des facteurs anti-apoptotiques pouvant réguler la voie TRADD-dépendante (Pineda et al. 2007; Varfolomeev et al. 2008). Une fois ubiquitinylé, RIP1 interagit avec un complexe formé des protéines adaptatrices TAB1 et TAB2 et de la kinase TAK1. Cette dernière va ensuite activer le complexe NEMO formé des kinases IKK α , IKK β et IKK γ (Pineda et al. 2007). Ces protéines phosphorylent ensuite l'inhibiteur I κ B, ce qui transmet un signal menant à sa polyubiquitination et à sa dégradation protéasomale (Wilson et al. 2009). Cela libère le facteur NF- κ B qui transloque du cytoplasme vers le noyau, où il induira la transcription de gènes menant à la traduction de cytokines proinflammatoires et de c-IAPs, créant ainsi une boucle de rétro-inhibition (Varfolomeev & Ashkenazi 2004).

Il a été démontré qu'une inhibition de la transcription génique des protéines c-IAP1 et c-IAP2, à l'aide de petits ARN interférents (siRNA), sensibilisait les cellules à l'apoptose induite par le ligand TNF α (Varfolomeev et al. 2008). Ce phénomène est dû au fait que le complexe 1 active également les voies apoptotiques de la kinase c-Jun N-terminal (JNK) et de p38 (Yuasa et al. 1998; Wilson et al. 2009). Au sein du complexe I, les protéines TRAF2 et RIP1 sont impliquées dans l'activation de la MAP3K régulatrice du signal apoptotique-1 (ASK1) via un mécanisme qui demeure majoritairement inconnu. Il a été suggéré qu'elles pourraient former un complexe avec la protéine interagissant avec ASK1 de type 1 (AIP1), pour mener à la phosphorylation d'AIP-1. Cette dernière activerait ensuite la phosphatase de type 2A (PP2A), qui retirerait ensuite le groupement phosphate du résidu Ser967 d'ASK1. La MAP3K pourrait ensuite s'auto-activer par phosphorylation de sa thréonine 845 (Min et al. 2008). Elle activerait ensuite les MAP2K MKK3, MKK4 et MKK6, lesquelles activeraient les MAPK JNK et p38 (Ichijo et al. 1997; Symons et al. 2006).

La famille de protéines p38 comprend quatre MAPK présentant au moins soixante pourcent d'homologie : p38 α , p38 γ , la kinase régulée par un signal de stress

extracellulaire (ERK) et p38 δ (Cuadrado & Nebreda 2010). Dans la voie de signalisation TNF-dépendante, MKK3 et MKK6 activent les différentes isoformes de p38, tandis que MKK4 active JNK1/2/3 (Roux & Blenis 2004). P38 et JNK activent ensuite certains facteurs de transcription afin de permettre à la cellule de répondre au stress extracellulaire à l'origine de l'activation du récepteur de mort. Parmi ceux-ci, p38 α peut activer le suppresseur de tumeur p53, dont les deux rôles clefs sont de bloquer le cycle cellulaire et/ou d'induire l'apoptose (Suzuki & Matsubara 2010). Il est d'ailleurs estimé qu'environ cinquante pourcent des cancers sont caractérisés par une inactivité de p53 (Soussi & Beroud 2001). Lorsque la cellule est soumise à un stress faible, p53 va activer la transcription de gènes permettant l'interruption du cycle cellulaire et l'enclenchement d'un programme de restauration des fonctions atteintes (synthèse d'antioxydants, réparation de l'ADN, etc.). En présence d'un stress important, p53 va induire la transcription de gènes et d'ARN interférents pro-apoptotiques. Il peut notamment se lier au promoteur de Bax et induire son expression (Suzuki & Matsubara 2010). Tel qu'indiqué dans la section 2.2, l'ouverture du pore mitochondrial PTP est contrôlé par les protéines de la famille Bcl-2. Une surexpression de Bax provoquera l'ouverture du pore et la sortie du cytochrome C dans le cytosol, ce qui mènera à l'induction de l'apoptose par la voie intrinsèque. Les voies FADD et TRADD dépendante d'induction de l'apoptose peuvent donc également activer la voie mitochondriale. Cela démontre qu'il est important de ne pas voir les trois types d'induction de l'apoptose en tant que voies de signalisation indépendantes, puisqu'elles peuvent coopérer et s'inter-réguler afin d'amplifier le signal apoptotique et assurer l'élimination de la cellule.

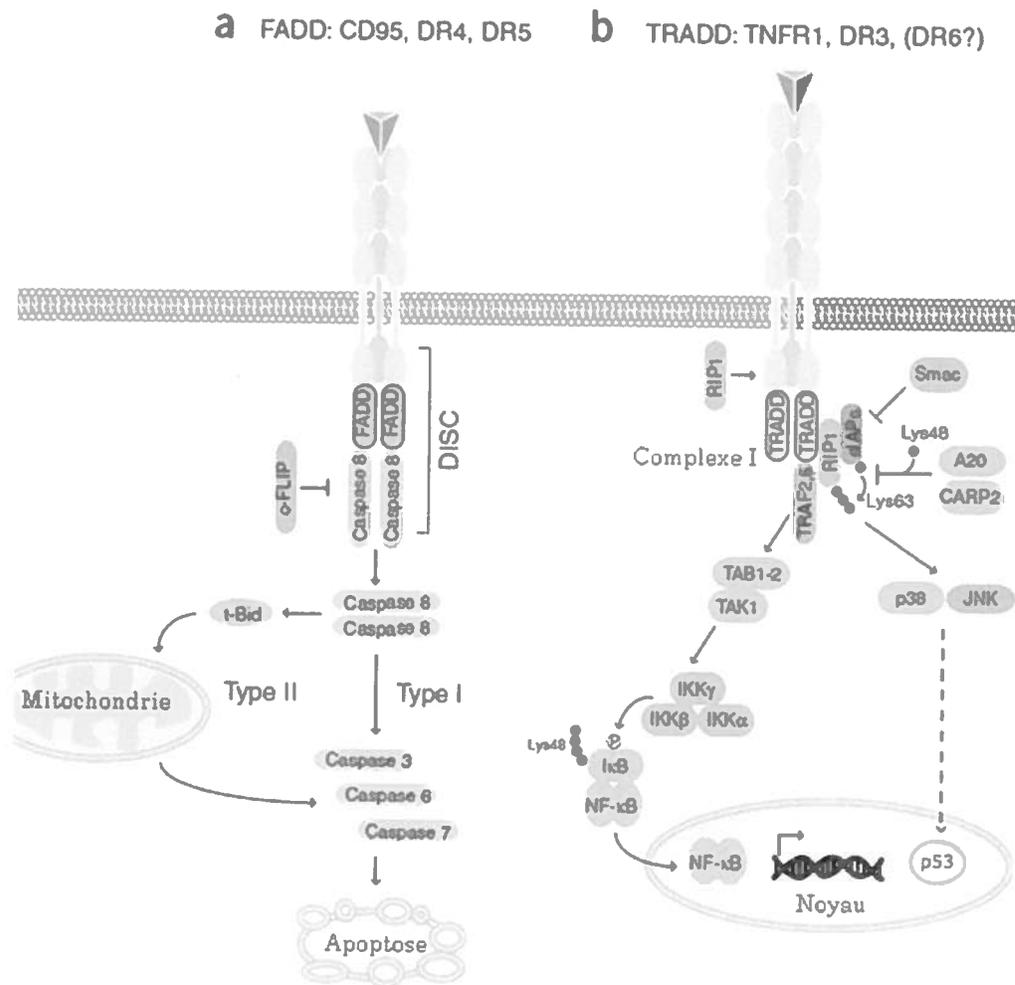


Figure 11 : Voies (a) FADD-dépendante et (b) TRADD-dépendante d'induction de l'apoptose suite à la liaison des récepteurs de mort par leurs ligands respectifs (Wilson et al. 2009).

2.4 Voie du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique régule la synthèse et le repliement des protéines de même que l'homéostasie du calcium intracellulaire. Une déplétion du calcium de cette organelle et l'accumulation de protéines mal repliées peut entraîner l'apoptose par la voie du réticulum endoplasmique (Yang et al. 2009). Des études ont révélées que le stress oxydatif pouvait provoquer une perte de l'homéostasie calcique et entraîner le mauvais repliement des protéines (Chinta et al, 2008; Mattson, 2006). L'organisme réagit à ce stress par l'activation de l'enzyme inositol-dépendante 1 (IRE1), de la kinase du réticulum similaire à PKR (PERK) et de l'activateur du facteur de transcription 6 (ATF6) (voir figure 12). Au repos, ces trois récepteurs membranaires du réticulum sont maintenus à l'état inactif par la chaperonne GRP78, également appelée HSP70. En situation de stress, cette protéine se dissocie des récepteurs, ce qui entraîne leur activation (Szegezdi et al. 2006). PERK phosphoryle ELF-2 α , lequel inhibe la synthèse protéique. IRE1 et ATF6 régule l'expression de différents gènes impliqués dans le transport de protéines mal repliées et dans leur dégradation (Xu et al. 2005). Si l'action combinée de ces trois facteurs de transcription ne suffit pas à résoudre l'état de stress du réticulum, des mécanismes pro-apoptotiques sont enclenchés.

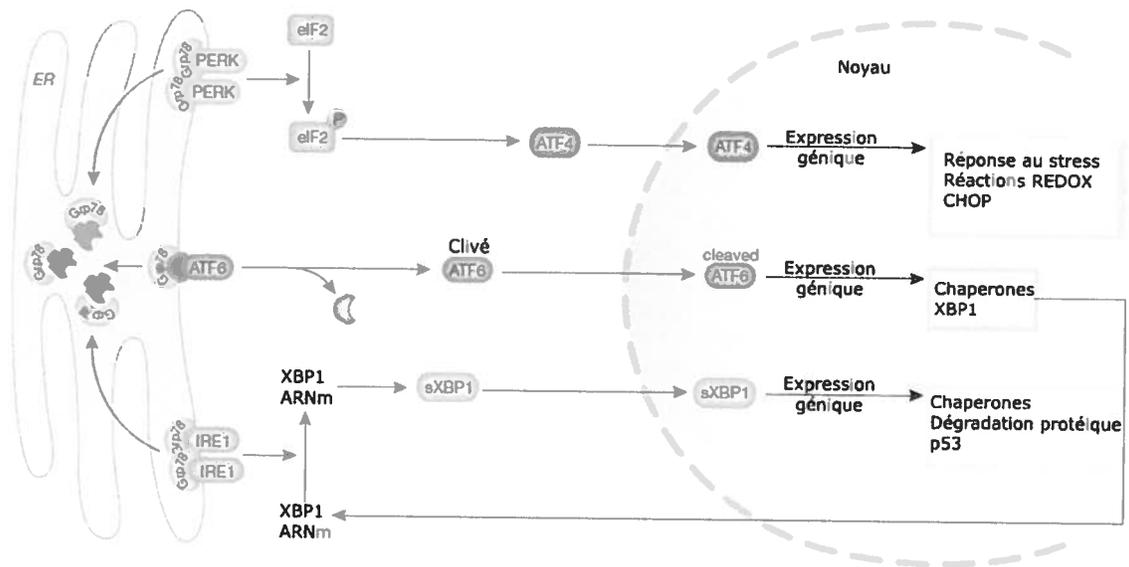


Figure 12 : Enzymes et facteurs de transcription impliqués dans la régulation du stress du réticulum endoplasmique. Modifié de : (Szegezdi et al. 2006)

Un stress prolongé au niveau du réticulum induit la formation d'un complexe formé d'IRE1 et de la kinase TRAF2. Cette dernière active ensuite ASK1, lequel active JNK. La voie des MAPK kinases est alors enclenchée et mène à l'inhibition de la famille de protéines anti-apoptotiques Bcl-2, à l'activation de la protéine pro-apoptotique bim, puis à l'activation de la caspase-3 (Suzuki & Matsubara 2010). Celle-ci active ensuite les endonucléases responsables de la fragmentation de l'ADN. Une autre voie apoptotique impliquant le réticulum endoplasmique est possible. Il a été démontré que les protéines Bax et Bak insérés dans la membrane du réticulum subissent des changements de conformations suite à un stress de l'organelle, lequel mène à la sortie du Ca^{2+} vers le cytosol (Szegezdi et al. 2006). Ce dernier active ensuite les calpaïnes, qui activent à leur tour la caspase-12. Cette dernière est en mesure de cliver la procaspase-9 indépendamment de la voie intrinsèque, pour ensuite mener aux différentes étapes menant à la mort de la cellule par apoptose (Xu et al. 2005).

2.1 O-GlcNAcylation et apoptose

Tel que mentionné dans la section 1.3.6, le métabolisme du glucose est anormalement élevé chez la majorité des types de cellules cancéreuses. L'augmentation de l'O-GlcNAcylation, via la voie de biosynthèse des hexosamines, pourrait avoir un impact sur l'efficacité des agents chimiothérapeutiques à induire l'apoptose des cellules tumorales. Il a été démontré que diverses lignées cellulaires cancéreuses réagissaient naturellement à divers stress en propageant des signaux menant à une hausse de l'O-GlcNAcylation et que ce mécanisme permettrait de les protéger de leur mort (Zachara et al. 2004). L'un des facteurs pouvant expliquer une hausse de l'O-GlcNAcylation en situation de stress est que l'enzyme de déglycosylation OGA est clivée lors du processus d'apoptose (Wells et al. 2002; Butkinaree et al. 2008). Il a été démontré *in vitro* que ce clivage n'avait pas d'effet sur l'activité de l'enzyme, puisque les deux extrémités de l'enzyme demeureraient liées suite au clivage par la caspase ou se réassembleraient par la suite. Cependant, l'activité de l'enzyme a été mesurée par sa capacité à déglycosyler le substrat synthétique paranitrophényl-GlcNAc *in vitro*. Ce test ne démontrait donc pas si le clivage de l'enzyme affectait sa capacité à lier ses substrats

peptidiques ou sa localisation cellulaire, mais démontrait que le site actif de la protéine demeurait intact (Butkinaree et al. 2008).

En raison de son importance lors de la réponse au stress et de sa compétition avec la phosphorylation pour les résidus Ser/Thr, l'O-GlcNAcylation est fortement impliquée dans la régulation de l'apoptose. Le niveau de connaissance actuel sur le sujet est limité en raison de la découverte relativement nouvelle des modifications de type O-GlcNAc. Pourtant, il a été démontré que l'effet Ying/Yang pouvant s'opérer entre les deux types de MPT pouvaient permettre d'activer ou d'inactiver certaines voies apoptotiques précédemment reconnues pour être régulées uniquement par la phosphorylation. C'est le cas de la voie PI-3K/AKT, dont l'O-GlcNAcylation de la protéine AKT1 sur le résidu Ser473 peut empêcher la phosphorylation de la protéine (Vosseller et al. 2002; Gandy et al. 2006; Kang et al. 2008). Cela provoque l'inactivation de la voie de survie cellulaire contrôlée par la protéine, corrélant avec une hausse de l'apoptose chez les cellules β pancréatiques murines (Kang et al. 2008). Dans cette expérience, des concentrations croissantes de D-glucosamine ont été utilisées afin d'augmenter la quantité d'UDP-GlcNAc via la voie de biosynthèse des hexosamines. La hausse de la biodisponibilité de son substrat a provoqué une suractivation de l'O-GlcNAcylation des protéines par l'enzyme OGT, provoquant une hausse proportionnelle de l'apoptose chez ces cellules par analyse du cycle cellulaire. Cependant, un effet contraire a été observé chez d'autres types cellulaires. Chez le rat, il a été démontré qu'une augmentation de l'O-GlcNAcylation par injection de glucosamine ou par administration de l'inhibiteur de déglycosylation PUGNAc protégeait les cardiomyocytes face à l'apoptose induite par des blessures cardiaques lors d'ischémie/réperfusion. Cette protection serait provoquée par plusieurs facteurs, incluant une inhibition de la protéolyse des calpaïnes, une diminution de l'activation de la MAPK p38 et une augmentation des protéines anti-apoptotiques mitochondriales Bcl-2 (Champattanachai et al. 2007; Fülöp et al. 2007; Liu et al. 2007; Champattanachai et al. 2008). Il a été démontré chez les thymocytes qu'une diminution de l'expression d'OGT par approche rétrovirale corrélait avec une augmentation de l'apoptose (O'Donnell et al. 2004).

Plusieurs autres protéines impliquées dans des voies apoptotique ont été identifiées comme étant régulées par O-GlcNAcylation, bien que l'impact de ces modifications sur l'induction de l'apoptose n'ait pas encore été déterminé *in vivo*. C'est le cas de la portion p65 de NF- κ B, pour laquelle il a été démontré que l'O-GlcNAcylation

favorisait la translocation vers le noyau. Le facteur de transcription serait par la suite déglycosylé et phosphorylé pour activer notamment la transcription de protéines anti-apoptotiques tels cIAP1/2, Bcl-xL et cFLIP (Chang et al. 2002; Mora et al. 2003; Yang et al. 2008). L'activation du facteur de transcription p53 est également régulé par O-GlcNAc, mais via un mécanisme totalement différent. Il est d'abord important de rappeler que des mutations au niveau du gène du suppresseur tumoral p53 sont impliquées dans environ cinquante pourcent des cancers (Suzuki & Matsubara 2010). Cette statistique démontre l'importance de la compréhension des mécanismes permettant sa régulation dans une optique chimiothérapeutique. La sérine 149 de p53 est un site d'O-GlcNAcylation étant en compétition avec la phosphorylation du résidu Thr155. Lorsque phosphorylé, ce site est ciblé par le signalosome COP9 pour mener à l'ubiquitination et à la dégradation protéasomale de la protéine. L'O-GlcNAcylation de la sérine 149 bloque la phosphorylation de la thréonine 155 et entraîne une augmentation de l'expression et de la stabilité du suppresseur tumoral en inhibant sa dégradation (Yang et al. 2006).

Ainsi, l'ajout d'O-GlcNAc est une MPT impliquée dans la régulation de facteurs clefs de la régulation apoptotique tels p53, NF- κ B et Akt. Cependant, la découverte relativement récente de ce type de modification fait en sorte que l'impact du niveau d'O-GlcNAc sur l'induction de l'apoptose n'a pas été étudié chez tous les types de cellules. Une seule étude a été publiée concernant l'impact d'O-GlcNAc lors de l'apoptose des lymphocytes T, mais seulement une hausse de l'apoptose chez les cellules n'exprimant pas OGT a été constatée. Les résultats préliminaires concernant leurs effets chez les thymocytes HPB-ALL seront décrits dans la section 2.

SECTION 2 : ARTICLE SCIENTIFIQUE

CONTRIBUTION À L'ARTICLE

La rédaction de l'article à soumettre qui suit a été effectuée par moi-même, avec l'aide du Dr. Jacques Bernier. L'immunoprécipitation du DFF45 (figure 4.D) a été effectuée par Marlyse O'Pimba et j'ai effectué l'ensemble des autres manipulations.

RÉSUMÉ EN FRANÇAIS

L'addition du monosaccharide O-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) est une modification post-traductionnelle principalement impliquée dans la régulation de protéines nucléocytoplasmiques en réponse au niveau de nutriments et au stress. L'enzyme O-N-acetylglucosamine transférase (OGT) catalyse l'addition du groupe O-GlcNAc, tandis que l'O-N-acetylglucosaminidase (OGA) retire la modification. Les impacts de cette modification demeurent relativement inconnus, mais pourrait jouer un rôle majeur dans différentes voies de signalisation en raison de sa compétition avec la phosphorylation pour les résidus sérines et thréonines. Les effets de l'O-GlcNAcylation sur l'apoptose semblent dépendant d'un type cellulaire à l'autre, puisqu'une élévation d'O-GlcNAc aurait un effet protecteur chez les myocytes primaires de rats néonataux, mais serait toxique chez les cellules β -pancréatiques de la même espèce. Les lymphoblastes-T humains HPB-ALL ont démontrés une plus grande résistance à la fragmentation de l'ADN induite par le tributylétain (TBT), lorsque traitée à l'inhibiteur d'OGA O-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene) amino-N-phenylcarbamate (PUGNAc). Des modulations au niveau de l'O-GlcNAcylation ont été observées entre les cellules traitées ou non au TBT. Le DFF45, la protéine inhibitrice du DFF40 au sein du facteur de fragmentation de l'ADN (DFF), s'est révélée être modifiée par O-GlcNAc. L'O-GlcNAcylation du DFF45 pourrait protéger la protéine de son clivage par les caspases effectrices lors de l'apoptose et/ou affecter sa localisation nucléocytoplasmique.

Mots clefs : Apoptose, O-GlcNAc, OGT, PUGNAc, TBT, DFF et DFF45.

Implications of O-GlcNAc modification in the regulation of nuclear apoptosis in T cell.

Bruno Johnson¹, Marlyse O'Pimba¹ and Jacques Bernier¹.

¹Institut national de la recherche scientifique-Institut Armand-Frappier, 531 Boul. des Prairies, Laval, QC, Canada, H7V1B7

Corresponding author :

Jacques Bernier
531 boul. des Prairies
INRS-Institut Armand-Frappier
Laval, QC, Canada
H7V 1B7
Jacques.bernier@iaf.inrs.ca
T: 450-687-5010 ext 8813
Fax: 450-686-5510

ABSTRACT

The addition of a single O-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) monosaccharide is a nutrient/stress sensitive post-translational modification affecting nucleocytoplasmic proteins. The enzyme O-N-acetylglucosamine transferase (OGT) catalyses the addition of O-GlcNAc while O-N-acetylglucosaminidase (OGA) removes the modification. The effects of O-GlcNAcylation are still relatively unknown, but could play a major role in different signalling pathways because of its competition with phosphorylation on serine and threonine residues. The effects of O-GlcNAcylation on apoptosis appears to be cell-dependant as elevated levels provided a protective role in primary neonatal rats ventricular myocytes, but had a cytotoxic effect in rats pancreatic β -cells. The aim of this study was to determine the implications of these post-translational modifications on T cell apoptosis. Human T-lymphoblastics HPB-ALL cells were more resistant to TBT induced-nuclear apoptosis when treated to the OGA inhibitor O-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene) amino-N-phenylcarbamate (PUGNAc). Modulations in protein O-GlcNAcylation was observed in TBT-treated cells compared to control. DFF45, the inhibitory protein of DFF40 in the DNA Fragmentation factor (DFF) complex, was found to be O-GlcNAc modified. O-GlcNAcylation of DFF45 could protect the protein from caspase cleavage and/or its nucleocytoplasmic localisation.

Keywords: Apoptosis, O-GlcNAc, OGT, PUGNAc, TBT, DFF and DFF45.

INTRODUCTION

Cancer cells require more energy than healthy cells to assure the different mechanisms needed for their proliferation. Surprisingly, they generally display reduced rates of oxidative phosphorylation and generate most of their ATP through the lesser efficient process of fermentation, a phenomenon known as the “Warburg effect” (Warburg et al. 1956). These cells require higher levels of intracellular glucose to produce sufficient levels of energy, which was proven by several evidences, including the overexpression of GLUT transporters in most cancer cell lines (Yamamoto et al. 1990; Zamora-Leon et al. 1996; Au et al. 1997). The impacts of this altered glucose metabolism are not completely known and understood. It has been speculated that cancer cells have evolved to produce their energy through a pathway that increased their protection against apoptosis (Schlisio 2009). The higher influx of intracellular glucose in cancer cells can lead, through the hexosamine biosyntheses pathway, to the formation of uridine diphosphate n-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc).

The attachment of N-acetylglucosamine (N-GlcNAc) monosaccharides is a nutrient/stress sensitive post-translational modification (PTM) affecting cytoplasmic and nuclear proteins (Haltiwanger et al. 1998; Kang et al. 2008). The transfer of O-GlcNAc on serine/threonine residues of target proteins (O-GlcNAcylation) is catalysed by the enzyme O-N-acetylglucosamine transferase (OGT), while its removal is catalysed by β -D-N-acetylglucosaminidase (OGA). O-GlcNAcylation and phosphorylation compete on serine/threonine residues and can co-regulate the activation of previously studied signalisation pathway (Lazarus et al. 2009). However, the impact of O-GlcNAcylation on apoptosis is unclear and has not been thoroughly studied compared to phosphorylation. An increase of this type of O-glycosylation in glucose-stimulated rat pancreatic β -cells correlated with an increase of apoptosis (Liu et al. 2000). This effect could be due to the O-GlcNAcylation of AKT1, which inhibited its phosphorylation and consequently, its activation by mTORC2, leading to apoptosis in murine pancreatic β -cells (Kang et al. 2008). Contrarily, an increase in O-GlcNAc was proven to promote cell survival in other studies. In primary cultures of neonatal rat ventricular myocytes, glucosamine increased O-GlcNAc levels and protected the cells from ischemia-reperfusion injuries. It was observed that glucosamine treatments increased mitochondrial levels of anti-apoptotic Bcl-2, altered p38 activation and reduced calpains proteolysis (Champattanachai et al.

2007; Fülöp et al. 2007; Liu et al. 2007; Champattanachai et al. 2008). Furthermore, O-GlcNAcylation protected different types of cell lines from numerous types of stress stimulus, including heat, toxic agents, UVB rays, glucose deprivation and ischemia-reperfusion injuries (Zachara & Hart 2004; Taylor et al. 2008; Ho et al. 2009). Consequently, the effects of O-GlcNAcylation on apoptosis seem to be cell-dependant and not every cellular type had been studied so far. There is also an apparent lack of knowledge on the impact of this type of O-glycosylation on nuclear apoptosis.

The DNA fragmentation factor 40 (DFF40/CAD/CPAN) is the principal endonuclease responsible for oligosomal fragmentation of DNA during nuclear apoptosis. In healthy cells, DFF40 is bound to its inhibitor DFF45/ICAD in an inactive heteromeric complex (Liu et al. 1997; Lechardeur et al. 2005). During apoptosis, effectors caspases 3 and 7 cleave DFF45 to release DFF40. Later, the endonuclease forms limited oligomers, which represent the active form of the protein (Lechardeur et al. 2005). Nandi et al. reported the global detection and proteomic analysis of O-GlcNAcylated proteins in HeLa cells (Nandi et al. 2005). Interestingly, their study revealed that DFF45 is O-GlcNAcylated. However, the signification of this post-translational modification of DFF45 was not determined.

In this report, we evaluate the effects of O-GlcNAcylation on the induction of apoptosis in T cells. The O-(2-acetamidO-2-deoxy-d-glucopyranosylidene) amino-N-phenylcarbamate (PUGNAc), a potent inhibitor of the OGA was used to increase O-GlcNAcylation. Our results demonstrated that increasing O-GlcNAc modifications in HPB-all have no protective effect against induction of apoptosis by mitochondrial perturbing agent namely tributyltin (TBT). However, a significant decrease of DNA fragmentation occurs in PUGNAc treated cells. The GlcNAcylation of DFF45 can represent a control level to inhibit the accidental activation of DFF40, which can be deleterious for the organism.

MATERIAL AND METHODS

Cell culture

The HPB-ALL human T lymphoma cell line was provided by the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Cells were grown in RPMI 1640 (Sigma Aldrich, R-8758) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Sigma Aldrich, F-1051), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (Sigma Aldrich, P0781) and 10 mM HEPES (Sigma Aldrich, H0887) when required.

Cell treatment

Cells were treated as previously described with some modifications (Dupéré-Minier et al. 2004; Desharnais et al. 2008). Briefly, cells were washed thrice in phosphate-buffered saline (PBS) and resuspended at a density of 1×10^6 cells/ml in RPMI 1640 supplemented with 0.1% (4 hours incubation) or 1% (16 hours incubation) heat decomplexed fetal bovine serum. Cells were exposed or not to 75 µM O-(2-Acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylideneamino)N phenylcarbamate (PUGNAc) for 16 hours at 37°C. Cells were exposed to 0.8 µM TBT (Tributyltin chloride 96% purity, Aldrich, Milwaukee,WI,USA) diluted in ethanol and incubated 4 hours at 37°C. Control cells were exposed to TBT vehicle, EtOH 0,1%.

Apoptosis assessment

Internucleosomal DNA fragmentation was evaluated by cell cycle analysis as described previously with some modifications, using G1/G0 subdiploid peak quantification (Desharnais et al. 2008). Briefly, treated cells were washed once and resuspended at a density of 1×10^6 cells/ml in PBS before being added slowly to 9 volumes of 70% EtOH for fixation. Cells were incubated at -20°C overnight, then washed once in PBS and resuspended at a density of 3.33×10^6 cells/ml in modified Krishan Buffer (0.1% sodium citrate, 0.3% NP-40, 20 µg/ml RNase and 50 µg/ml propidium

iodine). Samples were incubated for one hour at 37°C and analysed by flow cytometry on a FACScan® (Becton Dickinson, Oakville, ON, Canada). Analysis were performed using live gates to discriminate between doublets and cells exhibiting reduced DNA content corresponding to the sub G1/G0 diploid peak, which were defined as apoptotic cells. These results were confirmed by the evaluation of internucleosomal DNA fragmentation performed by standard agarose gel electrophoresis, as described previously. Briefly, treated cells were washed once in PBS and resuspended at a density of 1×10^5 cells/ μ l in lysis buffer (10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, sarkosyl 0.5% w/v, 0.5 mg/ml proteinase K). Lysates were incubated 1h at 50°C, before adding 1.5 mg/ml RNase. Samples were incubated 1h at 50°C, 2 min at 70°C and were then diluted in 33.3% (v/v) of loading buffer (10 mM EDTA pH 8.0, 1.0% (w/v) low-gelling t^0 agarose, 0.25% (w/v) bromophenol blue and 40 % (w/v) sucrose). Lysates from 2×10^6 cells were loaded on a 2% (w/v) agarose gel. Migration was conducted overnight at 10 V in TBE 0.5X. The DNA ladder was stained with 0.5 μ M EtBr and visualized by UV transillumination using a Fluor S-MultiImager (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada).

Immunoprecipitation and western-blot analysis

Immunoprecipitation of O-GlcNAcylated proteins were performed with 20×10^6 treated cells for each condition. After harvesting, cells were washed once in PBS and resuspended in lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100 and 1X of Halt protease inhibitors cocktail) and incubated 30 minutes at 4°C, vortexing at every 10 minutes. Cell lysates were centrifugated at 13 000 x g for 5 minutes at 4°C. Supernatants were incubated while rotating for 1 hour at 4°C with agarose beads coupled to the succinylated form of the wheat germ agglutinin lectin (sWGA). Samples were centrifugated at 13 000 x g for 1 minute at 4°C and washed five times with lysis buffer. O-GlcNAcylated proteins coupled to beads were dissociated by boiling samples at 100°C for 10 minutes in Laemli buffer. Proteins were loaded on a 10% SDS-polyacrylamide gel, separated and transferred onto a PVDF membrane. Membranes were blocked with 0.3% BSA for one hour at room temperature and probed overnight at 4°C with desired primary antibody and one hour at room temperature with the correspondent secondary antibody. Bands were visualized by chemiluminescence with an ECL detection system (Amersham Biosciences). Immunoprecipitation of DFF45 was performed with a Direct IP Kit (Thermo Scientific Pierce, Rockford, IL, USA). According

to the manufacturer's recommendations, 20×10^6 cells were washed once with 1X coupling buffer and gently resuspended in ice-cold IP lysis/wash buffer at a concentration of 40×10^6 cells/ml. Cells were incubated on ice for 5 minutes with periodic mixing and centrifuged at $13\,000 \times g$ for 10 minutes. The supernatant was transferred to the α -DFF45 coupled resin in the spin column and mix by rotation overnight at 4°C . Columns were washed four times with IP lysis/wash buffer, then washed once with conditioning buffer. DFF45 was eluted with elution buffer, and samples were conserved for western blotting.

2D gel electrophoresis

HPB-ALL cells were exposed to GlcN (16 mM) for 16h. Cells were harvested in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.02% sodium azide, 1% NP-40 and 1X of Halt protease inhibitors cocktail), and total O-GlcNacylated proteins were immunoprecipitated using agarose beads coupled to lectin sWGA. Beads were washed and resuspended in Destreak rehydration buffer supplemented with 60 mM DTT and 0.5% IPG buffer (pH 3-10). Samples were mixed by rotation at room temperature for 30 minutes, then the supernatant obtained after centrifugation was loaded on a 13 cm IPG strip (pH 3-10). Samples were rehydrated for 15 hours at 30V and isoelectric focusing was performed on an Ettan IPGPhor system, as per the manufacturer's instruction. Second dimension was performed on a 10% gel and proteins were transferred on a nitrocellulose membrane. Proteins were identified by western-blot as previously described. Destreak buffer, IPG buffer and the Ettan IPGPhor system were all provided by GE Healthcare Sciences (Mississauga, ON, Canada).

Statistical Analysis

Experimental data are expressed as means \pm SEM. Repeated-measures ANOVA (Dunnett's test) were performed using GraphPad Prism (version 5.01). Differences were considered statistically significant when $P < 0.05$.

RESULTS

O-GlcNAc modulation in HPBALL T-cells reduced TBT-induced DNA fragmentation

To determine the effects of O-acetylglycosylation on TBT-induced apoptosis, human HPB-All T cells were treated or not with PUGNAc for 16h. PUGNAc is an inhibitor of O-GlcNAcase and was used to increase O-GlcNAcylation. Thereafter, cells were exposed to TBT, a mitochondrial perturbing agent, for 4h and the pro-caspase 3 cleavages determined. As shown in figure 1A, the presence of PUGNAc alone does not cause pro-caspase 3 cleavage, indicating that the concentrations used were not cytotoxic. This result was confirmed by trypan blue exclusion test (data not shown). In presence of TBT, pro-caspase 3 bands disappeared indicating its activation. PUGNAc plus TBT treated cells were also in apoptosis, as processing of pro-caspase 3 occurred. Next, we analyzed the late events of apoptosis, corresponding to DNA fragmentation. It was determined by sub G0/G1 cell cycle analysis by flow cytometry (Fig 1.B). Results showed that DNA fragmentation was greater in cells exposed to TBT (50.7 %) compared to control cells (11.7%). On the other hand, the inhibition of O-GlcNAcase with PUGNAc reduced significantly the number of cells in sub G0/G1 induced by TBT (38.2 %), suggesting that an increase of O-GlcNAc perturbs DNA fragmentation. To confirm this observation, DNA laddering was examined on 2% agarose gel. Presence of PUGNAc in TBT-treated cells reduced the magnitude of intensity of DNA bands confirming a reduction in internucleosomal DNA fragmentation (Fig. 1C).

Apoptosis was associated with a modulation of proteins O-GlcNAcylation.

To determine the modulation of proteins O-GlcNAcylation during TBT-induced apoptosis in HPB-ALL cells, the O-GlcNAc modifications were analysed in total cells lysate by western blot. Results showed grossly a global increase in O-GlcNAcylation in apoptotic cells as compared to control cells although some bands disappear in apoptotic cells. To confirm the specificity of detection with antibody ctd110.6, cells were treated with glucosamine (GlcN) before exposure to TBT. GlcN was used to induce an elevation

of O-GlcNAcylation through the hexosamine biosynthesis pathway. GlcN treatment increased the detection of O-GlcNAc modifications, with same patterns in non- or apoptotic cells compared to GlcN untreated cells, confirming the efficacy of the method of detection of O-GlcNAcylated proteins. Interestingly, a band at 45 kDa appeared to be partially deglycosylated, while a band at approximately 200 kDa seemed to be totally deglycosylated. In presence of GlcN, later band disappeared in apoptotic cells confirming reversible modification. On contrary, in TBT-treated cells, O-GlcNAcylation of the band at 45 kDa was superior in presence of GlcN, suggesting that nutritional environment under the cell influence their O-GlcNAcylation. The O-GlcNAc modification is found on many nuclear and cytoplasmic proteins and is a highly dynamic post-translational modification that plays a key role in signal transduction pathways. Next, we have determined the O-GlcNAc modification in cytoplasmic and nuclear fraction after TBT-induced apoptosis. In cytoplasmic fraction, O-GlcNAc modifications increased following apoptosis induction (Fig 3 A). However, the band at 45 kDa slowly disappeared following incubation with TBT. This decrease in O-GlcNAcylation was partially inhibited in apoptotic cells treated with PUGNAc. There is also a band at 75 kDa that increased in both cytoplasm and nuclear fractions during apoptosis. In the nucleus, the band at the 45kDa increased after apoptosis induction. In PUGNAc treated cells, O-GlcNAc modification at 45 kDa increase after TBT-induced apoptosis. These results clearly show an increase in total O-GlcNAcylated proteins in the cytoplasm of apoptotic cells. It is also apparent that band at 45 kDa decrease in cytoplasmic extracts and increases in nuclear extract.

DFF45 is subject to O-GlcNAc modification

The next step was to determine whether the 45 kDa band identified in figure 2 and 3 corresponded to DFF45, the inhibitory protein of the DFF complex. HPBALL cells were treated or not with GlcN plus PUGNAc and total O-GlcNAc modified proteins were precipitated with succinylated wheat germ agglutinin (sWGA), a lectin binding specifically to O-GlcNAc and coupled to agarose beads. Proteins were then loaded and separated on a 10% polyacrylamide gel, transferred on a PVDF membrane and probed with an anti-DFF45 antibody. The results in figure 4 showed that DFF45 was precipitated with sWGA and thus O-GlcNAcylated in healthy cells. Treatment of cells with GlcN and PUGNAc increased the level of DFF45 in sWGA-precipitated fraction, demonstrating its

O-GlcNAcylation. Next, we have immunoprecipitated DFF45 and determined the presence of O-GlcNAc modification. As expected, a band of 45 kDa, corresponding to DFF45 was O-GlcNAcylated. To ensure the presence of DFF45, HPB-ALL cells were treated to GlcN overnight and O-GlcNAcylated proteins were precipitated using lectin sWGA, as described previously. O-GlcNAc modified proteins were released from the lectin by incubation at room temperature in DeStreak buffer. Samples were loaded on a 13 cm IPG Strip and electric isofocusing were performed on an Ettan IPGPhor system. Second dimension was performed on a 10% SDS-PAGE gel and DFF45 were detected by western-blot. Two dots were detected at approximately 45 and 75 kDa (fig. 4B). The spot at 45 kDa had an isoelectric point to the theoretical value of 4.68 for DFF45. Thus, DFF45 are subject to O-GlcNAc modification.

O-GlcNAc glycosylation protect the DFF45 from caspase cleavage during apoptosis

A small portion of DFF45 is O-GlcNAcylated in normal cells. Treatment with GlcN and PUGNAc increased their O-GlcNAc modification. Moreover, treatment of HPB-ALL with PUGNAc decreased DNA fragmentation after exposure to a mitochondrial perturbing agent. Next we have determined if this type of modification can protect DFF45 from caspase cleavage in TBT-induced apoptosis. Cells were treated or not with GlcN plus PUGNAc and apoptosis induced with TBT. Cells were lysed after 4h, O-GlcNAc modified proteins were precipitated with sWGA and presence of DFF45 was analysed by western blot. Results in figure 4C showed that the level of DFF45 in control or GlcN plus PUGNAc remained similar between vehicle and TBT-treated cells, suggesting that DFF45 O-GlcNAc modified was not cleaved following TBT-induced apoptosis. Total cell lysate (50 µg) analysed for DFF45 showed that the majority of DFF45 disappeared after 4h of TBT-induced apoptosis. Remaining uncleaved DFF45 can represent the O-GlcNAc modified fraction that was enriched by sWGA precipitation.

DISCUSSION

Post-translational addition of O-GlcNAc serves primarily to modulate cellular signalling and transcription regulatory pathways in response to nutrients and stress. Attachment of the monosaccharide to Ser and/or Thr residues occurs mainly on nuclear and cytosolic protein (Zachara & Hart 2006). An increase in O-GlcNAc levels was proven to be protective against stress or trauma in vivo (Yang et al. 2006; Xing et al. 2008). In this study, we established that an increase in O-GlcNAcylation occurs in apoptotic T cells. Using PUGNAc, a potent inhibitor of the OGA, we showed that an increase of O-GlcNAc raised O-GlcNAcylation without any effect on apoptosis induction (Fig 2). It has been proven in the past that O-GlcNAc also provided a form of protection against apoptosis provoked by ischemia-reperfusion injury in neonatal cardiomyocytes (Champattanachai et al. 2007). In those cells, an increase in O-GlcNAcylation was found to reduce calpains proteolysis, alter p38 activation and increase mitochondrial Bcl-2 expression. Oppositely, other studies found that an increase in O-GlcNAcylation increased apoptosis. It was demonstrated in murine β -pancreatic cells that hyperglycaemic condition increased O-GlcNAc modification of Ser473 and decreased phosphorylation of Akt1, which inactivated the anti-apoptotic signalling pathway controlled by this protein (Kang et al. 2008). However, Ku and colleagues found that the O-glycosylation of keratin 18 (K18) induced Akt1 activation and favoured cell survival, showing that this pathway is heavily regulated (Ku et al. 2010). Although PUGNAc did not provide any protective effect on apoptosis induction, a significant decrease of DNA fragmentation was observed (Fig 1).

O-GlcNAc modifications of Ser/Thr on cytoplasmic and nuclear proteins are involved in control of cell cycle, cell development and cell apoptosis. We have shown that O-GlcNAcylation is modulated during apoptosis with a predominant increase. Some decrease was also observed, particularly of a band around 45 kDa. Cytoplasmic and nuclear fractions analysis showed that the band at 45 kDa decreased in the cytoplasm and increased in the nucleus (Fig 3). This observation points out two possibilities, either O-GlcNAcylation are involved in protein nucleocytoplasmic translocation or in its degradation. O-GlcNAcylation, affects ELF-1 translocation, which regulates the transcription of several haematopoietic genes (Tsokos et al. 2003). O-GlcNAc is also involved in proteolysis protection as demonstrated for calpains (Liu et al. 2007).

Using an OGA inhibitor and glucosamine to increase total O-GlcNAcylation, we identified DFF45, the inhibitory protein of DFF40 in the DFF complex, as an O-GlcNAc modified protein. Literature review of proteomic global identification of O-GlcNAc modified proteins point out one study where DFF45 was identified as O-GlcNAc modified protein in non-apoptotic HeLa cells (Nandi et al. 2005). Interestingly, cleavage of DFF45 by caspases during apoptosis was not observed in fractions precipitated with sWGA (Fig 4). These results suggest that the O-GlcNAcylation of DFF45 could protect the protein from its cleavage by caspase during apoptosis. Two serines (107 and 110) of DFF45 are localised near one of the two sites of caspase cleavage (117 and 224) and would represent good targets for study in site-directed mutagenesis (McCarty et al. 1999). However, further studies would be needed to determine the role of this PTM of DFF45. It would be important to assess whether the O-glycosylation of DFF45 affects the binding of the protein to DFF40. It was demonstrated that O-GlcNAc modification of Sp-1 derived peptide block its association with TAF110, providing an evidence that this type of post-translation modification can influence protein-protein interactions (Roos et al. 1997). O-GlcNAcylation of YY1, a transcription factor important during development, blocks its binding to the retinoblastoma protein (Love & Hanover 2005).

O-GlcNAcylation is increased in chronic lymphocytic leukemia lymphocytes (Shi, Tomic 2010). The high level of O-GlcNAcylation correlated with an inhibition of signaling pathways controlling cell growth (Shi et al. 2010). Stimulation of lymphocytes with plant lectin increased nuclear O-GlcNAc levels and decreased cytoplasmic O-GlcNAc levels in T lymphocytes (Kearse & Hart 1991). O-GlcNAcylation affects mature T cells through regulation of critical transcription factors. Modifications of NF- κ B and NFAT by O-GlcNAc are required after T cell stimulation to obtain a productive activation (Golks et al. 2007). To our knowledge, this study is the first to confirm the protective role of O-GlcNAcylation from DNA fragmentation during apoptosis in T cells. HPB-ALL cells were more resistant to TBT induced-nuclear apoptosis, when treated to PUGNAc. Subunit DFF45 of the DFF complex was found to be O-GlcNAc modified. O-GlcNAcylation of DFF45 could protect the protein from caspase cleavage and/or its nucleocytoplasmic localisation.

LEGENDS

Fig.1 Effects of O-Glycosylation level on the induction of apoptosis. HPBALL cells were exposed or not to PUGNAc (75 μ M) for 16h and treated or not with TBT (0.8 μ M) for 4h at 37 °C. Control cells were incubated with 0.1 % (v/v) EtOH. A) Proteins were extracted, loaded on a 10% SDS-PAGE and immunoblotted with an α -procaspase-3 antibody. B) After PI labelling, cells were analysed by flow cytometry and apoptotic cells were identified as exhibiting reduced DNA content (M1). C) DNA was extracted and internucleosomal fragmentation was visualized on a 2% agarose gel. All data are representative of at least 3 independent experiments.

Fig. 2 Modulation of O-GlcNAC modifications levels in HPBALL cells, following treatment with 0.8 μ M TBT. Cells were exposed or not to glucosamine (GlcN, 16 mM) for 16h and treated with TBT (0.8 μ M) for 4h at 37 °C. Proteins were extracted and loaded on a 10% SDS-PAGE and immunoblotted with an α -O-GlcNAcylated proteins antibody (ctd110.6). Control cells were incubated with 0.1 % (v/v) EtOH. All data are representative of at least 3 independent experiments.

Fig. 3 Modulation of O-GlcNAC levels in both cytoplasmic and nuclear fractions of HPBALL cells, following treatment with 0.8 μ M TBT. Cells were exposed to PUGNAc (75 μ M) for 16h and treated with TBT (0.8 μ M) for 0, 2 and 4h at 37 °C. Cytoplasmic (A and B) and nuclear (C and D) proteins were extracted and loaded on a 10% SDS-PAGE and immunoblotted with an α -O-GlcNAcylated proteins antibody (ctd110.6). Control cells were incubated with 0.1 % (v/v) EtOH. All data are representative of at least 3 independent experiments.

Fig. 4 The endonuclease DFF45 is α -glycosylated in HPBALL cells. A) Cells were exposed or not to GlcN (16 mM) and PUGNAc (10 μ M) for 16h and treated or not with TBT (0.8 μ M) for 4h at 37 °C. Cells were harvested and total O-GlcNAcylated proteins were precipitated using agarose beads coupled to lectin sWGA or DFF45 was immunoprecipitated with a specific antibody. Samples were loaded on a 10% polyacrylamide gel and immunoblotted with an α -DFF45 or α -O-GlcNAcylated antibody (ctd110.6). B) HPB-ALL cells were exposed to GlcN (16 mM) for 16h, harvested and total O-GlcNAcylated proteins were immunoprecipitated using lectin sWGA. Proteins were resuspended in Destreak rehydration buffer and loaded on a 13 cm IPG Strip (pH 3-10). Isoelectric focusing was performed on an Ettan IPGPhor system. Second dimension was performed on a 10% SDS-PAGE gel. Proteins were transferred on a nitrocellulose membrane and immunoblotted with an α -DFF45 antibody. C) Cells were harvested and total o-GlcNAcylated proteins were immunoprecipitated using agarose beads coupled to lectin sWGA. Samples were loaded on a 10% polyacrylamide gel and immunoblotted with an α -DFF45 antibody. All data are representative of at least 3 independent experiments.

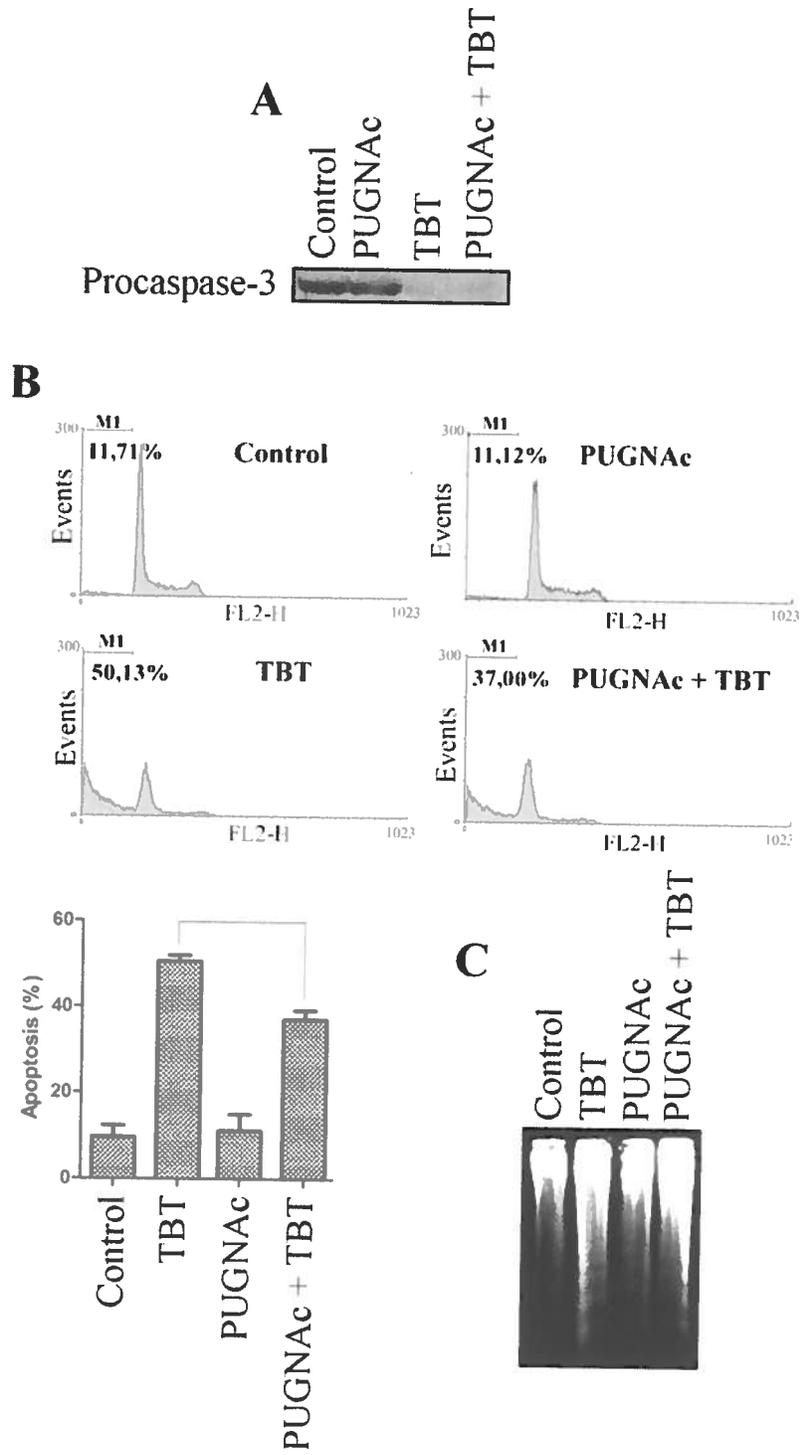


Figure 1

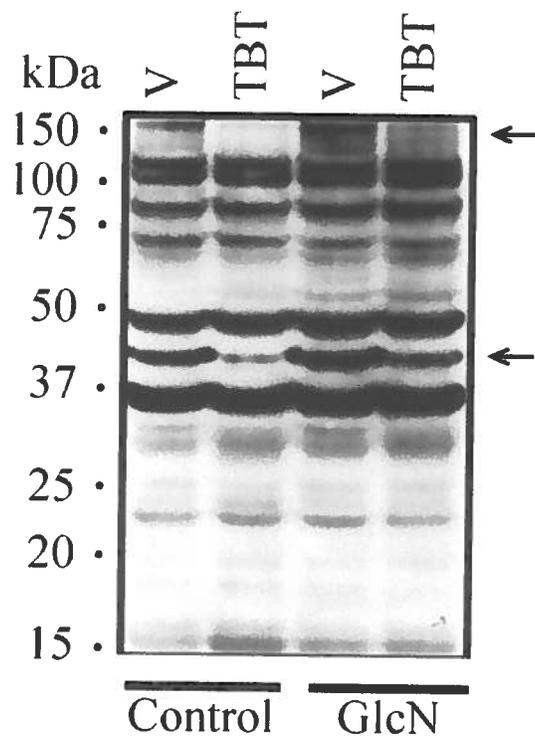


Figure 2

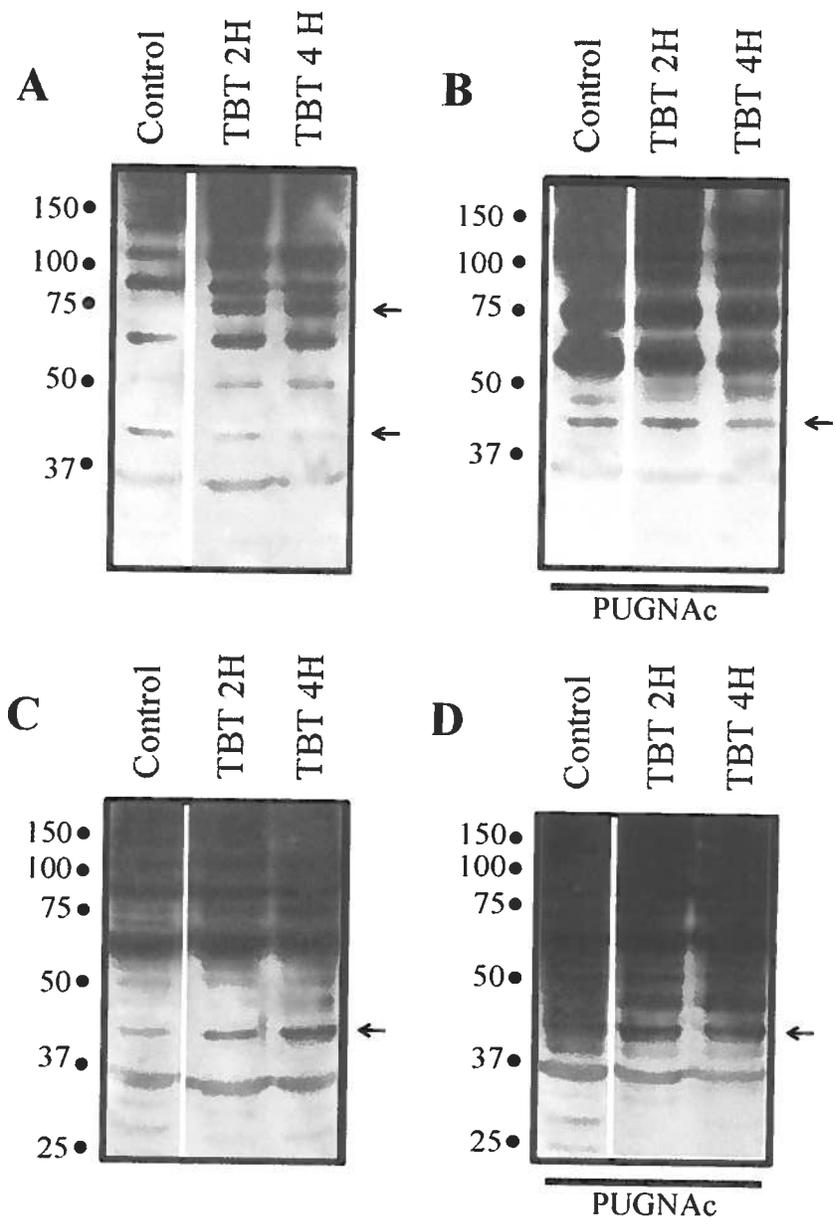


Figure 3

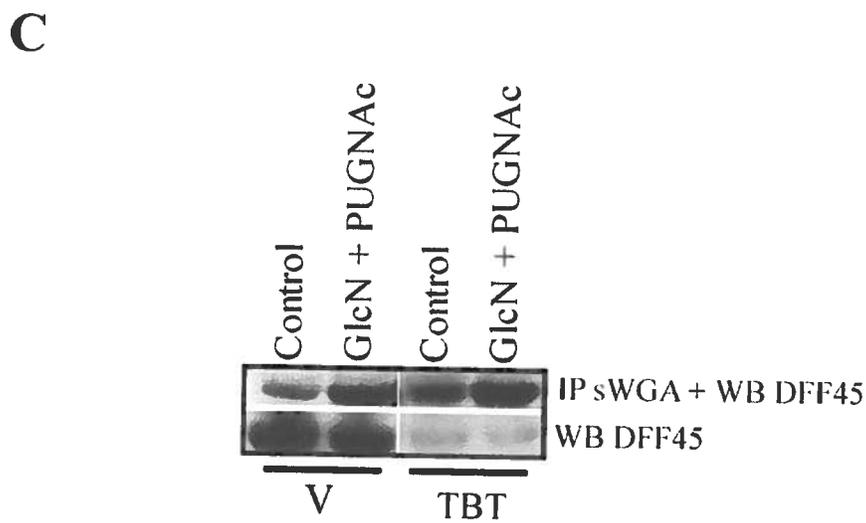
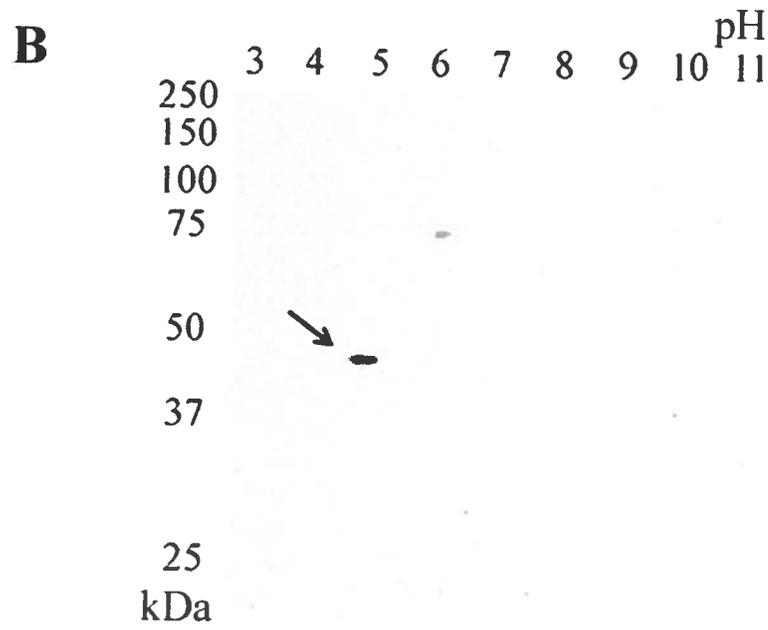
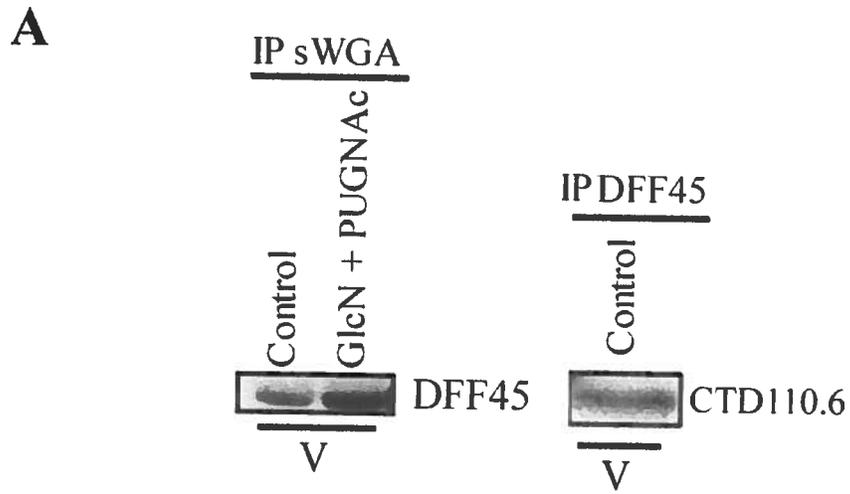


Figure 4

REFERENCES

- Au, K. K., E. Liong, et al. (1997). "Increases in mRNA levels of glucose transporters types 1 and 3 in Ehrlich ascites tumor cells during tumor development." Journal of Cellular Biochemistry 67(1): 131-135.
- Champattanachai, V., R. B. Marchase, et al. (2007). "Glucosamine protects neonatal cardiomyocytes from ischemia-reperfusion injury via increased protein-associated O-GlcNAc." American Journal of Physiology - Cell Physiology 292(1): C178-C187.
- Champattanachai, V., R. B. Marchase, et al. (2008). "Glucosamine protects neonatal cardiomyocytes from ischemia-reperfusion injury via increased protein O-GlcNAc and increased mitochondrial Bcl-2." American Journal of Physiology - Cell Physiology 294(6): C1509-C1520.
- Desharnais, P., G. Dupéré-Minier, et al. (2008). "Involvement of CD45 in DNA fragmentation in apoptosis induced by mitochondrial perturbing agents." Apoptosis 13(2): 197-212.
- Dupéré-Minier, G., C. Hamelin, et al. (2004). "Apoptotic volume decrease, pH acidification and chloride channel activation during apoptosis requires CD45 expression in HPB-ALL T cells." Apoptosis 9(5): 543-551.
- Fülöp, N., Z. Zhang, et al. (2007). "Glucosamine cardioprotection in perfused rat hearts associated with increased O-linked N-acetylglucosamine protein modification and altered p38 activation." American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology 292(5): H2227-H2236.
- Golks, A., T.-T. T. Tran, et al. (2007). "Requirement for O-linked N-acetylglucosaminyltransferase in lymphocytes activation." EMBO J 26(20): 4368-4379.
- Haltiwanger, R. S., K. Grove, et al. (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-dglucopyranosylidene)amino-N-phenylcarbamate." Journal of Biological Chemistry 273(6): 3611-3617.
- Ho, S.-R., K. Wang, et al. (2009). "O-GlcNAcylation enhances FOXO4 transcriptional regulation in response to stress." FEBS Letters 584(1): 49-54.
- Kang, E.-S., D. Han, et al. (2008). "O-GlcNAc modulation at Akt1 Ser473 correlates with apoptosis of murine pancreatic [beta] cells." Experimental Cell Research 314(11-12): 2238-2248.
- Kearse, K. P. and G. W. Hart (1991). "Lymphocyte activation induces rapid changes in nuclear and cytoplasmic glycoproteins." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 88(5): 1701-1705.
- Ku, N.-O., D. M. Toivola, et al. (2010). "Cytoskeletal keratin glycosylation protects epithelial tissue from injury." Nat Cell Biol 12(9): 876-885.

- Lazarus, B. D., D. C. Love, et al. (2009). "O-GlcNAc cycling: Implications for neurodegenerative disorders." The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 41(11): 2134-2146.
- Lechardeur, D., D. Dougaparsad, et al. (2005). "Oligomerization State of the DNA Fragmentation Factor in Normal and Apoptotic Cells." The Journal of Biological Chemistry 280(48): 40216-40225.
- Liu, J., R. B. Marchase, et al. (2007). "Increased O-GlcNAc levels during reperfusion lead to improved functional recovery and reduced calpain proteolysis." American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology 293(3): H1391-H1399.
- Liu, K., A. J. Paterson, et al. (2000). "Glucose stimulates protein modification by O-linked GlcNAc in pancreatic beta cells: Linkage of O-linked GlcNAc to beta cell death." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97(6): 2820-2825.
- Liu, X., H. Zou, et al. (1997). "DFF, a Heterodimeric Protein That Functions Downstream of Caspase-3 to Trigger DNA Fragmentation during Apoptosis." Cell 89(2): 175-184.
- Love, D. C. and J. A. Hanover (2005). "The Hexosamine Signaling Pathway: Deciphering the "O-GlcNAc Code"." Sci. STKE 2005(312): re13-.
- McCarty, J. S., S. Y. Toh, et al. (1999). "Multiple Domains of DFF45 Bind Synergistically to DFF40: Roles of Caspase Cleavage and Sequestration of Activator Domain of DFF40." Biochemical and Biophysical Research Communications 264(1): 181-185.
- Nandi, A., R. Sprung, et al. (2005). "Global Identification of O-GlcNAc-Modified Proteins." Analytical Chemistry 78(2): 452-458.
- Roos, M. D., K. Su, et al. (1997). "O glycosylation of an Sp1-derived peptide blocks known Sp1 protein interactions." Molecular and Cellular Biology 17(11): 6472-80.
- Schlisio, S. (2009). "Neuronal apoptosis by prolyl hydroxylation: implication in nervous system tumours and the Warburg conundrum." Journal of Cellular and Molecular Medicine 13(10): 4104-4112.
- Shi, Y., J. Tomic, et al. (2010). "Aberrant O-GlcNAcylation characterizes chronic lymphocytic leukemia." Leukemia 24(9): 1588-1598.
- Taylor, R. P., G. J. Parker, et al. (2008). "Glucose Deprivation Stimulates O-GlcNAc Modification of Proteins through Up-regulation of O-Linked N-Acetylglucosaminyltransferase." Journal of Biological Chemistry 283(10): 6050-6057.
- Tsokos, G. C., M. P. Nambiar, et al. (2003). "Activation of the Ets Transcription Factor Elf-1 Requires Phosphorylation and Glycosylation." Annals of the New York Academy of Sciences 987(1): 240-245.
- Warburg, O., S. Weinhouse, et al. (1956). "On Respiratory Impairment in Cancer Cells." Science 124(3215): 267-272.
- Xing, D., W. Feng, et al. (2008). "Increased protein O-GlcNAc modification inhibits inflammatory and neointimal responses to acute endoluminal arterial injury." American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology 295(1): H335-H342.

- Yamamoto, T., Y. Seino, et al. (1990). "Over-expression of facilitative glucose transporter genes in human cancer." Biochemical and Biophysical Research Communications 170(1): 223-230.
- Yang, S., L.-y. Zou, et al. (2006). "Glucosamine Administration During Resuscitation Improves Organ Function After Trauma Hemorrhage." Shock 25(6): 600-607
10.1097/01.shk.0000209563.07693.db.
- Zachara, N. E. and G. W. Hart (2004). "O-GlcNAc a sensor of cellular state: the role of nucleocytoplasmic glycosylation in modulating cellular function in response to nutrition and stress." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects 1673(1-2): 13-28.
- Zachara, N. E. and G. W. Hart (2006). "Cell signaling, the essential role of O-GlcNAc!" Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids 1761(5-6): 599-617.
- Zamora-Leon, S. P., D. W. Golde, et al. (1996). "Expression of the fructose transporter GLUT5 in human breast cancer." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93(5): 1847-1852.

DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

L'objectif du présent mémoire était de démontrer l'importance des modifications de type O-GlcNAc dans la régulation de l'apoptose des lymphocytes T. Nos résultats ont démontré pour la première fois l'importance de ces MPT dans la régulation de la fragmentation de l'ADN survenant lors de l'étape finale de la mort programmée. Nous avons démontré que les cellules HPB-ALL exposés au PUGNAc et mis en présence de TBT pendant 4h présentaient une fragmentation de l'ADN inférieure (38,2 %) aux cellules non exposées à l'inhibiteur (50,7 %). Il a été observé que le clivage de la caspase-3 était complet après 4h et ce indépendamment du niveau d'O-GlcNAc, laissant présumer que le PUGNAc pourrait réguler des facteurs situés en aval de cette étape dans la voie apoptotique intrinsèque. Le DFF45 représentait une cible de choix, puisqu'il est directement clivé par la caspase-3 afin d'activer le DFF40, l'endonucléase majoritairement impliqué dans la fragmentation de l'ADN lors de l'apoptose. De plus, une étude d'identification globale de protéine O-GlcNAcylées avait révélé la présence de DFF45 modifié par le monosaccharide (Nandi et al. 2005). Ce résultat était secondaire aux objectifs de cette étude et le rôle de la modification dans la régulation du complexe DFF n'a pas été investigué par cette équipe.

Notre projet de recherche a permis de confirmer ce résultat, puisque du DFF45 O-GlcNAcylé a été immunoprécipité chez les cellules HPB-ALL. Lors de l'apoptose induite par le TBT, il a été observé par immunobuvardage de type western que le DFF45 O-GlcNAcylé ne semblait pas être clivé lors de l'apoptose. Il est possible que le site d'O-GlcNAcylation de la protéine soit situé près des sites de clivage par la caspase-3, identifiés entre les acides aminés 117 et 224 (McCarty et al. 1999). Nous avons également investigué un rôle possible de l'O-GlcNAcylation dans la régulation de la localisation cellulaire du complexe DFF. Des travaux préliminaires (non-révélés dans le présent document) ont permis d'éliminer l'hypothèse que l'O-GlcNAcylation jouait un rôle dans la translocation du DFF45 entre le cytoplasme et le noyau. Cependant, des travaux publiés récemment par d'autres groupes ont révélés la présence de complexe de régulation de la transcription impliquant les enzymes OGA et OGT. Le corépresseur mSin3A peut lier certains facteurs de transcription en plus de recruter OGT, OGA et des HDAC (Yang et al. 2002; Toleman et al. 2004). L'enzyme OGA possède un domaine

catalytique HAT qui, conjointement à l'action des HDAC, permet au complexe de réguler l'environnement chromosomique (Slawson & Hart 2011). Chez les cellules non apoptotiques, le complexe DFF se trouve majoritairement lié à la chromatine. Il serait d'abord intéressant de vérifier par microscopie confocale si le DFF45 colocalise avec les enzymes OGA et OGT. Si c'est le cas, nous pourrions par la suite vérifier par co-immunoprécipitation si certains facteurs de transcription et corépresseur, tel p53 et mSin3A, font partis de ce complexe. Il a été déterminé par le passé qu'en plus de son implication lors de l'apoptose, le DFF40 pouvait réguler la transcription de certains gènes en induisant des ruptures au niveau de l'ADN. Par exemple, les myoblastes murins C2C12 déficients en DFF40 seraient incapables de se différencier en cellules musculaires à cause d'une diminution de l'expression du facteur de transcription p21 (Larsen et al. 2010). Le mécanisme permettant au DFF40 de cibler des régions spécifiques de l'ADN n'est pas connu, mais pourrait impliquer sa localisation au sein de complexe de régulation impliquant des facteurs de transcription et des corépresseurs.

À notre connaissance, notre laboratoire est le premier à confirmer un mécanisme post-traductionnel de régulation du uDFF45. Des résultats non publiés avaient déjà révélé la présence de DFF45 acétylé et phosphorylé chez les cellules HPB-ALL, laissant présumer que les MPT pourraient fortement réguler l'activation du complexe DFF (Dupéré-Minier 2009). Le clivage de l'ADN est une étape cruciale du processus apoptotique, bien que survenant à sa toute fin. Des taux élevés de mutations et une instabilité chromosomique ont été observés chez les cellules déficientes en DFF, suggérant un rôle important du complexe dans l'élimination des cellules ayant subi des dommages à l'ADN (Widlak & Garrard 2009). De plus, plusieurs types de cancers présentent des mutations du gène DFF45 ou une altération dans l'expression de la protéine (Widlak & Garrard 2009). Il a également été démontré que les cellules apoptotiques présentant des dommages à l'ADN pouvaient transmettre leurs oncogènes aux cellules les ayant phagocytés, lors du processus de transfert génétique horizontal.

Nos résultats indiquent qu'une hausse de l'O-glycosylation pourrait diminuer le clivage du DFF45, ayant pour effet d'inhiber l'activation du DFF40 et de réduire la fragmentation de l'ADN lors de l'apoptose. Cet impact pourrait jouer un rôle important lors du cancer, puisque les cellules tumorales sont caractérisées par un métabolisme anaérobie élevé du glucose pouvant entraîner une activation de la voie de biosynthèse des hexosamines (Warburg et al. 1956; Diaz-Ruiz et al. 2010). Des taux

élevés d'O-GlcNAc ont d'ailleurs été observés dans certaines tumeurs mammaires, colorectales et pulmonaires (Gu et al. 2010; Mi et al. 2010). Une diminution de l'activité de l'endonucléase suite à une hausse de l'O-GlcNAcylation pourrait jouer un rôle de protection face à l'élimination des cellules cancéreuses lors de la chimiothérapie. La fragmentation de l'ADN joue un rôle de potentialisateur lors du processus apoptotique, puisque les cellules ne peuvent échapper à leur destruction suite à l'activation du DFF. De plus, certaines chimiothérapies ciblant l'ADN des cellules tumorales peuvent induire des mutations pouvant mener à l'apparition de nouvelles cellules malignes suite au traitement. Tel que mentionné précédemment, la fragmentation de l'ADN lors de l'apoptose est primordiale afin d'éviter le transfert génétique horizontal d'oncogène des cellules tumorales aux cellules saines. La régulation de l'apoptose nucléaire par la O-glycosylation devra être mieux comprise afin d'augmenter l'efficacité des procédés chimiothérapeutiques utilisés présentement.

La diminution de la fragmentation de l'ADN lors de l'apoptose induite par le TBT, suite à une augmentation de l'O-GlcNAcylation semble s'inscrire dans un mécanisme global de protection cellulaire observé fréquemment dans la littérature lors de la dernière décennie. Chez les cardiomyocytes murins, la présence de glucosamine ou de PUGNAc s'est révélé avoir un effet protecteur face à l'apoptose induite par des lésions d'ischémie-réperfusion (Champattanachai et al. 2007; Fülöp et al. 2007; Liu et al. 2007). La hausse d'O-GlcNAcylation chez ces cellules provoquerait une augmentation du niveau de Bcl-2, une altération de l'activation de p38 et une diminution de l'activation des calpaïnes. Il a été démontré chez les thymocytes qu'une diminution de l'expression d'OGT par approche rétrovirale corrélait avec une augmentation de l'apoptose (O'Donnell et al. 2004). Cependant, les résultats publiés à ce jour sur l'effet du niveau global d'O-GlcNAcylation sur l'induction de l'apoptose varient selon le type de cellules étudiées. Chez les cellules β pancréatiques murines, une hausse du transfert d'O-GlcNAc en présence de glucosamine aurait pour effet d'augmenter l'O-GlcNAcylation d'Akt1, ce qui entraînerait l'inactivation de la voie antiapoptotique PI3K/Akt et une augmentation de l'apoptose (Kang et al. 2008).

Nos résultats concordent avec un article de Zachara et collaborateurs en 2004, qui notaient l'importance des modifications O-GlcNAc lors de la réponse au stress (Zachara et al. 2004). Dans cette dernière étude, des lignées cellulaires (cellules rénales de singe COS-7, cellules épithéliales de carcinome humain HeLa, ovaires de

hamster chinois CHO, cellules endothéliales d'artères coronariennes humaines HCAEC, fibroblastes d'embryons murins MEF, neuroblastomes murins Neuro-2A et cellules rénales embryonnaires humaines HEK293) ont été soumises à divers stimuli telles que des rayons UVB, des chocs thermiques, de l'éthanol, iodoacétamide et de l'arsenic de sodium. Les résultats démontrent qu'un mécanisme généralisé de hausse de l'O-GlcNAcylation suite au stress. De plus, une inhibition de l'enzyme OGT augmentait la vulnérabilité des cellules face au stress, tandis qu'une augmentation de l'O-GlcNAcylation augmentait la viabilité cellulaire (Zachara et al. 2004). Un mécanisme similaire a été observé chez les cellules HPB-ALL suite à l'exposition au TBT, puisqu'une augmentation de la quantité totale de protéines nucléocytoplasmiques O-glycosylées a été observée par immunoblot et qu'une augmentation du transfert d'O-GlcNAc a eu un effet protecteur sur la fragmentation de l'ADN lors de l'apoptose. L'acidification du milieu intracellulaire est une étape clef du processus apoptotique. La diminution du pH intracellulaire des cellules HPB-ALL suite à leur exposition au TBT a été caractérisée par le passé par notre laboratoire et pourrait expliquer la hausse de l'O-GlcNAcylation, puisque le pH optimal de l'enzyme OGT est de 6,0 (Haltiwanger et al. 1992; Dupéré-Minier et al. 2004).

Parmi les avenues futures de notre projet de recherche, il serait important de démontrer si les formes de DFF45 O-GlcNAc sont associées au DFF40. L'inhibition du clivage du DFF45 par les caspase-3 et -7 devra aussi être démontré *in vitro*. Puisque l'OGT forme des complexes multimériques avec certains facteurs de transcription, il sera important d'établir s'il existe la formation d'un tel complexe multimérique entre le DFF et OGT (Yang et al. 2002; Toleman et al. 2004; Yao et al. 2007). La présence de ces complexes pourrait moduler l'activité de cette enzyme. Cette possibilité est possible puisqu'il a été démontré que les modifications de type O-GlcNAc étaient présentes au niveau des histones (Sakabe et al. 2011), modifiant la conformation de la chromatine et possiblement l'accessibilité du DFF40 à la région internucléosomale. Finalement, il sera important d'identifier les sites d'O-GlcNAc sur le DFF45 et d'établir si ces mêmes résidus de Ser/Thr peuvent être phosphorylés. Il a été établi qu'il existait une compétition dynamique entre l'ajout d'O-GlcNAc et la phosphorylation, permettant de moduler l'activité de certaines protéines. Cet effet Ying-Yang a été reporté entre autres pour les phosphatases PP1 β et PP1 γ (Wells et al. 2004) et le facteur Oct-2 (Ahmad et al. 2006). Finalement, il nous faudra établir si le DFF40, la portion active du DFF, est aussi sujet à ce type de modification.

En résumé, les travaux réalisés dans le cadre de ce mémoire ont permis de révéler pour la première fois l'implication de l'O-glycosylation dans la régulation de l'apoptose nucléaire. Ce projet de recherche aura également permis de confirmer un résultat secondaire d'une étude précédente démontrant l'O-GlcNAcylation du DFF45. Nos résultats ont démontré que cette modification post-traductionnelle pourrait protéger la protéine de son clivage par la caspase-3 lors de l'apoptose. La fragmentation de l'ADN est une étape clef du processus apoptotique et nos résultats auront démontré qu'une hausse de l'O-GlcNAcylation pourrait offrir aux cellules cancéreuses une protection indésirable lors de la chimiothérapie.

RÉFÉRENCES

- Ahmad, I., D. C. Hoessli, et al. (2006). "Oct-2 DNA binding transcription factor: functional consequences of phosphorylation and glycosylation." Nucleic Acids Research 34(1): 175-184.
- Almuhaideb, A., J. Bomanji, et al. (2011). "18F-FDG PET/CT imaging in oncology." Annals of Saudi Medicine 31(1): 3-13.
- Aub, J. C., C. Tieslau, et al. (1963). "Reactions of normal and tumor cell surfaces to enzymes, I. Wheat-germ lipase and associated mucopolysaccharides." Proc Natl Acad Sci U S A 50(4): 613-619.
- Azmi, A. S., Z. Wang, et al. (2011). "Emerging Bcl-2 inhibitors for the treatment of cancer." Expert Opinion on Emerging Drugs 16(1): 59-70.
- Baron, A. D., J. S. Zhu, et al. (1995). "Glucosamine induces insulin resistance in vivo by affecting GLUT 4 translocation in skeletal muscle. Implications for glucose toxicity." The Journal of Clinical Investigation 96(6): 2792-2801.
- Bayascas, J. R., V. J. Yuste, et al. (2004). "Characterization of splice variants of human caspase-activated DNase with CIDE-N structure and function." FEBS Letters 566(1-3): 234-240.
- Bettermann, K., M. Benesch, et al. (2011). "SUMOylation in carcinogenesis." Cancer Letters(0).
- Blatch, G. L. and M. Lässle (1999). "The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions." BioEssays 21(11): 932-939.
- Blomstrom, D. C., D. Fahey, et al. (1986). "Molecular characterization of the interferon-induced 15-kDa protein. Molecular cloning and nucleotide and amino acid sequence." Journal of Biological Chemistry 261(19): 8811-6.
- Butkinaree, C., W. D. Cheung, et al. (2008). "Characterization of B-N-Acetylglucosaminidase Cleavage by Caspase-3 during Apoptosis." Journal of Biological Chemistry 283(35): 23557-23566.
- Butkinaree, C., K. Park, et al. (2010). "O-linked [beta]-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc): Extensive crosstalk with phosphorylation to regulate signaling and transcription in response to nutrients and stress." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects 1800(2): 96-106.
- Cagnol, S., A. Mansour, et al. (2010). "Raf-1 Activation Prevents Caspase 9 Processing Downstream of Apoptosome Formation." J Signal Transduct 2011;2011:834948.
- Cao, X., L. Fang, et al. (2007). "Glucose uptake inhibitor sensitizes cancer cells to daunorubicin and overcomes drug resistance in hypoxia." Cancer Chemotherapy and Pharmacology 59(4): 495-505.
- Cermelli, S., Y. Guo, et al. (2006). "The Lipid-Droplet Proteome Reveals that Droplets Are a Protein-Storage Depot." Current Biology 16(18): 1783-1795.

- Champattanachai, V., R. B. Marchase, et al. (2007). "Glucosamine protects neonatal cardiomyocytes from ischemia-reperfusion injury via increased protein-associated O-GlcNAc." American Journal of Physiology - Cell Physiology 292(1): C178-C187.
- Champattanachai, V., R. B. Marchase, et al. (2008). "Glucosamine protects neonatal cardiomyocytes from ischemia-reperfusion injury via increased protein O-GlcNAc and increased mitochondrial Bcl-2." American Journal of Physiology - Cell Physiology 294(6): C1509-C1520.
- Chang, D. W., Z. Xing, et al. (2002). "c-FLIPL is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis." EMBO J 21(14): 3704-3714.
- Chen, D., R. A. Stetler, et al. (2000). "Characterization of the Rat DNA Fragmentation Factor 35/Inhibitor of Caspase-activated DNase (Short Form)." Journal of Biological Chemistry 275(49): 38508-38517.
- Cohen, G-N. (2000). "Apoptose en pathologie humaine". Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS, Paris, p.20.
- Cohen, P. (2001). "The role of protein phosphorylation in human health and disease. ." European Journal of Biochemistry 268(19): 5001-5010.
- Comer, F. I., K. Vosseller, et al. (2001). "Characterization of a Mouse Monoclonal Antibody Specific for O-Linked N-Acetylglucosamine." Analytical Biochemistry 293(2): 169-177.
- Comtesse, N., E. Maldener, et al. (2001). "Identification of a Nuclear Variant of MGEA5, a Cytoplasmic Hyaluronidase and a beta-N-Acetylglucosaminidase." Biochemical and Biophysical Research Communications 283(3): 634-640.
- Copeland, R. J., J. W. Bullen, et al. (2008). "Cross-talk between GlcNAcylation and phosphorylation: roles in insulin resistance and glucose toxicity." Am J Physiol Endocrinol Metab 295(1): E17-28.
- Cuadrado, A. and A. R. Nebreda (2010). "Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling " Biochemical Journal 429-3(10.1042/BJ20100323): 403-417.
- Daou, S., N. Mashtalir, et al. (2011). "Crosstalk between O-GlcNAcylation and proteolytic cleavage regulates the host cell factor-1 maturation pathway." Proceedings of the National Academy of Sciences 108(7): 2747-2752.
- Dauphinee, S. M., M. Ma, et al. (2005). "Role of O-linked beta-N-acetylglucosamine modification in the subcellular distribution of alpha4 phosphoprotein and Sp1 in rat lymphoma cells." Journal of Cellular Biochemistry 96(3): 579-588.
- Dephoure, N., C. Zhou, et al. (2008). "A quantitative atlas of mitotic phosphorylation." Proceedings of the National Academy of Sciences 105(31): 10762-10767.
- Desharnais, P., G. Dupéré-Minier, et al. (2008). "Involvement of CD45 in DNA fragmentation in apoptosis induced by mitochondrial perturbing agents." Apoptosis 13(2): 197-212.
- Diaz-Ruiz, R., M. Rigoulet, et al. (2010). "The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics In Press, Corrected Proof.

- Digel, M., R. Ehehalt, et al. (2010). "Lipid droplets lighting up: Insights from live microscopy." FEBS Letters 584(11): 2168-2175.
- Dong, D. L. and G. W. Hart (1994). "Purification and characterization of an O-GlcNAc selective N-acetyl-beta-D-glucosaminidase from rat spleen cytosol." Journal of Biological Chemistry 269(30): 19321-19330.
- Dorfmüller, H. C., V. S. Borodkin, et al. (2006). "GlcNAcstatin : a Picomolar, Selective O-GlcNAcase Inhibitor That Modulates Intracellular O-GlcNAcylation Levels." Journal of the American Chemical Society 128(51): 16484-16485.
- Dorfmüller, H. C., V. S. Borodkin, et al. (2009). "GlcNAcstatins are nanomolar inhibitors of human O-GlcNAcase inducing cellular hyper-O-GlcNAcylation " J Biochemical Journal 420(10.1042/BJ20090110): 221-227.
- Dou, H., C. Huang, et al. (2011). "SUMOylation and de-SUMOylation in response to DNA damage." FEBS Letters 585(18): 2891-2896.
- Dupéré-Minier, G. (2009). Implication du CD45 dans l'apoptose des lymphocytes T. Virologie-Immunologie. Laval, Qc, Canada, INRS-IAF. Ph.D.: 324.
- Dupéré-Minier, G., C. Hamelin, et al. (2004). "Apoptotic volume decrease, pH acidification and chloride channel activation during apoptosis requires CD45 expression in HPB-ALL T cells." Apoptosis 9(5): 543-551.
- Erwig, L. P. and P. M. Henson (2007). "Clearance of apoptotic cells by phagocytes." Cell Death Differ 15(2): 243-250.
- Fülöp, N., Z. Zhang, et al. (2007). "Glucosamine cardioprotection in perfused rat hearts associated with increased O-linked N-acetylglucosamine protein modification and altered p38 activation." American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology 292(5): H2227-H2236.
- Gandy, J. C., A. E. Rountree, et al. (2006). "Akt1 is dynamically modified with O-GlcNAc following treatments with PUGNAc and insulin-like growth factor-1." FEBS Letters 580(13): 3051-3058.
- Gao, Y., L. Wells, et al. (2001). "Dynamic O-Glycosylation of Nuclear and Cytosolic Proteins." Journal of Biological Chemistry 276(13): 9838-9845.
- Giglione, C., A. Boularot, et al. (2004). "Protein N-terminal methionine excision." Cellular and Molecular Life Sciences 61(12): 1455-1474.
- Gilbert, S.F. (2004). "Biologie du développement", 2^{ème} édition, De Boeck Université, Bruxelles. p. 114.
- Goldberg, H., C. Whiteside, et al. (2011). "O-linked Beta-N-acetylglucosamine supports p38 MAPK activation by high glucose in glomerular mesangial cells." American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism 301(4): E713-E726.
- Greis, K. D., B. K. Hayes, et al. (1996). "Selective Detection and Site-Analysis of O-GlcNAc-Modified Glycopeptides by beta-Elimination and Tandem Electrospray Mass Spectrometry." Analytical Biochemistry 234(1): 38-49.
- Gu, J., R.-P. Dong, et al. (1999). "Functional Interaction of DFF35 and DFF45 with Caspase-activated DNA Fragmentation Nuclease DFF40." Journal of Biological Chemistry 274(30): 20759-20762.

- Gu, Y., W. Mi, et al. (2010). "GlcNAcylation Plays an Essential Role in Breast Cancer Metastasis." Cancer Research 70(15): 6344-6351.
- Haas, I. G. (1995). "Protein-mediated protein maturation in eukaryotes." FEBS Letters 369(1): 72-75.
- Haltiwanger, R. S., M. A. Blomberg, et al. (1992). "Glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins. Purification and characterization of a uridine diphospho-N-acetylglucosamine:polypeptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase." Journal of Biological Chemistry 267(13): 9005-9013.
- Haltiwanger, R. S., K. Grove, et al. (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-dglucopyranosylidene)amino-N-phenylcarbamate." Journal of Biological Chemistry 273(6): 3611-3617.
- Hamiel, C., S. Pinto, et al. (2007). "Molecular mechanism of glutamine induction of HSP70 involves activation of the O-linked-N-acetylglucosamine pathway in murine embryonic fibroblast cells." Critical Care 11(Suppl 2): P8.
- Hanover, J. A., S. Yu, et al. (2003). "Mitochondrial and nucleocytoplasmic isoforms of O-linked GlcNAc transferase encoded by a single mammalian gene." Archives of Biochemistry and Biophysics 409(2): 287-297.
- Hardiville, S., E. Hoedt, et al. (2010). "O-GlcNAcylation/Phosphorylation Cycling at Ser10 Controls Both Transcriptional Activity and Stability of Lactoferrin." Journal of Biological Chemistry 285(25): 19205-19218.
- Harreman, M. T., T. M. Kline, et al. (2004). "Regulation of Nuclear Import by Phosphorylation Adjacent to Nuclear Localization Signals." Journal of Biological Chemistry 279(20): 20613-20621.
- Hebert, D. N. and M. Molinari (2007). "In and Out of the ER: Protein Folding, Quality Control, Degradation, and Related Human Diseases." Physiological Reviews 87(4): 1377-1408.
- Heckel, D., N. Comtesse, et al. (1998). "Novel Immunogenic Antigen Homologous to Hyaluronidase in Meningioma." Human Molecular Genetics 7(12): 1859-1872.
- Hetz, C. (2010). "Bcl-2 protein family : essentials regulators of cell death". Landes Biosciences and Springer Science. New-York, p.2-8.
- Horsch, M., L. Hoesch, et al. (1991). "N-Acetylglucosaminono-1,5-lactone oxime and the corresponding (phenylcarbamoyl)oxime." European Journal of Biochemistry 197(3): 815-818.
- Housley, M. P., N. D. Udeshi, et al. (2009). "A PGC-1-Alpha-O-GlcNAc Transferase Complex Regulates FoxO Transcription Factor Activity in Response to Glucose." Journal of Biological Chemistry 284(8): 5148-5157.
- Hsu, P. P., S. A. Kang, et al. (2011). "The mTOR-Regulated Phosphoproteome Reveals a Mechanism of mTORC1-Mediated Inhibition of Growth Factor Signaling." Science 332(6035): 1317-1322.
- Hughes, D., Mehmet, H. (2003). "Cell proliferation and apoptosis". BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford, UK. P.297. Patna, India, p.21.

- Ichijo, H., E. Nishida, et al. (1997). "Induction of Apoptosis by ASK1, a Mammalian MAPKKK That Activates SAPK/JNK and p38 Signaling Pathways." Science 275(5296): 90-94.
- Ikuta, T., Y. Kobayashi, et al. (2004). "Phosphorylation of nuclear localization signal inhibits the ligand-dependent nuclear import of aryl hydrocarbon receptor." Biochemical and Biophysical Research Communications 317(2): 545-550.
- Inohara, N., T. Koseki, et al. (1999). "Identification of Regulatory and Catalytic Domains in the Apoptosis Nuclease DFF40/CAD." Journal of Biological Chemistry 274(1): 270-274.
- Isono, T. (2011). "O-GlcNAc-Specific Antibody CTD110.6 Cross-React with N-(GlcNAc)2-Modified Proteins Induced under Glucose Deprivation." PLoS ONE 6(4): e18959.
- Iwahana, H., I. Yakymovych, et al. (2006). "Glycoproteome profiling of transforming growth factor-beta (TGFbeta) signaling: Nonglycosylated cell death-inducing DFF-like effector A inhibits TGFbeta1-dependent apoptosis." PROTEOMICS 6(23): 6168-6180.
- Jans, D. A. and S. Hubner (1996). "Regulation of protein transport to the nucleus: central role of phosphorylation." Physiological Reviews 76(3): 651-685.
- Jeon, Y. J., H. M. Yoo, et al. (2010). "ISG15 and immune diseases." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease 1802(5): 485-496.
- Jinek, M., J. Rehwinkel, et al. (2004). "The superhelical TPR-repeat domain of O-linked GlcNAc transferase exhibits structural similarities to importin [alpha]." Nat Struct Mol Biol 11(10): 1001-1007.
- Kaneto, H., J. Fujii, et al. (1995). "Apoptotic cell death triggered by nitric oxide in pancreatic beta-cells." Diabetes 44(7): 733-738.
- Kang, E.-S., D. Han, et al. (2008). "O-GlcNAc modulation at Akt1 Ser473 correlates with apoptosis of murine pancreatic [beta] cells." Experimental Cell Research 314(11-12): 2238-2248.
- Karlsson, H. k. K. R., J. R. Zierath, et al. (2005). "Insulin-Stimulated Phosphorylation of the Akt Substrate AS160 Is Impaired in Skeletal Muscle of Type 2 Diabetic Subjects." Diabetes 54(6): 1692-1697.
- Kawauchi, K., K. Araki, et al. (2009). "Loss of p53 enhances catalytic activity of IKK-Beta through O-linked Beta-N-acetyl glucosamine modification." Proceedings of the National Academy of Sciences 106(9): 3431-3436.
- Keembiyehetty, C. N., A. Krzeslak, et al. (2011). "A lipid-droplet-targeted O-GlcNAcase isoform is a key regulator of the proteasome." Journal of Cell Science 124(16): 2851-2860.
- Kelly, W. G., M. E. Dahmus, et al. (1993). "RNA polymerase II is a glycoprotein. Modification of the COOH-terminal domain by O-GlcNAc." Journal of Biological Chemistry 268(14): 10416-10424.
- Kim, E. J., D. O. Kang, et al. (2006). "Enzymatic characterization of O-GlcNAcase isoforms using a fluorogenic GlcNAc substrate." Carbohydrate Research 341(8): 971-982.

- Kim, T.-H., Y. Zhao, et al. (2004). "Bid-Cardiolipin Interaction at Mitochondrial Contact Site Contributes to Mitochondrial Cristae Reorganization and Cytochrome c Release." Molecular Biology of the Cell 15(7): 3061-3072.
- Kreppel, L. K., M. A. Blomberg, et al. (1997). "Dynamic Glycosylation of Nuclear and Cytosolic Proteins." Journal of Biological Chemistry 272(14): 9308-9315.
- Larsen, B. D., S. Rampalli, et al. (2010). "Caspase 3/caspase-activated DNase promote cell differentiation by inducing DNA strand breaks." Proceedings of the National Academy of Sciences 107(9): 4230-4235.
- Lavin, M., Watters, D. (1999) " Signalling pathways in apoptosis". CRC Press. Amsterdam, Pays-Pas. P.36-40.
- Lazarus, B. D., D. C. Love, et al. (2006). "Recombinant O-GlcNAc transferase isoforms: identification of O-GlcNAcase, yes tyrosine kinase, and tau as isoform-specific substrates." Glycobiology 16(5): 415-421.
- Lazarus, B. D., D. C. Love, et al. (2009). "O-GlcNAc cycling: Implications for neurodegenerative disorders." The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 41(11): 2134-2146.
- Lazarus, B. D., M. D. Roos, et al. (2005). "Mutational Analysis of the Catalytic Domain of O-Linked N-Acetylglucosaminyl Transferase." Journal of Biological Chemistry 280(42): 35537-35544.
- Lazarus, M. B., Y. Nam, et al. (2011). "Structure of human O-GlcNAc transferase and its complex with a peptide substrate." Nature 469(7331): 564-567.
- Lechardeur, D., D. Dougaparsad, et al. (2005). "Oligomerization State of the DNA Fragmentation Factor in Normal and Apoptotic Cells." The Journal of Biological Chemistry 280(48): 40216-40225.
- Leduc, R., S. S. Molloy, et al. (1992). "Activation of human furin precursor processing endoprotease occurs by an intramolecular autoproteolytic cleavage." Journal of Biological Chemistry 267(20): 14304-14308.
- Lefebvre, T., N. Planque, et al. (2002). "O-glycosylation of the nuclear forms of Pax-6 products in quail neuroretina cells." Journal of Cellular Biochemistry 85(1): 208-218.
- Lehman, D. M., D.-J. Fu, et al. (2005). "A Single Nucleotide Polymorphism in MGEA5 Encoding O-GlcNAc-selective N-Acetyl-Beta-d-glucosaminidase Is associated With Type 2 Diabetes in Mexican Americans." Diabetes 54(4): 1214-1221.
- Leslie, R. D. G. and R. M. Cohen (2009). "Biologic Variability in Plasma Glucose, Hemoglobin A1c, and Advanced Glycation End Products Associated with Diabetes Complications." J Diabetes Sci Technol. 3(4): 635–643.
- Lim, K. and H.-I. Chang (2010). "Elevated O-Linked N-Acetylglucosamine Correlated with Reduced Sp1 Cooperative DNA Binding with Its Collaborating Factors in Vivo." Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 74(8): 1668-1672.
- Lin, L., S. Park, et al. (2009). "RAGE signaling in inflammation and arterial aging." Front Biosci 14: 1403–1413.
- Liu, J., R. B. Marchase, et al. (2007). "Increased O-GlcNAc levels during reperfusion lead to improved functional recovery and reduced calpain proteolysis." American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology 293(3): H1391-H1399.

- Liu, K., A. J. Paterson, et al. (2000). "Glucose stimulates protein modification by O-linked GlcNAc in pancreatic beta cells: Linkage of O-linked GlcNAc to beta cell death." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97(6): 2820-2825.
- Liu, Q.-L., H. Kishi, et al. (2003). "Heat shock protein 70 binds caspase-activated DNase and enhances its activity in TCR-stimulated T cells." Blood 102(5): 1788-1796.
- Liu, X., P. Li, et al. (1998). "The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95(15): 8461-8466.
- Liu, X., H. Zou, et al. (1997). "DFF, a Heterodimeric Protein That Functions Downstream of Caspase-3 to Trigger DNA Fragmentation during Apoptosis." Cell 89(2): 175-184.
- Londos, C., D. L. Brasaemle, et al. (1999). "Perilipins, ADRP, and other proteins that associate with intracellular neutral lipid droplets in animal cells." Seminars in Cell & Developmental Biology 10(1): 51-58.
- Los, M., Gibson, S.B. (2005). "Apoptotic pathways as targets for novel therapies in cancer and other diseases". Springer Science + Business Media, New-York, USA, p.8.
- Lu, C., F. Zhu, et al. (2006). "Cell Apoptosis: Requirement of H2AX in DNA Ladder Formation but not for the Activation of Caspase-3." Mol Cell. 23(1): 121-13.
- Lubas, W. A. and J. A. Hanover (2000). "Functional Expression of O-linked GlcNAc Transferase." Journal of Biological Chemistry 275(15): 10983-10988.
- Macauley, M. S. and D. J. Vocadlo (2009). "Increasing O-GlcNAc levels: An overview of small-molecule inhibitors of O-GlcNAcase." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects 1800(2): 107-121.
- Macauley, M. S., G. E. Whitworth, et al. (2005). "O-GlcNAcase Uses Substrate-assisted Catalysis." Journal of Biological Chemistry 280(27): 25313-25322.
- Maillard, L. C. (1913). "Genèse des matières protéiques et des matières humides : action de la glycérine et des sucres sur les acides aminés." Masson et Cie, éditeurs. Libraires de l'académie de médecine. Paris, France, p.10-25.
- Malakhova, O. A., M. Yan, et al. (2003). "Protein ISGylation modulates the JAK-STAT signaling pathway." Genes & Development 17(4): 455-460.
- Marshall, S., V. Bacote, et al. (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." Journal of Biological Chemistry 266(8): 4706-4712.
- Mayer, G., G. Boileau, et al. (2004). "The proprotein convertase furin colocalizes with caveolin-1 in the Golgi apparatus and endosomes of hepatocytes." Cell and Tissue Research 316(1): 55-63.
- Mazzitelli, S., P. Xu, et al. (2011). "The Loss of c-Jun N-Terminal Protein Kinase Activity Prevents the Amyloidogenic Cleavage of Amyloid Precursor Protein and the Formation of Amyloid Plaques In Vivo." The Journal of Neuroscience 31(47): 16969-16976.

- McCarty, J. S., S. Y. Toh, et al. (1999). "Multiple Domains of DFF45 Bind Synergistically to DFF40: Roles of Caspase Cleavage and Sequestration of Activator Domain of DFF40." Biochemical and Biophysical Research Communications 264(1): 181-185.
- Mi, W., Y. Gu, et al. (2010). "O-GlcNAcylation is a novel regulator of lung and colon cancer malignancy." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease 1812(4): 514-519.
- Min, W., Y. Lin, et al. (2008). "AIP1 Recruits Phosphatase PP2A to ASK1 in Tumor Necrosis Factor-Induced ASK1-JNK Activation." Circulation Research 102(7): 840-848.
- Monsigny, M., A.-C. Roche, et al. (1980). "Sugar-Lectin Interactions: How Does Wheat-Germ Agglutinin Bind Sialoglycoconjugates?" European Journal of Biochemistry 104(1): 147-153.
- Mora, A. L., R. A. Corn, et al. (2003). "Antiapoptotic function of NF- κ B in T lymphocytes is influenced by their differentiation status: roles of Fas, c-FLIP, and Bcl-xL." Cell Death Differ 10(9): 1032-1044.
- Moussard, C. (2006). Biochimie structurale et métabolique. Paris.
- Nagata, S., H. Nagase, et al. (2003). "Degradation of chromosomal DNA during apoptosis." Cell Death Differ 10(1): 108-116.
- Nanashima, N., J. Asano, et al. (2005). "Nuclear Localization of STAT5A Modified with O-Linked N-Acetylglucosamine and Early Involution in the Mammary Gland of Hirosaki Hairless Rat." Journal of Biological Chemistry 280(52): 43010-43016.
- Nandi, A., R. Sprung, et al. (2005). "Global Identification of O-GlcNAc-Modified Proteins." Analytical Chemistry 78(2): 452-458.
- Neeper, M., A. M. Schmidt, et al. (1992). "Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins." Journal of Biological Chemistry 267(21): 14998-5004.
- Neimanis, S., W. Albig, et al. (2007). "Sequence Elements in Both Subunits of the DNA Fragmentation Factor Are Essential for Its Nuclear Transport." Journal of Biological Chemistry 282(49): 35821-35830.
- Ngoh, G. A., L. J. Watson, et al. (2008). "Non-canonical glycosyltransferase modulates post-hypoxic cardiac myocyte death and mitochondrial permeability transition." Journal of Molecular and Cellular Cardiology 45(2): 313-325.
- Nursten, H. (2005). "The Maillard reaction: chemistry, biochemistry, and implications." Royal Society of Chemistry.
- O'Donnell, N., N. E. Zachara, et al. (2004). "Ogt-Dependent X-Chromosome-Linked Protein Glycosylation Is a Requisite Modification in Somatic Cell Function and Embryo Viability." Mol. Cell. Biol. 24(4): 1680-1690.
- Oberhammer, F., J. W. Wilson, et al. (1993). "Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation." EMBO J. 12(9): 3679-3684.

- Olsen, J. V., M. Vermeulen, et al. (2010). "Quantitative Phosphoproteomics Reveals Widespread Full Phosphorylation Site Occupancy During Mitosis." Sci. Signal. 3(104): ra3-.
- Özcan, S., S. S. Andrali, et al. (2010). "Modulation of transcription factor function by O-GlcNAc modification." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms 1799(5-6): 353-364.
- Phatnani, H. P. and A. L. Greenleaf (2006). "Phosphorylation and functions of the RNA polymerase II CTD." Genes & Development 20(21): 2922-2936.
- Pickart, C. M. (2004). "Back to the Future with Ubiquitin." Cell 116(2): 181-190.
- Pineda, G., C.-K. Ea, et al. (2007). "Ubiquitination and TRAF signaling TNF Receptor Associated Factors (TRAFs)". Springer New York. 597: 80-92.
- Robinson, K. A., L. E. Ball, et al. (2007). "Reduction of O-GlcNAc protein modification does not prevent insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes." American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism 292(3): E884-E890.
- Rodés, J. (2007). "Textbook of hepatology. From basic science to clinical practice. 3rd edition. Blackwell Publishing. Malden, Ma, USA. P.335.
- Roquemore, E. P., A. Dell, et al. (1992). "Vertebrate lens alpha-crystallins are modified by O-linked N-acetylglucosamine." Journal of Biological Chemistry 267(1): 555-563.
- Ross, C. A. and M. A. Poirier (2004). "Protein aggregation and neurodegenerative disease." Nature medicine 10: S10-S17.
- Rossetti, L., M. Hawkins, et al. (1995). "In vivo glucosamine infusion induces insulin resistance in normoglycemic but not in hyperglycemic conscious rats." The Journal of Clinical Investigation 96(1): 132-140.
- Roux, P. P. and J. Blenis (2004). "ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions." Microbiology and Molecular Biology Reviews 68(2): 320-344.
- Sakabe, K., Z. Wang, et al. (2011). "Beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) is part of the histone code." Proceedings of the National Academy of Sciences 107(46): 19915-19920.
- Sakahira, H. and S. Nagata (2002). "Co-translational Folding of Caspase-activated DNase with Hsp70, Hsp40, and Inhibitor of Caspase-activated DNase." Journal of Biological Chemistry 277(5): 3364-3370.
- Salvesen, G. S. and S. J. Riedl (2007). Caspase Mechanisms Programmed Cell Death in Cancer Progression and Therapy, Springer Netherlands. 615: 13-23.
- Sinha, J.K., Bhattacharaya, S. (2006). "A text book of immunology". Academic Publishers, Kolkata, India, p.476.
- Sinha, R.K. (2004). "Modern plant physiology". Alpha Science International. Patna, India.

- Scorrano, L., M. Ashiya, et al. (2002). "A Distinct Pathway Remodels Mitochondrial Cristae and Mobilizes Cytochrome c during Apoptosis." Developmental Cell 2(1): 55-67.
- Sell, D. R. and V. M. Monnier (2011). "Molecular Basis of Arterial Stiffening: Role of Glycation." Gerontology DOI: 10.1159/00033466.
- Shimada, H., K.-I. Hirai, et al. (2009). "Paraquat Toxicity Induced by Voltage-dependent Anion Channel 1 Acts as an NADH-dependent Oxidoreductase." Journal of Biological Chemistry 284(42): 28642-28649.
- Slawson, C. and G. W. Hart (2011). "O-GlcNAc signalling: implications for cancer cell biology." Nat Rev Cancer 11(9): 678-684.
- Song, M., H.-S. Kim, et al. (2008). "O-GlcNAc transferase is activated by CaMKIV-dependent phosphorylation under potassium chloride-induced depolarization in NG-108-15 cells." Cellular Signalling 20(1): 94-104.
- Soussi, T. and C. Beroud (2001). "Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome." Nat Rev Cancer 1(3): 233-239.
- Suzuki, K. and H. Matsubara (2010). "Recent Advances in p53 Research and Cancer Treatment." Journal of Biomedicine and Biotechnology 2011.
- Symons, A., S. Beinke, et al. (2006). "MAP kinase kinases and innate immunity." Trends in Immunology 27(1): 40-48.
- Szegezdi, E., S. E. Logue, et al. (2006). "Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis." EMBO Rep 7(9): 880-885.
- Tessier, F. J. (2011). "The Maillard reaction in the human body. The main discoveries and factors that affect glycation." Pathologie Biologie 58(3): 214-219.
- Toleman, C., A. J. Paterson, et al. (2006). "Streptozotocin inhibits O-GlcNAcase via the production of a transition state analog." Biochemical and Biophysical Research Communications 340(2): 526-534.
- Toleman, C., A. J. Paterson, et al. (2004). "Characterization of the Histone Acetyltransferase (HAT) Domain of a Bifunctional Protein with Activable O-GlcNAcase and HAT Activities." Journal of Biological Chemistry 279(51): 53665-53673.
- Torres, C. R. and G. W. Hart (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(5): 3308-3317.
- Turk, J., J. A. Corbett, et al. (1993). "Biochemical Evidence for Nitric Oxide Formation from Streptozotocin in Isolated Pancreatic Islets." Biochemical and Biophysical Research Communications 197(3): 1458-1464.
- Varfolomeev, E., T. Goncharov, et al. (2008). "c-IAP1 and c-IAP2 Are Critical Mediators of Tumor Necrosis Factor α (TNF α induced NF-Kappa B Activation." Journal of Biological Chemistry 283(36): 24295-24299.
- Varfolomeev, E. E. and A. Ashkenazi (2004). "Tumor Necrosis Factor: An Apoptosis JuNKie?" Cell 116(4): 491-497.

- Vasquez-Nin, G.H., Escobar, M.L., De Felici, M., Echeverria, O.M., Klinger, F.G. (2010). "Cell death in mammalian ovary". Éditions Springer, Rome, Italie. P.71.
- Voet, D. and J. G. Voet (2005). "Biochimie, 3^{ème} édition". De Boeck supérieur. Bruxelles, Belgique.

- Vosseller, K., L. Wells, et al. (2002). "Elevated nucleocytoplasmic glycosylation by O-GlcNAc results in insulin resistance associated with defects in Akt activation in 3T3-L1 adipocytes." Proceedings of the National Academy of Sciences 99(8): 5313-5318.
- Walsh, C. (2006). "Posttranslational modification of proteins: expanding nature's inventory." Roberts and Company Publishers.
- Wang, Z., A. Pandey, et al. (2007). "Dynamic Interplay between O-Linked N-Acetylglucosaminylation and Glycogen Synthase Kinase-3-dependent Phosphorylation." Molecular & Cellular Proteomics 6(8): 1365-1379.
- Warburg, O., S. Weinhouse, et al. (1956). "On Respiratory Impairment in Cancer Cells." Science 124(3215): 267-272.
- Wells, L., Y. Gao, et al. (2002). "Dynamic O-Glycosylation of Nuclear and Cytosolic Proteins." Journal of Biological Chemistry 277(3): 1755-1761.
- Wells, L., L. K. Kreppel, et al. (2004). "O-GlcNAc Transferase Is in a Functional Complex with Protein Phosphatase 1 Catalytic Subunits." Journal of Biological Chemistry 279(37): 38466-38470.
- Welte, M. A. (2007). "Proteins under new management: lipid droplets deliver." Trends in Cell Biology 17(8): 363-369.
- Widlak, P. and W. Garrard (2006). "The apoptotic endonuclease DFF40/CAD is inhibited by RNA, heparin and other polyanions." Apoptosis 11(8): 1331-1337.
- Widlak, P. and W. Garrard (2009). "Roles of the Major Apoptotic Nuclease-DNA Fragmentation Factor-in Biology and Disease." Cellular and Molecular Life Sciences 66(2): 263-274.
- Widlak, P. and W. T. Garrard (2001). "Ionic and cofactor requirements for the activity of the apoptotic endonuclease DFF40/CAD." Molecular and Cellular Biochemistry 218(1): 125-130.
- Widlak, P., M. Kalinowska, et al. (2005). "The Histone H1 C-Terminal Domain Binds to the Apoptotic Nuclease, DNA Fragmentation Factor (DFF40/CAD) and Stimulates DNA Cleavage" Biochemistry 44(21): 7871-7878.
- Widlak, P., P. Li, et al. (2000). "Cleavage Preferences of the Apoptotic Endonuclease DFF40 (Caspase-activated DNase or Nuclease) on Naked DNA and Chromatin Substrates." Journal of Biological Chemistry 275(11): 8226-8232.
- Wilson, N. S., V. Dixit, et al. (2009). "Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks." Nat Immunol 10(4): 348-355.
- Wilson, V. G. (2010). "SUMO Regulation of Cellular Processes." Springer.
- Xing, D., K. Gong, et al. (2011). "O-GlcNAc Modification of NF-kappaB p65 Inhibits TNF-beta-Induced Inflammatory Mediator Expression in Rat Aortic Smooth Muscle Cells." PLoS ONE 6(8): e24021.
- Xu, C., B. Bailly-Maitre, et al. (2005). "Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions." The Journal of Clinical Investigation 115(10): 2656-2664.

- Yang, W., E. Tiffany-Castiglioni, et al. (2009). "Paraquat activates the IRE1/ASK1/JNK cascade associated with apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells." Toxicology Letters In Press, Corrected Proof.
- Yang, W. H., J. E. Kim, et al. (2006). "Modification of p53 with O-linked N-acetylglucosamine regulates p53 activity and stability." Nat Cell Biol 8(10): 1074-1083.
- Yang, W. H., S. Y. Park, et al. (2008). "NFkappaB activation is associated with its O-GlcNAcylation state under hyperglycemic conditions." Proceedings of the National Academy of Sciences 105(45): 17345-17350.
- Yang, X., F. Zhang, et al. (2002). "Recruitment of O-GlcNAc Transferase to Promoters by Corepressor mSin3A: Coupling Protein O-GlcNAcylation to Transcriptional Repression." Cell 110(1): 69-80.
- Yao, D., T. Taguchi, et al. (2007). "High Glucose Increases Angiopoietin-2 Transcription in Microvascular Endothelial Cells through Methylglyoxal Modification of mSin3A." Journal of Biological Chemistry 282(42): 31038-31045.
- Yuasa, T., S. Ohno, et al. (1998). "Tumor Necrosis Factor Signaling to Stress-activated Protein Kinase (SAPK)/Jun NH2-terminal Kinase (JNK) and p38." Journal of Biological Chemistry 273(35): 22681-22692.
- Yuzwa, S. A., M. S. Macauley, et al. (2008). "A potent mechanism-inspired O-GlcNAcase inhibitor that blocks phosphorylation of tau in vivo." Nat Chem Biol 4(8): 483-490.
- Zachara, N., K. Vosseller, et al. (2011). "Detection and analysis of proteins modified by o-linked N-acetylglucosamine." Curr Protoc Protein Sci. 66:12.8.1-12.8.33.
- Zachara, N. E., N. O'Donnell, et al. (2004). "Dynamic O-GlcNAc Modification of Nucleocytoplasmic Proteins in Response to Stress." Journal of Biological Chemistry 279(29): 30133-30142.
- Zhou, P., A. A. Lugovskoy, et al. (2001). "Solution structure of DFF40 and DFF45 N-terminal domain complex and mutual chaperone activity of DFF40 and DFF45." Proceedings of the National Academy of Sciences 98(11): 6051-6055.