Université de Lille – Sciences et Technologies Ecole Doctorale Biologie-Santé (ED 446)

Thèse de doctorat d'Université

Présentée par

# **Steffi BALDINI**

En vue de l'obtention du grade de

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

Régulation des propriétés de deux enzymes clefs du métabolisme glucido-

lipidique hépatique, la GlucoKinase et la Fatty Acid Synthase par

O-GlcNAcylation au cours de la lipogenèse et de la prolifération cellulaire.

Soutenue publiquement le 10 Novembre 2016 devant le jury composé de :

Rapporteurs : Dr. Catherine Postic

Pr. Christelle Breton

- Examinateurs : Pr. Annick Pierce Pr. Edgar Zenteno Pr. Stéphane Vincent Dr. Philippe Lefebvre
  - Pr. Didier Vieau

Directeur de thèse : Pr. Tony Lefebvre

« La vie, c'est comme une bicyclette, il

faut avancer pour ne pas perdre l'équilibre. »

Albert Einstein

 $\dot{A}$  mes grands-parents  ${\rm et}$  mes parents

qui m'ont appris à faire de la bicyclette...



Tout d'abord, un grand merci aux directeurs successifs de l'Unité le **Dr. Jean-Claude Michalski** et **Pr. Christophe D'Hulst** de m'avoir accueillie au sein de l'UGSF.

J'adresse toute ma gratitude au **Pr. Annick Pierce** qui me fait l'honneur de présider ma thèse. Merci également au **Dr**. **Catherine Postic** et au **Pr. Christelle Breton** d'accepter d'être mes rapportrices. Je remercie aussi le **Pr. Edgar Zenteno**, le **Pr. Stéphane Vincent**, le **Dr. Philippe Lefebvre** et le **Pr. Didier Vieau** d'avoir accepté d'examiner ce travail de thèse. Plus particulièrement, merci au Dr. Catherine Postic et au Pr. Didier Vieau de m'avoir apporté tous vos précieux conseils lors de mes deux comités de suivi de thèse.

Un immense merci à mon directeur de thèse, le **Pr. Tony Lefebvre**. Ces 4 années à vos côtés ont été pour moi une véritable chance et surtout un grand apprentissage. Votre encadrement et votre passion pour la recherche m'ont toujours permis d'avancer et de rebondir suite aux difficultés qui ont pu se présenter.

Merci d'avoir accepté de reprendre les rênes de ma thèse et d'avoir toujours été là pour m'écouter et me soutenir tant sur le plan professionnel que personnel. Vous avez réussi à m'inculquer énormément de choses et à sortir le meilleur de moi-même. Ce n'était pas gagné mais on a tout de même réussi à la finir ! Merci de m'avoir envoyée à de nombreux congrès afin de présenter nos travaux. Ces présentations aux quatre coins du globe nous ont fait grandir moi et mon CV (comme vous le dites toujours, c'est très important). Et enfin, merci pour l'ambiance que vous faites régner dans cette super équipe, votre bonne humeur quotidienne et vos petites blagues (pas toujours très drôles) vont me manquer. Et promis un jour je vous tutoierai !!

**Céline**, je tenais également à vous remercier pour les deux années passées ensemble. Vous avez cru en moi et avez toujours été disponible notamment lors du concours pour la bourse de thèse. Les corrections du mémoire, les répétitions et questions à n'en plus finir m'ont permis de décrocher ce concours et d'avoir la chance d'effectuer une thèse. Merci de m'avoir inculqué tout votre savoir-faire ainsi que votre passion pour le métabolisme.

Je remercie également tous les membres de mon équipe, sans qui ces années au C9 n'auraient pas été aussi agréables.

**Annick**, merci pour votre oreille attentive lors des déjeuners au coin repas. Je me souviendrai toujours de vos petits sourires lorsque nous racontions nos soirées où l'on « mange liquide ».

**Anne-Sophie** et **Ikram**, un grand merci pour votre disponibilité à toute épreuve. Vous avez toujours été là quand j'en avais besoin. Merci de votre soutien qui m'a permis d'avancer et d'accomplir ce travail !!

**Marlène**, un grand merci pour ta gentillesse, pour les longues conversations le matin très tôt, pour ta disponibilité et ta grande connaissance sur tous les types cellulaires existants !! La petite sonnerie de ton portable va me manquer.

**Agata**, merci pour les congrès que nous avons partagés ensemble et pour toutes les discussions scientifiques ou non que nous avons pu avoir dans le bureau. Tu es toujours de bons conseils et prête à aider quand j'en ai eu besoin.

**Moyira**, tu ne devais rester que 6 mois et te voilà parmi nous pour finir ta thèse. Quel bonheur !! Tu es définitivement notre rayon de soleil. Une journée sans ton rire au laboratoire est vraiment triste (mais ça va !!). Enfin, merci d'avoir repris le sujet sur chlamy qui va donner lieu à au moins 1 000 publications ;).

Ninon, cette année n'était pas facile pour toi et pourtant tu as géré le stress et la pression comme une pro !! Tu as vraiment beaucoup d'avenir dans le métier. Je te souhaite une bonne thèse (mais je suis convaincue qu'elle le sera). En tout cas, merci pour toutes ces questions que tu me poses sans arrêt et qui n'ont fait qu'accroître ma curiosité et mes connaissances sur la *O*-GlcNAc. En dehors du travail, nous avons également passé beaucoup de temps ensemble et appris à nous connaitre et nous apprécier. Merci à **Bryan** et toi pour tous ces supers moments passés ensemble. Les apéros, repas et chansons à n'en plus finir sont toujours des moments au top et m'ont permis de décompresser quand il le fallait (vivement votre mariage ©).

Et pour finir **Maïté**, ta réussite au concours grâce à ta passion pour ton sujet et pour la recherche t'a permis de décrocher une bourse de thèse. A cet instant, nous nous sommes rapprochées chaque jour un peu plus et maintenant une belle amitié est née. Tu as suivi de très près toutes les joies et les moments un peu plus sombres de ma thèse et as toujours su m'épauler en restant près de moi (d'ailleurs il reste des glaces dans mon congélo...) Merci pour les soirées gaufres que nous avons partagées, et qui étaient en réalité de longs moments de

discussions, à échanger et à refaire le monde. Merci pour ces instants que je ne suis pas prête d'oublier !!

Merci également aux anciens membres de l'équipe : **Anne-Marie**, ma première année au labo à côté de votre bureau nous a permis, au fil du temps, de nouer un véritable lien. Jusqu'au bout, vous avez été d'une aide sans faille pour l'obtention de mes mutants et ça y est nous y sommes arrivées !! Merci également d'avoir partagé avec moi votre passion pour les voyages (j'adorais vraiment les sessions photos que l'on pouvait avoir ensemble et vos conseils quant à mes prochaines destinations).

**Nao**, merci pour tes connaissances incroyables dans le domaine de la spectrométrie de masse qui nous permettront, j'en suis convaincue, de déterminer un jour les sites de *O*-GlcNAcylation de ma FAS chérie. Merci aussi pour ta bonne humeur !!

Vaness, je ne sais pas où j'en serais aujourd'hui si tu n'avais pas été là lors de mon master 2 et au début de ma thèse. Je me souviendrai toujours de notre première rencontre. Je répétais mon oral de master 1 et j'ai vite compris que ton air froid n'était qu'une façade et que tu étais en réalité une personne très chaleureuse et sur qui j'ai toujours pu compter. Quel bonheur de t'avoir eue avec moi dans le bureau pendant un an !! Merci pour tes critiques très enrichissantes sur mes résultats et tes conseils avisés sur les contrôles à réaliser ou d'autres manips à faire. J'ai compris que ce sont ces précieux conseils qui m'ont fait grandir, réfléchir et acquérir les bonnes bases pour le métier de chercheur !! De plus, ta passion et ton acharnement sans faille pour faire le métier de tes rêves sont un vrai exemple pour moi !!

Merci à tous les autres membres de l'unité qui m'ont aidée de près ou de loin à réaliser mon travail de thèse. Et oui, le C9 est une grande famille et il y a toujours quelqu'un pour vous dépanner et vous écouter et pour ça merci à tout le monde.

Merci à **Reyna et Humberto** de m'avoir ouvert la porte de leur maison mais également de leur équipe de recherche lors de mon stage au Mexique. Vous êtes des gens exceptionnels au grand cœur que je n'oublierai jamais.

Merci également à tous les doctorants de mon année avec qui j'ai partagé le master (avec un pot des M2 dont on se souviendra encore longtemps) et les 3 années de thèse : **Thomas** (alias ma petite coquillette), **Maxou, Eudoxie** et plus particulièrement Derifa et Cindy.

**Derifa**, nous avons toujours été très proches et j'étais plus que ravie de partager toutes ces années avec toi. Heureusement que tu étais là pour nous rappeler les paperasses administratives à faire en temps et en heure. Merci pour tous tes petits messages de soutien mais également pour nos soirées couscous et tajine que je ne suis pas prête d'oublier. J'attends d'ailleurs que tu m'inculques tes petits secrets de ces recettes !! Je tiens beaucoup à toi.

**Cindy**, qu'aurais-je fait sans toi lors de toutes ces années. Nous avons été si proches que nous vivions presque ensemble. Deux à trois soirs par semaine, le weekend on trouvait toujours un prétexte pour passer du temps ensemble, discuter, s'amuser (boire de la vodka perrier ou eau du robinet quand il n'y avait plus de perrier ;)), se soutenir !! Merci pour tous ces moments gravés dans mon cœur pour toujours.

Merci également à tous les anciens et nouveaux thésards avec qui j'ai passé des soirées inoubliables et plus particulièrement, **Anne-Sophie**, **Pierre**, **Jorick**, **Florent**, **Charles**, **Maxence**, **Sven**, **Pierre**-André, Mattis, Sylvain et tous ceux que j'oublie certainement...

En dehors du labo (et oui, nous, petits thésards, arrivons tout de même à avoir une vie sociale en dehors du labo), je tiens à remercier le groupe des p'tits potes et, en particulier, **Madeline**, **Aurélien** ou Raymond pour les intimes, **Manon**, **Mathieu**, Thomas et Mathilde. Merci pour les petits weekends et soirées passés ensemble.

Thomas et Mathilde, merci pour les soirées géocaching où nous passons toujours de bons moments (on le trouvera ce cache à la porte de Paris !!), les weekends jeux, les soirées soles meunières (souvent enfarinées), les soirées films filles/garçons. Bref vous m'avez permis de m'évader et de penser à autre chose quand le moral n'était pas au beau fixe !! Un merci plus particulier à Mathilde. Nous avons appris à nous connaitre petit à petit pour finalement se rendre compte que nous avons énormément de choses en commun. Merci pour toutes ces discussions sur nos façons d'être, de penser et de voir les choses !! Elles m'ont fait beaucoup de bien !! Ne change surtout pas.

Cette thèse n'aurait sans doute pas été la même sans mes copines chéries !!

**Ma Karinou**, voilà près de 4 ans que l'on se connait !! On en a passé des soirées ensemble à écumer les rues de Lille et à se sentir libres et sans contraintes !! Qu'est-ce que ça fait du bien

de s'évader un peu !! Tu as toujours été là pour moi même lorsque tu es partie à Norwich. Le temps est passé et te voilà revenue un an plus tard et maintenant maman !! Comme je suis contente pour toi !! Tu m'as aidée jusqu'à la fin de la thèse avec la relecture de bout en bout de mon manuscrit !!

Alex, je ne me souviens plus le nombre d'années depuis notre première rencontre (mais comme on dit quand on aime on ne compte pas <sup>(i)</sup>). On en a traversé des choses ensemble, des choses merveilleuses et des coups durs mais peu importe le moment tu as toujours été là pour moi, même au beau milieu de la nuit !! Tu es mon repère et une amie en or !! Et de toute façon, pas besoin de ces remerciements pour te dire tout ce que je pense de toi, tu le sais...

Ma Jeannounette, avec toi aussi quelle histoire d'amour !! Cette thèse m'a permis de te rencontrer et quel bonheur !! Les moments au labo passés en ta compagnie ont été les meilleures années de ma thèse, l'ascenseur entre les paillasses, les chansons en salle de culture, les petits mots doux sur les boites de Pétri, les roulés boulés devant les portes de labo, les courses de chaises dans les couloirs, les apéros labos (mais chut) jusqu'à pas d'heure et j'en passe !! Tu as quitté le labo mais ce n'est pas pour autant qu'on ne se voit plus. Nos liens s'en sont même renforcés. Nous avons nos fameux mercredis soirs immanquables où l'on peut se confier et discuter de choses et d'autres et bien sûr les vendredis « sorties » !! Tu sais ce que je pense de toi, tu es très chère à mes yeux, je t'aime tout simplement....

Un grand merci aussi à toute ma **famille et belle-famille**. Comme on dit on ne choisit pas sa famille mais même si j'avais choisi je n'aurais jamais eu mieux que vous !! Quel bonheur d'avoir une famille si unie. Merci d'être dans ma vie !!

Un merci tout particulier à ma marraine, mon oncle et mes grands-parents. Et non Pépé Mémé, je ne serai jamais médecin et je ne pourrai jamais vous prescrire vos médicaments... Même si vous ne comprenez pas toujours ce que je fais, vous m'avez toujours soutenu !! **Mémé** je me souviendrai toujours de ces après-midis à chanter du Mike Brant ou du Frank Michael ensemble ce qui me faisait totalement déconnecter du travail. Et **Pépé** merci pour tes merveilleux petits plats qui ont toujours eu le don de me remonter le moral et bien sûr de me faire oublier les plats du RU... Un énorme merci à **mon frère et ma belle-sœur**, merci pour ces fameux weekends au Havre où nous avions toujours, entre deux fous rires, de grandes discussions sur mon avenir, vous m'avez toujours rassurée sur la thèse et réconfortée dans les moments de doute. Merci également d'avoir agrandi la famille avec l'arrivée de deux petites filles magnifiques (merci d'ailleurs de m'avoir fait l'honneur d'être marraine même si ça n'a pas été facile...). Je vous aime fort et merci d'être là tout simplement d'autant plus que maintenant nous sommes voisins.

Pour finir, je tiens à remercier **mes parents** sans qui je n'en serais pas là. Merci d'être là, de me soutenir, de me pousser toujours plus haut et de faire de moi ce que je suis aujourd'hui. Ça n'a pas toujours été facile mais vous avez tenu bon et avez réussi à m'inculquer une éducation dont je suis tellement fière... Vous êtes des parents exceptionnels !! Mon objectif serait un jour de vous ressembler, vous êtes un véritable exemple pour moi et je ne sais même pas retranscrire l'amour que je vous porte ! Je suis fière de vous avoir en tant que parents et surtout fière d'être votre fille. Merci pour tout, je vous aime !!

Enfin, le meilleur pour la fin : **mon amoureux**. Je sais que tu n'aimes pas trop que l'on étale ses sentiments en public mais je ne peux m'en empêcher, c'est plus fort que moi, tu me connais. Nos débuts n'ont pas été faciles mais qu'est-ce que ça valait le coup !! Je n'aurais sans doute pas réussi à traverser toute cette thèse sans toi !! Tu as été une épaule très solide et d'un soutien dont tu n'imagines même pas la portée. On m'a demandé il n'y a pas longtemps quelle était la plus belle preuve d'amour que tu m'avais faite et j'ai répondu que la plus belle preuve était que tu sois là constamment pour moi dans les bons comme les mauvais moments et Dieu sait qu'il y en a eu ces derniers temps !! Ces derniers mois n'ont pas été faciles et tu m'as toujours répété qu'il fallait que je sois forte, que la vie était ainsi mais qu'il ne fallait jamais se laisser aller car on arriverait toujours à ses fins avec assez de volonté. Merci pour tout, tu sais tout ce que je pense de toi, je t'aime et je sais que le meilleur reste à venir...

Avant-propos

Cette thèse de doctorat a été réalisée au sein de l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UGSF) à Villeneuve d'Ascq sous la direction du Pr. Tony Lefebvre. Cette thèse a été financée par l'Université Lille 1 et la Région Nord-Pas-De-Calais et a fait l'objet de publications, de communications orales et par affiche présentées ci-dessous :

#### **Publications**

**Baldini, S.F**., and Lefebvre, T. (2016). O-GlcNAcylation and the Metabolic Shift in High-Proliferating Cells: All the Evidence Suggests that Sugars Dictate the Flux of Lipid Biogenesis in Tumor Processes. Front. Oncol. *6:6.* 

**Baldini, S.F.**, Wavelet, C., Hainault, I., Guinez, C., and Lefebvre, T. (2016). The Nutrient-Dependent O-GlcNAc Modification Controls the Expression of Liver Fatty Acid Synthase. J. Mol. Biol. *428*, 3295-3304.

**Baldini, S.F.,** Steenackers, A., Olivier-Van Stichelen, S., Mir, A.-M., Mortuaire, M., Lefebvre, T., and Guinez, C. (2016). Glucokinase expression is regulated by glucose through O-GlcNAc glycosylation. Biochem. Biophys. Res. Commun. *478*, 942-948.

Steenackers, A., Olivier-Van Stichelen, S., **Baldini, S.F.**, Dehennaut, V., Toillon, R.-A., Le Bourhis, X., El Yazidi-Belkoura, I., and Lefebvre, T. (2016). Silencing the Nucleocytoplasmic O-GlcNAc Transferase Reduces Proliferation, Adhesion, and Migration of Cancer and Fetal Human Colon Cell Lines. Front. Endocrinol. *7*, 46.

Vercoutter-Edouart, A.-S., Yazidi-Belkoura, I.E., Guinez, C., **Baldini, S**., Leturcq, M., Mortuaire, M., Mir, A.-M., Steenackers, A., Dehennaut, V., Pierce, A., (2015). Detection and identification of O-GlcNAcylated proteins by proteomic approaches. Proteomics *15*, 1039–1050.

Machon, O., **Baldini, S.F.**, Ribeiro, J., Steenackers, A., Varrot, A., Lefebvre, T. and Imberty, A. (soumis pour publication). Recombinant fungal lectin as a new tool to investigate *O*-GlcNAcylation processes. *Glycobiology*.

### **Communications orales**

<u>Steffi BALDINI</u>, Anne-Marie MIR, Marlène MORTUAIRE, Tony LEFEBVRE et Céline GUINEZ "*In vivo O-GlcNAcylation effects on FAS properties*" 24<sup>ème</sup> joint meeting, Wittenberg, Allemagne, du 24 au 26 Novembre 2013.

<u>Steffi BALDINI</u> "Impact of diet on lipidic metabolism and the apparition of hepatic steatosis, regulation of expression and activity of FAS by *O*-GlcNAcylation" Journées scientifiques de l'UMR8576, Villeneuve d'Ascq, **France**, le 21 Février 2014.

<u>Steffi BALDINI</u>, Anne-Marie MIR, Marlène MORTUAIRE, Céline GUINEZ et Tony LEFEBVRE *"Regulation of hepatic Fatty Acid Synthase properties by O-GlcNAcylation in vivo and ex vivo"* Glycobiology World Congress, Philadelphia, **USA**, du 10 au 12 Août 2015.

<u>Steffi BALDINI</u>, Anne-Marie MIR, Marlène MORTUAIRE, Céline GUINEZ et Tony LEFEBVRE *"Regulation of hepatic Fatty Acid Synthase properties by O-GlcNAcylation in vivo and ex vivo" 15<sup>ème</sup>* Journée André Verbert, Lille, **France**, le 15 Septembre 2015.

<u>Steffi BALDINI</u>, Anne-Marie MIR, Marlène MORTUAIRE, Céline GUINEZ et Tony LEFEBVRE *"Regulation of hepatic Fatty Acid Synthase properties by O-GlcNAcylation in vivo and ex vivo"* GLYCO23 23rd International Symposium on Glycoconjugates, Split, **Croatie**, du 15 au 20 Septembre 2015.

<u>Steffi BALDINI</u>, Cindy WAVELET, Isabelle Hainault, Céline Guinez, Tony Lefebvre "*Regulation* of hepatic Fatty Acid Synthase properties by O-GlcNAcylation in vivo and ex vivo" 26ème congrès du GFG (Glycosciences French Group), Aussois, **France**, du 23 au 27 Mai 2016

<u>Steffi BALDINI</u>, Cindy WAVELET, Isabelle Hainault, Céline Guinez, Tony Lefebvre *"Regulation of hepatic Fatty Acid Synthase properties by O-GlcNAcylation in vivo and ex vivo"* Protein O-GlcNAcylation in Health and Disease Day, Londres, **Angleterre**, 8 Juillet 2016.

### **Communications par affiche**

<u>Steffi BALDINI</u>, Marlène Mortuaire, Anne-Marie Mir, Isabelle Hainault, Catherine Postic, Céline Guinez et Tony LEFEBVRE. *«Régulation de la Fatty Acid Synthase hépatique in vivo et ex vivo* 

*au niveau du foie »* Congrès Société Francophone du Diabète, Bordeaux, **France**, du 24 au 27 Mars 2015.

<u>Steffi BALDINI</u>, Marlène Mortuaire, Anne-Marie Mir, Isabelle Hainault, Catherine Postic, Céline Guinez and Tony LEFEBVRE. "Regulation of hepatic Fatty Acid Synthase in vivo and ex vivo by O-GlcNAcylation" 26<sup>ème</sup> Joint Glycobiology Meeting, Lille, **France**, du 25 au 27 Octobre 2015.

<u>Steffi BALDINI</u>, Cindy WAVELET, Isabelle Hainault, Céline Guinez, Tony Lefebvre *"Regulation of hepatic Fatty Acid Synthase properties by O-GlcNAcylation in vivo and ex vivo"* 26ème congrès du GFG (Glycosciences French Group), Aussois, **France**, du 23 au 27 Mai 2016.

#### **Récompenses**

- Récompense de la meilleure communication orale : 15<sup>ème</sup> Journée André Verbert (conférence annuelle des doctorants) « session en anglais », le 14 Septembre 2015, Lille, France.
- Obtention du prix Bernard Fournet-André Verbert 2016 lors des 26<sup>èmes</sup> Journées du Groupe Français des Glycosciences, du 23 au 27 mai 2016, Aussois, **France.**



La stéatose hépatique non alcoolique, caractérisée par une accumulation anormale de lipides dans le foie, est la conséquence d'un déséquilibre entre la synthèse et l'utilisation des triglycérides. Cette stéatose est généralement consécutive à une alimentation trop riche en sucres et en graisses et à une vie sédentaire, et est souvent associée au surpoids (25<IMC<30) et à l'obésité (IMC>30).

Après un repas, l'organisme active deux voies principales, la glycolyse et la lipogenèse, pour équilibrer la glycémie. Plus particulièrement, deux enzymes sont sollicitées : la GlucoKinase (GK) et la *Fatty Acid Synthase* (FAS) entrainant une augmentation de la biosynthèse des acides gras. Une autre voie métabolique du glucose est la voie de biosynthèse des hexosamines. Cette voie conduit à la formation du nucléotide-sucre UDP-GlcNAc, substrat des processus de *O*-GlcNAcylation. La *O*-GlcNAcylation est une glycosylation réversible des protéines cytosoliques, nucléaires et mitochondriales assurée par la *O*-GlcNAc transférase (OGT) et la *O*-GlcNAcase (OGA). Au vu de la relation entre les concentrations en glucose intracellulaire, les niveaux de *O*-GlcNAcylation et l'activation du métabolisme glucido-lipidique, l'hypothèse selon laquelle la *O*-GlcNAcylation régulerait la glycolyse et la lipogenèse en contrôlant l'expression et l'activité de la GK et de la FAS a été émise.

Dans un premier temps, l'objectif de la thèse a été de caractériser la *O*-GlcNAcylation de la GK et de la FAS puis, dans un second temps, de déterminer l'impact de cette modification sur leur expression, leur stabilité vis-à-vis de la dégradation et leur activité enzymatique. Pour cela, les niveaux de *O*-GlcNAcylation et d'expression de la GK et de la FAS ont été mesurés dans différents modèles *in vivo* et *ex vivo* : des foies de souris ob/ob, de souris C57BL/6 soumises à un régime classique ou à un régime riche en sucres ou traitées avec un inhibiteur de l'OGA. Des hépatocytes primaires de souris et des lignées cellulaires hépatiques cultivés dans des conditions de *O*-GlcNAcylation variables ont également été analysés.

Nous avons démontré d'une part que la FAS et la GK sont *O*-GlcNAcylées, et que leur *O*-GlcNAcylation est dépendante des conditions nutritionnelles. De plus, nos résultats ont montré que la *O*-GlcNAcylation de la GK et de la FAS augmente leur expression en corrélation avec une meilleure stabilité de la protéine. Ainsi, nous avons montré qu'une augmentation des niveaux de *O*-GlcNAcylation conduit à une augmentation de l'interaction entre la FAS et la déubiquitinylase USP2a.

Nos résultats apportent un nouvel élément de régulation du métabolisme glucido-lipidique par une régulation de la GK et de la FAS par *O*-GlcNAcylation. Ainsi, il existerait un lien entre

l'apport excessif de glucose, l'augmentation des niveaux de *O*-GlcNAcylation, l'activation du métabolisme glucido-lipidique et la production abondante d'acides gras conduisant à la stéatose hépatique.

Les perspectives de ma thèse consistent en l'étude de la régulation de l'expression de la FAS par *O*-GlcNAcylation au cours du cycle cellulaire. En effet, au-delà de la production des acides gras constituant les réserves lipidiques, la FAS joue un rôle primordial dans la biosynthèse d'acides gras en qualité de composants majeurs des membranes plasmiques. Par conséquent, la FAS serait dérégulée en cas de prolifération cellulaire anormale, caractéristique majeure des cellules cancéreuses qui optent pour un métabolisme glycolytique plutôt qu'oxydatif. Ce shift métabolique est accompagné d'une augmentation de l'expression de la FAS et d'une augmentation globale des protéines *O*-GlcNAcylées et de l'expression de l'OGT.

Ainsi, nos premiers résultats montrent que l'expression de la FAS varie au cours du cycle cellulaire. L'OGT et la *O*-GlcNAcylation jouent très probablement un rôle sur cette expression puisque l'inhibition de l'OGT dérégule les variations d'expression de la FAS au cours du cycle cellulaire.



Nonalcoholic hepatic steatosis, characterized by an abnormal accumulation of fatty acids in the liver, is the consequence of an imbalance between the synthesis and the use of triglycerides. This steatosis generally follows a diet too rich in sugar and fat and a sedentary life, and is often associated with overweight (25 < BMI < 30) and obesity (BMI> 30).

After a meal, the organism activates two major pathways, the glycolysis and the lipogenesis, to counteract glycemiae. More particularly, two enzymes are activated: Glucokinase (GK) and fatty acid synthase (FAS) causing an increase in fatty acid biosynthesis. Another metabolic pathway of glucose is the hexosamine biosynthesis pathway. This pathway leads to the formation of the sugar nucleotide UDP-GlcNAc, which is the substrate of *O*-GlcNAcylation process. *O*-GlcNAcylation is a reversible glycosylation modifying cytosolic, nuclear and mitochondrial proteins catalysed by *O*-GlcNAc transferase (OGT) and *O*-GlcNAcase (OGA). In view of the relationship between concentrations of intracellular glucose levels, *O*-GlcNAcylation and activation of the glucido-lipidic metabolism, we hypothesized that the *O*-GlcNAcylation would regulate glycolysis and lipogenesis by controlling the expression and activity of GK and FAS.

The aim of the thesis was, on the one hand, to characterize *O*-GlcNAcylation of GK and FAS, and, on the other hand, to determine the impact of this modification on their expression, stability and enzymatic activity. For that purpose, *O*-GlcNAcylation and expression of GK and FAS levels were measured in various models *in vivo* and *ex vivo*: livers of mouse of ob/ob, C57BL/6 placed on a normal diet, a high carbohydrate diet or treated with an OGA inhibitor. Mouse primary hepatocytes and liver cell lines cultured in conditions that modulate *O*-GlcNAcylation levels were also analyzed.

We demonstrated that FAS and GK are *O*-GlcNAcylated, and that their *O*-GlcNAcylation status is dependent upon nutritional conditions. In addition, our results showed that the *O*-GlcNAcylation of GK and FAS increases their expression and correlates with a better stability of proteins. Thus, we showed that an increase in the *O*-GlcNAcylation levels leads to an increase of the interaction between FAS and the deubiquitinylase USP2a.

Our results provide a new regulatory mechanism of glucido-lipidic metabolism by a regulation of GK and FAS by *O*-GlcNAcylation. Thus, it must exist a link between an excessive intake of glucose, increased levels of *O*-GlcNAcylation, activation of glucido-lipidic metabolism and abundant fatty acid production leading to hepatic steatosis.

In the perspectives of my thesis, we focused on the regulation of FAS expression by *O*-GlcNAcylation during the cell cycle. Indeed, beyond the production of fatty acids that constitute energy storage, FAS plays a pivotal role in the biosynthesis of biological membranes fatty acids. Accordingly, FAS may be dysregulated in abnormal cell proliferation, a major characteristic of cancer cells that prefer a glycolytic metabolism rather than an oxydative one. This metabolic shift is accompanied by an increased expression of FAS. In addition, these cells exhibit an overall increase of *O*-GlcNAcylated protein and expression of OGT.

Thus, our initial results suggest that FAS has a variable expression during cell cycle. In addition, OGT and *O*-GlcNAcylation may play a role on this expression level since the use of an OGT inhibitor deregulate changes in the FAS expression in different phases of the cycle.

Abréviations

1,3-BPG: 1,3-bisphosphoglycérate

2-PG: 2-phosphoglycérate

3-PG: 3-phosphoglycérate

5hmC: 5-hydroxylméthylcytosine

5mC: 5-méthylcytosine

ACAT: acétyl-CoA acétyltransférase

ACC: acétylCoA carboxylase

ACL: ATP citrate lyase

ACP: acyl carrier protein

ACS: acyl-CoA synthase

ADN: acide désoxyribonucléique

ADP: adénosine diphosphate

AG: acides gras

AGCL: acides gras à chaînes longues

AGL: acides gras libres

**AGPAT:** acylglycérol phosphate acyltransférase

AMP: adénosine monophosphate

**AMPc:** adénosine monophosphate cyclique

AMPK: AMP-activated protein kinase

AOA: acide oxaloacétique

Apo: apolipoprotéine

ARN: acide ribonucléique

ASC-2: activating signal co-integrator 2

ATGL: adipose triglycéride lipase

ATP: adénosine triphosphate

**BADGP**: benzyl-2-acétamido-2-désoxy-α-D-galactopyranoside

BAF: BRG1/BRM-associated factor

BCA: bicinchoninic Acid

BMAL: brain muscle ARNT-like 1

**CAMKIV:** calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV

**CBP**: CREB binding protein

CD: chow diet

**CD:** catalytic domain

CD147: cluster of differentiation 147

**CDIPT:** CDP-diacylglycérol-inositol 3 phosphatidyltransférase

**CEACAM1**: carcinoembryonic antigenrelated cell adhesion molecule 1

**CEPT1:** choline/éthanolamine phosphotransférase 1

**CERS:** céramide synthase

CHPT1: choline phosphotransferase 1

**ChREBP:** carbohydrate responsive element binding protein

**CLOCK:** Circadian locomotor output cycles kaput

**CPT1:** carnitine palmitoyltransférase 1

**CREB:** cAMP response element binding protein

**CRTC2:** CREB-specific coactivator TORC2

CTD: C-terminal repeat domain

DAG: diacylglycérol

**dbOGAP:** Database of *O*-GlcNAcylated Proteins and Sites

DGAT: diacylglycérol acyltransférase

DH: déshydratase

DHAP: dihydroxyacétone phosphate

**DMEM:** Dulbecco's modified Eagle's medium

**DNA-PK:** DNA-dependent protein kinase

DON: 6-diazo-5-oxo-L-norleucine **DPBS:** Dulbecco's phosphate buffered Saline **DUB:** déubiquitinase eIF2: eukaryotic chain initiation factor 2 **EMEM:** Eagle's minimal essential medium **EOGT:** EGF-domain specific *O*-GlcNAc transferase EP300: E1A-associated protein p300 ER: énoyl ACP reductase Erk: extracellular signal-regulated kinase ERRa: estrogen-related receptor alpha F1,6BP: fructose 1,6 bisphosphate F1,6BPase: fructose 1,6 bisphosphatase F2,6BP: fructose 2,6 bisphosphate F6P: fructose-6-phosphate FABP: fatty acid binding proteins FAD: flavine adénine dinucléotide **FAS:** fatty acid synthase **FAT:** fatty acid translocase FATPs: fatty acid transport proteins FBPase: fructose 1,6 bisphosphatase **FoxO1:** forkhead box protein O1 FXR: farnesoid X receptor **FXRE:** FXR response element G1P: glucose-1-phosphate **G3P:** glycéraldéhyde-3-phosphate **G6P:** glucose-6-phosphate **G6Pase:** glucose-6-phosphatase G6PDH: glucose-6P déshydrogénase

amidotransférase **GH84:** glycoside hydrolase 84 (family) **GK:** glucokinase **GKRP:** glucokinase regulatory protein **GlcNAc:** N-acétylglucosamine **GlcNAc PM:** N-acétylglucosamine phosphate mutase GlcNH<sub>2</sub>6P AT: glucosamine-6-phosphate N-acétyltransférase GlcNH<sub>2</sub>6P: glucosamine-6-phosphate **GLUT:** glucose transporter **GP:** glycogène phosphorylase **GPAT:** glycérol 3P acyltransférase **GRACE:** glucose response activation conserved element **GS:** glycogène synthase **GSK3**: glycogène synthase kinase 3 **GSP:** glycogène synthase phosphatase **GTP:** guanosine triphosphate **HAT:** histone acétyltransferase **HBP:** hexosamine biosynthetic pathway **HBSS:** Hank's balanced salt solution HCD: high carbohydrate diet **HCF-1:** host cell factor 1 HDAC9: histone désacétylase 9 **HER2:** human epidermal growth factor receptor 2 **HIF1:** hypoxia-inducible factor 1 **HMG:** 2-hydroxy-2-méthylglutaryl **HNF4:** hepatocyte nuclear factor 4

Hsc70: heat shock cognate 70

**GFAT**: glutamine:fructose-6-phosphate

**HSL:** hormono-sensitive lipase, Hsp70: heat shock protein 70 **IRS1:** insulin receptor substrate 1 **KR**: ketoacyl ACP reductase KS: ketoacyl-synthase LDL: low density lipoprotein **LID:** low glucose inhibitory domain LPA: acide lysophosphatidique L-PK: liver pyruvate kinase LRH1: liver receptor homolog 1 LXR: liver X receptor LXRE: LXR response element MafA: V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A MAG: monoacylglycérol MAPK: mitogen-activated protein kinase MAT: malonyl acétyl-transférase MCAT: malonyl-CoA ACP transacylase **MCM:** mini-chromosome maintenance MGEA5: meninginoma expressed antigen 5 MGL: monoglycérol lipase MLX: max-like protein MODY: maturity-onset diabetes of the young mOGT: mitochondrial OGT mTORC1: mammalian target of rapamycin complex 1 MTP: microsomal triglyceride transfer Protein NADH,H<sup>+</sup>: nicotinamide adénine dinucléotide

NADPH: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate NAFLD: nonalcoholic fatty liver disease **NASH:** nonalcoholic steatohepatitis ncOGT: nucleocytoplasmic OGT NCoR: nuclear receptor co-repressor **NES:** nuclear export signal **NeuroD1:** neurogenic differentiation 1 **NF-Kb**: nuclear factor kappa B NLS: nuclear localization signal OGA: O-GlcNAcase **O-GlcNAcylation:** O-N acétylglucosaminylation OGT: O-linked Nacetylglucosaminyltransferase PA: acide phosphatidique PAX6: paired box protein 6 PC: pyruvate carboxylase **PCAF:** p300/CBP-associated factor PDH: pyruvate déshydrogénase PDK1: 3 phosphoinositide dependent kinase 1 PDX-1: pancreatic and duodenal homeobox 1 PEG: polyéthyléne glycol **PEP:** phosphoénol pyruvate **PEPCK:** phosphoénol pyruvate carboxykinase **PFA:** paraformaldéhyde **PFK1:** phosphofructokinase 1 **PFK2/FBP2:** phosphofructokinase

2/fructose bisphosphatase 2

**PGC1a:** peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1  $\alpha$ 

PI3K: phosphoinositide-3-kinase

**PIP3:** phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate

PKA: protéine kinase A

PKB: protéine kinase B

PP1: protéine phosphatase 1

PP2A: protéine phosphatase 2A

**PPAR**: peroxisome proliferator-activated receptor

PPO: PIP-binding activity of OGT

PPTase: phosphopantéthéinyl transférase

PRC: polycomb repressive complex

Rb1: retinoblastoma 1

RIPA: radio immunoprecipitation assay

RXR: retinoid X receptor

SCAP: SREBP cleavage-activating protein

SCD1: stéaroyl-CoA désaturase 1

SEC: secret agent

**SGLT:** sodium-dependent glucose transporter

SHP: small heterodimer partner

SIK: salt-inducible kinases

**SMRT:** silencing mediator for retinoic acid and thyroid hormone receptor

sOGT: short OGT

SPTLC: sérine palmitoytransférase

SPY: spindly

SRE: serum response element

**SREBP:** sterol regulatory element-binding protein

**STAT5:** signal transducer and activator of transcription 5

STZ: streptozotocine

SVF: sérum de veau fœtal

sWGA: succinyl-wheat germ agglutinin

**TAF110:** TATA-binding protein associated factor 110

TAG: triacylglycérols

TBS: tris-buffered-saline

TE: thioestérase

Tet: ten-eleven translocation

TG: triglycérides

TPR: tetratricopeptides repeats

TSC: tuberous sclerosis complex

UDP-Glc: uridine diphosphate glucose

**UDP-GIcNAc PPase:** UDP-Nacétylglucosamine pyrophosphorylase

UDP-GlcNAc: uridine diphospho-Nacétylglucosamine

**USF:** upstream-stimulatory factors

USP2: ubiquitin specific peptidase 2

VLDL: very low-density lipoprotein

X5P: xylulose-5-phosphate

**α-KG:** α-cétoglutarate

Table des

Illustrations

Figure 1 : Représentation schématique du foie vue de face.

**Figure 2** : Régulation du métabolisme glucido-lipidique hépatique en fonction des conditions nutritionnelles.

Figure 3 : Régulation du métabolisme du glycogène hépatique.

Figure 4 : Représentation schématique de la néoglucogenèse au niveau du foie.

**Figure 5** : Schéma représentant la régulation transcriptionnelle des gènes codant la PEPCK et la G6Pase, deux enzymes clefs de la néoglucogenèse en fonction des conditions nutritionnelles.

Figure 6 : Lipolyse du tissu adipeux et transport des acides gras dans l'hépatocyte.

**Figure 7** : β-oxydation mitochondriale et cétogenèse.

Figure 8 : Les différentes voies métaboliques du glucose.

Figure 9 : Représentation schématique des voies de la glycolyse et des pentoses phosphates.

Figure 10 : Schéma représentant la voie de la lipogenèse.

**Figure 11** : Schéma représentant la biosynthèse des triglycérides et le devenir des acides gras néosynthétisés.

**Figure 12** : Représentation de l'activité de la GK et des hexokinases en fonction des concentrations en glucose.

Figure 13 : Présentation des différentes conformations de la GK.

**Figure 14** : Effet de l'hyperméthylation du promoteur de la GK dépendante de l'âge sur la susceptibilité au diabète de type 2.

**Figure 15**: Régulation de l'activité et de la localisation subcellulaire de la GK par son interaction avec la GKRP.

Figure 16 : Régulation de la GK par le complexe PFK2/FBP2.

**Figure 17** : Schéma général représentant les différents modes de régulation de la GK.

Figure 18 : Comparaison de l'organisation des différents domaines de la FAS.

Figure 19 : Représentation schématique de l'activité de la FAS.

Figure 20 : Mécanisme d'action de SREBP-1c.

**Figure 21**: Régulation de la transcription de la FAS via USF en fonction des conditions nutritionnelles.

Figure 22 : Régulation de l'activité de ChREBP en fonction des conditions nutritionnelles.

**Figure 23** : Régulation des facteurs de transcription régulant l'expression de la FAS en réponse au glucose et à l'insuline.

**Figure 24** : Mécanismes et voies métaboliques conduisant au développement de la stéatose hépatique.

**Figure 25**: Dynamique de la *O*-GlcNAcylation par le couple d'enzyme OGT/OGA et les différents inhibiteurs ciblant ces enzymes.

Figure 26 : Représentation des conformations des glycosyltransférases GT-A et GT-B.

Figure 27 : Représentation schématique de la structure de l'OGT.

**Figure 28** : Représentation de la séquence et de la structure des TPR de la hOGT.

Figure 29 : Clivage de la protéine HCF-1 par l'OGT.

Figure 30 : Représentation schématique de la structure de l'OGA.

**Figure 31** : L'UDP-GlcNAc, un carrefour métabolique.

Figure 32 : Représentation schématique de la voie de biosynthèse des hexosamines.

Figure 33 : Les différentes fonctions cellulaires de la O-GlcNAcylation.

Figure 34 : Relation schématique entre la O-GlcNAcylation et la phosphorylation.

Figure 35 : Les différents rôles de la O-GlcNAcylation sur la dégradation protéique.

Figure 36 : Quelques exemples illustrant le lien entre O-GlcNAcylation et cancérisation.

Figure 37 : Régulation hormonale de la voie de l'insuline en fonction de l'état nutritionnel.

**Figure 38**: Rôle de la *O*-GlcNAcylation sur la glucotoxicité, l'insulinorésistance et l'hyperglycémie.

Figure 39 : Régulation hypothétique de la GK et de la FAS par O-GlcNAcylation.

**Figure 40** : Localisation subcellulaire de la GK et de la GKRP dans différentes conditions de *O*-GlcNAcylation.

**Figure 41** : Modélisation moléculaire représentant la position du site potentiellement *O*-GlcNAcylé sur la structure tridimensionnelle du complexe GK/GKRP.

**Figure 42** : Dosage des triglycérides hépatiques chez les souris C57Bl6 contrôles (C57) ou chez les souris obèses (ob/ob).
**Figure 43** : Dosage des triglycérides hépatiques chez les souris soumises à un régime normal (CD) ou à un régime riche en sucres (HCD).

**Figure 44** : Incidence du régime riche en sucres sur la quantité d'acides gras hépatique et sur l'expression transcriptionnelle d'une désaturase.

**Figure 45** : Incidence de la *O*-GlcNAcylation sur l'expression de la FAS au niveau protéique et sur l'accumulation de lipides dans des hépatocytes primaires de souris

**Figure 46** : Effet de la *O*-GlcNAcylation sur l'expression de la FAS.

**Figure 47** : Mise en évidence de la dégradation protéasomale de la FAS au niveau du foie.

**Figure 48 :** Représentation schématique de la séquence protéique de la FAS et modélisation moléculaire de la position d'un site potentiellement *O*-GlcNAcylé sur la structure 3D de l'activité  $\beta$ -cétoacylsynthase de la FAS.

**Figure 49** : Schéma hypothétique de la régulation de la GK et de la FAS en condition pathologique d'hyperglycémie à jeun.

**Figure 50** : Régulation de l'expression de la FAS par la voie PI3K/Akt et crosstalk OGT/Akt/mTORC1.

**Figure 51** : Effet de l'inhibition de mTOR sur l'expression de l'OGT et de la FAS.

**Figure 52** : Etude de l'expression de la FAS au cours d'une cinétique de remise en sérum.

**Figure 53** : Rôle de l'inhibition de l'OGT sur l'expression de la FAS au cours du cycle cellulaire.

**Figure 54** : Vie et mort de la FAS au cours du cycle cellulaire.



# Généralités

I. F	Régulation du métabolisme glucido-lipidique dans le foie	_ 3
Α.	Le foie : un organe multifonction	3
1	. Structure	3
2	. Régulation du métabolisme glucido-lipidique hépatique en fonction des conditions nutritionnelle	s_ 5
В.	Rôle du foie dans le contrôle du métabolisme à jeun	5
1	. Régulation du métabolisme glucidique	5
	a) La glycogénolyse	7
	b) La néoglucogenèse	9
2	. Régulation du métabolisme lipidique	_ 15
	a) Les acides gras	_ 15
	b) Le captage des acides gras issus de la lipolyse	_ 17
	c) Activation des acides gras	_ 19
	d) Entrée des acides gras dans la mitochondrie, β-oxydation et cétogenèse	_ 19
C.	Rôle du foie dans le contrôle du métabolisme post-prandial	_23
1	. Régulation du métabolisme glucidique	_ 23
	a) L'entrée du glucose dans le foie	_ 23
	b) La glycogénogenèse	_ 25
	c) La Glycolyse	_ 27
	1) La glucokinase (GK)	_ 29
	2) La phosphofructokinase 1 (PFK1)	_ 29
	3) La liver pyruvate kinase (L-PK)	_ 31
	d) La voie des pentoses phosphates	_ 31
2	. Régulation du métabolisme lipidique	_ 33
	a) La lipogenèse	_ 33
	1) L'acétyl-CoA carboxylase (ACC)	_ 35
	2) La Fatty Acid Synthase (FAS)	_ 37
	3) Les elongases	_ 3/
	4) La stearoyi-coa desaturase 1 (SCD1)	_ 39 _ 20
	<ul> <li>b) Synthèse des trigiverndes</li> <li>c) Sécrétion des VI DI</li> </ul>	_ 39 
	c) Secretion des VLDL	_ 41
II. L	a Glucokinase	_45
Α.	La glucokinase : une hexokinase à part	_45
в.	Structure de la GK et régulation de son activité	_45
C.	Régulation transcriptionnelle de la GK	_47
1	HNF4/HIF1	_ 49
2	. SREBP1c	_ 51
3	. Modèle proposé sur la régulation transcriptionnelle de la GK	_ 51
4	. L'insuline régule la transcription de la GK, mais ce n'est pas la seule	_ 51
D.	Régulation de l'activité et de la localisation de la GK par la protéine régulatrice :	
GK	RP	_53
E.	Régulation de la GK par le complexe PFK2/FBP2	_55

F.	Inhibition allostérique de la GK par des acides gras à chaîne longue activés	57
G.	La glucokinase et le diabète de la maturité chez le sujet jeune (MODY)	57
<i>III.</i> I	La Fatty Acid Synthase	61
А.	Caractéristiques générales	61
в.	La FAS et ses sept activités	63
c.	Régulation de l'expression de la FAS	67
	1. Régulation transcriptionnelle de la FAS	67
	a) Sterol response binding protein (SREBP)	67
	1) Régulation de l'activation de SREBP par le clivage protéolytique	67
	2) Régulation de la translocation nucléaire de SREBP	69
	3) Régulation transcriptionnelle de SREBP-1c	69
	4) Le recrutement de SREBP-1c sur le promoteur de la FAS dépend des facteurs USFs	71
	b) Upstream stimulatory factor (USF)	71
	c) Carbohydrates responsive element binding protein (ChREBP)	73
	d) Liver X Receptor (LXR)	75
	e) Farnesoid X receptor (FXR)	77
2	2. Régulation de l'expression de la FAS par les microARNs	77
3	3. Régulation de l'expression de la FAS par un remodelage de la chromatine	79
2	4. Régulation post-traductionnelle de la FAS	81
IV. I A.	Physiologie de la stéatose hépatique	85 87
B	Voies métaboliques conduisant à la stéatose bénatique	0,
р. С	les lie tien de le lie e contration de le chéateau hératione	0,
C.	Implication de la lipogenese dans l'instauration de la steatose nepatique	89
	a) L'adenosine tripnosphate citrate iyase (ACL)	89
	b) L acetyi-CoA Carboxylase (ACC)	91
	<ul> <li>c) La Fally Acid Synthase (FAS)</li></ul>	91
	a) La steroyi-coa desaturase 1 (SCD1)	
		93
D.	Stéatose hépatique et insulinorésistance	93
Ε.	Traitements	95
V. I	La O-N acétylglucosaminylation (O-GlcNAcylation)	97
Α.	Caractéristiques générales	97
В.	Les enzymes de la O-GlcNAcylation	99
-	1. La β-O-N-acétylglucosaminyltransférase (OGT)	99
	a) Généralités sur les glycosyltransférases	99
	b) Structure et mécanisme d'action de l'OGT	101
	c) Structure de l'OGT Erreur ! Signet no	on défini.
	1) Le domaine N-terminal	105

	2) Le domaine C-terminal	107
	d) Régulation de l'OGT	107
	1) Régulation par la disponibilité en substrat	109
	2) Régulation transcriptionnelle de l'OGT	109
	3) Régulation post-traductionnelle de l'OGT	109
	e) L'autre visage de l'OGT : son activité protéolytique	111
	f) Localisation subcellulaire de l'OGT	111
	g) Rôle de la EOGT (EGF-domain specific O-GlcNAc transferase)	111
	h) L'inhibition de l'OGT	113
2	La β-N-acétylglucosaminidase (OGA)	115
	a) Généralités	115
	b) Isoformes et localisation	115
	c) Structure de l'OGA	117
	d) Régulation de l'OGA	117
	1) Régulation post-traductionnelle de l'OGA	117
	2) Régulation de l'OGA par son interaction avec l'OGT	117
	e) Inhibition de l'OGA	119
C	La voie de hiosynthèse des hexosamines	121
1	Généralités	<u></u> 121
2	La synthèse de l'HDP-GICNAC	121 121
-	a) La glutamine fructose 6 phosphate amidotransférase (GEAT)	121
	1) Structure	121
	2) Régulation	123
	b) La glucosamine 6-phosphate N-acétyltransférase : GlcNAc 6P AT (Emeg 32)	123
~		425
<b>D.</b>	La O-GicNAcylation : un regulateur des proprietes proteiques	125
1	La O-GlcNAcylation et la phosphorylation	125
	a) Dialogue phosphorylation/O-GlcNAcylation	125
-	b) Dialogue entre OGT/OGA/kinases/phosphatases	127
2	Rôle de la <i>O</i> -GlcNAcylation dans les interactions protéines/protéines	129
3	Role de la <i>O</i> -GicNAcylation sur la localisation subcellulaire	131
4	Role de la <i>O</i> -GlcNAcylation sur la degradation proteasomale	131
	a) La O-GICNAcylation regule l'ubiquitinylation des proteines via leur phosphorylation	131
	b) La O-GlcNAcylation stabilise les proteines via le recrutement de deubiquitinases.	133
	c) La O-GiciNAcylation facilite la monoubiquitinylation	135
	d) La <i>O</i> -GicNAcylation module l'activite proteasomale	135
Ε.	Rôle de la O-GlcNAcylation dans les processus physiologiques	135
1	Rôle de la O-GlcNAcylation dans la régulation de la transcription et de la traduction	135
	a) Transcription	135
	b) Traduction	137
2	Rôle de la O-GlcNAcylation dans la régulation épigénétique	139
	a) La O-GlcNAcylation nous fait tourner la « Tet »	139
	b) La O-GlcNAcylation et les histones	139
3	Rôle de la O-GlcNAcylation dans la réponse au stress	141
4	Rôle de la O-GlcNAcylation dans la régulation du cycle circadien	141
5	Rôle de la O-GlcNAcylation dans la régulation du cycle cellulaire	143
		1.0
F.	<i>O</i> -GlcNAcylation et pathologies	145
<b>F.</b>	O-GlcNAcylation et pathologies	<b>145</b> 145

2.	0-0	SicNAcylation et cancer	147
3.	Rôl	e de la O-GlcNAcylation sur le métabolisme glucidique en condition physiologique et	
hyperglycémique			153
a)	F	Rôle de la O-GlcNAcylation en condition physiologique	153
	1)	A jeun	153
	2)	En période postprandiale	153
b)	F	Rôle de la O-GlcNAcylation sur la glucotoxicité et de l'insulinorésistance en condition	
hy	per	glycémique	155
	1)	Diminution de l'absorption du glucose par O-GlcNAcylation	157
	2)	Rôle de la O-GlcNAcylation sur la néoglucogenèse et la glycogénogenèse	157
	3)	Régulation de la synthèse de l'insuline par O-GlcNAcylation	159
	4)	Rôle de la O-GlcNAcylation dans la dérégulation de la voie de signalisation de l'insuline _	159

# Résultats : Détermination et étude du rôle de la O-GlcNAcylation de la GK et de la FAS hépatique au cours de la lipogenèse

Ι.	Contexte de l'étude	165
<i>II</i> .	Hypothèse de travail	167

### *III. Etude du rôle de la O-GlcNAcylation sur les propriétés de la GK et de la FAS hépatiques* 167

Α.	La glucokinase	167
1.	1. Introduction	
2.	. Résultats	169
	a) Publication	171
	b) Résultats supplémentaires	174
	1) Matériels et méthodes spécifiques aux résultats supplémentaires	174
	(a) Conditions de culture des cellules HepG2	174
	(b) Fractionnement subcellulaire	174
	(c) SDS-PAGE, Western Blot	174
	2) Résultats préliminaires	176
	(a) Rôle de la O-GlcNAcylation sur la localisation de la GK et de la GKRP	176
	(b) Position des sites potentiels de O-GlcNAcylation sur la structure tridimension	onnelle du
	complexe GK/GKRP	176
3.	. Conclusion/Discussion	178
B.	La Fatty Acid Synthase	180
1.	Introduction	180
2.	. Résultats	182
	a) Publication	182
	b) Résultats supplémentaires	184
	1) Matériels et méthodes	184
	(a) Culture primaire d'hépatocytes	184
	(b) Lyse des hépatocytes primaires de souris et western blot	184
	(c) Mise en évidence des acides gras	186
	(i) Coloration à l'huile rouge	186
	(ii) Dosage des triglycérides	186

	(ii	Dosage des acides gras par GC-MS	186
	(d)	Traitement à la β-N-acétylglucosaminidase	188
	2) R	ultats supplémentaires	188
	(a)	/alidation des modèles in vivo	188
	(i)	Accumulation de triglycérides hépatiques dans les souris ob/ob versus les souris co	ontrôles
		188	
	(ii	Efficacité du régime riche en sucres	190
	(b)	Dosage des acides gras par GC/MS	190
	(c)	Rôle de la O-GlcNAcylation sur l'expression de la FAS dans des hépatocytes de souris	192
	(d)	Stabilisation de la FAS par O-GlcNAcylation	196
	(e)	Etude de la dégradation de la FAS	198
3.	Discuss	n	198
	a) Les r	veaux d'expression des protéines O-GlcNAcylées et de la FAS varient en fonction des	
	condition	nutritionnelles	200
	b) Mise	en évidence de l'interaction FAS/OGT et de la O-GlcNAcylation de la FAS	202
	c) Rôle	de la O-GlcNAcylation sur les propriétés de la FAS	204
	1) R	e sur l'expression de la FAS	204
	2) R	e sur la stabilité de la FAS	206
	3) R	e sur l'activité de la FAS	208
Сс	onclusior		212

# Perspectives de recherche : Régulation de la FAS par O-GlcNAcylation au cours du cycle cellulaire

I. Contexte de l'étude	216
II. Hypothèse de travail	220
III. Résultats préliminaires	222
A. Matériels et méthodes	222
1. Culture cellulaire	222
2. Synchronisation et cinétique de SVF	222
3. Traitement à la rapamycine	222
B. Résultats préliminaires	224
IV. Perspectives de recherche	
Conclusion générale	

# Bibliographie

### Annexes

IV.



# I. <u>Régulation du métabolisme glucido-lipidique dans le</u> <u>foie</u>

Le glucose est un élément vital pour l'ensemble de l'organisme. Pour faire face aux variations constantes entre l'apport et l'utilisation de ce sucre, notre organisme a mis en place des mécanismes moléculaires capables de stabiliser la glycémie entre 0.7 et 1.2 g.L<sup>-1</sup>. Quatre organes et tissus majeurs régulent les taux de glucose sanguin : le foie, le tissu adipeux, le muscle et le rein. Cependant, le foie reste l'organe principal dans le maintien de l'homéostasie glucido-lipidique. Il est le premier à capter les nutriments, dont le glucose, ainsi que les différentes hormones sécrétées par le pancréas afin de réguler la glycémie.

# A. <u>Le foie : un organe multifonction</u>

### 1. <u>Structure</u>

Le foie est le plus gros des organes internes du corps humain. Il est composé de deux lobes majeurs et de deux petits lobes, pèse en moyenne 1.5 kg et constitue environ 2% de la masse totale du corps. Le foie est situé dans le haut de l'abdomen en dessous du diaphragme et est encadré en partie par la cage thoracique.

Le foie est composé de différents types cellulaires dont la grande majorité est représentée par les hépatocytes. La position des hépatocytes par rapport à la veine porte leur confère des propriétés différentes dues à la différence de disponibilité en substrats et d'accès aux hormones. Les hépatocytes périportaux participent davantage à la néoglucogenèse,  $\beta$ oxydation et cétogenèse tandis que les hépatocytes périveineux sont spécialisés dans la glycogénogenèse, la glycolyse et la lipogenèse (Jungermann and Kietzmann, 1996).

En plus de réguler le métabolisme glucido-lipidique, le foie présente de nombreuses autres fonctions telles qu'une fonction exocrine (production d'acides biliaires), une activité de détoxification et de biosynthèse de protéines comme l'albumine ou les facteurs de coagulation.



Figure 1 : Représentation schématique du foie vue de face.

Deux vaisseaux irriguent le foie : l'artère hépatique et la veine porte. Les substances provenant des intestins transformées par le foie sont apportées par la veine porte. Quant à l'oxygène, il est apporté par le sang de l'artère hépatique. *Tiré de http://www.arcagy.org/infocancer* 

L'ensemble des fonctions du foie nécessite une communication entre les cellules hépatiques et la circulation. Deux réseaux de vaisseaux irriguent le foie :

- le réseau « porte », permettant l'apport de sang et de bile au foie, est constitué de l'artère hépatique, de la veine porte et du canal biliaire.

- et le réseau « cave » permettant la circulation des différents métabolites produits par le foie vers d'autres tissus, constitué de la veine cave inférieure (Figure 1).

## 2. <u>Régulation du métabolisme glucido-lipidique hépatique en</u> fonction des conditions nutritionnelles

Le glucose constitue la source d'énergie majeure de l'organisme. L'organe jouant un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie glucido-lipidique est le foie. Il est directement irrigué par l'artère hépatique et la veine porte lui desservant les hormones pancréatiques (insuline et glucagon) et les nutriments (Figure 1). Ces propriétés lui confèrent une place stratégique au sein de l'organisme lui permettant de réguler les taux de glucose et d'acides gras (AG) en fonction des conditions nutritionnelles.

A jeun, la sécrétion pancréatique de glucagon permet la libération du glucose par deux voies : la glycogénolyse puis la néoglucogenèse prend le relai. Ce mécanisme s'accompagne d'une  $\beta$ oxydation des acides gras adipocytaires afin de fournir le cofacteur (nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) et l'énergie (adénosine triphosphate (ATP)) nécessaires à la néoglucogenèse.

En période postprandiale, la sécrétion d'insuline induit l'entrée et le stockage du glucose par le foie sous deux formes : sous forme de glycogène par la glycogénogenèse, et sous forme d'acides gras par la glycolyse couplée à la lipogenèse (Han et al., 2016) (Figure 2).

### B. <u>Rôle du foie dans le contrôle du métabolisme à jeun</u>

### 1. <u>Régulation du métabolisme glucidique</u>

Chez l'Homme, une période de jeûne est définie par une diminution de la glycémie comprise entre 0.7 et 1.1 g.L<sup>-1</sup>.



**Figure 2** : Régulation du métabolisme glucido-lipidique hépatique en fonction des conditions nutritionnelles.

A jeun, la sécrétion pancréatique de glucagon induit le relargage du glucose par la glycogénolyse et la gluconéogenèse. Cependant, suite à un repas, la sécrétion de l'insuline par le pancréas permet le stockage du glucose en excès sous la forme de glycogène (glycogénogenèse) ou d'acides gras (glycolyse et lipogenèse).

<u>Abréviations</u>: VLDV : very low-density lipoprotein.

Dans ce cas, le foie assure le maintien de la glycémie en permettant la biosynthèse de glucose nécessaire pour les organes et cellules gluco-dépendants (cerveau, rétine et globules rouges) n'utilisant pratiquement que le glucose comme source d'ATP. Les tissus gluco-indépendants, quant à eux, utilisent les acides gras ou la partie carbonée des acides aminés.

Le glucose est obtenu par la digestion de disaccharides (saccharose, lactose) ou de polysaccharides (amidon, glycogène). De façon endogène, il peut être produit à partir de précurseurs non glucidiques par la voie de la gluconéogenèse.

Durant le jeûne, l'utilisation des réserves énergétiques s'effectue en trois phases : une phase glucidique (dégradation du glycogène), une phase protéique (néoglucogenèse à partir de l'hydrolyse des protéines musculaires) et une phase cétonique (à partir des acides gras). Entre 0 et 12 heures de jeûne, la phase glucidique permet de maintenir la glycémie grâce, en grande partie, à l'utilisation du glycogène (glycogénolyse) mais aussi par la néoglucogenèse effectuée à partir des acides aminés, du lactate et du glycérol. Entre 1 et 3 jours de jeûne, la phase protéique maintient la glycémie grâce à la néoglucogenèse (Nordlie et al., 1999) et la lipolyse est stimulée. Après 8 jours de jeûne, la cétogenèse produit des corps cétoniques, substrats alternatifs au glucose pour les organes tels que le cerveau.

Les voies permettant le maintien de la glycémie au cours du jeûne sont détaillées dans les parties suivantes.

#### a) La glycogénolyse

Durant les périodes postprandiales, l'accumulation de glycogène hépatique constitue une forme de stockage de glucose utilisée lorsque la prise alimentaire diminue. Par conséquent, la synthèse et le catabolisme du glycogène sont très régulés, en particulier par l'inhibition et l'activation de deux enzymes, respectivement la glycogène synthase (GS) (enzyme clef de la glycogénogenèse) et la glycogène phosphorylase (GP) (enzyme clef de la glycogénolyse).

La GS permet l'élongation des chaînes de glycogène. Elle catalyse le transfert d'un résidu de glucose sur des branches préexistantes de glycogène. Elle est inactivée par phosphorylation par la glycogène synthase kinase 3 (GSK3) et la protéine kinase A (PKA). A jeun, GSK3 phosphorylée et active, inactive la GS et conduit à l'inhibition de la synthèse de glycogène hépatique.



Figure 3 : Régulation du métabolisme du glycogène hépatique.

La régulation de l'activité des deux enzymes clefs du métabolisme du glycogène se fait essentiellement par le contrôle de leur état de phosphorylation. En période postprandiale, la fixation de l'insuline sur son récepteur entraîne l'activation d'Akt qui phosphoryle et inactive GSK3 résultant en l'activation de la GS. La GS est aussi régulée par les concentrations de G6P. Au cours du jeûne, la GS est inactivée par phosphorylation et la GP est phosphorylée par la phosphorylase kinase au préalable activée par PKA et activée.

<u>Abréviations</u> : GK : Glucokinase, GS : Glycogène synthase, PKA : protéine kinase A, GSK3 : glycogène synthase kinase 3, G6Pase : glucose-6 phosphatase, GP : glycogène phosphorylase, PP1 : protein phosphatase 1.

La GP est une enzyme majeure de la glycogénolyse. Elle catalyse la phosphorolyse d'un résidu de glucose et forme le glucose-1-phosphate (G1P). Le G1P est converti en glucose-6-phosphate (G6P) par la phosphoglucomutase puis en glucose par la glucose-6-phosphatase.

Au cours du jeûne, le glucagon est un activateur effectif de la GP grâce à une augmentation des niveaux d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) (Keppens et al., 1993).

La déphosphorylation de la GP par la protéine phosphatase (PP1) inactive l'enzyme alors que sa phosphorylation par la glycogène phosphorylase kinase l'active (Adeva-Andany et al., 2016) (Figure 3).

Lorsque les niveaux de glycogène diminuent, l'apport de glucose est renforcé par la néoglucogenèse.

#### b) La néoglucogenèse

La néoglucogenèse hépatique est induite en réponse à une période de jeûne prolongé. Elle induit la biosynthèse de glucose *de novo* à partir de précurseurs non glucidiques : le pyruvate provenant de l'oxydation du lactate des hématies ou des muscles, les acides aminés et le glycérol provenant de la lipolyse du tissu adipeux (Figure 4).

Les acides aminés glucogéniques peuvent être convertis soit en pyruvate soit en intermédiaires du cycle de Krebs :  $\alpha$ -cétoglutarate ( $\alpha$ -KG), succinylCoA, fumarate et acide oxaloacétique (AOA). Quant au lactate, il est converti en pyruvate par la lactate déshydrogénase et le glycérol en dihydroxyacétone phosphate, un intermédiaire néoglucogénique.

La majorité des étapes de la néoglucogenèse sont des réactions inverses de la glycolyse à l'exception de trois, contournées par d'autres étapes :

- le phosphoénol pyruvate (PEP) est formé par deux réactions. Premièrement, une carboxylation ATP-dépendante réalisée par la pyruvate carboxylase (PC) et formant l'AOA. L'AOA est ensuite soumis à une décarboxylation couplée à une phosphorylation GTP (guanosine triphosphate) dépendante par la phosphoénol pyruvate carboxykinase (PEPCK).
- le fructose-1,6-bisphosphate (F1,6BP) est hydrolysé par la fructose-1,6bisphosphatase (F1,6BPase).
- la glucose-6-phosphatase (G6Pase) hydrolyse le G6P en glucose.



#### Figure 4 : Représentation schématique de la néoglucogenèse au niveau du foie.

La gluconéogenèse permet la biosynthèse de glucose à partir de précurseurs non glucidiques tels que le pyruvate, le glycérol et les acides aminés glucogéniques.

<u>Abréviations</u>: G6Pase: glucose-6-phosphatase, G6P: glucose-6-phosphate, F6P: fructose-6-phosphate, FBPase: fructose 1,6 Bisphosphatase, F1,6BP: fructose 1,6 Bisphosphate, DHAP: dihydroxyacétone phosphate, G3P: glycéraldéhyde-3-phosphate, 1,3-BPG: 1,3-Bisphosphoglycérate, 3-PG: 3-phosphoglycérate, 2-PG: 2-phosphoglycérate, PEP: phosphoénol pyruvate, PEPCK: phosphoénol pyruvate carboxykinase, AOA: acide oxaloacétique, PC: pyruvate carboxylase.

Dans le foie, l'oxydation des acides gras fournit l'acétylCoA (activateur allostérique de la pyruvate carboxylase (PC)) et les cofacteurs (ATP et NADH) indispensables au fonctionnement de la néoglucogenèse et à l'augmentation du taux de glucose. Dans des conditions d'hypoglycémie, la diminution de l'utilisation de glucose musculaire, l'augmentation des acides gras libres et l'augmentation de la néoglucogenèse favorisent l'apport en glucose aux organes gluco-dépendants.

La néoglucogenèse s'effectue dans plusieurs compartiments cellulaires. Le pyruvate est converti en oxaloacétate dans la mitochondrie. Toutes les étapes jusqu'à la formation du G6P sont cytosoliques. La dernière étape catalysée par la G6Pase s'effectue au niveau du *reticulum* endoplasmique (Mithieux, 1997) (Figure 4).

Quatre enzymes régulent les étapes clefs de la néoglucogenèse : la PC, la PEPCK, la F1,6BPase, et la G6Pase.

Ces enzymes sont régulées de manière transcriptionnelle, post-traductionnelle et allostérique.

La PC convertit le pyruvate en AOA. Chez l'Homme, le gène de la PC est régulé par la présence de trois promoteurs alternatifs dont le rôle physiologique n'est pas clairement élucidé

(Wang et al., 2008a). L'activité de l'enzyme est stimulée par l'acétyl-CoA mitochondrial provenant de l'oxydation des acides gras (Scrutton et al., 1965).

La PEPCK catalyse la conversion de l'AOA en PEP. A jeun, l'expression transcriptionnelle de la PEPCK est augmentée par des hormones telles que le glucagon, les glucocorticoïdes ou les hormones thyroïdiennes (Hanson and Reshef, 1997). Inversement, des fortes concentrations en glucose ou en insuline inhibent son expression (Granner et al., 1983).

Chez l'homme, la PEPCK est régulée par acétylation. Bien que l'acétylation n'a pas d'effet direct sur l'activité enzymatique de la PEPCK, elle est fortement corrélée à une diminution de son expression (Zhao et al., 2010) en induisant son ubiquitinylation et sa dégradation (Jiang et al., 2011).

L'acétylation de l'enzyme est régulée en fonction du statut nutritionnel cellulaire. Elle est augmentée par le glucose (produit final de la voie) et diminuée par les acides aminés (précurseurs de la néoglucogenèse).



**Figure 5 :** Schéma représentant la régulation transcriptionnelle des gènes codant la PEPCK et la G6Pase, deux enzymes clefs de la néoglucogenèse en fonction des conditions nutritionnelles.

A jeun, le glucagon induit l'activation de PKA. PKA phosphoryle CREB et induit via PP2B et l'inactivation de SIK, la déphosphorylation de CRTC2. CRTC2 déphosphorylé migre au niveau du noyau et se fixe à CREB. FoxO1 activé promeut aussi la néoglucogenèse. Ces événements induisent la transcription de PGC-1 $\alpha$ , PEPCK et G6Pase promouvant la néoglucogenèse. En période postprandiale, l'activation d'Akt par l'insuline induit l'activation de SIK qui phosphoryle et inhibe CRTC2. Akt phosphoryle et inactive FoxO1. Ainsi, l'activation d'Akt par l'insuline inhibe la néoglucogenèse.

<u>Abréviations</u>: CRTC2 : CREB-specific coactivator TORC2, CREB : cyclic AMP-responsive element-binding protein, PGC : peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator, FOXO : forkhead box O, PKA : protein kinase A, PP2B : protein phosphatase-2B, G6Pase : glucose-6-phosphatase, PEPCK : phosphoénol pyruvate carboxykinase, SIK : salt-inducible kinase. La F1,6BPase hydrolyse le F1,6BP en fructose-6-phosphate (F6P). Elle est inhibée de manière allostérique par le fructose-2,6-bisphosphate (F2,6BP) produit de l'enzyme bifonctionnelle, phosphofructokinase 2/fructose bisphosphatase 2 (PFK2/FBP2). Peu de choses sont connues quant à la régulation transcriptionnelle de la F1,6BPase mais son expression est augmentée en période de jeûne et diminuée en période postprandiale (el-Maghrabi et al., 1991).

Le complexe enzymatique G6Pase du *reticulum* endoplasmique est constitué de la G6Pase, d'un transporteur de G6P (T1), de phosphate inorganique (T2) et de glucose (T3) (Mithieux, 1997). L'expression de la G6Pase est augmentée de manière transcriptionnelle par le glucagon et diminuée par l'insuline (Hutton and O'Brien, 2009).

La transcription de la PEPCK et de la G6Pase est régulée en fonction des conditions nutritionnelles. Deux facteurs de transcription interviennent : CREB (cAMP response element binding protein) et FoxO1 (forkhead box protein O1). A jeun, le glucagon active la PKA qui phosphoryle CREB augmentant son interaction avec le coactivateur CBP/p300 (CREB binding protein). Dans un même temps, la PKA induit la déphosphorylation et la translocation nucléaire d'un second coactivateur de CREB, CRTC2 (CREB regulated transcription coactivator 2). Actif, CREB induit la transcription de PGC1 $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1) qui augmente l'activité transcriptionnelle de FoxO1. Par conséquent, FoxO1 et CREB se fixent sur leurs éléments de réponse respectifs présents sur les promoteurs de la PEPCK et de la G6Pase (Figure 5).

Inversement, en réponse à l'insuline, Akt inhibe l'activité de FoxO1 en le phosphorylant et le séquestrant dans le cytoplasme via la protéine 14.3.3.

De plus, Akt induit l'activation de la kinase SIK (salt-inducible kinase) qui phosphoryle CRTC2 et empêche le recrutement de CREB sur son élément de réponse. Ces mécanismes inhibent la transcription de la PEPCK et de la G6Pase (Oh et al., 2013) (Figure 5).

Au cours du jeûne, le foie produit du glucose au travers de la glycogénolyse et la néoglucogenèse mais il régule également le métabolisme lipidique en captant les acides gras issus de la lipolyse adipocytaire. Ces acides gras sont β-oxydés pour fournir de l'énergie.

13

#### 2. <u>Régulation du métabolisme lipidique</u>

Contrairement aux glucides qui forment une famille relativement homogène, les lipides constituent quant à eux une famille très hétérogène. On connait aujourd'hui près d'un millier de lipides différents. Les lipides sont des composés comportant une chaîne aliphatique (formée de -CH<sub>2</sub>-) d'au moins 8 atomes de carbones. Quelques acides gras à chaîne très courte font exception à la règle (exemple de l'acide butyrique en C4).

#### a) Les acides gras

Les acides gras (AG) ont des fonctions multiples et agissent au niveau métabolique, structural et signalétique. Ils sont les principaux constituants des membranes et les précurseurs de messagers cellulaires. De plus, ils constituent une source d'énergie indispensable pour l'organisme.

Ils sont principalement localisés au niveau du tissu adipeux où ils forment des réserves énergétiques. En raison de leur insolubilité dans l'eau, ils peuvent être stockés en grande quantité sans affecter l'équilibre osmotique et sans augmenter l'encombrement des réserves. D'ordinaire les acides gras sont monocarboxyliques, à chaine linéaire non ramifiée contenant un nombre pair d'atomes de carbones.

D'après la nomenclature, le carbone de la fonction carboxylique est le carbone 1 (C1). Le carbone de la fonction  $CH_3$  terminale est le carbone  $C\omega$ .

Les AG peuvent être saturés (sans double liaison), monoinsaturés (une double liaison) ou polyinsaturés (plusieurs doubles liaisons)

Le nombre de carbones de la chaîne aliphatique détermine le type d'AG. Les AG à chaîne courte ont un nombre de carbones inférieur à 8, les AG à chaîne moyenne entre 8 et 12, les acides gras à chaîne longue entre 12 et 20 et les acides gras à chaîne très longue, un nombre de carbones supérieur à 20.

Comme pour le glucose, la disponibilité des AG varie en fonction du statut nutritionnel et hormonal. A jeun, les AG hépatiques proviennent de la lipolyse du tissu adipeux.



Figure 6 : Lipolyse du tissu adipeux et transport des acides gras dans l'hépatocyte.

Les triglycérides sont hydrolysés dans le tissu adipeux puis libérés dans la circulation sanguine où ils s'associent à l'albumine. A l'approche des membranes hépatocytaires, le complexe est dissocié et les acides gras entrent dans la cellule grâce à différents transporteurs. Une fois dans la cellule, les acides gras sont activés sous forme d'acyl-CoA et sont soit estérifiés soit oxydés.

<u>Abréviations</u> : TAG : triacylglycérols, ATGL : adipose triglyceride lipase, AGL : acides gras libres, DAG : diacylglycérol, HSL : hormono-sensitive lipase, MAG : monoacylglycérol, MGL : monoglycérol lipase, FATP : Fatty Acid Transport Proteins, FAT : Fatty Acid Translocase, FABP : Fatty Acid Binding Proteins, ACS : acyl-CoA synthase.

#### b) Le captage des acides gras issus de la lipolyse

La lipolyse est une voie catabolique induisant la mobilisation de carburant métabolique en particulier des AG libres à partir du tissu adipeux pour les tissus périphériques non adipeux (foie, cœur, pancréas et muscle) où ils sont stockés sous forme de triglycérides (TG) ou β-oxydés.

Cette voie implique l'hydrolyse des triglycérides adipocytaires relarguant dans la circulation des AG libres et du glycérol. L'hydrolyse des triglycérides fait intervenir trois lipases (Figure 6). L'adipose triglycéride lipase (ATGL) hydrolyse les TG en diacylglycérol (DAG) et permet la libération d'un AG.

Suite à cette première étape, le DAG est soit converti en monoacylglycérol (MAG) grâce à la monoglycérol lipase (MGL), soit complètement oxydé par l'action de la MGL suivie de celle de la lipase hormono-sensible (HSL) permettant le relargage respectivement d'un ou deux AG et du glycérol (Saponaro et al., 2015).

Les AG, insolubles en milieu aqueux, sont transportés dans la circulation sanguine en complexe avec l'albumine. Précédemment, il a été montré que les AG entrent par diffusion passive à travers la bicouche lipidique. Cependant, le groupe de Stremmel (Stremmel et al., 2001) a montré que l'entrée des AG dans la cellule est beaucoup plus complexe impliquant plusieurs étapes : la dissociation des AG de l'albumine, le transport à travers la membrane plasmique, la fixation à des protéines intracellulaires, leur activation sous forme d'acyl-CoA suivie de leur estérification ou de leur  $\beta$ -oxydation.

Les auteurs ont suggéré que les AG se présentent à la membrane complexés à l'albumine. Du fait de l'affinité très forte de la membrane pour les AG, lorsque le complexe AG/albumine s'en approche, il se dissocie. Les AG libérés peuvent diffuser passivement à travers la membrane (essentiellement les AG à chaîne courte) ou se lier aux protéines de transport membranaire : les cavéolines, les Fatty Acid Transport Proteins (FATPs), les Fatty Acid Translocase (FAT/CD36) et les Fatty Acid Binding Proteins (FABPs) (Glatz and van der Vusse, 1996) (Stremmel et al., 2001) (Figure 6).



#### **Figure 7** : β-oxydation mitochondriale et cétogenèse.

Les acides gras à chaîne courte ou moyenne peuvent diffuser passivement dans la matrice mitochondriale et les acides gras à chaîne longue utilisent un système de transporteurs (CPT1/CPT2) pour le passage des deux membranes. Une fois dans la mitochondrie, les acides gras sont  $\beta$ -oxydés afin de fournir de l'acétyl-CoA. Ce produit peut, par la cétogenèse, fournir des composés utilisables comme source d'énergie par différents tissus et des cofacteurs nécessaires à la néoglucogenèse.

<u>Abréviations</u>: AGCL: acides gras à chaînes longues, ACS: acyl-CoA synthase, CPT1/2: carnitine palmitoyltransférase 1/2, ATP: adénosine triphosphate, NADH, $H^+$ : nicotinamide adénine dinucléotide, HMG: hydroxy-méthylglutaryl.

#### c) Activation des acides gras

Dans le cytoplasme, les AG sont activés par les acyl-CoA synthases (ACSs) sous forme d'acyl-CoA. Ce processus est indispensable pour le passage des AG à travers les membranes et l'entrée dans les organites. En effet, pour fournir de l'énergie, ils sont estérifiés dans le *reticulum* endoplasmique ou oxydés dans la mitochondrie.

Les ACSs sont une famille d'enzymes catalysant l'addition du Coenzyme A sur des AG libres. Cette famille comporte 5 isoformes décrites qui différent par leur préférence en substrat (longueur des chaînes) et leur localisation. En effet, seules les isoformes 1, 4 et 5 sont exprimées au niveau du foie. Les isoformes 1 et 4 sont retrouvées au niveau du *reticulum* endoplasmique orientant les AG plutôt vers l'estérification alors que l'isoforme 5 mitochondriale oriente les AG vers la  $\beta$ -oxydation (Ellis et al., 2010) (Coleman et al., 2002).

# d) Entrée des acides gras dans la mitochondrie, β-oxydation et cétogenèse

L'oxydation des AG hépatiques a un rôle majeur dans l'homéostasie glucido-lipidique. La  $\beta$ oxydation est activée durant le jeûne, un exercice soutenu ou l'allaitement. Elle dégrade les acylCoA d'une part pour former des corps cétoniques, utilisés comme source d'énergie par divers tissus (muscle, rein et cerveau) et d'autre part pour libérer des cofacteurs (NADH,H<sup>+</sup>, FADH<sub>2</sub>) pour la production d'ATP et d'acétyl-CoA nécessaires à la néoglucogenèse (Figure 7). La  $\beta$ -oxydation a lieu dans la mitochondrie (pour les AG à chaîne courte, moyenne et longue) et dans le peroxysome (pour les AG toxiques et à chaîne très longue).

Alors que les AG à chaîne courte et moyenne passent la membrane mitochondriale externe sans activation, la translocation des AG à chaîne longue (AGCL) à travers la membrane mitochondriale externe nécessite leur conversion en acyl-carnitine, à partir d'acyl-CoA libre et de carnitine, grâce à la carnitine palmitoyltransférase (CPT1).

Le malonyl-CoA, produit de l'acétylCoA carboxylase 2 (ACC2) est un inhibiteur allostérique de CPT1. Le malonyl-CoA diminue le taux de β-oxydation en empêchant l'import des AG vers la mitochondrie (McGarry and Brown, 1997).

Les acyl-carnitines néosynthétisés sont transportés à travers la membrane mitochondriale interne par CPT2 (carnitine acylcarnitine translocase). Elle convertit les acyl-carnitines en acyl-CoA en échange de carnitine libre et permet leur translocation vers la mitochondrie. Au sein de la matrice mitochondriale, l'acylCoA formé peut s'engager dans la voie de la  $\beta$ oxydation nécessitant l'activité de 4 enzymes afin de produire de l'acétylCoA : l'acyl-CoA déshydrogénase, l'énoyl-CoA hydratase, l'hydroxyacyl-CoA déshydrogénase et la  $\beta$ cétothiolase (Figure 7).

Les acétyl-CoA formés sont soit complètement oxydés par le cycle de Krebs afin de générer du NADH/H<sup>+</sup> et FADH<sub>2</sub> pour la biosynthèse d'ATP via les chaînes de transporteurs d'électrons soit utilisés pour la cétogenèse.

La cétogenèse permet la synthèse de corps cétoniques : acétone, acétoacétate et hydroxybutyrate, utilisés comme source d'énergie par divers tissus tels que les muscles, le cerveau et les reins (Figure 7). En effet, ils diffusent librement à travers les membranes de ces tissus qui, contrairement au foie, peuvent réactiver ces corps cétoniques en acétyl-CoA. La cétogenèse est un processus exclusivement hépatique et est hormono-dépendante. Elle est régulée positivement par le jeûne et négativement en période postprandiale (Fukao et al., 2004) (Figure 7).

A jeun, la diminution du taux de malonyl-CoA augmente l'activité de CPT1 et l'entrée des AG dans la mitochondrie. Ces AG sont ensuite catabolisés par oxydation augmentant le rapport NADH,H<sup>+</sup>/NAD<sup>+</sup>. Par conséquent, la réduction de l'oxaloacétate en malate est plus importante. Le malate peut être exporté de la mitochondrie et participer à la néoglucogenèse. La formation de malate empêche l'acétyl-CoA provenant de la β-oxydation de donner du citrate. La seule destinée possible de l'acétyl-CoA est la synthèse de corps cétoniques (Figure 7). Après la sortie des corps cétoniques hépatiques, ils sont captés par les tissus capables de les utiliser. L'acétyl-CoA est également un activateur allostérique de la pyruvate carboxylase induisant le néoglucogenèse (Figure 7).

A jeun, afin de réguler l'homéostasie glucidique, le foie oriente les flux métaboliques vers la formation et la libération de glucose par deux voies : tout d'abord par la glycogénolyse puis la néoglucogenèse. Enfin les AG en provenance du tissu adipeux sont également captés par le foie et β-oxydés afin de fournir les cofacteurs pour réaliser la néoglucogenèse ou des corps cétoniques permettant l'apport d'énergie aux tissus extrahépatiques.

# C. <u>Rôle du foie dans le contrôle du métabolisme post-</u> prandial

La période postprandiale correspond aux 8 heures après la prise alimentaire. Durant cette période, la digestion transforme les aliments en nutriments distribués dans les organes de réserves. Les réserves énergétiques sont constituées de glycogène, de protéines et de triglycérides.

Après un repas, la glycémie augmente et peut atteindre jusqu'à 2 g.L<sup>-1</sup>. Les îlots bêta pancréatiques secrètent l'insuline pour stocker le glucose et rétablir une glycémie normale (1 g.L<sup>-1</sup>). En effet, le foie capte le glucose et le métabolise en glycogène (glycogénogenèse) et en AG (lipogenèse).

### 1. <u>Régulation du métabolisme glucidique</u>

#### a) L'entrée du glucose dans le foie

La capacité à transporter le glucose à travers la membrane plasmique est une caractéristique commune à toutes les cellules, de la simple bactérie aux cellules très spécialisées comme les neurones. L'entrée du glucose dans la cellule est régie par des protéines de transport. Il existe différents types de transport de glucose : la diffusion passive, le transport actif secondaire couplé aux ions sodium par les transporteurs SGLT (sodium-dependent glucose transporters) et la diffusion facilitée réalisée par les transporteurs GLUT (glucose transporters).

Le transporteur SGLT est exprimé à la membrane apicale des entérocytes, dans les reins et le cœur. Il transporte le glucose contre son gradient de concentration contrairement aux transporteurs GLUT. Les transporteurs GLUT équilibrent les concentrations de glucose intracellulaires et extracellulaires en accélérant le passage du glucose dans le sens du gradient.

A ce jour, la famille GLUT est constituée de 14 membres dont l'expression diffère entre les espèces, les tissus et les types cellulaires (Olson and Pessin, 1996) (Karim et al., 2012). Quatre transporteurs sont présents au niveau du foie : GLUT-1, 2, 9 et 10 (Nordlie et al., 1999) (McVie-Wylie et al., 2001) (Keembiyehetty et al., 2006).

Cependant, grâce à de très bonnes constantes Vm et Km pour le glucose, seul le transporteur GLUT-2 assure l'entrée et la sortie de glucose dans l'hépatocyte (Leturque et al., 2009).



Figure 8 : Les différentes voies métaboliques du glucose.

En période postprandiale, le foie régule les taux de glucose en le métabolisant. Le glucose est piégé dans l'hépatocyte grâce à sa phosphorylation en G6P par la glucokinase. Le G6P emprunte alors différentes voies : la glycogénogenèse (stockage du glucose sous forme de glycogène), la voie des pentoses phosphates (synthèse du NADPH,H<sup>+</sup> nécessaire à la lipogenèse), la glycolyse couplée à la lipogenèse (stockage du glucose sous formes d'acides gras) et la voie de biosynthèse des hexosamines (synthèse d'UDP-GlcNAc nécessaire, entre autres, à la *O*-GlcNAcylation des protéines).

<u>Abréviations</u> : Ribose 5P : Ribose-5-phosphate, UDP-GlcNAc : Uridine diphospho-N-acétylglucosamine.

La régulation de l'expression du gène codant GLUT-2 est complexe et dépend des niveaux de glycémie et d'insulinémie (Rencurel et al., 1996).

Le transporteur GLUT-2 est localisé au niveau de la membrane plasmique basolatérale de l'hépatocyte (Thorens et al., 1990). Sa localisation joue un rôle important dans la régulation des flux de glucose et est modulée en fonction des conditions nutritionnelles.

En réponse à l'insuline, deux équipes ont montré que GLUT-2 et le récepteur à l'insuline colocalisent et cointernalisent. Ces observations sont en accord avec le rôle inhibiteur de l'insuline sur la production hépatique de glucose (Eisenberg et al., 2005) (González-Rodriguez et al., 2008).

En effet, après un repas, le foie stocke le glucose sous forme de glycogène ou de lipides. Inversement, la production de glucose endogène est limitée par l'inhibition des enzymes néoglucogéniques. Par conséquent, l'internalisation de GLUT-2 constitue un autre mécanisme empêchant l'entrée de glucose au niveau du foie.

A jeun, la délétion de GLUT-2 n'affecte pas la production de glucose hépatique suggérant que le glucose peut être relargué des hépatocytes par d'autres transporteurs (par exemple GLUT-1) ou d'autres mécanismes (Seyer et al., 2013).

Suite à son entrée dans la cellule, le glucose est phosphorylé en G6P par la glucokinase. Le G6P étant incapable d'être transporté par les transporteurs à glucose, est piégé dans les hépatocytes.

A l'état nourri, le G6P agit comme un précurseur de la synthèse de glycogène, d'uridine diphosphate N-acétylglucosamine (UDP-GlcNAc) et de pyruvate par la voie de la glycolyse. Le pyruvate est oxydé dans la mitochondrie par le cycle de Krebs pour générer de l'ATP et utilisé pour la biosynthèse d'AG par la lipogenèse. Le G6P est également métabolisé par la voie des pentoses phosphates générant du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH,H<sup>+</sup>), cofacteur requis pour la lipogenèse et la biosynthèse d'autres molécules (Figure 8).

#### b) La glycogénogenèse

En période postprandiale, le glucose permet la reconstitution des réserves de glycogène, utilisées au cours de la période de jeûne, par le muscle squelettique et le foie. Le glycogène est un polyoside constitué d'un enchaînement de résidus de glucose liés par des liaisons glycosidiques en  $\alpha$ 1,4 et des ramifications en  $\alpha$ 1,6.
Le foie stocke une partie du glucose en glycogène car il peut être reconverti rapidement en glucose pour le maintien de l'homéostasie glucidique.

A l'état nourri, le glucose entre dans l'hépatocyte et emprunte la voie de la glycogénogenèse. La première réaction du métabolisme du glucose est catalysée par la GK et fournit le G6P. Le G6P est converti en G1P par la phosphoglucomutase puis en uridine diphosphate glucose (UDP-Glc) par l'UDP-Glc pyrophosphorylase. L'UDP-Glc est incorporé à la chaîne préexistante de glycogène.

L'enzyme clef de la glycogénogenèse est la glycogène synthase (GS). Elle catalyse le transfert d'unités de glucose en  $\alpha$ 1,4 aux résidus terminaux non réducteurs du glycogène en utilisant l'UDP-Glc. Les enzymes de branchement transfèrent des chaînes de 6 à 8 unités de glucose en formant des liaisons  $\alpha$ 1,6.

La GS est régulée de façon post-traductionnelle par phosphorylation/déphosphorylation.

A l'état nourri, l'activation de la voie Akt conduit à la phosphorylation et l'inactivation de GSK3. GSK3 ne peut plus phosphoryler la GS qui devient active (Figure 3). En parallèle, la déphosphorylation de la GS par la glycogène synthase phosphatase (GSP) comprenant PP1 en association avec des protéines cibles du glycogène active la biosynthèse de glycogène (Ceulemans et al., 2002) (Ferrer et al., 2003) (Figure 3).

La GS est également activée de manière allostérique par le G6P. Le G6P induit un changement de conformation de la GS la rendant plus accessible à la GSP (Ferrer et al., 2003).

#### c) La Glycolyse

Les hépatocytes ont une grande flexibilité dans le choix des carburants métaboliques (glucose et/ou acides gras). La sélection de ce carburant est régulée par des signaux nutritifs et hormonaux. La glycolyse prédomine lorsque les concentrations en glucose sont élevées. En plus d'être complètement oxydés pour générer de l'ATP, les intermédiaires et produits glycolytiques sont utilisés pour la synthèse de lipides, d'acides aminés et d'autres biomolécules.

L'oxydation du glucose comporte deux séries d'étapes : l'une cytosolique (la glycolyse) permettant la biosynthèse de deux molécules de pyruvate, l'autre mitochondriale (cycle de Krebs) oxydant totalement le pyruvate en CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O.



Figure 9 : Représentation schématique des voies de la glycolyse et des pentoses phosphates.

Suite à son entrée dans la cellule et à sa phosphorylation, le G6P peut emprunter la voie de la glycolyse (bleu) nécessaire pour la production de pyruvate couplée à la lipogenèse (rose) indispensable à la biosynthèse des acides gras ou la voie des pentoses phosphates (vert) nécessaire à la formation de métabolites indispensables pour la synthèse des nucléotides ou des intermédiaires de la glycolyse.

<u>Abréviations</u>: GK : glucokinase, G6P : glucose-6-phosphate, F6P : fructose-6-phosphate, PFK1 : phosphofructokinase 1, F1,6BP : fructose-1,6-Bisphosphate, DHAP : dihydroxyacétone phosphate, G3P : glycéraldéhyde-3-phosphate, 1,3-BisPG : 1,3-Bisphosphoglycérate, 3 PG : 3-phosphoglycérate, 2-PG : 2-phosphoglycérate, PEP : phosphoénol-pyruvate, L-PK : liver-pyruvate kinase.

La glycolyse est conservée au cours de l'évolution et, par cette voie, le glucose est une source d'énergie et précurseur de molécules d'intérêt biologique.

La glycolyse est une série de réactions dégradant une molécule de glucose en deux molécules de pyruvate et deux molécules d'ATP (Figure 9). Parmi les 9 réactions glycolytiques, deux sont limitantes (avec un  $\Delta$ G<0) et catalysées par des enzymes finement régulées : PFK1 qui convertit le F6P en F1,6BP et la pyruvate kinase (PK) qui convertit le PEP en pyruvate.

De plus, la glucokinase (GK) phosphorylant le glucose en G6P, métabolite commun à plusieurs voies dont la glycolyse, est finement régulée.

### 1) La glucokinase (GK)

La GK est exprimée dans le foie et les cellules  $\beta$  du pancréas, et fonctionne comme un senseur du glucose de par son Km élevé. Elle catalyse la phosphorylation du glucose en G6P. La présentation et la régulation de la GK sont détaillées dans la deuxième partie du manuscrit.

### 2) La phosphofructokinase 1 (PFK1)

PFK1 est une enzyme tétramérique catalysant la première étape de l'engagement du glucose dans la glycolyse grâce à une réaction irréversible. Son activité est limitante et critique dans le flux glycolytique (Jenkins et al., 2011).

L'activité de PFK1 est inhibée de manière allostérique par l'ATP et le citrate, reflets de l'abondance énergétique, et activée par l'adénosine monophosphate (AMP) et l'adénosine diphosphate (ADP) (Jenkins et al., 2011).

Le lactate, produit final de la glycolyse, induit la dissociation de l'enzyme. PFK1 passe d'une forme tétramérique à dimérique ce qui réduit son activité et crée une boucle de rétrocontrôle négatif du flux glycolytique (Costa Leite et al., 2007).

Inversement, l'activité de PFK1 est augmentée par le F2,6BP, signal métabolique non glycolytique critique dans la régulation du métabolisme du glucose hépatique. Le F2,6BP régule la dynamique entre la glycolyse et la néoglucogenèse en activant PFK1 et en inhibant F1,6BPase (Rider et al., 2004).

Le F2,6BP est généré à partir du F6P par une enzyme bifonctionnelle contenant un domaine kinase (PFK2) et un domaine phosphatase (F2,6BPase).

L'activité de PFK2 est régulée de manière hormonale. En réponse à l'insuline, PFK2 est déphosphorylée et activée par la protéine phosphatase 2A (PP2A) (Assimacopoulos-Jeannet and Jeanrenaud, 1990). La concentration en F2,6BP augmente accélérant le flux glycolytique (Rider et al., 2004) (Atsumi et al., 2005).

Inversement, au cours du jeûne, le glucagon active la PKA qui phosphoryle et inhibe l'enzyme PFK2/FBP2 diminuant la concentration de F2,6BP et la glycolyse.

### 3) La liver pyruvate kinase (L-PK)

Comme la plupart des enzymes glycolytiques, l'activité de la L-PK est régulée positivement par des effecteurs allostériques tels que le F1,6BP et négativement par l'ATP, l'acétylCoA et les acides gras. Le F1,6BP adapte l'activité de l'enzyme à la vitesse du flux métabolique induit par PFK1. Cela permet à la PK de réguler son activité par anticipation en fonction du flux.

Son activité est régulée en fonction des conditions nutritionnelles. Elle diminue à jeun et augmente en période postprandiale (Vaulont et al., 1986).

La PK est également régulée de manière post-traductionnelle par phosphorylation. Son activité est inhibée par phosphorylation par la PKA en réponse au glucagon et activée par déphosphorylation en réponse à l'insuline (S J Pilkis and Claus, 1991).

### d) La voie des pentoses phosphates

Dans le foie, la voie des pentoses phosphates est une autre voie métabolique majeure du glucose (Figure 9). Cette voie cytosolique métabolise le G6P indépendamment de la glycolyse. Les intérêts de cette voie sont multiples :

- Elle synthétise du ribose-5P nécessaire pour la synthèse des nucléotides, des acides ribonucléiques (ARNs) et de l'acide désoxyribonucléique (ADN).
- Elle permet la formation du cofacteur NADPH,H<sup>+</sup> indispensable pour les réactions de biosynthèse, entre autres, des AG.

La voie des pentoses phosphates comprend deux branches distinctes, oxydative et non oxydative. Les réactions de la branche oxydative sont irréversibles et produisent deux molécules de NADPH,H<sup>+</sup> et une molécule de ribulose-5P. La branche non oxydative ou régénératrice transformant le ribose-5P en hexose-6P.



### Figure 10 : Schéma représentant la voie de la lipogenèse.

Le glucose peut entrer dans la voie de la glycolyse pour former le pyruvate. Le pyruvate, dans la mitochondrie, est à l'origine de la biosynthèse de citrate. Le citrate donne l'oxaloacétate et l'acétyl-CoA. L'ACC métabolise l'acétyl-CoA en malonyl-CoA. La FAS utilise le malonyl-CoA et l'acétyl-CoA pour synthétiser des acides gras qui pourront ensuite être allongés et/ou désaturés.

<u>Abréviations</u>: G6P : glucose 6P, G3P : glycéraldéhyde 3P, PC : pyruvate carboxylase, PDH : pyruvate déshydrogénase, ACL : ATP citrate lyase, ACC : Acétyl-CoA carboxylase, FAS : Fatty Acid Synthase, SCD1 : stéaroyl-CoA désaturase, GPAT : glycérol 3P acyltransférase.

La partie oxydative dépend principalement de l'activité de l'enzyme glucose-6P déshydrogénase (G6PDH) alors que la transaldolase est l'enzyme limitante de la partie non oxydative (Figure 9).

### 2. <u>Régulation du métabolisme lipidique</u>

En période postprandiale, les lipides sont émulsionnés dans l'intestin puis hydrolysés sous forme d'AG. Les AG libérés à chaîne courte (C<8) ou moyenne (8<C<12) pénètrent dans le foie par diffusion simple. Les acides gras plus longs (C>12) sont estérifiés et transitent dans la circulation sous forme de chylomicrons. Durant leur transit, les AG sont hydrolysés et se lient à l'albumine. Ainsi, ils sont à disposition des tissus cibles (muscle, tissu adipeux).

Le foie forme des very low density lipoprotein (VLDL) afin d'exporter les TG vers les tissus, et en particulier le tissu adipeux. Le foie est capable de capter une petite partie des low density lipoprotein (LDL) dérivant des VLDL néosynthétisés par lui-même.

De plus, lorsque les taux de glucose augmentent, le foie produit des AG à partir du glucose grâce à la lipogenèse.

### a) La lipogenèse

Le foie est l'organe principal permettant la conversion des glucides en AG. Le processus est divisé en trois parties : la synthèse d'AG, l'élongation/la désaturation des AG et l'assemblage en TG ou la production d'esters de cholestérol (Figure 10). Les TG néosynthétisés ou esters de cholestérol sont stockés sous forme de gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes ou secrétés dans la circulation par des particules VLDL vers le tissu adipeux et autres tissus extrahépatiques.

Après un repas, les glucides sont utilisés préférentiellement pour générer de l'ATP. L'excès de ces glucides est converti en AG.

La synthèse des AG est intimement reliée au catabolisme du glucose (Postic and Girard, 2008). En effet, le glucose est converti en pyruvate par la glycolyse (Figure 10). Le pyruvate est importé dans la mitochondrie et métabolisé en acétyl-CoA par la pyruvate déshydrogénase (PDH). L'acétyl-CoA est combiné à l'oxaloacétate par la citrate synthase pour former le citrate. Le citrate synthétisé dans la matrice mitochondriale ne peut sortir dans le cytoplasme qu'en empruntant la navette citrate-pyruvate. Dans le cytoplasme, le citrate est clivé en acétyl-CoA et oxaloacétate par l'ATP citrate lyase (ACL). L'oxaloacétate est réduit en malate lui-même converti en pyruvate par l'enzyme malique permettant la production de NADPH,H<sup>+</sup>. Le pyruvate est recyclé dans la mitochondrie. Il est carboxylé par la PC pour former l'oxaloacétate et poursuivre vers la synthèse de citrate. Ce cycle (cycle de Lardy) induit la synthèse d'acétyl-CoA cytoplasmique à partir du pyruvate. Dans le cytoplasme, l'acétyl-CoA est carboxylé par l'ACC pour former le malonyl-CoA. Le malonyl-CoA cytosolique est utilisé pour la biosynthèse d'AG. Cette réaction est catalysée par la Fatty Acid Synthase (FAS) qui représente la deuxième enzyme de la biosynthèse *de novo* d'AG. La FAS utilise le malonyl-CoA comme précurseur, l'acétyl-CoA comme donneur de carbone et le NADPH,H<sup>+</sup> (fourni par la voie des pentoses phosphates et la réaction réalisée par l'enzyme malique) comme équivalent réducteur (Chirala and Wakil, 2004).

Le palmitate (C16 :0) est le premier AG synthétisé de manière endogène. Il peut être allongé en stéarate (C18 :0) ou en AG plus longs par des enzymes d'élongation (ELOVL). Le palmitate et le stéarate peuvent également être désaturés par la stéaroyl-CoA désaturase 1 (SCD1) qui convertit les AG saturés en AG monoinsaturés. Une fois les AG synthétisés, allongés et désaturés, ils sont estérifiés avec le glycérophosphate fourni par le métabolisme des glucides pour former des lipides plus complexes comme les triglycérides (Figure 10).

La lipogenèse est régulée en fonction du statut nutritionnel cellulaire. L'insuline favorise la lipogenèse alors que le glucagon l'inhibe.

#### 1) L'acétyl-CoA carboxylase (ACC)

L'ACC catalyse la carboxylation de l'acétyl-CoA pour former le malonyl-CoA. Chez les mammifères, il existe deux isoformes de l'ACC. ACC1 est localisée dans le cytoplasme et ACC2 dans la membrane mitochondriale externe. La délétion systémique d'ACC1 cause la mort embryonnaire (Abu-Elheiga et al., 2005). Cependant l'inhibition transitoire hépatique d'ACC1 mais pas d'ACC2 diminue les niveaux de malonyl-CoA et par conséquent la lipogenèse, augmente la β-oxydation et protège le foie de la stéatose (Savage et al., 2006).

ACC1 est très exprimée dans le tissu adipeux, le foie et la glande mammaire en lactation. Son expression et son activité dépendent des conditions nutritionnelles. Elles sont inhibées à jeun et restaurées après un repas. Le gène codant ACC1 est sous le contrôle de trois promoteurs distincts induits par le glucose, l'insuline, les hormones thyroïdiennes et la leptine (Mao et al., 2003). L'activité de l'ACC1 est contrôlée par des effecteurs allostériques. Parmi eux, le citrate et d'autres acides carboxyliques induisant la polymérisation de l'enzyme et son activation (Vagelos et al., 1963). Le malonyl-CoA, le CoA libre et les AG sont, en revanche, des inhibiteurs d'ACC1 (Moule et al., 1992).

L'activité d'ACC1 est également régulée de manière post-traductionnelle par phosphorylation. Le glucagon entraîne une rapide phosphorylation et inactivation d'ACC1. Cette inhibition est contrôlée par l'AMPc mais la phosphorylation d'ACC1 est très largement réalisée par l'AMPactivated protein kinase (AMPK). Quant à l'insuline, elle réverse l'inhibition causée par l'AMPK (Witters and Kemp, 1992) (Munday, 2002) et active l'ACC1.

L'isoforme ACC2 est présente au niveau du cœur, du muscle et très peu dans le foie. L'inhibition de l'ACC2 n'a pas d'effet sur le déroulement de la lipogenèse mais augmente la  $\beta$ -oxydation des AG.

### 2) La Fatty Acid Synthase (FAS)

La FAS catalyse la biosynthèse d'AG saturés à partir du malonyl-CoA et de l'acétyl-CoA. Sa régulation est détaillée dans la partie trois de ce manuscrit.

### 3) Les élongases

Certains AG provenant de l'alimentation ou issus de la lipogenèse sont allongés en AG à très longue chaîne (C>20). L'élongation des AG implique l'addition de deux carbones sur les acyl-CoA en utilisant le malonyl-CoA et le NADPH, H<sup>+</sup> comme agent réducteur.

Les protéines d'élongation d'AG à très longue chaîne (ELOVL) sont des enzymes liées à la membrane du *reticulum* endoplasmique. A ce jour, 7 protéines de la famille ELOVL sont identifiées chez les mammifères et classées en deux groupes. Les isoformes 1, 3, 6 et 7 allongent les AG saturés et monoinsaturés alors que les isoformes 2, 4 et 5 allongent plutôt les AG polyinsaturés.

ELOVL6, première isoforme découverte, catalyse la conversion du palmitate (C16 :0) en stéarate (C18 :0). Elle est up-régulée dans des souris transgéniques surexprimant le facteur sterol regulatory element-binding protein (SREBP) (Moon et al., 2001).



**Figure 11** : Schéma représentant la biosynthèse des triglycérides et le devenir des acides gras néosynthétisés.

Les AG sont activés en acyl-CoA grâce à l'ACS. La GPAT permet ensuite la formation d'acide lysophatidique. L'estérification d'un second acyl-CoA sur le LPA est catalysée par l'AGPAT pour donner l'acide phosphatidique. Le PA est déphosphorylé par la lipine pour donner du DAG. La dernière étape de la biosynthèse d'un triglycéride est catalysée par la DGAT et permet le transfert d'un troisième et dernier acyl-CoA sur le DAG. Les triglycérides ainsi néosynthétisés sont soit stockés sous forme de gouttelettes lipidiques soit incorporés dans des VLDL afin d'être exportés hors du foie. Les AG peuvent être incorporés dans d'autres lipides complexes. L'incorporation spécifique en différentes classes lipidiques est orchestrée par les enzymes limitantes des différentes voies. Les phospholipides sont synthétisés à partir du DAG par trois enzymes essentiellement: CPET1 catalysant la synthèse de phosphatidylcholine et phosphatidyléthanolamine, CHPT1 permet uniquement la synthèse de phosphatidylcholine et CDIPT catalyse la synthèse de phosphatidylinositol. D'autre part, les AG peuvent être incorporés au cholestérol permettant la formation d'esters de cholestérol. Pour finir, les céramides sont synthétisés par l'incorporation de deux acides gras (palmitate activé sous forme de palmitoyl-CoA) sur une sérine puis ensuite la sphinganine par la SPTLC et CERS respectivement.

<u>Abréviations</u>: LPA: acide lysophosphatidique, DAG: diacylglycérol, DGAT, diacylglycérol acyltransférase, ACAT: acétyl-CoA acétyltransférase, SPTLC: sérine palmitoytransférase, CERS: céramide synthase, CEPT1: choline/éthanolamine phosphotransférase 1, CHPT1: choline phosphotransferase 1, CDIPT: CDP-diacylglycérol-inositol 3 phosphatidyltransférase, ACS: Acyl-CoA synthase, GPAT: glycérol 3P acyltransférase, AGPAT: acylglycérol P acyltransferase, PA: acide phosphatidique, DGAT: diacylglycérol acyltransferase, TG: triglycérides.

Des souris KO pour ELOVL6 présentent une diminution de la quantité d'acides stéarique et oléique hépatiques. Ces souris échappent à la résistance à l'insuline induite par l'alimentation mais ne présentent pas d'amélioration au niveau de l'obésité ou de la stéatose hépatique (Matsuzaka et al., 2007). Au contraire, la surexpression d'ELOVL6 dans le foie induit la stéatose et la fibrose hépatique (Matsuzaka et al., 2012).

### 4) La stéaroyl-CoA désaturase 1 (SCD1)

L'enzyme SCD1 catalyse la désaturation de l'acide palmitique (C16 :0) et stéarique (C18 :0) en acide palmitoléique (C16 :1) et oléique (C18 :1) respectivement. Quatre isoformes de SCD existent mais seule l'isoforme 1 est retrouvée dans le foie (Ntambi et al., 1988). Des souris SCD1 knockout global (Ntambi et al., 2002) et spécifique au foie ont été générées (Miyazaki et al., 2007) afin de déterminer l'importance de cette enzyme dans la lipogenèse.

Les souris sont minces et présentent un défaut dans la biosynthèse des lipides et plus particulièrement des TG. La lipogenèse n'est donc plus induite et les souris sont protégées de la résistance à l'insuline et de l'obésité induite par un régime riche en sucre.

Peu de choses sont connues sur la régulation post-traductionnelle de SCD1. Cependant, son expression est régulée de manière transcriptionnelle en fonction des conditions nutritionnelles. Le régime riche en sucre, l'insuline et le cholestérol sont des effecteurs positifs de la transcription de SCD1 (Mauvoisin and Mounier, 2011).

Les AG néosynthétisés peuvent être le substrat d'enzymes produisant différentes entités. En effet, ils peuvent former des esters de cholestérol, des céramides, des phospholipides et des triglycérides (Figure 11).

En période postprandiale, l'excès de glucose permet la production, entre autres, d'AG. Les AG sont stockés dans des gouttelettes lipidiques hépatiques sous forme de TG ou exportés hors du foie vers le tissu adipeux ou autres tissus extrahépatiques grâce aux particules VLDL.

### b) Synthèse des triglycérides

Les longues chaînes d'acyl-CoA issues de la lipogenèse *de novo* peuvent être estérifiées sur le glycérol pour former des glycérolipides. La biosynthèse des triglycérides s'effectue principalement dans le *reticulum* endoplasmique. Trois étapes conduisent à la fixation de 3 molécules d'acyl-CoA sur le glycérol-3P.

La première étape est catalysée par la glycérol-3P acyltransférase (GPAT) et estérifie un acyl-CoA sur le premier carbone du glycérol-3P pour former l'acide lysophosphatidique (LPA). Le LPA donne ensuite des phospholipides ou des TG (Figure 11).

Il existe quatre isoformes de la GPAT. Elles sont toutes exprimées dans le foie mais ont des localisations subcellulaires différentes. Les GPAT1 et 2 sont localisées au niveau de la membrane mitochondriale externe alors que les isoformes 3 et 4 sont localisées dans le *reticulum* endoplasmique (Lewin et al., 2004) (Gimeno and Cao, 2008). GPAT1 joue un rôle primordial dans la biosynthèse des triglycérides puisqu'une diminution de l'expression de ses ARNm dans le foie de souris ob/ob réduit la biosynthèse de triglycérides et, par conséquent, améliore les désordres métaboliques (Xu et al., 2006).

L'étape suivante consiste à estérifier un autre acyl-CoA sur le carbone 2 du LPA pour former l'acide phosphatidique (PA) (Figure 11). Cette réaction est catalysée par l'acylglycérol phosphate acyltransférase (AGPAT).

Afin de former le TG, le PA doit être déphosphorylé pour donner du DAG. La déphosphorylation est catalysée par une famille de protéines appelée Lipine.

Le DAG néosynthétisé est pris en charge par la diacylglycérol acyltransférase (DGAT), enzyme limitante, afin de former le TG (Figure 11).

Au niveau hépatique, les TG sont stockés sous forme de gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme ou exportés hors du foie sous forme de VLDL.

#### c) Sécrétion des VLDL

Le foie secrète les TG sous forme de particules VLDL qui les distribuent vers les tissus périphériques comme le muscle squelettique, cardiaque et les tissus adipeux.

Les VLDL produits sont constitués d'un core de lipides neutres (particulièrement des TG) entouré d'un manteau hydrophile (monocouche de phospholipides). Chaque particule de VLDL est stabilisée par une seule protéine clef structurale : l'apolipoprotéine (apo). L'apo B100 est la protéine majeure mais il existe, dans ces mêmes particules, l'apoCl, l'apoCll, l'apo Clll et l'apoE.

La biosynthèse des VLDL s'effectue dans la lumière du RE et est réalisée en deux étapes (Rustaeus et al., 1999). Elle débute par la translocation de l'Apo B100 nouvellement synthétisée à travers la membrane du *reticulum*.

Au cours de cette étape, l'Apo B100 est partiellement lipidée pour former une pré-particule VLDL. Dans un même temps, des particules riches en TG sans apoB sont produites. Cette étape est facilitée par l'enzyme microsomal triglyceride transfer protein (MTP). La MTP présente 3 domaines : un site de fixation pour l'ApoB 100, un domaine pour le transfert lipidique et un domaine d'interaction membranaire (Hussain et al., 2003).

La deuxième étape de la formation des VLDL consiste en la fusion des pré-particules de VLDL avec les particules riches en triglycérides présentes dans le cytosol pour former des particules de VLDL matures exportées vers le tissu adipeux (Tiwari and Siddiqi, 2012).

#### Conclusion

Au cours du jeûne, le foie maintient une glycémie constante en mobilisant, dans un premier temps, les réserves de glycogène (glycogénolyse). En réponse à un jeûne prolongé, le foie synthétise *de novo* du glucose (néoglucogenèse). Concernant le métabolisme lipidique, lorsque les concentrations en glucose sont basses, le foie capte les AG provenant de la lipolyse du tissu adipeux. Ces AG sont oxydés afin de fournir l'énergie et les cofacteurs nécessaires à la néoglucogenèse. Ils sont également précurseurs de la cétogenèse.

A l'état nourri, le glucose entre dans le foie puis est phosphorylé par la glucokinase en G6P. Cette étape permet la séquestration du glucose dans l'hépatocyte. Le G6P, peut être dirigé vers différentes voies telles que la glycogénogenèse, la glycolyse, la voie de biosynthèse des hexosamines et la voie des pentoses phosphates. A l'état nourri, le glucose en excès produit l'acétyl-CoA permettant la biosynthèse des AG par la lipogenèse. Ces AG néosynthétisés sont estérifiés sous forme de TG, stockés sous forme de gouttelettes lipidiques au niveau du foie ou exportés par les VLDL.

Le métabolisme glucido-lipidique est sous le contrôle des hormones pancréatiques. A jeun, le glucagon induit l'expression des gènes impliqués dans la néoglucogenèse et inhibe celle des gènes codant les enzymes impliquées dans l'utilisation du glucose. De plus, le glucagon favorise le catabolisme des AG et inhibe la lipogenèse. L'insuline, quant à elle, est produite en réponse à la prise alimentaire. Elle active la transcription des gènes codant les enzymes impliquées dans l'utilisation du glucose et inhibe celles impliquées dans la biosynthèse du glucose. D'autre part, elle favorise la biosynthèse des AG et des TG et bloque leur utilisation.

Dans la deuxième partie de ce manuscrit, nous nous intéresserons à une enzyme clef de l'utilisation du glucose : la glucokinase.





L'activité de la GK augmente en corrélation avec l'augmentation des concentrations en glucose (surtout en concentration physiologique, environ 5 mmol.L<sup>-1</sup>). C'est pourquoi la glucokinase présente une cinétique sigmoide à l'inverse des hexokinases qui présente une cinétique en hyperbole.

## II. La Glucokinase

La glucokinase (GK, hexokinase IV) appartient à la famille des hexokinases (EC 2.7.1.1). Elle catalyse la première étape du métabolisme du glucose en le phosphorylant en G6P. Bien qu'initialement décrite dans le foie, la GK est également exprimée dans les cellules  $\beta$  pancréatiques, les neurones, l'hypophyse et les cellules entéro-endocrines K et L.

## A. La glucokinase : une hexokinase à part

La GK diffère des autres hexokinases sur plusieurs aspects : sa masse moléculaire, son affinité pour le glucose et son mode de régulation.

Sa masse moléculaire de 50 kDa représente la moitié de celle des hexokinases I, II et III. Cette différence s'explique par la présence d'un unique domaine kinase contrairement aux autres hexokinases en possédant deux.

La GK a une faible affinité pour le glucose (S0.5  $\approx$  7mM), environ 20 fois plus élevé que le Km des autres hexokinases. D'un point de vue enzymatique, les constantes de vitesse et d'affinité de la GK varient en fonction du ligand. Cette caractéristique fait que la représentation graphique de la vitesse initiale de réaction en fonction de la concentration en substrat représente une courbe sigmoïde et non une branche d'hyperbole comme pour les autres hexokinases (Figure 12) (Cárdenas et al., 1998).

Finalement, l'activité de la GK n'est pas inhibée par des concentrations physiologiques de son produit (G6P) contrairement aux autres hexokinases (Agius, 2008).

Ces propriétés expliquent pourquoi la GK tient une place centrale dans la régulation du métabolisme du glucose.

## B. Structure de la GK et régulation de son activité

La GK est catalytiquement active sous la forme d'un monomère et contient un seul site de fixation pour le glucose. Elle présente une structure bipartite composée d'un large domaine et d'un petit domaine liés par une charnière flexible.

La GK se présente sous la forme de conformations de basses et hautes affinités pour le glucose.



Figure 13 : Présentation des différentes conformations de la GK.

La GK existe sous trois conformations (fermée, ouverte et super ouverte) et possède deux cycles catalytiques (lent et rapide). La fixation du glucose sur la GK sous forme super-ouverte ou ouverte entraîne un changement de conformation de la GK vers un état fermé permettant la phosphorylation du Glc en G6P.

<u>Abréviations</u> : Glc : glucose, ATP : adénosine triphosphate, ADP : adénine diphosphate, G6P : glucose-6P. En effet, le glucose et les activateurs modifient l'espace entre les grands et les petits domaines globulaires de la GK génèrant l'ouverture d'une poche pour la fixation du glucose (Kamata et al., 2004) (Figure 13).

La structure cristallographique de la GK a clairement montré un changement de conformation important entre la forme active (fermée) et inactive (super-ouverte). De plus, une forme ouverte intermédiaire existe, Ainsi la GK peut adopter trois conformations différentes.

En absence de glucose, la GK reste majoritairement sous la forme super-ouverte thermodynamiquement favorable.

Lorsque le glucose se fixe à la forme super-ouverte, la GK change de conformation vers la forme ouverte. Ce changement est dû à l'interaction entre l'Asp 205 et le glucose. Après cette transition lente vers la forme ouverte, la présence d'ATP induit un changement de conformation vers la forme fermée, étape à laquelle la réaction enzymatique s'effectue. A la fin de la réaction, la GK retourne à l'état ouvert par le relargage du G6P et de l'ADP.

Comme l'équilibre entre la forme super-ouverte et ouverte est lent à s'établir, une large proportion de la GK reste à l'état ouvert. Si, pendant ce temps, le glucose se fixe sur la forme ouverte, la GK entre de nouveau dans le cycle catalytique sinon la GK retourne à l'état super-ouvert (Figure 13).

La GK présente deux cycles catalytiques : un lent et un rapide. A faibles concentrations en glucose, la GK utilise principalement le cycle lent puisque la forme super-ouverte est plus stable que les autres formes en absence de glucose. Quand les concentrations en glucose sont élevées, la GK utilise le cycle rapide. La capacité de la GK à réguler les concentrations de glucose plasmatiques est due à ce shift de cycle catalytique.

### C. <u>Régulation transcriptionnelle de la GK</u>

Chez les humains, le gène de la GK est localisé sur le chromosome 7p15.3-p15.1 et est constitué de 12 exons. Le gène code une protéine de 465 acides aminés avec une masse moléculaire de 52 kDa.

Chez les mammifères, deux promoteurs alternatifs tissus-spécifiques contrôlent l'expression de la GK. Le promoteur en amont, promoteur neuroendocrine, conduit à la synthèse de l'ARNm de la GK dans les tissus non hépatiques. Le promoteur en aval est impliqué dans la transcription du gène dans les hépatocytes. Ces promoteurs conduisent à la formation de transcrits variés : l'exon 1a retrouvé dans les cellules  $\beta$  du pancréas, les exons 1b et 1c exprimés dans le foie (lynedjian, 1993; Magnuson, 1990).

L'activité enzymatique de la GK est régulée en fonction du statut nutritionnel de la cellule. Après 48 heures de jeûne, elle est réduite de deux tiers et l'expression du gène est quasiment nulle (Tiedge and Lenzen, 1995). En période postprandiale, la restauration de l'expression et de l'activité enzymatique et de la GK sont insulino-dépendantes. Cependant, le glucagon a des effets inverses à ceux de l'insuline (lynedjian, 1993).

Dans des foies de rats diabétiques, l'expression de la GK est réduite de plus de 90% par rapport aux rats contrôles. L'administration d'insuline augmente le niveau d'expression et d'activité de la GK de façon temps dépendante pour atteindre une augmentation de 65% après 24h de stimulation à l'insuline (lynedjian et al., 1988).

Les effets de l'insuline sont transmis par la voie phosphatidylinositol-3-kinase/protéine kinase B (PI3K/PKB). En effet, des inhibiteurs de PI3K tels que la wortmannine et le LY294002 ou de PKB suppriment les effets de l'insuline sur l'induction de l'expression de la GK (Ribaux and Iynedjian, 2003).

Les facteurs de transcription régulant l'expression de la GK sont, par conséquent, insulinodépendants et dépendent de l'activation de la voie PI3K/PKB. Ces facteurs sont : HNF4 (hepatocyte nuclear factor 4), SREBP et LXR (liver X receptor).

### 1. <u>HNF4/HIF1</u>

Des sites de fixation pour HNF4 et HIF1 (hypoxia-inducible factor 1) sont présents sur le promoteur de la GK (Roth et al., 2002).

Dans des hépatocytes stimulés à l'insuline, HIF1 agit de façon coopérative avec le facteur de transcription HNF4 et le co-activateur p300 pour augmenter la transcription du gène codant la GK. Cette interaction est régulée par la voie PI3K/Akt (Roth et al, 2004). Le fait que HIF1 puisse être un médiateur de l'insuline est relevant puisque l'hypoxie et l'insuline agissent en synergie pour induire l'expression de la GK dans des hépatocytes (Kietzmann et al., 1997).

### 2. <u>SREBP1c</u>

L'effet de l'insuline sur la transcription de la GK est également régulé par le facteur de transcription SREBP1c (Kim et al., 2004).

En plus de moduler la GK, SREBP1c est un régulateur majeur des enzymes lipogéniques telles que l'ACC et la FAS. La transcription de SREBP1c est, elle-même, induite par l'insuline dans les hépatocytes (cf partie III, C,1,a p 102) (Fleischmann and Iynedjian, 2000).

La surexpression de SREBP1c dans des hépatocytes primaires induit une augmentation de la transcription du gène codant la GK. A l'inverse, un mutant dominant négatif SREBP1c inhibe la transcription de la GK dépendante de l'insuline (Foretz et al., 1999).

## 3. Modèle proposé sur la régulation transcriptionnelle de la GK

Une cascade d'événement impliquant SREBP1c, PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ), LXR et SHP (small heterodimer partner) a été proposée (Kim et al., 2009). LXR agirait à deux niveaux :

- Il up-régule la GK et SREBP1c en se fixant directement sur leurs promoteurs respectifs ;
  ensuite l'insuline active SREBP1c et par conséquent augmente de manière synergique
  l'expression de la GK dépendante de LXR.
- LXR augmente l'expression de la GK en up-régulant l'activité transcriptionnelle de PPAR.

De plus, LXR et PPAR augmentent la transcription du gène codant SHP créant une boucle de rétrocontrôle négative. En effet, SHP réprime la transcription de la GK en interagissant directement avec le partenaire de LXR et PPAR : RXR (retinoid X receptor).

## 4. <u>L'insuline régule la transcription de la GK, mais ce n'est pas</u> <u>la seule</u>

Bien que les effets de l'insuline sur l'expression du gène codant la GK soient bien connus, la régulation transcriptionnelle par d'autres hormones existe mais est moins bien caractérisée. L'addition *in vitro* de tri-iodothyronine (T3) à des cultures primaires d'hépatocytes de rat induit l'expression de la GK. La dexaméthasone seule n'induit pas la transcription de la GK mais augmente la transcription de la GK induite par l'insuline et diminue celle induite par la T3 (Narkewicz et al., 1990).



**Figure 14 :** Effet de l'hyperméthylation du promoteur de la GK dépendante de l'âge sur la susceptibilité au diabète de type 2.

La GK produit le G6P, activateur allostérique de la GS. L'hyperméthylation du promoteur de la GK induite par le vieillissement inhibe l'expression de la GK conduisant à 2 effets : la diminution de l'action de l'insuline et de l'utilisation du glucose et la diminution de la synthèse du glycogène. Même si la normoglycémie est maintenue, les sujets âgés sont plus susceptibles de développer un diabète de type 2.

<u>Abréviations</u>: GK : Glucokinase, GS : Glycogène synthase, GP : glycogène phosphorylase, G6P : glucose-6-phosphate

Un site de fixation au récepteur estrogen-related receptor alpha (ERR $\alpha$ ) a également été identifié sur le promoteur de la GK. La protéine PGC1 $\alpha$  (proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 $\alpha$ ) active ERR $\alpha$  augmentant la transcription de la GK (Zhu et al., 2010).

Même si peu d'études ont porté sur cette régulation, l'expression de la GK peut être régulée de manière épigénétique. Néanmoins, l'hyperméthylation du promoteur de la GK chez les rats âgés suggére que des modifications épigénétiques soient responsables de la faible transcription de la GK chez ces rats avec potentiellement un effet diabétogène (Jiang et al., 2008) (Figure 14).

# D. <u>Régulation de l'activité et de la localisation de la GK par la</u> protéine régulatrice : <u>GKRP</u>

L'activité de la GK est régulée rapidement par son interaction avec une protéine spécifique inhibitrice, la glucokinase regulatory protein (GKRP) découverte par Van Schaftingen en 1989 (Van Schaftingen, 1989) (Figure 15).

La GKRP est une protéine nucléaire inactivant la GK durant le jeûne en interagissant avec sa forme super-ouverte (Figure 13). Ainsi, un changement de conformation de la GK peut induire la dissociation du complexe GK/GKRP (Futamura et al., 2006).

A l'état libre, la GKRP est localisée dans le noyau et le cytoplasme. A jeun, l'association entre la GK et GKRP résulte en l'import du complexe et la séquestration nucléaire des deux protéines par des mécanismes moléculaires encore inconnus. Néanmoins, le masquage de la séquence NES (nuclear export signal) de la GK pourrait expliquer ce phénomène (Shiota et al., 1999).

Une augmentation des concentrations en glucose induit la dissociation du complexe GK/GKRP et promeut le démasquage de la séquence NES de la GK et sa translocation cytoplasmique (Shiota et al., 1999). Ce mécanisme ne semble pas faire intervenir l'exportine 1 puisque l'export de la GK n'est pas inhibé par la leptomycine B (Mukhtar et al., 1999).

La GK n'a pas de séquence NLS (nuclear localization signal). L'entrée du complexe dans le noyau s'effectue grâce à la séquence NLS de la GKRP.

L'association entre les deux protéines est ligand-dépendante. Les ligands de la GKRP sont le F1P et le F6P, compétiteurs mutuels.



**Figure 15 :** Régulation de l'activité et de la localisation subcellulaire de la GK par son interaction avec la GKRP.

A jeun, la GK est sequestrée dans le noyau par la GKRP. Après un repas, la concentration en glucose augmente entrainant une dissociation du complexe GK/GKRP permettant à la GK de lier le glucose, d'adopter une conformation fermée et de sortir du noyau pour générer du G6P.

<u>Abréviations</u> : GKRP, GlucoKinase Regulatory Protein, NES : nuclear export signal.

Le F1P est un activateur de la GK en favorisant la dissociation du complexe GK/GKRP. Les concentrations de F1P intrahépatique augmentent suite à l'absorption intestinale de fructose, provenant de l'hydrolyse du saccharose, converti en F1P par la fructokinase.

Le F6P est un inhibiteur de la GK en renforçant l'interaction entre la GK et la GKRP. L'inhibition par le F6P montre un mécanisme de rétrocontrôle négatif car le F6P est en équilibre avec le G6P à travers la phosphohexose isomérase.

Par conséquent, après un repas, la GK est dissociée de la GKRP nucléaire et retourne vers sa forme active cytosolique (Schaftingen et al., 1994; Van Schaftingen, 1989; Van Schaftingen et al., 1992) (Figure 15).

Dans des hépatocytes de rat cultivés à 5.5 mM de glucose, la GK est principalement nucléaire et inactive. En présence de fortes concentrations en glucose ou fructose, la GK est active et cytoplasmique. La GKRP contrôle ces différences de localisation (de la Iglesia et al., 1999).

Dans des cellules dépourvues de GK et de GKRP, l'expression forcée de la GK seule résulte en sa localisation cytoplasmique. Cependant, la co-expression avec GKRP entraîne une accumulation nucléaire des deux protéines (Bosco et al., 2000). De la même façon, la perte de l'expression et de l'activité de la GK est observée dans des souris KO pour le gène codant la GKRP. Ces données décrivent deux rôles de la GKRP : elle inactive la GK en la séquestrant dans le noyau et elle stabilise la GK en la protégeant de la dégradation (Farrelly et al., 1999) (Figure 15).

Une fraction mineure de GK et GKRP hépatiques est associée à la fraction mitochondriale (Arden et al., 2006). La mitochondrie peut être un nouveau régulateur de la compartimentation de la GK. Un complexe enzymatique mitochondrial incluant BAD (Bcl-2-associated death promoter), GK, PKA, PP1 et WAVE1 (membre de la famille de protéines Wiskott–Aldrich) a été identifié (Danial et al., 2003) et le lien fonctionnel entre Bad et la GK a été mis en évidence dans des hépatocytes déficients pour Bad. Ces hépatocytes présentent une diminution de l'activité de la GK. De plus, ces souris présentent une intolérance au glucose indiquant un lien entre le métabolisme du glucose et l'apoptose (Danial et al., 2003).

## E. <u>Régulation de la GK par le complexe PFK2/FBP2</u>

PFK2/FBP2 est une enzyme bifonctionnelle cytosolique impliquée dans la formation et l'hydrolyse du F2,6BP.



Figure 16 : Régulation de la GK par le complexe PFK2/FBP2.

Les différentes molécules de Fru phosphorylées sont des régulateurs du flux glycolytique. Le Fru1,6BP inhibe PFK1 alors que le Fru2,6BP l'active. Le F6P est un activateur de PFK2 et de la GKRP. La FBP2 active la GK. Le F1,6BP, le F2,6BP et le F6P inhibent également les fructose bisphosphatases 1 et 2. A travers l'inhibition par les phosphatases, le catabolisme du glucose n'est pas entravé à l'état postprandial quand l'apport en glucose est important.

<u>Abréviations</u>: GKRP : glucokinase regulatory protein, GK : glucokinase, PFK1/2 : phosphofructokinase 1/2, FBP1/2 : fructose bisphosphatases 1/2.

En 2001, l'enzyme PFK2/FBP2 est identifiée comme un activateur de la GK dans les cellules pancréatiques et le foie (Baltrusch et al., 2001). L'activation est induite par la fixation de la GK sur le domaine bisphosphatase de l'enzyme. En période postprandiale, cette interaction active et stabilise la GK cytoplasmique préservant ses fonctions de senseur du glucose (Massa et al., 2004) (Figure 16).

Dans le foie, le complexe induit la phosphorylation du glucose (via l'activation de la GK) mais également la glycolyse (via l'activation de PFK2). PFK2 induit la biosynthèse de F2,6BP, activateur allostérique de PFK1, enzyme clef de la glycolyse (Figure 16).

PFK2/FBP2 est régulée par le glucagon et l'insuline au travers de cycles de phosphorylation/déphosphorylation via l'AMPc. L'activation de la GK par sa fixation au domaine FBPase2 est réprimée dans le foie par l'AMPc. (Massa et al., 2004).

La surexpression de PFK2/FBP2 dans des hépatocytes augmente l'expression de la GK. La phosphorylation/déphosphorylation de ce complexe module la fixation de la GK et affecte sa translocation du noyau vers le cytoplasme (Payne et al., 2005). Chez des rats diabétiques induits par la streptozotocine, la surexpression de l'isoforme hépatique de PFK2 diminue la production de glucose en inhibant la néoglucogenèse et en favorisant la glycolyse. Par conséquent, la glycémie diminue (Wu et al., 2001).

# F. <u>Inhibition allostérique de la GK par des acides gras à</u> chaîne longue activés.

Les AGCL (acides gras à chaîne longue) sont des inhibiteurs potentiels allostériques de la GK (Tippett and Neet, 1982). En effet, ils entrent en compétition avec le glucose et l'ATP. Bien que les AGCL ne se fixent pas au domaine catalytique de la GK, ils entraînent un changement de conformation de la GK la rendant inactive.

# G. <u>La glucokinase et le diabète de la maturité chez le sujet</u> jeune (MODY)

Le diabète de la maturité chez le sujet jeune (MODY : maturity-onset diabetes of the young) est une pathologie monogénique dans laquelle les patients présentent des anomalies d'insulinosécrétion.



### Figure 17 : Schéma général représentant les différents modes de régulation de la GK.

La GK est régulée de manière transcriptionnelle (1) par l'insuline via la voie PI3K/Akt. Cette voie induit la fixation de SREBP1c, HIF-1 $\alpha$  et HNF-4 $\alpha$  sur le gène codant la GK. LXR induit également l'expression de la GK en se fixant sur ses éléments de réponse. La GK est régulée par son interaction avec la protéine régulatrice GKRP (2). Le F1P et le F6P sont des régulateurs de la formation de ce complexe. Le F1P entraîne sa dissociation alors que le F6P favorise l'association entre les deux protéines. Au cours de ma thèse, nous avons également montré que la GK pouvait être régulée au niveau post-traductionnel par *O*-GlcNAcylation, la stabilisant.

<u>Abréviations</u>: IRS : insulin receptor substrate, PI3K : phosphoinositide-3-kinase, PDK1 : phosphoinositide dependent kinase 1, PKC : protéine kinase C, SREBP-1c : sterol regulatory element binding protein 1c, HIF : hypoxia inducible factor, HNF : hepatocyte nuclear factor, LXR : liver X receptor, GK : glucokinase, GKRP : glucokinase regulatory protein, NLS : nuclear localization sequence, HBP : hexosamine biosynthetic pathway.

Plusieurs gènes sont associés à ce diabète dont celui codant la glucokinase (*GCK* = MODY2) (Froguel et al., 1993). Six gènes peuvent induire le diabète MODY mais le gène *GCK* est le plus fréquemment impliqué (environ 1/1000 patients) (Chakera et al., 2014).

Le MODY2 est causé par une mutation hétérozygote liée à une perte de fonction de la protéine. Plus de 600 mutations ont été décrites. Dans ce type de pathologie, la sécrétion d'insuline est réduite de moitié pour un taux de glycémie donné. Chez ces patients, un test de tolérance au glucose oral révèle que les concentrations de glucose sanguin sont élevées. A jeun, l'hyperglycémie est importante (7 mmol.L<sup>-1</sup> = 1.26 g.L<sup>-1</sup>) (Chakera et al., 2015) dès la naissance et augmente avec l'âge (Steele et al., 2014). En période postprandiale, la glycémie augmente plus rapidement puisque la sécrétion d'insuline est moins efficace sur la montée de la glycémie.

#### Conclusion

La GK est une enzyme clef de la régulation du métabolisme glucidique puisqu'elle est la première enzyme prenant en charge le glucose à son entrée dans la cellule. Par conséquent, l'expression, l'activité et la localisation de la GK doivent être finement régulées.

Au niveau transcriptionnel, la régulation est essentiellement dépendante de l'insuline via la voie PI3K/Akt. SREBP1-c est activé en réponse à PKC et HIF1, HNF4 et leur co-activateur p300 sont activés en réponse à l'activation d'Akt. L'activation de la transcription de la GK est également induite par la fixation de LXR sur son élément de réponse LXRE.

La régulation de la GK est aussi sous le contrôle de son interaction avec la protéine régulatrice GKRP. La GKRP inhibe la GK en la séquestrant au noyau. En présence d'AMPc, la GKRP lie le F6P et interagit avec la GK pour l'inactiver. Par contre, en période postprandiale, elle fixe le F1P entrainant la dissociation du complexe GK/GKRP, la GK est alors activée.

Au cours de ma thèse, nous avons mis en évidence un autre mode de régulation de la GK. En effet, nous avons montré qu'elle pouvait être régulée de manière post-traductionnelle par *O*-GlcNAcylation. La *O*-GlcNAcylation de la GK augmente son expression, très probablement en la stabilisant et en réduisant sa dégradation protéasomale (Figure 17).

En période postprandiale, l'expression et l'activité de la GK sont augmentées. Le G6P, ainsi formé, peut emprunter différentes voies métaboliques.



### Figure 18 : Comparaison de l'organisation des différents domaines de la FAS.

La FAS est présente sous la forme d'un complexe de type I chez les mammifères avec un seul peptide qui porte les 7 activités (a). Chez les procaryotes, la FAS est sous la forme d'un complexe de type II avec une protéine différente pour chaque activité (b).

<u>Abréviations</u> : MAT : Malonyl acetyl-transferase, KS : ketoacyl-synthase, DH : dehydratase, KR : ketoacyl ACP reductase, ER : enoyl ACP reductase, ACP : acyl carrier protein, TE : thioesterase.

Cependant, la majorité emprunte la glycolyse pour former le pyruvate qui, à son tour, entre dans la voie de la lipogenèse : le glucose est stocké sous forme d'acides gras.

Dans la troisième partie de ce manuscrit, nous détaillerons la structure, l'activité et la régulation de la FAS.

# III. La Fatty Acid Synthase

La FAS catalyse la biosynthèse d'AG saturés à partir de précurseurs simples. Le produit principal de la FAS est le palmitate (C16:0). Le stéarate (C18:0) est synthétisé grâce à des élongases. Des AG plus courts peuvent être fabriqués notamment dans la glande mammaire en lactation et dans le système nerveux central.

Les substrats de la FAS sont l'acétyl-CoA, le malonyl-CoA et le NADPH,H<sup>+</sup>. L'acétyl-CoA sert d'amorce alors que le NADPH,H<sup>+</sup> fournit les équivalents réducteurs nécessaires à la biosynthèse des AG. Les AG sont allongés à partir de l'acétyl-CoA initial par des condensations répétées avec le malonyl-CoA fournissant à chaque cycle deux carbones. La synthèse du palmitate requiert sept cycles d'addition de malonyl-CoA sur un acétyl-CoA.

## A. Caractéristiques générales

La FAS est uniquement active sous forme de dimère (Stoops et al., 1979). Chaque sous- unité de 273 kDa contient sept activités catalytiques différentes. Initialement, il a été montré que les deux sous-unités s'associaient de façon tête-bêche (Stoops and Wakil, 1981) mais des données structurales ont mis en évidence l'association tête-tête de la FAS (Witkowski et al., 2004; Maier et al., 2006).

Chez les mammifères, la FAS est un complexe de type I avec un seul peptide contenant l'ensemble des domaines d'activités. Chez les procaryotes, les levures et les plantes, la FAS est un complexe de type II puisque des protéines différentes portent chacune des activités de la FAS (Figure 18). La FAS est une enzyme clef, son KO total chez la souris induit la létalité embryonnaire (Chirala et al., 2003).



Figure 19 : Représentation schématique de l'activité de la FAS.

L'ACP fixe l'acétyl-CoA et le malonyl-CoA grâce au domaine MAT. Le produit ainsi formé est allongé par le domaine KS, réduit par le domaine KR, déshydraté par le domaine DH, réduit une nouvelle fois par le domaine ER et libéré par le domaine TE.

<u>Abréviations</u> : MAT : Malonyl acetyl-transferase, KS : ketoacyl-synthase, DH : dehydratase, KR : ketoacyl ACP reductase, ER : enoyl ACP reductase, ACP : acyl carrier protein, TE : thioesterase.
La FAS, protéine cytosolique soluble ou liée à la membrane plasmique, est exprimée dans tous les tissus mais plus abondamment dans le foie, les poumons et les reins (Jayakumar et al., 1995; Semenkovich et al., 1995).

# B. La FAS et ses sept activités

La FAS se présente sous la forme d'un homodimère. L'acyl carrier protein (ACP), un de ses domaines, permet le transport, à la manière d'un bras mobile, de l'AG en cours d'élongation d'activité catalytique en activité catalytique afin de ne pas diluer le produit en cours de synthèse dans le cytoplasme. Le groupement thiol terminal fixe l'acétyl-CoA et le malonyl-CoA grâce au domaine MAT (malonyl acetyl transferase). Le produit formé est allongé par le domaine KS (ketoacyl synthase), réduit par le domaine KR (ketoacyl ACP reductase), déshydraté par le domaine DH (dehydratase), réduit une nouvelle fois par le domaine ER (enoyl ACP reductase) et libéré par le domaine TE (thioesterase) (Finzel et al., 2015) (Figure 19).

## <u>L'ACP</u>

L'ACP joue un rôle majeur dans la biosynthèse des AG puisqu'il permet le transport de la chaîne d'AG en cours d'élongation vers les différentes activités catalytiques.

L'ACP transporte les AG par une liaison covalente thioester. Ce thioester se trouve à la fin du bras 4'-phosphopantéthéine attaché de manière post-traductionnelle à l'ACP par l'enzyme PPTase (phosphopantéthéinyl transférase).

## La Malonyl-CoA ACP transacylase (MCAT)

La MCAT (Malonyl-CoA ACP transacylase) initie la biosynthèse des AG en convertissant le malonyl-CoA en malonyl-ACP. Une délétion de MCAT chez *E. coli* est létale (Verwoert et al., 1994) mais une surexpression de ce domaine augmente la concentration de malonyl-ACP et de l'activité KS (Garwin et al., 1980).

## La ketosynthase (KS)

La ketosynthase catalyse la formation d'une liaison carbone-carbone par une condensation décarboxylante. La FAS de type I est constituée d'une seule KS alors que la FAS de type II a 2 ou 3 KS distinctes codées par des gènes différents.

L'AG est chargé sur la cystéine du site actif et le malonyl-ACP est allongé à chaque tour de deux unités de carbone. Ce domaine est inhibé par une concentration élevée d'acyl-ACP à longues chaînes.

Trois inhibiteurs de la FAS ciblant ce domaine existent. La cérulénine, inhibiteur sélectif se fixe de manière covalente à la cystéine du site actif (Moche et al., 1999). La thiolactomycine, produit naturel inhibe toutes les enzymes de condensation de la FAS y compris l'activité KS (Jackowski et al., 1989). La platensimycine est un produit naturel avec des propriétés antibiotiques (Figure 19) (Shang et al., 2015). La formation du complexe acide gras-enzyme est essentielle pour la fixation de ce composé qui est 200 fois plus efficace que la cérulénine et 50 fois plus que la thiolactomycine (Wang et al., 2006). Seules la cérulénine et la platensimycine inhibent la FAS de type I.

#### La ketoréductase et déshydratase

La ketoréductase réduit le 3-ketoacyl-ACP en 3-hydroxyacyl-ACP en utilisant le NADPH,H<sup>+</sup> comme cofacteur. La déshydratase complète la réaction et modifie le 3-hydroxyacyl-ACP en motif énoyl par la perte d'une molécule d'eau.

#### L'énoyl réductase (ER)

Cette enzyme réalise la dernière étape de la biosynthèse des AG en réduisant le 2-énoyl-ACP en fatty acid-ACP grâce au cofacteur NADPH,H<sup>+</sup>. Alors que les activités de la ketoréductase et la déshydratase sont réversibles, la réaction que catalyse l'énoyl-réductase ne l'est pas et constitue l'étape limitante de la biosynthèse des AG.

Cette activité est inhibée par de faibles concentrations de palmitoyl-CoA et par le triclozan, l'isoniazide et les diazoborines (Figure 19). Ces inhibiteurs se fixent sur le site actif de l'ER et forment un complexe avec les cofacteurs NADPH,H<sup>+</sup>.

#### La thioestérase (TE)

Cette enzyme permet le relargage des AG en les libérant de l'ACP.



## Figure 20 : Mécanisme d'action de SREBP-1c.

En réponse au signal insulinémique, Insig se dissocie et le complexe SREBP-1c/SCAP est transféré dans l'appareil de Golgi par des vésicules COPII. SREBP-1c subit alors un double clivage par les protéases S1P et S2P libérant la forme mature. L'activation de mTORC1 inhibe la lipine 1 elle-même inhibitrice de la translocation nucléaire de SREBP-1c. L'insuline promeut également la transcription de SREBP-1c via les facteurs LXR et mTOR et réprime celle d'Insig.

<u>Abréviations</u> : mTOR : mammalian target of rapamycin, LXR : liver X receptor, SCAP : SREBP cleavageactivating protein, Insig : insulin-induced gene, SREBP-1c : sterol response element binding protein 1c.

# C. <u>Régulation de l'expression de la FAS</u>

La plupart des enzymes impliquées dans la lipogenèse, et en particulier la FAS, sont régulées durant le cycle jeûne/période postprandiale. L'activité de ces enzymes est faible durant le jeûne et augmentée en réponse à une prise alimentaire (Rui, 2014).

Comme beaucoup d'enzymes allostériques, la régulation de la FAS se fait à trois niveaux avec des temps de réponse très différents.

# 1. <u>Régulation transcriptionnelle de la FAS</u>

Après un repas, la FAS est activée de manière transcriptionnelle par différents facteurs de transcription induits par l'insuline ou le glucose.

L'insuline active des kinases et des phosphatases spécifiques activant les facteurs de transcription tels qu'USF (Upstream-Stimulatory Factors), SREBP1c et LXR. Les métabolites produits par le catabolisme du glucose affectent la fonction et la localisation de certains de ces facteurs de transcription et de ChREBP (Carbohydrate responsive element binding protein).

# a) Sterol response binding protein (SREBP)

La famille des SREBPs comporte plusieurs membres : SREBP-1a, SREBP-1c et SREBP2 (Hua et al., 1995; Shimomura et al., 1997). SREBP-1a et SREBP-1c sont codés par le même gène et transcrits à partir de deux promoteurs différents.

Les protéines SREBPs sont synthétisées sous forme de précurseurs contenant deux hélices transmembranaires nécessaires à leur ancrage à la membrane du *reticulum* endoplasmique.

Le facteur SREBP est associé à SCAP (SREBP cleavage activating protein) et Insig (Goldstein et al., 2002). Pour être activé, le complexe SREBP/SCAP est dissocié d'Insig et s'associe avec des vésicules COPII afin de migrer vers l'appareil de Golgi (Sun et al., 2005). SREBP est ensuite clivé, de façon séquentielle, dans le Golgi par S1P et S2P (protéases sites 1 et 2). La partie N-terminale cytosolique libérée entre dans le noyau et induit ses gènes cibles (Figure 20).

# 1) <u>Régulation de l'activation de SREBP par le clivage protéolytique</u>

L'insuline active la transcription et le clivage protéolytique de SREBP-1c (Hegarty et al., 2005; Kim et al., 1998). La délétion des protéines PI3K, Akt, mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) et p70S6K inhibe le clivage protéolytique induit par l'insuline, montrant le rôle essentiel de la voie PI3K/mTOR dans l'activation de SREBP-1c (Yecies et al., 2011; Owen et al., 2012). La phosphorylation de SREBP-1c par Akt augmente l'affinité du complexe SREBP/SCAP pour les protéines des vésicules COPII et la translocation du complexe dans le Golgi (Yellaturu et al., 2009a). De plus, l'insuline inhibe l'expression d'Insig2 via l'activation d'Akt (Yellaturu et al., 2009b) (Figure 20).

## 2) Régulation de la translocation nucléaire de SREBP

Bien que les facteurs de transcription SREBPs présentent une séquence NLS (Nagoshi et al., 1999), son transport nucléaire est régulé par mTORC1 et un de ses substrats, la phosphatase lipine 1 (Peterson et al., 2011). A jeun, la lipine 1 déphosphorylée empêche la translocation nucléaire de SREBP-1c.

En période postprandiale, la lipine 1 régule la translocation de SREBP-1c dans le noyau via mTORC1. La délétion de la lipine 1 restaure la translocation nucléaire de SREBP dans des souris KO pour mTORC1 (Harris et al., 2007) (Figure 20).

# 3) <u>Régulation transcriptionnelle de SREBP-1c</u>

L'expression transcriptionnelle de SREBP-1c est régulée en fonction des conditions nutritionnelles. Elle est diminuée à jeun et augmentée en période postprandiale (Horton et al., 1998) de manière hormones-dépendante. En ce sens, l'insuline induit son expression (Shimomura et al., 1999) alors que le glucagon la réprime (Tang et al., 2009).

En plus d'induire son clivage protéolytique, mTORC1 active la transcription de SREBP en réponse à l'insuline (Li et al., 2010). L'inhibition de p70S6K (substrat de mTORC1) inhibe le processus protéolytique mais n'a pas d'effet sur les niveaux d'ARNm de SREBP-1c (Owen et al., 2012) suggérant l'existence de deux mécanismes distincts.

Le facteur LXR induit également l'expression de SREBP-1c en se fixant sur son promoteur (Chen et al., 2004).



**Figure 21 :** Régulation de la transcription de la FAS via USF en fonction des conditions nutritionnelles.

Les facteurs USF1 et USF2 forment un dimère qui se fixe sur la région E-box du promoteur de la FAS. A jeun, USF interagit avec HDAC9 qui la désacétyle et inactive son activité. Après un repas, USF1 est phosphorylée par la DNA-PK, elle-même activée par déphosphorylation par PP1, et acétylée par PCAF. USF1 phosphorylé, acétylé et par conséquent activé interagit avec BAF60C permettant sa translocation au noyau. De plus, BAF60C recrute le complexe BAF contenant BRG1 et son activité ATPasique nécessaire au remodelage de la chromatine.

<u>Abréviations</u>: HDAC9 : histone désacétylase 9, USF1/2 : upstream stimulatory factor 1/2, SRE : serum response element, PP1 : protéine phosphatase 1, DNA-PK : DNA-dependent protein kinase, PCAF : p300/CBP-associated factor, BAF60C : Brg1/Brm-associated factor 60c, SREBP1c : sterol response element binding protein 1c.

# 4) <u>Le recrutement de SREBP-1c sur le promoteur de la FAS</u> dépend des facteurs USFs

La fixation de SREBP-1c sur la région -150 du promoteur de la FAS est cruciale pour la réponse à l'insuline mais SREBP-1c est incapable de se fixer sur son élément de réponse SRE quand le site de fixation pour USF (-65) est muté (Latasa et al., 2003). La fixation de SREBP-1c dépendante de l'insuline nécessite la présence des facteurs USFs sur le promoteur de la FAS.

## b) Upstream stimulatory factor (USF)

Deux isoformes d'USF existent : USF1 et USF2 codés par deux gènes différents. Ils forment des homo- ou hétéro-dimères et activent la FAS en se fixant sur la région -65 « E-box » de son promoteur.

La mutation du site -65 E-box abolit la transcription de la FAS en réponse à l'insuline (Wang and Sul, 1997). D'autres études ont montré que USF1 et USF2 se fixent également sur la E-box en position -332 (Moon et al., 2000). La présence de ce second site augmente l'activation de la FAS.

USF1 et USF2 sont importants pour la régulation de la FAS puisque des souris KO pour les gènes codant ces facteurs de transcription présentent un défaut d'activation de la FAS en condition de régime riche en sucres (Casado et al., 1999).

## Régulation post-traductionnelle d'USF1 par phosphorylation et acétylation

Durant le cycle jeûne-prise alimentaire, le niveau d'expression d'USF et sa fixation sur le promoteur de la FAS ne varient pas. Ce sont les modifications post-traductionnelles qui régulent l'activité de ces facteurs en fonction de l'état nutritionnel.

Des expériences de spectrométrie de masse ont montré que la prise alimentaire induit la phosphorylation d'USF sur la S262 et l'acétylation sur le site K237 (Wong et al., 2009). Des mutants mimant l'hyperphosphorylation et l'hyperacétylation de ces sites présentent une augmentation de la transcription de la FAS (Figure 21). Inversement, des mutants déphosphorylés et désacétylés n'induisent plus la transcription de la FAS.

Ces modifications post-traductionnelles sont régies par l'interaction d'USF avec différents partenaires tels que la DNA-PK (DNA-dependent protein kinase) et PP1 (Figure 21).



Figure 22 : Régulation de l'activité de ChREBP en fonction des conditions nutritionnelles.

A jeun, la sécrétion de glucagon entraîne l'activation de PKA phosphorylant ChREBP sur la S196 et la T666 induisant la séquestration cytosolique de ChREBP par la protéine 14-3-3. En période post-prandiale, le glucose emprunte en partie la voie des pentoses phosphates induisant la synthèse du métabolite X5P. Le X5P active PP2A qui déphosphoryle ChREBP. Ainsi, ChREBP migre vers le noyau et active la transcription de ses gènes cibles dont la FAS. Le G6P, produit de la glucokinase, peut également induire l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de ChREBP.

<u>Abréviations</u>: ChREBP: carbohydrate responsive element binding protein, PKA: protein kinase A, AMPc: adénosine monophosphate cyclique, G6P: glucose-6P, X5P: xylulose-5P, PP2A: protein phosphatase-2A, MLX: max like protein.

En période postprandiale, PP1 est transloquée dans le noyau puis déphosphoryle et active la DNA-PK. La DNA-PK phosphoryle USF sur la S262 permettant le recrutement de l'enzyme PCAF (p300/CBP-associated factor) qui acétyle USF en position K237 (Wong et al., 2009). USF phosphorylée et acétylée induit la transcription de la FAS.

A jeun, USF interagit avec HDAC9 (histone désacétylase 9) bloquant le recrutement des autres facteurs nécessaires à l'activation transcriptionnelle (Figure 21).

# c) Carbohydrates responsive element binding protein (ChREBP)

ChREBP a été le premier facteur de transcription sensible au glucose identifié. Il régule l'expression des gènes codant certaines enzymes impliquées dans la glycolyse et la lipogenèse dont la FAS (lizuka et al., 2004). ChREBP forme un hétérodimère avec son partenaire MLX (Max-like protein) et se fixe sur les éléments ChoRE des gènes cibles (Stoeckman et al., 2004). Il existe deux isoformes de ChREBP résultant d'un épissage alternatif : ChREBP a et ChREBPβ, découverte depuis peu (Herman et al., 2012). Le glucose, via ses métabolites, induit la transcription de ChREBPα qui, à son tour, active la transcription de ChREBPβ.

## Régulation de l'activité de ChREBP en fonction des conditions nutritionnelles

A jeun, ChREBP est phosphorylé par la PKA sur la S196 et la T666. ChREBP phosphorylé est incapable de transloquer dans le noyau et de se fixer sur ses gènes cibles (Kawaguchi et al., 2001) (Figure 22).

Initialement, le xylulose-5-phosphate (X5P), intermédiaire de la voie des pentoses phosphates, a été pressenti comme étant le régulateur de ChREBP. Le X5P est un activateur de PP2A (Kabashima et al., 2003) qui déphosphoryle ChREBP sur les sites S196 et T666 permettant sa translocation nucléaire et sa fixation sur ses gènes cibles (Figure 22).

Plus tard, il a été montré que d'autres métabolites comme le G6P et le Fru2,6BP étaient nécessaires pour l'activation de ChREBP (Arden et al., 2012; Dentin et al., 2012). ChREBP est également acétylé (Bricambert et al., 2010) et *O*-GlcNAcylé (Guinez et al., 2011) induisant son recrutement sur les régions promotrices de ses gènes cibles.

Un autre régulateur de type protéique a été décrit, LRH1 (Liver Receptor Homolog 1).

Des souris KO LRH1 foie spécifique présentent une diminution de la transcription de la glucokinase mais également de la synthèse du glycogène, de la glycolyse et de la lipogenèse. Les auteurs ont corrélé ces effets à une diminution de l'activité de ChREBP (Oosterveer et al., 2012).

Des interactions intramoléculaires interviennent également dans le contrôle de l'activité de ChREBP. La protéine ChREBP $\alpha$  est constituée de deux domaines : un domaine LID (Low Glucose inhibitory Domain) et un domaine GRACE (Glucose response activation conserved element).

Le domaine LID peut inhiber l'activité de ChREBP conférée par le domaine GRACE, inhibition levée en forte concentration en glucose (Li et al., 2006a). Quant à ChREBP $\beta$ , il ne présente pas de domaine LID et est, par conséquent, constitutivement actif même dans des conditions de faibles concentrations en glucose.

#### d) Liver X Receptor (LXR)

Deux isoformes de LXR existent : LXRα exprimée dans les tissus importants pour la régulation du métabolisme comme le foie et le tissu adipeux et LXRβ, ubiquitaire (Repa and Mangelsdorf, 2000). Les LXRs sont des récepteurs nucléaires activés par des dérivés du cholestérol ou des agonistes synthétiques (Janowski et al., 1996). Ils forment un hétérodimère avec RXR et peuvent être activés par le ligand de RXR, l'acide 9-cis rétinoïque (Willy et al., 1995) afin de se fixer sur l'élément de réponse LXRE présent sur le promoteur de la FAS au niveau de la région -700.

Les LXRs sont très importants dans la régulation du métabolisme lipidique puisque des souris ob/ob délétées des deux isoformes de LXR présentent une diminution de 80% de la lipogenèse (Beaven et al., 2013). Bien que ces souris restent obèses, la stéatose hépatique est diminuée. LXR peut augmenter la transcription des gènes codant les enzymes impliquées dans la lipogenèse en se fixant sur les promoteurs de SREBP-1c (Repa et al., 2000; Yoshikawa et al., 2001) et de ChREBP (Cha and Repa, 2007) favorisant leur transcription.

Concernant la régulation de LXR, le glucose et le G6P se fixent sur LXR et induisent son activité (Mitro et al., 2007).

La fixation de co-répresseurs ou de co-activateurs régulent également l'activité de LXR.



**Figure 23** : Régulation des facteurs de transcription régulant l'expression de la FAS en réponse au glucose et à l'insuline.

La fixation de l'insuline sur son récepteur entraîne l'activation de kinases et phosphatases telles que PI3K, Akt, PKC, mTORC1 et 2, et PP1 régulant l'activité ou la localisation des facteurs de transcription. Ainsi, les différents facteurs de transcription activés (ChREBP, LXR, SREBP1c et USF) se fixent sur leurs éléments de réponse respectifs présents sur le promoteur de la FAS afin d'en induire la transcription.

<u>Abréviations</u>: X5P : xylulose 5P, G6P : glucose 6P, F2,6BP : fructose 2,6 bisP, PP : protéine phosphatase, ChREBP : carbohydrate responsive element binding protein, Mlx : max like protein, PI3K : phosphoinositide 3 kinase, mTOR : mammalian target of rapamycin, PKC : protein kinase C, TSC : tuberous sclerosis complex, BAF : Brg1/Brm-associated factor, SREBP : sterol response element binding protein, DNA-PK : DNA-dependent protein kinase, USF : upstream stimulatory protein, PCAF : P300/CBP-associated factor. La conformation du complexe LXR-RXR change afin de libérer les corépresseurs SMRT (silencing mediator for retinoic acid and thyroid hormone receptor) et NCoR (Nuclear receptor co-repressor) et se fixer aux co-activateurs EP300 (E1A-associated protein p300) et ASC-2 (activating signal co-integrator 2) (Lee et al., 2008).

A jeun, la PKA phosphoryle LXR empêchant la formation du complexe LXR/RXR, la fixation de LXR sur ses gènes cibles et favorise préférentiellement le recrutement de co-répresseurs (Yamamoto et al., 2007).

## e) Farnesoid X receptor (FXR)

FXR est un récepteur nucléaire régulant l'expression des gènes impliqués dans la synthèse des acides biliaires et leur transport dans le foie et l'intestin (Lefebvre et al., 2009).

Une fois activé par ses ligands naturels comme les acides biliaires, FXR se fixe seul ou en complexe avec RXR sur les éléments de réponse FXRE (FXR response element) présents sur le promoteur de la FAS.

FXR est important dans la régulation du métabolisme lipidique puisque des souris déficientes pour FXR présentent une hypertriglycéridémie (Sinal et al., 2000).

Contrairement aux autres facteurs de transcription décrits précédemment, FXR inhibe la lipogenèse en réduisant l'expression de SREBP-1c via l'induction de SHP (Watanabe et al., 2004) mais aussi directement celle de la FAS en se fixant sur son promoteur (Matsukuma et al., 2006). Cette régulation négative est en contradiction avec l'activation transcriptionnelle par SREBP-1c, USF, ChREBP et LXR.

Ainsi, la FAS est régulée de manière transcriptionnelle par le glucose et l'insuline. Le glucose active ChREBP qui induit la transcription de la FAS. Quant à l'insuline, elle permet, par la voie PI3K/Akt, l'activation de SREBP-1c et des facteurs USF1/2. LXR induit également l'expression transcriptionnelle de la FAS et FXR la diminue (Figure 23).

# 2. <u>Régulation de l'expression de la FAS par les microARNs</u>

Les microARNs sont des petits ARNs (20 à 24 nucléotides) non codants impliqués dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes en se fixant sur l'extrémité 3'UTR de leurs ARNm cibles.

Les microARNs sont transcrits par des polymérases pour former des pri-miARNs. Ces primiARNs sont ensuite cappés, polyadénylés puis clivés par l'enzyme Drosha pour générer des pré-miARNs. Une seconde enzyme Dicer prend en charge ces pré-miARNs pour former un duplex miARN/miARN. Un des deux brins sert de guide pour cibler l'ARNm cible afin d'en moduler l'expression et l'autre brin est dégradé.

Les microARNs ont un rôle émergent dans des processus majeurs physiologiques et pathologiques en intervenant dans la régulation du métabolisme et en particulier le métabolisme lipidique (Tsai et al., 2012; Szabo and Bala, 2013).

La famille des miR-33 est composée de deux membres, miR-33a et miR-33b, pouvant réprimer respectivement l'expression de SREBP-2 et SREBP-1 (Najafi-Shoushtari et al., 2010) et donc indirectement la FAS.

D'autres miARNs et plus particulièrement miR-27a peuvent bloquer directement la transcription de la FAS (Shirasaki et al., 2013).

# 3. <u>Régulation de l'expression de la FAS par un remodelage de</u> <u>la chromatine</u>

La structure de la chromatine est altérée durant le cycle de jeûne/prise alimentaire. Cette altération peut être due à deux mécanismes : les modifications post-traductionnelles des histones et le remodelage des chromosomes ATP-dépendants.

En réponse à l'insuline, l'histone H3 est acétylée, phosphorylée et méthylée ou non sur le promoteur de la FAS en fonction de l'état nutritionnel (Wang et al., 2013).

En plus des modifications post-traductionnelles des histones, le complexe BAF (BRG1/BRMassociated factor) portant une activité de remodelage de la chromatine régule la transcription des enzymes lipogéniques. Il est constitué de deux parties : un activateur de transcription (BRG1 ou BRM) avec une activité ATPase et un modulateur interagissant avec les facteurs de transcription.

En période postprandiale, la sous-unité BAF60C est phosphorylée par PKC favorisant sa translocation nucléaire et son interaction avec USF. En retour, BAF60C recrute BRG1 afin de former le complexe lipoBAF. Le complexe lipoBAF intervient dans le remodelage de la chromatine et l'activation de la transcription de la FAS.

# 4. <u>Régulation post-traductionnelle de la FAS</u>

La régulation transcriptionnelle de la FAS ne permet pas de répondre de manière quasi immédiate aux besoins. Afin de modifier rapidement son activité en fonction des conditions, la FAS est régulée de manière post-traductionnelle et peut être activée ou inactivée sans pour autant que sa quantité au niveau protéique ne varie (Jin et al., 2010; Sabbisetti et al., 2009). Ainsi, l'activité de la FAS diminue pendant une dizaine de minutes après un traitement à l'insuline induisant la phosphorylation de CEACAM1 (carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1) et ré-augmente ensuite sans affecter les niveaux protéiques de l'enzyme (Najjar et al., 2005).

La FAS est phosphorylée sur des résidus de sérine et de thréonine dans des lignées cancéreuses humaines et de souris mais est phosphorylée sur des résidus de tyrosine uniquement chez l'homme.

La phosphorylation de la FAS dans les adipocytes et le foie est corrélée à une diminution de son activité. Dans le foie de pigeon à jeun, la FAS est phosphorylée et son activité est diminuée. Au contraire, la déphosphorylation de la FAS augmente de plus de 20 fois son activité (Qureshi et al., 1975). Dans une lignée adipocytaire, les 3T3L1, la phosphorylation de la FAS par l'AMPK l'inactive (An et al., 2007).

En revanche, une étude réalisée sur une lignée cancéreuse du sein a montré que la FAS est tyrosine phosphorylée par HER2 (Human epidermal growth factor receptor 2) et que cette phosphorylation augmente son activité (Jin et al., 2010).

La FAS peut être également acétylée. L'acétylation des protéines joue des rôles divers comme la déstabilisation ou la modification de leur activité. Cependant, le rôle de l'acétylation sur l'expression ou l'activité de la FAS reste inconnu (Zhao et al., 2010).

# D. <u>Implications de la FAS dans le métabolisme hépatique et</u> dans l'émergence de pathologies

En plus de son rôle dans la sécrétion des VLDL, la FAS contribue largement au stockage des TG dans les gouttelettes lipidiques. Ce rôle varie en fonction des conditions nutritionnelles.

Chez des rats soumis à un régime standard, environ 10% des TG du foie proviennent de la lipogenèse alors que chez des rats soumis à un régime riche en graisses, la lipogenèse est inhibée, uniquement 1% des TG hépatiques provient de l'activité de la FAS (Delgado et al., 2009).

En revanche, dans des conditions pathologiques et en particulier dans les foies stéatosés, la part de la FAS dans la biosynthèse des TG est plus importante (Donnelly et al., 2005; lizuka et al., 2006). Ce rôle de la FAS dans la stéatose hépatique et le développement de l'insulinorésistance est discuté en partie 4 de ce manuscrit.

En plus de l'implication de la FAS dans le développement de la stéatose hépatique, la dérégulation de son expression et de son activité sont des caractéristiques des cellules cancéreuses. Ce point a fait l'objet de la publication d'une perspective :

**Baldini, S.F**., and Lefebvre, T. (2016). O-GlcNAcylation and the Metabolic Shift in High-Proliferating Cells: All the Evidence Suggests that Sugars Dictate the Flux of Lipid Biogenesis in Tumor Processes. Front. Oncol. *6:6*.

En effet, une des caractéristiques des cellules cancéreuses est leur shift métabolique. Otto Warburg a observé que les cellules cancéreuses consomment plus de glucose et produisent plus d'acide lactique que les cellules non cancéreuses (Warburg, 1956). Les flux importants de carbone à travers la glycolyse aérobie fournissent un avantage pour la croissance des cellules tumorales (Gatenby and Gillies, 2004). Les cellules cancéreuses métabolisent le glucose à des niveaux excédant les besoins énergétiques en optant pour un métabolisme glycolytique plutôt qu'oxydatif. L'augmentation du flux glycolytique fournit à la tumeur une source d'énergie suffisante et des co-facteurs tel que le NADPH,H<sup>+</sup> pour la synthèse, entre autres, des acides gras à travers la voie des pentoses phosphates. Les cellules tumorales profitent de la formation de l'acétyl-CoA issu du pyruvate de la glycolyse pour la synthèse des AG. Ces AG permettant de maintenir un flux constant de lipides pour la production des membranes cellulaires et pour la modification post-traductionnelle basée sur les lipides (lipidations, en particulier myristoylation, palmitoylation, c'est-à-dire les acylations).

En ce sens, les cellules cancéreuses présentent une surexpression de la FAS due à une augmentation de sa transcription, de sa traduction et de sa stabilité (Menendez and Lupu, 2007; Mounier et al., 2014).

#### Conclusion

La FAS est une enzyme hautement régulée ayant un rôle majeur dans la biosynthèse des AG. C'est une enzyme complexe constituée de deux sous-unités de sept activités chacune régulée de manière transcriptionnelle en fonction du glucose et de l'insuline principalement. Elle est également régulée de manière post-traductionnelle par phosphorylation et acétylation.

La régulation du métabolisme glucido-lipidique est très importante afin de maintenir l'homéostasie énergétique. Cependant, un dérèglement de ce métabolisme peut entraîner des désordres métaboliques. Les personnes diabétiques ou obèses présentent généralement une accumulation excessive d'AG au niveau du foie à l'origine de la stéatose hépatique.

# IV. <u>Physiologie de la stéatose hépatique</u>

Depuis quelques années, la prévalence du diabète et de l'obésité ne cesse d'augmenter et atteint même des proportions épidémiques (James, 2008). Ces pathologies sont associées à des dysfonctionnements physiologiques dans l'ensemble de l'organisme.

Ces patients sont souvent atteints de stéatose hépatique correspondant à une accumulation anormale d'AG au niveau du foie. La stéatose hépatique appartient à un large éventail de pathologies hépatiques regroupées sous le nom de NAFLD (nonalcoholic fatty liver disease) affectant 70% des patients obèses ou atteints de diabète de type 2. Cette stéatose peut évoluer en NASH (nonalcoholic steatohepatitis), 20% des patients obèses ou diabétiques de type 2 en souffrent, caractérisée par un état inflammatoire prononcé, et peut conduire à plus long terme à la cirrhose. La différence entre les NAFLD et les NASH est la présence de facteurs inflammatoires circulants comme par exemple l'interleukine 6 (Tarantino et al., 2009).





Les acides gras accumulés au niveau hépatique proviennent de trois sources différentes : l'alimentation, la lipolyse et la lipogenèse. La stéatose hépatique résulte d'un déséquilibre entre l'apport des acides gras et leur utilisation. En effet, ils sont  $\beta$ -oxydés au niveau de la mitochondrie ou estérifiés sous forme de triglycérides et exportés hors du foie. La stéatose peut provenir d'une augmentation de la lipolyse, de la lipogenèse et de l'apport en acides gras par l'alimentation et d'une diminution de la  $\beta$ -oxydation et de l'export des triglycérides.

<u>Abréviations</u>: ChREBP : carbohydrate responsive element binding protein, LXR : liver X receptor, SREBP : sterol response element binding protein, TG : triglycérides, VLDL : very low density lipoprotein.

L'augmentation de la prévalence de l'obésité dans le monde fait que la stéatose hépatique est devenue un problème de santé public majeur puisqu'elle peut évoluer rapidement en maladie sévère. Elle est également associée à des risques importants de développement de l'insulinorésistance, d'hypertension et de risques cardiaques.

# A. Diagnostique et prévalence

La stéatose hépatique est caractérisée par une accumulation anormale de TG dans le cytoplasme des hépatocytes en l'absence de consommation abusive d'alcool. La stéatose est déclarée quand une biopsie hépatique révèle une proportion de TG supérieure à 5% du volume ou de la masse du foie ou quand les coupes histologiques indiquent que plus de 5% des hépatocytes présentent une accumulation de TG (Kleiner et al., 2005).

La prévalence de la stéatose hépatique augmente avec l'index de masse corporelle (Ruhl and Everhart, 2003) et est dépendante du sexe, de l'âge, des déterminants génétiques et des origines ethniques (Browning, 2013; Lazo et al., 2013).

Environ 30% de la population est atteinte de NAFLD et ce taux de prévalence augmente chez les personnes obèses (90%) et chez les personnes diabétiques de type 2 (70%) (Leite et al., 2009).

# B. Voies métaboliques conduisant à la stéatose hépatique

Les AG accumulés au niveau du foie proviennent de différentes sources. Ils sont issus de la lipolyse (TG stockés dans les tissus périphériques et captés par le foie), de l'alimentation (principalement à travers le captage des chylomicrons dérivés des intestins) mais également de la lipogenèse hépatique.

L'accumulation anormale des AG au niveau du foie est causée par un dérèglement entre leur apport et leur utilisation. Elle provient d'une augmentation du captage des AG provenant des tissus périphériques par le foie, d'une augmentation de la lipogenèse, d'une diminution de la  $\beta$ -oxydation ou d'une diminution d'export des AG sous forme de VLDL (Postic and Girard, 2008) (Figure 24).

# C. <u>Implication de la lipogenèse dans l'instauration de la</u> <u>stéatose hépatique</u>

Longtemps, le rôle de la lipogenèse a été négligé dans l'accumulation anormale des AG hépatiques puisqu'une étude a montré que moins de 5% des TG présents dans le foie dérivent de la lipogenèse (Diraison and Beylot, 1998). Cependant, ces études portent à confusion puisqu'elles ont été réalisées dans des conditions de jeûne et sur des sujets minces ayant un faible taux d'activation de la lipogenèse.

Des études plus récentes ont montré que chez des individus atteints d'obésité, 59% des AG provenaient de lipolyse, 26% de la lipogenèse et 14% de l'alimentation (Donnelly et al., 2005) Une autre équipe a comparé des individus obèses avec des foies sains ou riches en graisses ; les auteurs ont noté une augmentation de la lipogenèse chez les patients ayant des foies stéatosés par rapport aux patients sains. Dans ces deux groupes, le taux d'AG provenant de l'alimentation ne varie pas (5%) mais ceux provenant de la lipogenèse augmentent dans les foies riches en gras par rapport aux foies sains (23% contre 10%) (Lambert et al., 2014). Ces deux études montrent l'impact non négligeable de la lipogenèse sur la stéatose hépatique.

#### Rôle des enzymes de la lipogenèse dans l'émergence de la NAFLD

Nous l'avons vu plus loin, les enzymes impliquées dans la biosynthèse des AG sont ACL, ACC, FAS, SCD1 et ELOVL6 ; l'implication de chacune de ces enzymes dans l'étiologie de la stéatose hépatique a le plus souvent été possible grâce aux souris KO global ou foie-spécifique.

# a) L'adénosine triphosphate citrate lyase (ACL)

Le KO global d'ACL (enzyme responsable de la formation de l'acétyl-CoA) induit une mort embryonnaire démontrant le rôle essentiel de la lipogenèse dans le développement (Beigneux et al., 2004). Cependant, l'invalidation spécifique d'ACL dans le foie réduit le niveau de la lipogenèse et protège ainsi des souris obèses db/db de la stéatose hépatique et de l'insulinorésistance (Wang et al., 2009).

#### b) L'acétyl-CoA Carboxylase (ACC)

Une inactivation globale d'ACC1 cause la mort embryonnaire alors que les souris présentant une inactivation globale d'ACC2 ont une vie normale. Néanmoins, elles présentent une augmentation de la  $\beta$ -oxydation et, par conséquent, stockent moins de graisses que les souris contrôles (Abu-Elheiga et al., 2001, 2005).

Les souris soumises à un régime standard présentant une invalidation foie-spécifique d'ACC1 accumulent moins de TG. Cependant, chez des souris soumises à un régime riche en graisses et en sucres, l'invalidation d'ACC1 ne protège pas les souris de l'obésité et de l'insulinorésistance (Mao et al., 2006). Le régime alimentaire compense, en partie, la perte d'une seule enzyme de la lipogenèse, en induisant probablement une surexpression d'ACC2.

#### c) La Fatty Acid Synthase (FAS)

L'invalidation globale de la FAS conduit à la mort embryonnaire (Chirala et al., 2003). Contrairement aux autres enzymes, le KO foie-spécifique de la FAS n'a aucun effet sur des souris soumises à un régime normal mais entraîne le développement de la stéatose hépatique chez des souris placées sur un régime riche en sucres. L'accumulation anormale d'AG hépatiques est due à une diminution de la  $\beta$ -oxydation. Les concentrations de palmitate (produit de la FAS) diminuent et ne permettent plus la stimulation du récepteur nucléaire PPAR $\alpha$  induisant la  $\beta$ -oxydation (Chakravarthy et al., 2005, 2009).

Cependant, l'expression de la FAS est augmentée dans les NAFLD (Kohjima et al., 2007) et dans les souris soumises à un régime riche en sucres et en graisses (Morgan et al., 2008).

#### d) La stéroyl-CoA désaturase 1 (SCD1)

Le KO global de SCD1 diminue l'expression des gènes codant les enzymes de la lipogenèse et augmente la  $\beta$ -oxydation. Les souris sont protégées de l'obésité et de l'insulinorésistance (Cohen et al., 2002; Ntambi et al., 2002).

De même, l'invalidation foie-spécifique de SCD1 protège les souris de l'obésité et de l'insulinorésistance lorsque ces désordres métaboliques sont dus à une alimentation riche en sucres mais pas chez des souris placées sur un régime riche en graisses (Miyazaki et al., 2007).

#### e) Les enzymes d'élongation (ELOVL6)

Les souris présentant un KO global ELOVL6 prennent moins de poids lorsqu'elles sont nourries normalement mais deviennent tout de même obèses en développant une stéatose hépatique sous régime riche en sucres et en graisses. Malgré le développement de la stéatose, les souris KO foie spécifique ELOVL6 sont protégées de l'insulinorésistance et sont même plus insulinosensibles. Ce phénomène est dû à la diminution de l'activité de PKC et à la restauration de la protéine IRS2 (Moon et al., 2001; Matsuzaka et al., 2007). De plus, la surexpression de ELOVL6 entraîne l'inflammation dans le foie et un passage de NAFLD en NASH (Matsuzaka et al., 2012).

# D. Stéatose hépatique et insulinorésistance

La résistance à l'insuline correspond à un manque de réponse de l'organisme à l'insuline. Au niveau du foie, une des caractéristiques de l'insulinorésistance est la perte de la capacité de l'insuline à diminuer la production de glucose hépatique. Plusieurs études ont montré que l'insulinorésistance peut être liée à la présence de TG dans le foie (Seppälä-Lindroos et al., 2002; Korenblat et al., 2008; Yatsuya et al., 2014) indépendamment de l'âge, du sexe, du pourcentage de graisse corporelle ou encore de l'indice de masse corporelle.

Cependant, la relation de cause à effet entre la stéatose hépatique et l'insulinorésistance n'est pas encore très claire. Des études chez le rongeur montrent que quelques jours de régime riches en graisses suffisent pour induire la stéatose hépatique et l'insulinorésistance (Samuel et al., 2004).

La protéine clef pouvant lier la stéatose hépatique et l'insulinorésistance est la kinase PKC. Un régime riche en graisses ou l'administration de lipides entraînent la production d'intermédiaires lipidiques comme le DAG qui relie l'accumulation anormale de TG hépatiques et l'insulinorésistance. Le DAG active la kinase PKCδ (Bezy et al., 2011; Greene et al., 2014) perturbant l'action de l'insuline. L'hormone n'est plus capable d'inhiber la production de glucose (Birkenfeld and Shulman, 2014).

Inversement, des souris présentant une invalidation de PKC ont permis de montrer que ces protéines régulent l'accumulation des TG dans le foie.

Ces souris sont protégées de l'insulinorésistance induite par un régime riche en graisses (Samuel et al., 2007; Frangioudakis et al., 2009; Huang et al., 2009).

L'enzyme MGAT qui convertit les monoacylglycérols en DAG faisant le lien entre la NAFLD et l'insulinorésistance, est également très étudiée. Son expression est augmentée dans des foies stéatosés et la perte de poids d'individus obèses diminue l'expression de son gène et restaure l'insulinosensibilité (Hall et al., 2012; Lee et al., 2012).

# E. <u>Traitements</u>

L'analyse de modèles animaux permet la découverte de nouveaux mécanismes à l'origine de ces pathologies permettant le développement de certains traitements (Varela-Rey et al., 2009).

Le premier traitement préconisé pour les personnes atteintes de stéatose hépatique est le changement de mode de vie. En effet, l'équilibre alimentaire, le sport et la perte de poids sont essentiels pour l'amélioration de cette pathologie (Corey and Rinella, 2016).

La stéatose hépatique étant liée à une insulinorésistance, des traitements à base de thiazolinediones telles que la pioglitazone (agoniste des récepteurs PPARy) ont été développés pour traiter ce dysfonctionnement. Ce médicament semble efficace puisqu'il résulte à la fois d'une amélioration de la stéatose hépatique et de l'insulinorésistance (Belfort et al., 2006).

Lorsque les changements de mode de vie ou les médicaments ne sont pas suffisants, la chirurgie peut être envisagée afin d'améliorer la stéatose.

## **Conclusion :**

La stéatose hépatique, résultant d'une accumulation anormale de gouttelettes lipidiques au niveau du foie est une pathologie en progression constante. L'accumulation de ces AG est en partie due à une augmentation de la lipogenèse. En effet, chez des personnes diabétiques ou obèses, un excès de glucides peut entraîner une activation de la glycolyse et de la lipogenèse anormale induisant une production excessive d'AG (Figure 24).

Une autre voie métabolique dépendante des glucides est la voie de biosynthèse des hexosamines à l'origine de la *O*-GlcNAcylation des protéines, modification post-traductionnelle essentielle.

# V. La O-N acétylglucosaminylation (O-GlcNAcylation)

# A. Caractéristiques générales

Découverte en 1984 par l'équipe de G.W. Hart, la *O*-GlcNAcylation ou  $\beta$ -*O*-Nacétylglucosaminylation est une modification post-traductionnelle dynamique correspondant à l'ajout d'un résidu de N-acétylglucosamine sur une sérine ou une thréonine (Torres and Hart, 1984) de protéines confinées dans les compartiments cytoplasmique, nucléaire et mitochondrial.

La *O*-GlcNAcylation est une modification post-traductionnelle très conservée et retrouvée dans de multiples organismes du plus complexe au plus simple : chez l'Homme, les insectes (*Drosophilia melanogaster*) (Kelly and Hart, 1989), les plantes (*Arabidopsis Thaliana*) (Zentella et al., 2016), les nématodes (*C. elegans*) (Lubas et al., 1997a), les apicomplexes (*Toxoplasma gondii*) (Perez-Cervera et al., 2011), les bactéries (*L. monocytogenes*) (Schirm et al., 2004), et les virus (cytomégalovirus, Herpes simplex virus...) (Greis et al., 1994; Angelova et al., 2015).

La *O*-GlcNAcylation est une modification vitale puisque un KO du gène codant l'enzyme catalysant cette modification induit la létalité embryonnaire (Shafi et al., 2000).

A ce jour, près de 4 000 protéines *O*-GlcNAcylées ont été identifiées, une partie de celles-ci sont répertoriées dans la base de données dbOGAP (dbOGAP : Database of *O*-GlcNAcylated Proteins and Sites) (Wang et al., 2011)). Ce nombre ne cesse d'augmenter notamment grâce au développement de nouvelles techniques de détection des protéines *O*-GlcNAcylées (production d'anticorps spécifiques, utilisation de la spectrométrie de masse...) (Vercoutter-Edouart et al. 2015).

# Les différentes techniques utilisées pour détecter la *O*-GlcNAcylation ont fait l'objet d'une publication jointe en annexe :

Vercoutter-Edouart, A.-S., El Yazidi-Belkoura, I., Guinez, C., Baldini, S., Leturcq, M., Mortuaire, M., Mir, A,-M., Steenackers, A., Dehennaut, V., Pierce, A., et al. (2015). Detection and identification of *O*-GlcNAcylated proteins by proteomic approaches. Proteomics *15*, 1039-1050.



**Figure 25 :** Dynamique de la *O*-GlcNAcylation par le couple d'enzyme OGT/OGA et les différents inhibiteurs ciblant ces enzymes.

L'OGT transfère un résidu de GlcNAc à partir du nucléotide sucre UDP-GlcNAc sur certains résidus sérine ou thréonine de protéines nucléocytoplasmiques ou mitochondriales. L'OGA hydrolyse le résidu de GlcNAc. Les différents inhibiteurs ciblant l'OGT sont l'alloxane, le BADGP et l'Ac-5SGlcNAc et ceux ciblant l'OGA sont le PUGNAc, le Thiamet-G, la GlcNAcstatin et le NButGT. *Inspiré de la thèse de Stéphanie Olivier-Van Stichelen.* 

<u>Abréviations</u> : S/T : sérine/thréonine, UDP-GlcNAc : uridine diphospho-N-acétylglucosamine.
## B. Les enzymes de la O-GlcNAcylation

Contrairement à la phosphorylation qui fait intervenir des centaines d'enzymes différentes, la *O*-GlcNAcylation n'est régulée que par un couple unique d'enzymes : l'OGT (*O*-linked  $\beta$ -Nacetylglucosaminyltransferase) qui transfert le résidu de GlcNAc sur sa protéine cible et l'OGA (*O*-linked  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase) qui hydrolyse ce résidu (Figure 25).

## 1. <u>La $\beta$ -O-N-acétylglucosaminyltransférase (OGT)</u>

## a) Généralités sur les glycosyltransférases

### Classification des glycosyltransférases

Les glycosyltransférases (GT) sont des enzymes catalysant la formation d'une liaison glycosidique entre un substrat donneur glycosyl et un large panel de substrats accepteurs comme des protéines, des acides nucléiques, des lipides et autres métabolites. Actuellement, 98 familles de GT sont répértoriées et classées en fonction des identités de séquence dans la base de données CAZY (carbohydrate-active enzymes). La grande majorité de ces enzymes utilisent des donneurs qui sont des nucléotides sucres, découverts pour la première fois par Luis Leloir conférant aux GT le nom d'enzymes de Leloir (Caputto et al., 1950).

#### Structure et mécanisme d'action des glycosyltransférases

De par la localisation membranaire de la plupart des GT, leur cristallisation et, par conséquent, leurs caractéristiques structurales sont difficiles à établir.

La fixation des enzymes de Leloir aux nucléotides sucres est permise grâce à la présence d'un domaine de type Rossmann, structure constiutée d'un sandwich  $\alpha/\beta/\alpha$ .

En dépit des grandes diversités de séquences entre les GT, des études structurales ont montré qu'elles pouvaient adopter deux conformations possibles, nommées GT-A et GT-B. Les enzymes de la famille GT-A présentent un seul domaine de structure  $\alpha/\beta/\alpha$  et comporte un motif de fixation DxD aux ions (Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>). Les GT-B présentent deux domaines Rossman avec un site catalytique entre ces deux domaines. Ce sont des GT indépendantes des ions métalliques (Figure 26a) (Lairson et al., 2008).

La β-glycosyltransférase du bactériophage T4 a été la première glycosyltransférase de type Leloir caractérisée d'un point de vue structural et utilisant l'UDP-Glc comme substrat donneur.



Figure 26 : Représentation des conformations des glycosyltransférases GT-A, GT-B et de l'OGT.

La représentation de la conformation de GT-A est celle de SpsA provenant de *Bacillus subtilis* et la conformation GT-B provient de la β-glucosyltransférase du bactériophage T4 (a). La structure cristalline de l'OGT humaine (Lazarus et al. , 2011) met en évidence deux domaines catalytiques (rouge et bleu), les TPRs (gris) mais également la présence d'un domaine supplémentaire de fonction inconnue nommé Int-D (vert).

<u>Abréviations</u> : GT : glycosyltransférase

Ces enzymes de type GT-B sont en général métal-indépendantes.

#### b) Structure et mécanisme d'action de l'OGT

En 1990, l'équipe de G.W. Hart a mis en évidence l'enzyme responsable de l'addition de Nacétylglucosamine sur les protéines cibles ; il s'agit de l'uridine diphospho-Nacétylglucosamine : polypeptide  $\beta$ -N-acétylglucosaminyltransférase, *O*-GlcNAc transférase ou OGT (Haltiwanger et al., 1990). L'OGT a été caractérisée suite à sa purification à partir d'extrait cytosolique de réticulocytes de lapin (Haltiwanger et al., 1990) puis à partir de foie de rat (Haltiwanger et al., 1992).

L'OGT est classée dans la famille GT41 adoptant une conformation GT-B (Haltiwanger et al., 1990). Elle transfère directement le sucre sur la protéine substrat et contient des motifs TPRs. La première structure cristalline de la famille GT41 a été réalisée à partir d'un orthologue de l'OGT chez la bactérie phytopathogène *Xanthomonas campestris* (XcOGT) (Clarke et al., 2008; Martinez-Fleites et al., 2008). La XcOGT présente 36% d'identité de séquence avec la hOGT dans le domaine catalytique et 3 des domaines TPRs. La cristallisation de cette structure confirme l'appartenance de l'OGT à la famille GT-B. Le site actif est localisé entre les 2 motifs structuraux de type Rossman. En 2011, la structure cristalline de la hOGT tronquée constituée de 4.5 TPR a été réalisée (Lazarus et al., 2011). Cette étude a reporté la structure de la hOGT (**Figure 26b**) et de l'UDP avec ou sans peptide accepteur et a permis de décrire le mécanisme catalytique bi-biordonné de l'OGT.

#### Séquence consensus

Bien qu'aucune séquence consensus stricte n'existe pour l'OGT, plusieurs études ont montré que plus de 50% des sites *O*-GlcNAcylés se rapprochaient du séquon P/V-P/V-V-S/T-S/T (Wang et al., 2010; Alfaro et al., 2012). La structure cristallographique de la ncOGT a permis de montrer que la présence de prolines ou d'acides aminés branchés jouxtant les sérines ou thréonines cibles renforçait la *O*-GlcNAcylation (Lazarus et al., 2011).

Plus récemment, Pathak et al. montrent l'existence d'une séquence préférentielle de *O*-GlcNAcylation [TS][PT][VT]**S/T**[RLV][ASY] mais que cette séquence n'est pas suffisante. En effet, une conformation spécifique semble également être primordiale (Pathak et al., 2015).

La formation d'un pont hydrogène entre le phosphate  $\alpha$  de l'UDP-GlcNAc et la sérine ou la thréonine acceptrice est importante pour la sélectivité de l'OGT. Elle rapproche le donneur et l'accepteur et positionne favorablement le groupement hydroxyle accepteur avec le carbone anomérique (Lazarus et al., 2012). La détermination de la structure cristalline de l'OGT (Lazarus et al., 2011) remet en cause ce mécanisme catalytique (Schimpl et al., 2012; Withers and Davies, 2012).

#### OGT et autres GlcNAc transférases ?

L'OGT est similaire aux autres GlcNAc transférases golgiennes préalablement décrites car elle utilise l'UDP-GlcNAc comme substrat et son activité est inhibée par l'UDP (Haltiwanger et al., 1990, 1992).

Cependant, sur certains points elle diffère des autres GlcNAc transférase puisque l'OGT est principalement retrouvée dans le cytosol, le noyau et la mitochondrie.

L'OGT est exprimée dans tous les tissus mais est présente de façon plus abondante dans le cerveau, le pancréas, le cœur et le muscle squelettique (Lubas et al., 1997b).

Le gène codant l'OGT a été conservé au cours de l'évolution des plantes à l'humain (Kreppel et al., 1997).

Chez Arabidopsis thaliana, l'OGT est codée par deux gènes distincts, spindly (SPY) et secret agent (SEC) (Hartweck et al., 2002). Cependant l'activité OGT de SPY n'a pas encore été démontrée. En plus du rôle de ces deux gènes durant la gamétogenèse et l'embryogenèse, SPY agit comme un répresseur de la signalisation de la gibbérelline et un régulateur positif en réponse aux cytokines. SPY a aussi un rôle dans le bon fonctionnement du cycle circadien (Hartweck et al., 2006).

Le Zebrafish est le seul vertébré connu à présenter deux copies du gènes codant l'OGT résultant d'une duplication (Sohn and Do, 2005).

Chez l'homme, le gène de l'OGT (environ 43 kb) est présent en un seul exemplaire sur le chromosome Xq13.1, région associée à la maladie de Parkinson (Shafi et al., 2000).



Figure 27 : Représentation schématique de la structure de l'OGT

Les trois isoformes de l'OGT humaines sont produites à partir d'un seul gène suite à un épissage alternatif et diffèrent au niveau de la région Nt : la ncOGT, l'isoforme la plus longue contenant 13 TPR, la mOGT en contenant 9 et la sOGT seulement 2. Chaque isoforme contient également deux domaines catalytiques et un domaine PPO.

<u>Abréviations</u>: TPR : tetratricopeptides repeats, NLS : nuclear localisation signal, CD : catalytic domain, PPO : PIP-binding activity of *OGT*, *OGT* : *O-GlcNAc transférase*, *ncOGT* : *nucleocytoplasmic OGT*, *mOGT* : *mitochondrial OGT*, *sOGT* : *short OGT*, *GSK* : glycogen synthase kinase, AMPK : AMP-activated protein kinase.

Bien qu'il n'y ait qu'un seul gène codant l'OGT, trois isoformes issues d'un épissage alternatif existent : l'isoforme nucléocytoplasmique (ncOGT), l'isoforme mitochondriale (mOGT) et l'isoforme courte ou «short » (sOGT).

Chaque isoforme comprend une région N-terminale et une région C-terminale liées entre elles par un domaine intermédiaire flexible adoptant une structure superhélicoïdale.

Les isoformes diffèrent par leur domaine N-terminal et plus particulièrement par le nombre de domaines de répétitions appelés répétitions tétratricopeptides (TPR, tetratricopeptides repeats).

L'isoforme humaine la plus longue, la ncOGT, (110 kDa) contient 13.5 TPRs et est localisée dans le noyau et le cytoplasme. Une forme plus courte, la mOGT, (103 kDa) en compte 9 et présente une séquence d'adressage à la mitochondrie. La sOGT (75 kDa) ne présente que 2.5 TPRs (Hanover et al., 2003; Love et al., 2003). Toutes les isoformes de l'OGT ont un domaine C-terminal commun portant deux régions catalytiques caractéristiques des glycosyltransférases de type GT-B (Figure 26 et 27).

#### 1) Le domaine N-terminal

La partie N-terminale de l'OGT est caractérisée par la présence de plusieurs TPRs, motifs retrouvés dans de nombreuses protéines. Ces TPRs sont des groupements de motifs de 34 acides aminés formant des motifs hélice-tour-hélice (Allan and Ratajczak, 2011).

Les résidus hydrophobes à l'interface sont conservés et essentiels pour la stabilité du motif (D'Andrea and Regan, 2003). Pour l'OGT, ces motifs sont empaquetés sous forme d'hélices α antiparallèles générant une super-hélice nécessaire à la reconnaissance et l'interaction avec le substrat (Jínek et al., 2004). Une région charnière a été identifiée entre les TPR 12 et 13 de la ncOGT régulant l'accès des protéines cibles au domaine de fixation de l'OGT (Figure 27).

Les résidus les plus conservés de ces TPRs sont présents surtout dans l'hélice A, et particulièrement le résidu d'asparagine en position 6 permettant la formation d'une accroche à la surface (Figure 28a). Cette même conformation est observée au niveau de l'importine  $\alpha$ . Ainsi, des auteurs ont suggéré que la présence de cette Asn permettrait la reconnaissance du substrat (Figure 28b) (Ramakrishnan et al., 2002).



Figure 28 : Représentation de la séquence et de la structure des TPR de la hOGT.

a) Les résidus conservés avec des chaînes latérales chargées sont marqués en orange et les autres résidus conservés en rose. Les résidus formant des interactions pour la dimérisation sont en marron. b) La comparaison entre les domaines TPRs de l'OGT et l'importine  $\alpha$  montre qu'ils sont très proches. *Schémas tirés de la thèse de Xiaowei Zheng.* 

<u>Abréviations</u> : TPR : *tetratricopeptides* repeats

Les domaines TPR influencent la sélectivité de l'OGT en favorisant son oligomérisation. Dans des tissus tels que le rein, le muscle, le foie ou encore le pancréas, l'OGT peut être sous la forme d'un complexe hétérotrimérique composé de deux sous-unités de 110 kDa et une de 78 kDa (Haltiwanger et al., 1992; März et al., 2006). En effet, les TPR6 et 7 peuvent former des interactions hydrohpobes. La mutation de ces TPR abolit l'oligomérisation de l'OGT et diminue son activité enzymatique (Jínek et al., 2004). L'OGT forme également des homo-oligomères dissociés suite à la délétion des TPRs 1 à 6 (Kreppel and Hart, 1999).

La délétion des six premiers TPRs montre qu'ils ne sont pas requis pour l'activité catalytique de l'enzyme. En effet, l'enzyme délétée est toujours capable de s'autoglycosyler, cette activité de glycosylation augmente même avec la délétion (Lubas and Hanover, 2000).

#### 2) Le domaine C-terminal

Le domaine C-terminal porte l'activité catalytique puisque la délétion de cette région conduit à une perte totale de l'activité de l'OGT (Lubas and Hanover, 2000). La structure de l'OGT humaine permet aujourd'hui de mieux décrire l'organisation du domaine C-terminal, notamment la présence des deux lobes formant le domaine catalytique caractéristique des enzymes GT-B (Roos and Hanover, 2000) (Figure 27). La particularité de l'enzyme humaine est la présence d'un domaine supplémentaire (Int-D) de fonction inconnue présent uniquement dans les séquences OGT de métazoaires.

La partie C-terminale semble également avoir un rôle dans l'interaction protéine/protéine (Cheung and Hart, 2008; Li et al., 2012). En effet, l'OGT interagit avec des protéines telles que le récepteur aux glucocorticoïdes ou encore la protéine p38MAPK indépendamment de son domaine TPR.

L'OGT possède également un domaine de fixation au phosphatidylinositol (3,4,5)triphosphate (PIP<sub>3</sub>). Il est impliqué dans le recrutement à la membrane plasmique de l'enzyme en réponse à l'insuline (Yang et al., 2008b) mais également dans le recrutement à la membrane nucléaire (Kebede et al., 2012).

#### c) Régulation de l'OGT

L'OGT est régulée à différents niveaux et des études ont montré que son activité catalytique n'est pas toujours en corrélation avec son expression. Elle est régulée par son oligomérisation, la disponibilité en substrat donneur de GlcNAc, les modifications post-traductionnelles et les interactions protéines-protéines.

### 1) <u>Régulation par la disponibilité en substrat</u>

L'OGT est régulée en fonction des concentrations en UDP-GlcNAc, une augmentation des niveaux de nucléotides-sucres induit son activité et renforce l'interaction entre les différents monomères d'OGT (Kreppel and Hart, 1999).

Au contraire, de fortes concentrations en UDP et UMP inhibent l'activité de l'OGT (Haltiwanger et al., 1992; Okuyama and Marshall, 2003).

## 2) Régulation transcriptionnelle de l'OGT

Longtemps, l'expression de l'OGT et de l'OGA ont été décrites comme constantes. Cependant, des études montrent des changements d'expression de ces deux enzymes dans différents contextes notamment en réponse à l'insuline (Perez-Cervera et al., 2013). Une seule équipe montre la régulation transcriptionnelle de l'OGT (Muthusamy et al., 2015). Les auteurs décrivent la présence de sites de fixation pour le facteur E2F1 sur le promoteur de l'OGT. La surexpression de ce facteur induit une diminution de l'expression de l'OGT dépendante de la protéine Rb1 (retinoblastoma 1) (Muthusamy et al., 2015).

La protéine Rb est un suppresseur de tumeur. En début de phase G1, elle est associée au facteur E2F1 inhibant son activité transcriptionnelle. En fin de phase G1, le complexe est dissocié permettant à E2F1 d'induire la transcription des gènes cibles nécessaires au passage à la phase S. Or, la *O*-GlcNAcylation de pRB et E2F1 en fin de phase G1 augmente leur activité (Wells et al., 2011). On peut imaginer une boucle de rétrocontrôle négative. pRB et E2F1 *O*-GlcNAcylés et actifs se fixent sur le promoteur de l'OGT afin de diminuer son expression.

#### 3) <u>Régulation post-traductionnelle de l'OGT</u>

Différentes modifications post-traductionnelles régulent l'activité et la spécificité de substrat de l'OGT. L'OGT est *O*-GlcNAcylée entre les acides aminés 1037 et 1046 dans le domaine catalytique et entre les acides aminés 390 et 406 du neuvième TPR. La *O*-GlcNAcylation de l'OGT augmente son activité catalytique (Kreppel et al., 1997) (Figure 27).



## Figure 29 : Clivage de la protéine HCF-1 par l'OGT.

Le clivage de la protéine HCF-1 par l'OGT dans le domaine de répétition résulte en la libération de deux fragments indépendants (HCF-1 N et HCF-1 C). L'OGT est également capable de *O*-GlcNAcyler HCF-1 sur plusieurs sites très largement situés sur la partie N-terminale.

<u>Abréviations</u> : HCF-1 : host cell factor-1, OGT : *O*-GlcNAc transférase, UDP-GlcNAc : uridine diphospho-N-acétylglucosamine. L'OGT est phosphorylée sur de multiples sites (Kreppel et al., 1997; Lubas and Hanover, 2000; Tai et al., 2004). Par exemple, la stimulation à l'insuline induit la phosphorylation et l'activité de l'OGT (Whelan et al., 2008). De plus, l'OGT peut être phosphorylée par l'AMPK et GSK3 augmentant son activité (Kaasik et al., 2013; Bullen et al., 2014) (Figure 27).

#### d) L'autre visage de l'OGT : son activité protéolytique

L'OGT, par son activité endopeptidase, est impliquée dans la maturation du régulateur mitotique HCF-1 (Host Cell Factor 1) (Kötzler and Withers, 2016). Le clivage de HCF-1 en deux fragments N- et C-terminaux distincts et sa *O*-GlcNAcylation sont essentiels pour l'entrée et la sortie de la phase G1 et la progression en phase M. Des expériences de *pulse-chase* montrent que ce clivage est réalisé préférentiellement dans le noyau mais aussi dans le cytoplasme (Wilson et al., 1995; Mangone et al., 2010).

HCF-1 possède des domaines protéiques constitués de 20 à 26 acides aminés localisés dans la région centrale de la protéine. Ces domaines sont très importants pour le clivage par l'OGT mais également pour sa *O*-GlcNAcylation (Capotosti et al., 2011; Kapuria et al., 2016) (Figure 29). Les mécanismes de protéolyse et de *O*-GlcNAcylation ne semblent dépendre uniquement que de la présence d'un résidu de glutamate sur HCF-1 (Lazarus et al., 2013).

#### e) Localisation subcellulaire de l'OGT

La ncOGT possède un domaine d'adressage au noyau (séquence NLS) précédant le domaine catalytique (Akimoto et al., 1999; Lubas et al., 1997b). Suite à une stimulation à l'insuline, l'OGT est redistribuée du noyau vers le cytoplasme et plus particulièrement vers la membrane plasmique (Whelan et al., 2008; Yang et al., 2008b). La mOGT, quant à elle, contient une séquence d'adressage vers la mitochondrie de 120 acides aminés dans sa partie N-terminale (séquence MLS). La délétion de cette séquence séquestre la mOGT dans le cytoplasme augmentant le pool de protéines *O*-GlcNAcylées cytoplasmiques (Love et al., 2003).

#### f) Rôle de la EOGT (EGF-domain specific *O*-GlcNAc transferase)

Contrairement à l'OGT qui modifie les protéines cytoplasmiques, nucléaires ou mitochondriales, l'addition d'un résidu de GlcNAc sur des protéines extracellulaires est réalisée par une OGT un peu différente : la EOGT (EGF-domain specific *O*-GlcNAc transferase) (Sakaidani et al., 2011; Müller et al., 2013).

Elle ne présente pas de similarité avec l'OGT mais est phylogénétiquement très proche des xylosyltransférases de plantes de la famille GT61 (19,4% d'identité entre les séquences de l'EOGT et de la β2-xylosyltransferase d'*Arabidopsis thaliana*).

La EOGT réside dans le *reticulum* endoplasmique et modifie des protéines secrétées contenant un domaine EGF-like (Ogawa et al., 2015). Ainsi, elle contribue aux interactions cellulesmatrice extracellulaire (Sakaidani et al., 2011). La EOGT utilise l'UDP-GlcNAc comme substrat traversant la membrane du *reticulum* grâce à des transporteurs de nucléotides-sucres (Sesma et al., 2009).

#### g) L'inhibition de l'OGT

Le gène codant l'OGT est indispensable à la survie cellulaire et à l'embryogenèse (Shafi et al., 2000; O'Donnell et al., 2004). Pour pallier le problème de viabilité engendré par le KO total, un KO de l'OGT tissu spécifique est réalisable (Watson et al., 2014). Cependant, la perte des activités catalytiques et non catalytiques conséquentes aux KO conduit à l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques de l'OGT afin d'en étudier le rôle sans en affecter les niveaux d'expression.

Comme nous l'avons vu plus haut, l'UDP et l'UTP sont des inhibiteurs puissants de l'OGT (Haltiwanger et al., 1992). Cependant, l'utilisation de ces composés en tant que drogues est confrontée à deux problèmes : ils sont incapables d'entrer dans la cellule et ils sont le substrat de beaucoup d'autres enzymes (Trapannone et al., 2016). Ainsi, des inhibiteurs pharmacologiques ont été synthétisés.

L'alloxane (2,4,5,6-tétraoxypyrimidine), analogue de l'uracile, a été le premier inhibiteur de l'OGT utilisé (Konrad et al., 2002; Liu et al., 2005) (Figure 25). Il est moins puissant que l'UDP mais pénètre dans la cellule grâce aux transporteurs de glucose. Cependant, il génère des espèces réactives de l'oxygène responsables de la toxicité cellulaire (Zhang et al., 1992). Pour pallier à ce problème, d'autres inhibiteurs ont été synthétisés à partir du substrat donneur, l'UDP-GlcNAc, notamment, le BADGP (benzyl-2-acétamido-2-désoxy-α-D-galactopyranoside) a été fabriqué (Figure 25). Son point faible est qu'il inhibe également d'autres glycosyltransférases (D'Alessandris et al., 2004).

Un autre composé, perméable aux cellules, a été synthétisé, l'Ac<sub>4</sub>-5S-GlcNAc (Figure 25). Il détourne la voie de biosynthèse des hexosamines pour produire l'UDP-5S-GlcNAc, un substrat donneur analogue à l'UDP-GlcNAc mais utilisé 3000 fois moins rapidement par l'OGT (Gloster et al., 2011). Cependant, ce composé peut engendrer des perturbations dans la synthèse de protéines *N*-Glycosylées (Ortiz-Meoz et al., 2015).

Tout récemment, une petite molécule inhibitrice de l'OGT a été décrite, il s'agit d'OSMI-1. Cette molécule est perméable à la membrane plasmique et inhibe la *O*-GlcNAcylation sans altérer les *N*- et *O*-glycannes à la surface cellulaire (Ortiz-Meoz et al., 2015).

## 2. <u>La β-N-acétylglucosaminidase (OGA)</u>

#### a) Généralités

La  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase ou OGA a été purifiée pour la première fois à partir de rate de rat en 1994 (Dong and Hart, 1994). Le clonage de l'OGA a permis son identification en tant qu'antigène exprimé dans les méningiomes et nommée MGEA5 (meninginoma expressed antigen 5).

L'OGA est une hexosaminidase monomérique nucléocytoplasmique appartenant à la famille des glycosides hydrolases 84 (GH84) (Cantarel et al., 2009; Comtesse et al., 2001).

En 2011, une étude a caractérisé les propriétés de l'enzyme recombinante et a décrit deux différences majeures entre l'OGA et les autres hexosaminidases lysosomales : le pH optimum et la sélectivité de substrat (Gao et al., 2001). Le pH optimum de l'OGA est neutre contrairement à celui des autres hexosaminidases qui est acide, et les HexA et B ont une sélectivité pour la GlcNAc et la GalNAc alors que l'OGA n'hydrolyse que la GlcNAc.

#### b) Isoformes et localisation

Le gène codant l'OGA est situé sur le chromosome 10q24.1-q24.3, région associée à la maladie d'Alzheimer et à la prédisposition au diabète de type 2 dans la population Mexicaine (Lehman et al., 2005; Myers et al., 2000).

Une seule isoforme existe chez les eucaryotes inférieurs comme la drosophile (Sekine et al., 2010) ou *C. elegans* (Forsythe et al., 2006). Chez l'Homme, l'OGA existe sous deux isoformes : une forme longue de 130 kDa et une forme courte sOGA de 75 kDa dépourvue d'un tiers de la protéine au niveau de la partie C-terminale (Comtesse et al., 2001).



Figure 30 : Représentation schématique de la structure de l'OGA.

Deux isoformes de l'OGA ont été décrites chez l'Homme, et sont produites à partir d'un seul gène. Ces isoformes différent par la présence d'un domaine Histone AcetylTransferase-like dans l'isoforme longue (130 kDa) et son absence dans la forme courte (75 kDa).

<u>Abréviations</u> : HAT : histone acétyltransferase, OGA : *O*-GlcNAcase, sOGA : short OGA.

La forme longue résiderait plutôt dans le cytoplasme alors que la forme courte est présente dans le noyau (Gao et al., 2001) et les gouttelettes lipidiques (Keembiyehetty et al., 2011). En plus de la différence de structure et de localisation, la sOGA a une activité moindre par rapport à la forme longue vis-à-vis des protéines substrats (Keembiyehetty et al., 2011) (Figure 30).

#### c) Structure de l'OGA

L'OGA contient un domaine N-terminal portant l'activité N-acétyl-β-D-glucosaminidase et un domaine C-terminal contenant une région similaire aux domaines histone acétyltransférases (HAT) (Comtesse et al., 2001). Après épissage alternatif, le domaine HAT-like est absent dans la forme courte. En plus des similarités de séquences entre l'OGA et les domaines HAT, l'OGA a une activité comparable à celle de CREB/p300 histone acétyltransférase vis-à-vis des histones libres (Toleman et al., 2004). Cependant, le rôle du domaine HAT-like reste à clarifier puisqu'une étude récente a montré que ce domaine de l'OGA n'est pas capable de fixer l'acétyl-CoA (Rao et al., 2013) (Figure 30).

#### d) Régulation de l'OGA

#### 1) <u>Régulation post-traductionnelle de l'OGA</u>

L'OGA est régulée de manière post-traductionnelle. Des études par spectrométrie de masse ont mis en évidence un site de phosphorylation (Ser364) dans les cellules HeLa et un site de *O*-GlcNAcylation (Ser405) dans le cerveau (Beausoleil et al., 2004; Khidekel et al., 2007) (Figure 30). Cependant le rôle de ces modifications sur l'activité de l'OGA n'a pas encore été étudié. L'OGA peut être clivée par la caspase 3 entre les domaines N- et C-terminaux durant la programmation de la mort cellulaire (Figure 30). Suite à ce clivage, l'activité de l'OGA reste la même suggérant la réassociation des deux fragments afin de maintenir un niveau constant de déglycosylation.

#### 2) <u>Régulation de l'OGA par son interaction avec l'OGT</u>

L'interaction de l'OGA avec l'OGT peut réguler son activité. Les deux protéines sont partenaires d'interaction dans un complexe appelé : *O*-GlcNAczyme (Cheung et al., 2008; Whisenhunt et al., 2006).

De plus, selon le contexte cellulaire, elles sont retrouvées en complexe avec d'autres protéines.

Par exemple, au cours de la cytokinèse, on retrouve la formation d'un complexe entre l'OGT, l'OGA, la kinase Aurora B et PP1c régulant les modifications post-traductionnelles de la vimentine indispensables pour le passage de la phase M (Slawson et al., 2008). Par contre, suite à la stimulation aux œstrogènes ou à la progestérone elles sont complexées avec mSin3A et l'histone désacétylase 1 (Whisenhunt et al., 2006). Dans cette dernière étude, l'activité de l'OGA est inhibée quand elle est en complexe avec l'OGT.

#### e) Inhibition de l'OGA

Les premiers inhibiteurs de l'OGA utilisés étaient la streptozotocine (STZ) (Roos et al., 1998) et le PUGNAc (O-(2-acétamido-2-désoxy-D-glucopyranosylidène)amido-N-phénylcarbamate) (Haltiwanger et al., 1998), tous deux analogues de la GlcNAc (Figure 25). Cependant, la streptozotocine, agent diabétogène, induit des effets toxiques spécifiques aux cellules  $\beta$  du pancréas (Gao et al., 2000; Pathak et al., 2008). L'utilisation du PUGNAc est également sujette à controverse puisqu'il inhibe les hexosaminidases lysosomales A et B, au même titre que l'OGA (Mehdy et al., 2012).

La détermination des mécanismes enzymatiques de l'OGA grâce à la cristallisation d'homologues bactériens a permis la synthèse d'inhibiteurs plus spécifiques. Le NButGT, sélectif vis-à-vis de l'OGA (1500 fois), n'induit pas d'insulinorésistance comme la streptozotocine et le PUGNAc (Macauley et al., 2005, 2008). Le Thiamet G présente une sélectivité vis-à-vis de l'OGA plus importante encore que le NButGT (37000 fois) (Figure 25). Les avantages de cet inhibiteur sont sa solubilité dans l'eau et sa capacité à pénétrer la membrane plasmique et la barrière hématoencéphalique (Yuzwa et al., 2008).

Parallèlement au développement d'inhibiteurs basés sur la thiazoline, un autre groupe a développé les GlcNAcstatines, une autre famille d'inhibiteurs de l'OGA (Dorfmueller et al., 2006) (Figure 25). La GlcNAcstatine G, montrant une sélectivité vis-à-vis de l'OGA de 900000 fois, est l'inhibiteur le plus sélectif de l'OGA (Dorfmueller et al., 2010). Cependant, ces composés sont faiblement solubles dans l'eau et difficile à synthétiser.



Figure 31 : L'UDP-GlcNAc, un carrefour métabolique.

Des précurseurs métaboliques tels que l'UTP, le Glucose, l'Acétyl-CoA et la glutamine sont indispensables à la biosynthèse de l'UDP-GlcNAc. L'interface entre ces métabolismes fait que la production d'UDP-GlcNAc est étroitement liée au statut nutritionnel de la cellule.

<u>Abréviations</u>: UTP : uridine triphosphate, Glc : glucose, UDP-GlcNAc : uridine diphospho-GlcNAc.

## C. La voie de biosynthèse des hexosamines

## 1. <u>Généralités</u>

Le nucléotide-sucre donneur substrat de l'OGT est l'uridine 5'-diphospho-Nacétylglucosamine ou UDP-GlcNAc. Ce composé est synthétisé par la voie de biosynthèse des hexosamines ; on estime qu'environ 2 à 3% du glucose entrant dans la cellule emprunte cette voie (Marshall et al., 1991). La synthèse d'UDP-GlcNAc fait intervenir différents précurseurs métaboliques tels que le glucose, la glutamine, l'acétyl-CoA et l'UTP. Par conséquent, l'UDP-GlcNAc est un véritable senseur métabolique en étant à l'interface des métabolismes glucidique, lipidique, nucléotidique et protéique (Figure 31).

## 2. La synthèse de l'UDP-GlcNAc

La synthèse de l'UDP-GlcNAc débute par l'entrée du glucose dans la cellule au travers d'un transporteur. Le glucose intracellulaire est phosphorylé en G6P par une hexokinase. Le G6P peut être utilisé pour la synthèse du glycogène, dans la voie des pentoses phosphates ou être converti en F6P par la glucose-6-phosphate isomérase. Le F6P est métabolisé par la glycolyse ou la voie de biosynthèse des hexosamines. S'ensuit la première étape de la voie de biosynthèse des hexosamines catalysée par la glutamine:fructose-6-phosphate amidotransférase (GFAT) formant de la glucosamine-6-phosphate (GlcNH<sub>2</sub>6P), à partir du F6P et de la glutamine. Ce composé est ensuite acétylé par la glucosamine-6-phosphate N-acétylglucosamine phosphate mutase (GlcNAc PM). Le nucléotide est ajouté grâce à l'UDP-N-Acétylglucosamine pyrophosphorylase (UDP-GlcNAc PPase) pour former l'UDP-GlcNAc (Figure 32).

#### a) La glutamine: fructose 6 phosphate amidotransférase (GFAT)

#### 1) Structure

La GFAT est une enzyme homotétramèrique catalysant la transformation du F6P en GlcNH<sub>2</sub>6P. Elle est constituée de deux domaines : un domaine N-terminal permettant la liaison avec la glutamine et un domaine C-terminal fixant le F6P. Ces deux domaines sont reliés par une région flexible permettant l'interaction entre les deux substrats.



Figure 32 : Représentation schématique de la voie de biosynthèse des hexosamines.

Le glucose entre dans la cellule, est phosphorylé en glucose 6P puis isomérisé en F6P. Ensuite, la première étape de la voie de biosynthèse des hexosamines est catalysée par la GFAT. S'ensuit une cascade de réactions aboutissant à la biosynthèse de l'UDP-GlcNAc. La GlcNH<sub>2</sub> peut également entrer dans la cellule par son propre transporteur et emprunter la voie de biosynthèse des hexosamines.

<u>Abréviations</u> : GlcNH<sub>2</sub> : glucosamine, ATP : adénosine triP, ADP : adénosine diP, G6P : glucose-6P, F6P : fructose-6P, GFAT : glutamine :fructose-6-phosphate amidotransférase, AT : acétyltransférase, PM : phosphate mutase, UDP-GlcNAc : uridine diP-N-acétylglucosamine, PPase : pyrophosphorylase.

Trois isoformes de la GFAT existent : GFAT1 et GFAT1-L codés par un seul gène présent sur le chromosome 2p13, et GFAT2 codé par un gène localisé sur le chromosome 5q34-35 (Whitmore et al., 1995; Zhou et al., 1995). GFAT1-L, uniquement exprimé dans le muscle squelettique, le cerveau et le cœur, est un variant d'épissage de GFAT1 mais possède des propriétés et une activité similaires à GFAT1 (DeHaven et al., 2001).

#### 2) <u>Régulation</u>

En plus d'être régulée par les flux de glucose, la voie de biosynthèse des hexosamines est modulée par l'activité de certaines de ces enzymes, notamment la GFAT, enzyme limitante de la voie. Un rétrocontrôle négatif de la voie existe puisque la GFAT est inhibée par des concentrations élevées d'UDP-GlcNAc, produit final de la voie, (Kornfeld, 1967) et de GlcNH<sub>2</sub>6P, intermédiaire de la voie (Broschat et al., 2002).

La GFAT est également régulée de manière post-traductionnelle par phosphorylation. Cependant, la phosphorylation a un rôle antagoniste sur les deux isoformes de GFAT. La PKA phosphoryle et inhibe la GFAT1 sur la sérine 205 (Chang et al., 2000) alors qu'elle active la GFAT2 en la phosphorylant sur la sérine 202 (Hu et al., 2004).

D'autres équipes ont également montré que la phosphorylation de la GFAT par l'AMPK et la CAMKII sur la sérine augmente son activité (Li et al., 2007).

Etant donné que la GFAT utilise la glutamine comme substrat, différents inhibiteurs, analogues de cet acide aminé, ont été développés sans inhiber pour autant les autres amidotransférases. Les deux inhibiteurs les plus fréquemment utilisés sont le DON (6-Diazo-5-Oxo-L-Norleucine) et l'azasérine (O-diazoacétyl-L-sérine) (Marshall et al., 1991; Milewski, 2002).

## b) La glucosamine 6-phosphate N-acétyltransférase : GlcNAc 6P AT (Emeg 32)

Une autre enzyme clef de la voie de biosynthèse des hexosamines est la glucosamine-6phosphate N-acétyltransférase (GlcNH<sub>2</sub>6P AT) également appelée Emeg 32. C'est une protéine liée à la membrane plasmique et indispensable pour le maintien des niveaux d'UDP-GlcNAc cellulaire (Boehmelt et al., 2000a, 2000b).

L'inhibition d'Emeg 32 et de la synthèse d'UDP-GlcNAc cause un défaut cellulaire vital. Des souris mutées pour ce gène présentent une diminution des niveaux de *O*-GlcNAcylation perturbant la prolifération et l'adhésion cellulaire (Boehmelt et al., 2000a).



Figure 33 : Les différentes fonctions cellulaires de la O-GlcNAcylation.

La *O*-GlcNAcylation est une modification importante puisqu'elle est capable de modifier certaines propriétés des protéines telles que leur dégradation, leur localisation mais également de réguler pléthore de processus biologiques comme le cycle cellulaire et circadien, la réponse au stress et la transcription/traduction.

La *O*-GlcNAcylation est une modification post-traductionnelle capable de réguler pléthore de propriétés biologiques de protéines. Elle modifie, seule ou en concert avec d'autres modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation, les surfaces d'interaction entre les protéines. Ainsi, les propriétés protéiques telles que la stabilité et la localisation peuvent être affectées. De ces modifications de propriétés peut découler une régulation de processus physiologiques tels que le cycle cellulaire et circadien, la réponse au stress, la transcription, la traduction et la régulation épigénétique (Figure 33).

# D. <u>La O-GlcNAcylation : un régulateur des propriétés</u> protéiques

## 1. La O-GlcNAcylation et la phosphorylation

La *O*-GlcNAcylation et la phosphorylation sont deux modifications partageant beaucoup de points communs. Elles modifient des sérines ou thréonines à des niveaux variables, dépendants de la protéine, du site à modifier et de l'état cellulaire.

La phosphorylation et la *O*-GlcNAcylation sont également toutes deux dépendantes des conditions nutritionnelles puisque la synthèse de leurs substrats donneurs respectifs, l'ATP et l'UDP-GlcNAc, dépend du métabolisme cellulaire. Ces substrats sont les deux structures nucléotidiques les plus abondantes au niveau de la cellule, l'ATP reflète le contenu énergétique de la cellule et l'UDP-GlcNAc le contenu nutritionnel.

#### a) Dialogue phosphorylation/O-GlcNAcylation

Des études de glycomiques et de phosphoprotéomiques montrent une relation très étroite entre la phosphorylation et la *O*-GlcNAcylation (Wang et al., 2008b).

Une diminution des protéines *O*-GlcNAcylées est observée lorsque des cellules sont traitées à l'acide okadaïque (un inhibiteur de phosphatases à large spectre) (Lefebvre et al., 1999) et une augmentation des niveaux de protéines *O*-GlcNAcylées lorsque les kinases PKA ou PKC sont inhibées (Griffith and Schmitz, 1999).

Cependant, le dialogue entre la phosphorylation et la *O*-GlcNAcylation est complexe car l'inhibition de la kinase GSK3 augmente la *O*-GlcNAcylation de certaines protéines chaperonnes ou du cytosquelette mais diminue également la *O*-GlcNAcylation d'autres protéines telles que des facteurs de transcription (Wang et al., 2007) (Figure 34).



Figure 34 : Relation schématique entre la O-GlcNAcylation et la phosphorylation.

Le dialogue entre la phosphorylation et la *O*-GlcNAcylation est complexe et se présente de différentes façons : il peut exister une compétition entre la *O*-GlcNAc et la phosphorylation sur le même site (a) ou sur des sites différents (b). Il peut également y avoir une coopération entre les deux modifications (c) ou alors un dialogue entre les deux modifications de façon totalement indépendante (d).

<u>Abréviations</u> : OGA : *O*-GlcNAcase, OGT : *O*-GlcNAc transférase, Pase : phosphatase.

Différents types de compétition existent entre la phosphorylation et la *O*-GlcNAcylation. Selon les conditions, certaines protéines sont modifiées sur le même site **(Figure 34).** C'est par exemple le cas de c-Myc (Chou et al., 1995a), le récepteur aux œstrogènes (Cheng and Hart, 2001), l'ARN polymérase II (Comer and Hart, 2001) ou encore la delta-lactoferrine. La delta-lactoferrine est un facteur de transcription induisant l'arrêt du cycle cellulaire. Ce facteur est modifié sur un même résidu, la sérine 10, par *O*-GlcNAcylation et phosphorylation (Hardivillé et al., 2010; Mariller et al., 2012). Selon la modification sur cette sérine, l'activité de la protéine est modifiée. **(Figure 34).** 

D'autre protéines sont modifiées de façon compétitive par un phosphate ou un résidu de GlcNAc sur des sites proximaux comme par exemple p53 (Yang et al., 2006), CAMKIV (Dias et al., 2009) ou encore FOXO1 (Housley et al., 2008).

Pour d'autres protéines, la *O*-GlcNAcylation et la phosphorylation coexistent comme pour la protéine IRS1 (Insulin Receptor Substrate 1) (Ball et al., 2006) (Figure 34).

#### b) Dialogue entre OGT/OGA/kinases/phosphatases

Une dynamique de *O*-GlcNAcylation et de phosphorylation sur les enzymes régulant ces modifications existe.

L'OGT et l'OGA sont phosphorylées (Figure 27) et un grand nombre de kinases sont *O*-GlcNAcylées comme par exemple Akt (Gandy et al., 2006) ou régulées en fonction des niveaux de *O*-GlcNAcylation comme PKC (Matthews et al., 2005). De plus, l'OGT et l'OGA sont très souvent retrouvées en complexe avec d'autres kinases et phosphatases (Wells et al., 2004).

La protéine CAMKIV (calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV) est un bon exemple de dialogue entre la phosphorylation et la *O*-GlcNAcylation. Cette kinase joue un rôle de première importance dans l'activation d'un certain nombre de facteurs de transcription. CAMKIV est *O*-GlcNAcylée et cette *O*-GlcNAcylation inactive l'enzyme. Afin d'être ré-activée, CAMKIV doit, dans un premier temps, être dé-*O*-GlcNAcylée puis phosphorylée (Dias et al., 2009). Un cycle de rétrocontrôle existe puisque CAMKIV active l'OGT par phosphorylation (Song et al., 2008).

# 2. <u>Rôle de la O-GlcNAcylation dans les interactions</u> protéines/protéines

La *O*-GlcNAcylation module les interactions protéiques en modifiant les surfaces d'interaction. Par exemple, le facteur de transcription Sp1 est un facteur ubiquitaire important pour la régulation de la transcription de gènes de ménage. Sp1 est *O*-GlcNAcylé dans son domaine de transactivation empêchant son interaction avec les protéines TAF110 (TATA-binding protein associated factor 110) et Holo-sp1, et inhibant sa capacité à réguler la transcription de ses gènes cibles (Roos et al., 1997).

Un autre exemple montrant le rôle de la *O*-GlcNAcylation sur les interactions protéiques est celui du facteur NF-Kb (Nuclear Factor kappa B). NF-Kb contrôle l'expression de gènes impliqués dans la prolifération et la réponse immunitaire. Dans des conditions de non stimulation, NF-Kb est séquestré dans le cytoplasme par son inhibiteur IkB. En réponse à un stimuli, IkB est dégradé conduisant à la migration de NF-Kb vers le noyau afin d'induire la transcription de ses gènes cibles. La *O*-GlcNAcylation active NF-KB en entraînant la dissociation du complexe NF-KB/IkB (Golks et al., 2007; Yang et al., 2008a).

Inversement, la *O*-GlcNAcylation peut être nécessaire pour l'interaction d'une protéine avec ses partenaires. En ce sens, seule la forme *O*-GlcNAcylée de STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5) interagit avec CBP (Gewinner et al., 2004) permettant la transcription de ses gènes cibles.

Les exemples ci-dessus montrent que la *O*-GlcNAcylation des protéines peut favoriser ou inhiber leur interaction avec d'autres partenaires. Cependant, des protéines reconnaissant spécifiquement les protéines *O*-GlcNAcylés afin d'en modifier leurs propriétés existent : ce sont les protéines de choc thermiques Hsc70 (Heat Shock Cognate 70) et Hsp70 (Heat Shock Protein) (Lefebvre et al., 2001; Guinez et al., 2004). Selon toute vraisemblance, cette interaction GlcNAc-dépendante permettrait aux protéines *O*-GlcNAcylées d'être protégées de la dégradation, de s'agréger et de s'insolubiliser (Guinez et al., 2007).



Figure 35 : Les différents rôles de la O-GlcNAcylation sur la dégradation protéique.

La *O*-GlcNAcylation régule la dégradation des protéines de 4 façons : elle empêche la phosphorylation de la protéine, son ubiquitinylation et donc sa dégradation (a), elle peut stabiliser les protéines par le recrutement de déubiquitinases (b), elle peut favoriser la monoubiquitinylation (c) et enfin elle peut directement moduler l'activité du protéasome. L'OGT interagit avec E3, E1, DUB et les sous-unités 19S et 20S du protéasome (d).

<u>Abréviations</u>: CRTC2 : cAMP-response element binding protein regulated transcription coactivator 2, DUB : déubiquitinase, PGC : Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma Co-activator, CLOCK : Circadian locomotor output cycles kaput, BMAL : brain muscle ARNT-like 1, FAS : fatty acid synthase, H2B : histone 2B, OGT : *O*-GlcNAc transférase.

## 3. Rôle de la O-GlcNAcylation sur la localisation subcellulaire

L'étude du rôle de la *O*-GlcNAcylation sur la localisation subcellulaire des protéines s'est approfondie dès lors que les protéines impliquées dans le transport nucléaire ont été décrites comme étant *O*-GlcNAcylées (Hanover et al., 1987; Holt et al., 1987).

La relocalisation cellulaire par la *O*-GlcNAcylation a été montrée, entre autres, pour des protéines telles que PAX6 (Paired Box Protein) (Lefebvre et al., 2002), STAT5 (Nanashima et al., 2005) ou encore NeuroD1 (Andrali et al., 2007). La *O*-GlcNAcylation est un signal de rétention cellulaire pour ces protéines et inversement, la forme *O*-GlcNAcylée de la  $\beta$ -caténine est retrouvée principalement dans le cytoplasme (Sayat et al., 2008).

## 4. Rôle de la O-GlcNAcylation sur la dégradation protéasomale

La *O*-GlcNAcylation module l'ubiquitinylation de manière globale mais aussi de façon protéine dépendante. Une augmentation des niveaux de *O*-GlcNAcylation par utilisation de glucosamine ou de PUGNAc, augmente l'ubiquitinylation totale. De manière plus ciblée, la *O*-GlcNAcylation peut bloquer l'ubiquitinylation de bon nombre de protéines.

Une étude a même montré que l'enzyme E1 (ubiquitin-activating enzyme) intervenant dans les processus d'ubiquitinylation est *O*-GlcNAcylée et sa *O*-GlcNAcylation corrèle avec une augmentation des niveaux d'ubiquitinylation (Guinez et al., 2008). Cela suggère l'existence d'un dialogue entre la *O*-GlcNAcylation et l'ubiquitinylation des protéines à sens unique puisque l'augmentation des niveaux d'ubiquitinylation n'influence pas la *O*-GlcNAcylation.

La *O*-GlcNAcylation régule la dégradation des protéines selon 4 voies : en bloquant la phosphorylation de la protéine et, par conséquent, son ubiquitinylation, en stabilisant les protéines par recrutement de déubiquitinases, en favorisant la monoubiquitinylation (ajout d'une ubiquitine sur une lysine), et enfin en modulant directement l'activité du protéasome (Figure 35).

# a) La *O*-GlcNAcylation régule l'ubiquitinylation des protéines via leur phosphorylation

La *O*-GlcNAcylation peut contrôler l'ubiquitinylation et la stabilité des protéines en modulant la phosphorylation. La phosphorylation régule l'ubiquitinylation des protéines de trois façons :

elle active la E3 ligase responsable du transfert de l'ubiquitine, elle induit la reconnaissance par la E3 ligase de la protéine à dégrader et elle régule l'interaction substrat/ubiquitine ligase au niveau de la compartimentation subcellulaire (Hunter, 2007).

P53, CRTC2 et la  $\beta$ -caténine sont trois exemples de protéines dont le rôle de la *O*-GlcNAcylation sur leur dégradation a été décrit en modulant la phosphorylation.

Dans le cas du suppresseur de tumeur p53, une élévation artificielle des niveaux de *O*-GlcNAcylation globaux augmente ses niveaux de *O*-GlcNAcylation et diminue la viabilité cellulaire. Une étude, maintenant controversée, a montré que la *O*-GlcNAcylation de p53 sur la S149 inhibe la phosphorylation de la T155 réduisant l'ubiquitinylation et la dégradation de p53 (Yang et al., 2006).

Le facteur de transcription CRTC2 régule la néoglucogenèse hépatique. A jeun, la déphosphorylation de CRTC2 sur la S171 induite par le glucagon permet sa translocation au noyau et l'activation de la transcription de ses gènes cibles impliqués dans la néoglucogenèse (Koo et al., 2005). En période postprandiale, l'insuline induit la phosphorylation de CRTC2 sur la S171 relocalisant la protéine au cytoplasme et activant sa dégradation (Dentin et al., 2007). La *O*-GlcNAcylation de CRTC2 sur la S171 réprime la séquestration cytoplasmique, sa dégradation et induit l'augmentation de la néoglucogenèse hépatique (Dentin et al., 2008).

De même, la *O*-GlcNAcylation de la  $\beta$ -caténine, oncogène fortement dérégulé dans les cancers colorectaux et hépatiques, sur la T41 empêche sa phosphorylation et sa dégradation. (Olivier-Van Stichelen et al., 2014) (Figure 35a).

# b) La O-GlcNAcylation stabilise les protéines via le recrutement de déubiquitinases.

Le lien entre *O*-GlcNAcylation et le recrutement de déubiquitinases a été fait pour la première fois pour PGC-1 $\alpha$ . PGC-1 $\alpha$  est un co-facteur transcriptionnel induisant, entre autres, la néoglucogenèse. La *O*-GlcNAcylation de PGC-1 $\alpha$  facilite le recrutement de la déubiquitinase BAP1 (Figure 35b). L'interaction entre les deux protéines stabilise PGC-1 $\alpha$  et favorise la néoglucogenèse (Ruan et al., 2012). De façon similaire, le complexe OGT-BAP1 *O*-GlcNAcyle et stabilise BMAL1 et CLOCK, deux acteurs principaux dans la régulation du cycle circadien (Li et al., 2013) (Figure 35b).
#### c) La O-GlcNAcylation facilite la monoubiquitinylation

Fujiki et al. ont montré que la *O*-GlcNAcylation de l'histone H2B sur la S112 sert d'ancrage pour l'histone H2B ubiquitine ligase, ce qui promeut sa monoubiquitinylation sur K120. Cette modification induit l'activation de la transcription par remodelage de la chromatine (Fujiki et al., 2011) (Figure 35c).

## d) La O-GlcNAcylation module l'activité protéasomale

Le protéasome 26S est responsable de la destruction des protéines polyubiquitinylées. Il est composé d'une sous-unité catalytique 20S et d'une sous-unité régulatrice 19S, toutes deux *O*-GlcNAcylées. La *O*-GlcNAcylation de la sous-unité 19S inhibe son activité et celle du protéasome (Sümegi et al., 2003; Zhang et al., 2003). Dans ce cas, la *O*-GlcNAcylation inhibe la dégradation des protéines (Figure 35d).

En modifiant les propriétés de certaines protéines, la *O*-GlcNAcylation est impliquée dans la régulation de nombreux processus physiologiques.

## E. <u>Rôle de la O-GlcNAcylation dans les processus</u> physiologiques

1. <u>Rôle de la O-GlcNAcylation dans la régulation de la</u> transcription et de la traduction

## a) Transcription

Les premières études liant la *O*-GlcNAcylation et la régulation de la topographie de la chromatine datent de la fin des années 1980. En effet, l'OGT et la *O*-GlcNAcylation sont très abondants sur la chromatine et la concentration de l'OGT corrèle avec une augmentation de la transcription chez la drosophile (Kelly and Hart, 1989).

De plus, l'activité de chaque facteur de transcription régulant l'expression de l'ARN polymérase II est augmentée par *O*-GlcNAcylation (Jackson and Tjian, 1988). L'activité catalytique de l'ARN polymérase II, le domaine CTD (C-terminal repeat domain), est lui-même fortement *O*-GlcNAcylé sur la sous-unité CTDIIa (forme où l'enzyme n'est pas phosphorylée) (Kelly et al., 1993).

La formation du complexe de pré-initiation par l'ARN polymérase II sur le promoteur nécessite la présence d'un motif GlcNAc sur le CTD empêchant sa phosphorylation et permettant la transcription (Comer and Hart, 1999).

La *O*-GlcNAcylation régule également la machinerie transcriptionnelle basale en modifiant un grand nombre de ses composés indispensables (Hart et al., 1996; Comer and Hart, 1999). La *O*-GlcNAcylation s'effectue au cours de l'assemblage du complexe de pré-initiation et régule, de ce fait, l'initiation de la transcription de nombreux gènes (Bond and Hanover, 2013).

Plus récemment, l'OGT a été décrite comme une protéine appartenant au groupe Polycomb (Gambetta et al., 2009; Sinclair et al., 2009). Les protéines Polycomb sont des répresseurs transcriptionnels majeurs découverts chez la drosophile. Ces protéines se rassemblent sous la forme de deux complexes, PRC1 et PRC2 (Polycomb Repressive Complex 1/2). Un lien entre l'OGT et l'activité des complexes PRC et en particulier PRC2 existe puisqu'une extinction de l'OGT conduit à une déstabilisation du complexe et une diminution de 50% de répression de la transcription (Chu et al., 2014). De plus, une boucle de régulation existe : des cellules dépourvues du complexe PRC2 fonctionnel présentent une diminution d'expression d'OGT et des niveaux de *O*-GlcNAcylation (Myers et al., 2011).

#### b) Traduction

La phosphorylation de la sous-unité  $\alpha$  de la protéine eIF2 (eukaryotic chain initiation factor 2), indispensable à l'initiation de la traduction, est un régulateur négatif majeur pour l'initiation de la synthèse protéique. La *O*-GlcNAcylation intervient à deux niveaux pour prévenir cette phosphorylation, via p67 qui protège eIF2 des kinases, et via eIF2 lui-même. Concernant p67, la protection intervient notamment lorsqu'il est *O*-GlcNAcylé, la traduction est alors favorisée (Ray et al., 1992). Lorsque le facteur eIF2 est lui-même *O*-GlcNAcylé, il est réciproquement hypophosphorylé, ce qui promeut la traduction (Jang et al., 2015).

La *O*-GlcNAcylation modifie également le facteur d'élongation EF1 (Dehennaut et al., 2008a) et un certain nombre de facteurs de traductions et de protéines ribosomales. Par exemple, la protéine ribosomale S6, composante de la voie de signalisation mTOR, est *O*-GlcNAcylée et sa *O*-GlcNAcylation varie en fonction des conditions nutritionnelles (Zeidan et al., 2010).

Un autre rôle de la *O*-GlcNAcylation sur la traduction est la modification des protéines présentes dans les granules de stress cellulaire (Ohn et al., 2008). Ces granules de stress ou *processing bodies* sont visibles sur les ribonucléoprotéines et régulent de façon coopérative la traduction et la désintégration de l'ARNm. Ces granules comportent de nombreuses protéines *O*-GlcNAcylées, leur *O*-GlcNAcylation jouant un rôle majeur en favorisant leur assemblage (Ohn et al., 2008).

Par conséquent, la *O*-GlcNAcylation favorise la traduction par divers processus : elle active les protéines impliquées dans l'initiation, l'élongation de la traduction et les protéines ribosomales et elle promeut l'assemblage des granules de stress régulant la traduction et la désintégration des ARNm.

## 2. <u>Rôle de la O-GlcNAcylation dans la régulation épigénétique</u>

## a) La O-GlcNAcylation nous fait tourner la « Tet »

La méthylation des cytosines est un événement épigénétique important pour différents processus cellulaires et est souvent associée à la répression de la transcription. Les protéines de la famille Tet (Ten-eleven translocation) convertissent la 5-méthylcytosine (5mC) en 5-hydroxylméthylcytosine (5hmC). Cette hydroxyméthylation promeut la déméthylation de l'ADN et active l'expression génique. La mutation des sites *O*-GlcNAcylés de Tet1 la stabilise et une diminution des niveaux de *O*-GlcNAcylation augmente l'activité de Tet3 (Zhang et al., 2014). De plus, l'OGT entraîne une relocalisation cytoplasmique de Tet3 (Shi et al., 2013; Zhang et al., 2014).

Un lien entre la méthylation de l'ADN, le code des histones et la *O*-GlcNAcylation existent puisque la délétion de Tet2 diminue la *O*-GlcNAcylation de l'histone H2B associée à une régulation de la transcription des gènes (Chen et al., 2013).

Les protéines Tet1, Tet2 et Tet3 interagissent avec l'OGT et permettent son recrutement à la chromatine pour modifier les histones (Chen et al., 2013).

#### b) La O-GlcNAcylation et les histones

Les degrés de compaction de la chromatine gouvernent l'accès de la machinerie transcriptionnelle à l'ADN.

La *O*-GlcNAcylation joue un rôle sur la méthylation des histones. Les 4 sous-unités du core d'histones sont *O*-GlcNAcylées (H2A, H2B, H3 et H4) (Sakabe et al., 2010) et leur *O*-GlcNAcylation augmente en phase G1, diminue en phase S et ré-augmente en phase G2/M. La *O*-GlcNAcylation influence aussi d'autres modifications post-traductionnelles. En effet, l'histone H3 est phosphorylée par la kinase Aurora et déphosphorylée par PP1. Ces deux enzymes interagissent avec l'OGT et l'OGA et la phosphorylation de l'histone H3 est diminuée lorsque les niveaux de *O*-GlcNAcylation sont augmentés (Zhang et al., 2011). En revanche, la *O*-GlcNAcylation de l'histone H2B entraîne son ubiquitinylation et sa dégradation (Fujiki et al., 2011).

La *O*-GlcNAcylation régule également l'acétylation des histones. L'OGT et l'OGA sont retrouvés dans un complexe avec le corépresseur Sin3A et l'histone désacétylase 1. Des expériences de ChIP ont montré un enrichissement de ce complexe sur le promoteur de gènes réprimés (Whisenhunt et al., 2006). Récemment, une étude a remis en cause la O-GlcNAcylation des histones puisque les auteurs, grâce à l'utilisation de différentes approches biochimiques, ne détectent pas cette modification (Gagnon et al., 2015).

#### 3. <u>Rôle de la O-GlcNAcylation dans la réponse au stress</u>

Les niveaux de *O*-GlcNAcylation sont rapidement augmentés en réponse au stress (Zachara et al., 2004; Guinez et al., 2007) et l'OGT est nécessaire pour la résistance au stress thermique (Guinez et al., 2008). Pour répondre au stress cellulaire, l'OGT adopte une fonction de chaperonne protégeant les protéines de la dégradation (Sohn et al., 2004). De plus, l'augmentation des niveaux de *O*-GlcNAcylation est en corrélation avec l'augmentation de la dégradation des protéines chaperonnes Hsp protégeant les protéines de la dégradation des protéines Hsp protégeant les protéines de la dégradation (Kazemi et al., 2010).

## 4. <u>Rôle de la O-GlcNAcylation dans la régulation du cycle</u> <u>circadien</u>

Le cycle circadien réunit tous les processus biologiques présentant une oscillation de 24 heures et la *O*-GlcNAcylation est cruciale pour sa régulation.

Dans une première boucle de régulation, les protéines CLOCK et BMAL1 initient la transcription de gènes cibles tels que PER et CRY.

En retour, une deuxième boucle de rétrocontrôle négative est mise en place dans laquelle PER et CRY répriment l'activité transcriptionnelle de CLOCK et BMAL1. Ces quatre principaux acteurs de la régulation du cycle circadien sont *O*-GlcNAcylés (Durgan et al., 2011; Kaasik et al., 2013). La *O*-GlcNAcylation stabilise CLOCK et BMAL1 en inhibant leur ubiquitinylation (Li et al., 2013). Quant à PER, la phosphorylation sur la S662 empêche sa *O*-GlcNAcylation et cette compétition entre les deux modifications joue un rôle essentiel sur la régulation de l'activité transcriptionnelle de PER et sur la régulation du cycle circadien (Kaasik et al., 2013).

## 5. <u>Rôle de la O-GlcNAcylation dans la régulation du cycle</u> cellulaire

Plusieurs observations montrent que la régulation des niveaux de *O*-GlcNAcylation est essentielle pour la progression normale des cellules au cours du cycle cellulaire. D'ailleurs Slawson et ses collaborateurs ont montré que les niveaux de *O*-GlcNAcylation varient au cours du cycle cellulaire (Slawson et al., 2005).

La délétion du gène codant l'enzyme Emeg32 diminue la prolifération de fibroblastes embryonnaires de souris (Boehmelt et al., 2000a). Ensuite, l'inactivation de l'OGT augmente l'expression d'un inhibiteur du cycle cellulaire, p27, se répercutant sur une diminution de la prolifération (O'Donnell et al., 2004).

Plusieurs études ont montré des variations majeures des niveaux de *O*-GlcNAcylation au cours de la transition des différentes phases du cycle cellulaire.

Chez le Xénope, une inhibition de l'activité de l'OGT par l'alloxane bloque la transition G2/M alors qu'une inhibition de l'activité de l'OGA (utilisation du PUGNAc) accélère le processus de maturation (Dehennaut et al., 2007). A l'inverse la microinjection de ncOGT dans les ovocytes favorise leur entrée en phase M (Dehennaut et al., 2008b).

Au cours de la transition G1/S, une diminution des niveaux de *O*-GlcNAcylation est observée en corrélation à une augmentation de l'activité de l'OGA (Drougat et al., 2012). Dans cette étude, des protéines impliquées dans les phases d'initiation et d'élongation de la réplication de l'ADN, les MCM (Mini-Chromosome Maintenance) 2, 3, 6 et 7 sont *O*-GlcNAcylées (Drougat et al., 2012).

Dans notre équipe, une étude montre également que l'OGT est essentielle pour la transition G0/G1 (Olivier-Van Stichelen et al., 2012a).

Beaucoup de facteurs clefs impliqués dans la régulation du cycle cellulaire sont *O*-GlcNAcylés comme par exemple ERK2 (Dehennaut et al., 2008a), c-Myc (Chou et al., 1995b) ou encore Sp1 (Vicart et al., 2006). Cependant, l'impact fonctionnel de la *O*-GlcNAcylation de ces protéines sur la régulation du cycle cellulaire n'a pas été clairement démontré.

La *O*-GlcNAcylation a un rôle majeur dans la régulation de nombreux processus physiologiques. Néanmoins dans des conditions de niveaux de *O*-GlcNAcylation aberrants, des modifications anormales de protéines et une possible dérégulation des voies de signalisation peuvent causer, sur le long terme, certaines pathologies.

## F. <u>O-GlcNAcylation et pathologies</u>

## 1. O-GlcNAc et maladies neurodégénératives

Etant donné que le gène codant l'OGA est sur un locus lié aux stades tardifs de la maladie d'Alzheimer (Bertram et al., 2000) et que celui de l'OGT est associé à la maladie de Parkinson (Nolte et al., 2003), une relation étroite entre les niveaux de *O*-GlcNAcylation et les processus de neurodégénération semble exister.

Les corrélations entre l'obésité, la perturbation de la voie de signalisation de l'insuline et le métabolisme du glucose dans le cerveau de patients atteints de maladie d'Alzheimer suggèrent que cette maladie peut être considérée comme un diabète de type 3 (Steen et al., 2005; Lefebvre et al., 2010). En effet, des patients atteints de diabète de type 2 ont deux fois plus de risque de développer un Alzheimer (Biessels et al., 2006).

Les conditions nutritionnelles, les concentrations en glucose et la *O*-GlcNAcylation sont, par conséquent, liées dans l'émergence ou le développement de telles pathologies (Lefebvre et al., 2005).

Une des caractéristiques communes aux maladies neurodégénératives est la diminution de la consommation de glucose dans les zones affectées du cerveau (Ishii, 2014). Comme pour tous les autres types cellulaires, la *O*-GlcNAcylation est fondamentale pour les neurones. D'ailleurs, le cerveau est un organe glucodépendant et gros consommateur de glucides où l'OGT et l'OGA sont les plus abondants (Kreppel et al., 1997; Gao et al., 2001).

Dans l'hippocampe, une région associée au stade précoce de la maladie d'Alzheimer, le jeûne diminue les niveaux globaux de *O*-GlcNAcylation alors que la prise alimentaire les augmente (Li et al., 2006b).

La protéine la plus étudiée pour comprendre l'implication de la *O*-GlcNAcylation dans le développement de maladies neurodégénératives est Tau. Dans la maladie d'Alzheimer, Tau hyperphosphorylée est retrouvée sous forme d'agrégats dans les enchevêtrements neurofibrillaires.

Tau est *O*-GlcNAcylée (Arnold et al., 1996) de façon dépendante à la prise alimentaire et inversement corrélée à sa phosphorylation (Li et al., 2006b; Yuzwa et al., 2008; Zhu et al., 2014). La *O*-GlcNAcylation affecte l'oligomérisation de Tau en protégeant la protéine de la phosphorylation. Sa *O*-GlcNAcylation sur la S400 diminue la phosphorylation du site voisin S404, bloquant le processus séquentiel de phosphorylation coordonné par la protéine GSK3. Inversement, la phosphorylation sur les sites S396 et S404 diminue fortement la *O*-GlcNAcylation du site S400 (Smet-Nocca et al., 2011).

Le rôle de la *O*-GlcNAcylation a également été étudié dans les processus d'émergence de la maladie de Parkinson et, en particulier, sur une protéine formant les corps d'inclusion neuronale, l' $\alpha$ -synucléine. Cette protéine est *O*-GlcNAcylée sur la T72 dans un domaine nécessaire à son oligomérisation (Marotta et al., 2012). La *O*-GlcNAcylation ne perturbe pas les fonctions normales de la protéine mais diminue son agrégation (Marotta et al., 2015).

Le rôle protecteur de la *O*-GlcNAcylation dans les pathologies neurodégénératives a été testé chez les souris. Un traitement à long terme avec des inhibiteurs d'OGA diminue les lésions neurodégénératives dans le cerveau (Yuzwa et al., 2008; Borghgraef et al., 2013; Graham et al., 2014).

## 2. <u>O-GlcNAcylation et cancer</u>

#### Augmentation des niveaux de O-GlcNAcylation et d'OGT dans les cellules cancéreuses

Comme pour le cerveau, la caractéristique principale des cellules cancéreuses est la consommation excessive de glucose et de glutamine. Le glucose et la glutamine étant deux substrats de la voie de biosynthèse des hexosamines, les cellules cancéreuses augmentent leur production d'UDP-GlcNAc, substrat de l'OGT.

Ainsi, une augmentation des niveaux de *O*-GlcNAcylation est observée dans plusieurs types de cancers comme le cancer du sein (Caldwell et al., 2010), du poumon, du colon (Mi et al., 2011), du foie (Zhu et al., 2012), du pancréas (Ma et al., 2013) et de la prostate (Lynch et al., 2012) suggérant que l'hyper *O*-GlcNAcylation précède ou accompagne l'émergence tumorale et contribue à la transformation cellulaire.

L'augmentation de la *O*-GlcNAcylation est due tout ou en partie à une augmentation de l'expression de l'OGT et à une élévation des concentrations d'UDP-GlcNAc pour les raisons invoquées plus haut. Dans les régions cancéreuses, une augmentation de *O*-GlcNAcylation de plus de 30 protéines et de l'OGT est observée (Champattanachai et al., 2013). Inversement, une inhibition de l'OGT induit une réduction de la prolifération cellulaire, de l'invasion, de la migration et une diminution de la croissance tumorale (Caldwell et al., 2010).

Un grand nombre de facteurs de transcription et suppresseurs de tumeurs, ayant un rôle dans la progression tumorale sont *O*-GlcNAcylés comme par exemple c-myc (Chou et al., 1995a) ou Sp1 (Dauphinee et al., 2005). De même, le suppresseur de tumeur HIC1 est *O*-GlcNAcylé, la *O*-GlcNAcylation affectant sa dimérisation et son activité (Lefebvre et al., 2004).

#### Rôle de la O-GlcNAcylation sur les propriétés des cellules cancéreuses

## <u>L'étude de l'effet d'un siOGT sur la prolifération, l'adhésion et la migration de cellules</u> <u>cancéreuses a fait l'objet d'une publication jointe en annexe.</u>

Steenackers, A., Olivier-Van Stichelen, S., **Baldini, S.F**., Dehennaut, V., Toillon, R.-A., Le Bourhis, X., El Yazidi-Belkoura, I., and Lefebvre, T. (2016). Silencing the Nucleocytoplasmic *O*-GlcNAc Transferase Reduces Proliferation, Adhesion, and Migration of Cancer and Fetal Human Colon Cell Lines. Front. Endocrinol. 7, 46.

Dans cette étude, nous reportons que l'extinction de l'OGT diminue la prolifération, la survie cellulaire, l'adhésion et la migration dans des lignées cellulaires non pathologiques (CCD841CoN) et cancéreuses (HT29 et HCT116). L'extinction de l'OGT désorganise également les réseaux de microfilaments et de microtubules dans les CCD841CoN même si les niveaux d'actine et de tubuline ne sont pas affectés.



Figure 36: Quelques exemples illustrant le lien entre O-GlcNAcylation et cancérisation.

Les signaux oncogéniques activent l'OGT grâce aux voies PI3K/Akt et MAPK/Erk. L'OGT activée, *O*-GlcNAcyle un certain nombre de facteurs impliqués dans l'émergence tumorale. La *O*-GlcNAcylation de Snail1 induit la répression de la E-cadhérine et l'invasion métastatique consécutive. La *O*-GlcNAcylation de c-myc et NF-KB augmente la survie et la prolifération cellulaire. PFK1 *O*-GlcNAcylé est moins actif, le métabolisme des cellules cancéreuses est orienté vers la voie des pentoses phosphates.

<sup>&</sup>lt;u>Abréviations</u> : PI3K : phosphoinositide-3-kinase, MAPK : mitogen-activated protein kinase, Erk : extracellular signal-regulated kinase, OGT : *O*-GlcNAc transférase, NF-KB : nuclear factor-kappa B, PFK : phosphofructokinase.

Cette étude renforce l'idée que l'OGT intervient dans les processus de cancérisation mais également sur les propriétés biologiques des cellules normales.

La *O*-GlcNAcylation affecte des protéines intervenant dans la mobilité cellulaire. En ce sens, l'augmentation des niveaux de *O*-GlcNAcylation diminue les niveaux de E-cadhérine (glycoprotéine responsable des jonctions d'adhérence) et augmente les niveaux de certaines MMPs (métalloprotéinase matricielle), protéases dégradant les composants de la matrice extracellulaire (Lynch et al., 2012; Zhu et al., 2012).

Dans les cellules cancéreuses, l'invasion cellulaire est favorisée par la *O*-GlcNAcylation de la protéine cofiline intervenant dans la mobilité cellulaire (Huang et al., 2013) et par celle de Snail1, répresseur transcriptionnel de la E-cadhérine, stabilisé par *O*-GlcNAcylation (Park et al., 2010). NF-KB, stabilisé par *O*-GlcNAcylation confére aux cellules une propriété anti-apoptotique (Ma et al., 2013) (Figure 36).

#### Relation entre la O-GlcNAcylation et les voies de signalisation induisant la prolifération

L'augmentation de l'expression de l'OGT dans les cellules cancéreuses est due, entre autres, à l'activation de deux voies : la voie PI3K/Akt et la voie MAPK/Erk puisque l'inhibition de PI3K ou d'Akt diminue les niveaux de *O*-GlcNAcylation (Zhang and Chen, 2015). L'augmentation des niveaux de *O*-GlcNAcylation régulée par la voie PI3K/Akt pourrait être due à la stabilisation de l'OGT par HSP90 (Sodi et al., 2015).

L'activation de la voie MAPK induit également une hausse des niveaux de *O*-GlcNAcylation et conduit à une augmentation de la migration cellulaire (Zhang et al., 2015) (Figure 36).

#### Exemple du rôle de la O-GlcNAcylation dans le shift métabolique des cellules cancéreuses

Les cellules cancéreuses reprogramment leur métabolisme cellulaire afin de générer des molécules telles que l'ATP, les nucléotides, les lipides et les équivalents réducteurs nécessaires à leur prolifération. Ainsi, la *O*-GlcNAcylation de PFK1, enzyme clef de la glycolyse, diminue son activité et redirige le flux de glucose vers la voie des pentoses phosphates conférant un avantage sélectif de croissance aux cellules cancéreuses. *In vitro*, le blocage de la *O*-GlcNAcylation de PFK1 réduit la prolifération cellulaire et empêche la formation tumorale (Yi et al., 2012) (Figure 36).



## Figure 37 : Régulation hormonale de la voie de l'insuline en fonction de l'état nutritionnel.

A jeun, le pancréas sécrète du glucagon qui stimule la néoglucogenèse en augmentant l'activité de CREB. La PKA phosphoryle CREB qui induit la transcription des gènes impliqués dans la néoglucogenèse renforcée par la *O*-GlcNAcylation de CRTC2, coactivateur de CREB. Après un repas, l'insuline se fixe sur son récepteur qui s'autophosphoryle et active la voie par cascade de phosphorylations dont Akt est un des chaînons. Akt activé permet la translocation des transporteurs GLUT4 à la membrane, la phosphorylation de GSK3 $\beta$  et, par voie de conséquence, l'activation de la glycogène synthase et la phosphorylation de FOXO qui est alors séquestré dans le cytoplasme : la néoglucogenèse est inactivée.

<u>Abréviations</u>: PKA: protein kinase A, OGT, *O*-GlcNAc transférase, CRTC2: CREB- regulated transcription coactivator 2, CREB: cyclic AMP-responsive element-binding protein, PGC: peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator, FOXO: forkhead box O, IRS: insulin receptor substrate, PI3K: phosphoinositide-3-kinase, PDK: phosphoinositide-dependent kinase, GSK: glycogen synthase kinase.

Par conséquent, les cellules cancéreuses présentent une augmentation de l'expression de l'OGT et des niveaux globaux de *O*-GlcNAcylation. La *O*-GlcNAcylation module les propriétés des cellules cancéreuses en favorisant la prolifération, la survie cellulaire, l'adhésion et la migration cellulaire. Elle intervient également dans le shift métabolique des cellules tumorales indispensable pour leur prolifération.

## 3. <u>Rôle de la O-GlcNAcylation sur le métabolisme glucidique en</u> <u>condition physiologique et hyperglycémique</u>

#### a) Rôle de la O-GlcNAcylation en condition physiologique

#### 1) <u>A jeun</u>

Afin de produire du glucose pour les organes gluco-dépendants, la période de jeûne induit la glycogénolyse et la néoglucogenèse. Les enzymes intervenant dans ces voies sont contrôlées, entre autres, par l'activité du facteur de transcription CREB stimulée par le glucagon. La phosphorylation de CREB par la kinase PKA promeut son interaction avec le complexe CBP/p300, son activation et la transcription des gènes codant la PC, la PEPCK et la G6Pase, toutes trois enzymes de la néoglucogenèse. CREB actif se fixe sur le facteur FOXO et induit l'expression de PGC1α, co-activateur de la transcription des gènes impliqués dans la néoglucogenèse (Figure 37) (Herzig et al., 2001).

L'activation du facteur CREB est permise grâce à son co-activateur : le facteur CRTC2. Au niveau basal, le facteur CRTC2 est phosphorylé sur les sérines 70 et 171 par les kinases SIKs (salt-inducible kinases) et AMPK et est séquestré dans le cytoplasme par les protéines 14-3-3 (Uebi et al., 2010). En réponse au glucagon et à l'élévation des niveaux d'AMPc, CRTC2 est déphosphorylé et *O*-GlcNAcylé sur ce même site induisant sa translocation nucléaire, sa fixation à CREB et la transcription des gènes codant les enzymes de la néoglucogenèse (Dentin et al., 2008) (Figure 37).

#### 2) En période postprandiale

Après un repas, la fixation de l'insuline sur son récepteur entraîne l'autophosphorylation de plusieurs tyrosines du domaine intracellulaire du récepteur provoquant le recrutement et la phosphorylation des protéines IRS.

Ces protéines activées phosphorylent la PI3K catalysant la formation du PIP3 à la membrane qui recrute Akt activée par PDK1 (3-phosphoinositide dependent protein kinase 1). Akt phosphoryle en retour plusieurs cibles dont la GSK3 (inhibant la glycogène synthase) et FOXO induisant son export nucléaire et prévenant la transcription des gènes de la néoglucogenèse. L'activation d'Akt et de PKC via PDK1, induit la translocation de vésicules abritant le transporteur de glucose GLUT4 à la membrane plasmique : l'import de glucose dans les cellules adipocytaires et les cellules du muscle squelettique est induite (Figure 37).

## b) Rôle de la *O*-GlcNAcylation sur la glucotoxicité et de l'insulinorésistance en condition hyperglycémique

L'hyperglycémie et l'hypertriglycéridémie causées par l'insulinorésistance, caractéristiques du diabète de type 2, semblent en partie résulter d'une activation de la voie de biosynthèse des hexosamines (Teo et al., 2010). Cette observation paraît paradoxale puisque les cellules résistantes à l'insuline captent moins de glucose et, en conséquence, produisent moins d'UDP-GlcNAc. En revanche, la disponibilité en glucose pourrait profiter aux cellules non insulinodépendantes. En ce sens, l'insulinorésistance est associée à une augmentation des niveaux d'UDP-GlcNAc (Traxinger and Marshall, 1991) et des niveaux de *O*-GlcNAcylation chez les animaux diabétiques (Fricovsky et al., 2012; Ruan et al., 2012). Réciproquement, la surexpression de GFAT ou l'administration de glucosamine *in vivo* induisent l'insulinorésistance (Hebert et al., 1996; Virkamäki et al., 1997).

De même, l'inhibition de l'OGA par le PUGNAc augmente les niveaux de *O*-GlcNAcylation et cause l'insulinorésistance (Vosseller et al., 2002) alors que l'inhibition par le NButGT ne provoque pas le même effet (Macauley et al., 2008). Sachant que le PUGNAc, contrairement au NButGT, inhibe les hexosaminidases lysosomales, on peut potentiellement attribuer cet effet à une défaillance du recyclage du récepteur à l'insuline qui est *N*-glycosylé.

Le rôle de la *O*-GlcNAcylation semble être tissus et types cellulaires dépendants puisque la surexpression transitoire de l'OGA dans le foie de souris db/db améliore la sensibilité à l'insuline (Dentin et al., 2008) alors que la surexpression de l'OGA ou l'extinction de l'OGT dans des cellules adipocytaires n'a pas d'effet sur l'insulinorésistance (Robinson et al., 2007).



# **Figure 38**: Rôle de la *O*-GlcNAcylation sur la glucotoxicité, l'insulinorésistance et l'hyperglycémie.

L'augmentation aberrante des niveaux de *O*-GlcNAcylation induirait une dérégulation du métabolisme glucido-lipidique à l'origine de la glucotoxicité et de l'insulinorésistance par quatre mécanismes : la diminution du transport du glucose, l'augmentation de la néoglucogenèse et la diminution de la glycogénogenèse, l'hyperinsulinémie et la dérégulation et l'inactivation de la voie de signalisation de l'insuline.

<u>Abréviations:</u> PDX1 : pancreatic and duodenal homeobox-1, NeuroD1 : neurogenic differentiation-1, OGT : *O*-GlcNAc transférase, CRTC2 : CREB-specific coactivator TORC2, CREB : cyclic AMP-responsive element-binding protein, PGC : peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator, FOXO : forkhead box O, IRS : insulin receptor substrate, PI3K : phosphoinositide-3-kinase, PDK : phosphoinositide-dependent kinase, GSK : glycogen synthase kinase.

En condition d'hyperglycémie, l'augmentation des niveaux de *O*-GlcNAcylation induit une dérégulation du métabolisme glucido-lipidique causant la glucotoxicité et l'insulinorésistance par quatre mécanismes : la diminution de l'absorption du glucose, l'augmentation de la néoglucogenèse et la diminution de la glycogénogenèse, l'augmentation de la synthèse de l'insuline et la dérégulation et l'inactivation de la voie de signalisation de l'insuline (Figure 38).

#### 1) Diminution de l'absorption du glucose par O-GlcNAcylation

La translocation du transporteur de glucose GLUT4 à la membrane plasmique est requise pour internaliser le glucose et réguler les taux de glucose sanguin. La *O*-GlcNAcylation de Munc18c, un composant essentiel pour le bourgeonnement des vésicules, est augmentée en réponse à la glucosamine, et un défaut d'adressage de la vésicule à la membrane plasmique est observée (Chen et al., 2003). Le trafic de GLUT4 est également dépendant de l'action des protéines PKCs au travers du remodelage de l'actine (Liu et al., 2006). Les protéines PKCs et l'actine sont *O*-GlcNAcylées : cette *O*-GlcNAcylation pourrait jouer un rôle inhibiteur sur la translocation de GLUT4 à la membrane (Robles-Flores et al., 2008) **(Figure 38).** 

## 2) <u>Rôle de la O-GlcNAcylation sur la néoglucogenèse et la</u> <u>glycogénogenèse</u>

L'hyperglycémie dans les hépatocytes d'individus diabétiques est due, en partie, à une augmentation de la néoglucogenèse. Depuis longtemps, il est admis que la *O*-GlcNAcylation joue un rôle dans le phénomène de glucotoxicité. Un nombre important de facteurs de transcription régulant la néoglucogenèse sont *O*-GlcNAcylés.

L'OGT forme un complexe avec HCF-1 pour *O*-GlcNAcyler PGC1α. En retour, PGC1α *O*-GlcNAcylé recrute la déubiquitinylase BAP1 qui réduit sa dégradation (Ruan et al., 2012). PGC1α cible l'OGT sur le facteur de trancription FOXO1, qui devient *O*-GlcNAcylé (Figure 38) (Housley et al., 2009).

Le facteur CRTC2 est également *O*-GlcNAcylé, ce qui induit sa dissociation des protéines de séquestration cytoplasmique et la transcription de ses gènes cibles impliqués dans la néoglucogenèse. La surexpression de l'OGA diminue la *O*-GlcNAcylation de CRTC2 et par conséquent la néoglucogenèse (Dentin et al., 2008).

Le métabolisme du glycogène est également perturbé par une augmentation des niveaux de *O*-GlcNAcylation. La glycogène synthase est stimulée par l'insuline via l'inhibition de GSK3β. Son activité est réduite chez les personnes diabétiques et sa *O*-GlcNAcylation est associée à une diminution de son activité résultant en une augmentation de la concentration en glucose due à une inhibition de la glycogénogenèse (Parker et al., 2003) (Figure 38).

#### 3) <u>Régulation de la synthèse de l'insuline par O-GlcNAcylation</u>

L'insuline est sécrétée par les cellules  $\beta$  du pancréas. Les niveaux de protéines *O*-GlcNAcylées et d'OGT sont plus élevés dans ces cellules que dans les cellules adjacentes suggérant un rôle de la *O*-GlcNAcylation sur l'expression de l'insuline (Hanover et al., 1999). Une augmentation des niveaux de *O*-GlcNAcylation induit la transcription des gènes *Ins1* et *Ins2* de part une élévation des marques épigénétiques de l'histone H3 (Durning et al., 2016). L'expression de l'insuline est régulée par 3 facteurs de transcription : NeuroD1 (neurogenic differentiation 1), PDX-1 (pancreatic and duodenal homeobox 1) et MafA (V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A).

En condition d'hyperglycémie, l'interaction entre l'OGT et NeuroD1 augmente. NeuroD1 *O*-GlcNAcylé est transloqué dans le noyau induisant la transcription du gène codant l'insuline (Andrali et al., 2007). De façon similaire, PDX1 est *O*-GlcNAcylé en réponse à de fortes concentrations en glucose augmentant son activité transcriptionnelle (Gao et al., 2003). Le facteur de transcription MafA est induit au niveau transcriptionnel par le Glc via un facteur de transcription inconnu mais régulé par la *O*-GlcNAcylation. MafA active alors la synthèse d'insuline (Vanderford et al., 2007) (Figure 38).

## 4) <u>Rôle de la O-GlcNAcylation dans la dérégulation de la voie de</u> <u>signalisation de l'insuline</u>

Les mécanismes induisant la résistance à l'insuline sont mal connus mais il existe un déséquilibre du dynamisme de la *O*-GlcNAcylation de la voie activée par cette hormone. En réponse à l'insuline, l'OGT est adressée à la membrane plasmique grâce à son domaine de fixation au PIP3, le domaine PPO (PIP-binding activity of OGT) (Yang et al., 2008b) : l'OGT serait phosphorylée et activée par le récepteur à l'insuline (Whelan et al., 2008).

L'OGT activée *O*-GlcNAcylerait et inhiberait bon nombre de protéines de la voie de l'insuline telles que IRS1, PI3K, PDK1 et Akt induisant, par conséquent, une atténuation du signal insulinémique (Yang et al., 2008b; Whelan et al., 2010).

L'atténuation de la signalisation de l'insuline est, en grande partie, due à la diminution de l'activité d'Akt. L'augmentation de la *O*-GlcNAcylation d'Akt sur les sites T305 et T312 diminue son activité en perturbant la phosphorylation de la T308 dissociant le complexe Akt/PDK1 (Wang et al., 2012). La diminution de l'activité d'Akt réduit la synthèse du glycogène en diminuant la phosphorylation de GSK3ß (Wang et al., 2007). Cependant, le dialogue entre la voie de signalisation à l'insuline et la *O*-GlcNAcylation est complexe puisque notre équipe a montré réciproquement que l'OGT et, par conséquent, la *O*-GlcNAcylation sont nécessaires à l'activation de voie PI3K/Akt (Perez-Cervera et al., 2013). Ainsi, l'OGT aurait un double rôle, sans doute l'un (activateur) en phase précoce et l'autre (inactivateur) en phase plus tardive.

Ainsi, l'hypothèse émise serait qu'à long terme, un défaut de régulation des niveaux de *O*-GlcNAcylation engendrerait une diminution d'absorption du glucose au travers de l'insulinorésistance et par conséquent un phénomène de glucotoxicité (Figure 38).

Résultats :



## I. <u>Contexte de l'étude</u>

La prévalence du diabète prend des proportions épidémiques comme l'indique une étude de la « World Health Organization » publiée en 2014 et recensant 422 millions de diabétiques dans le monde. A cela s'ajoute des problèmes de surcharge pondérale liée au diabète ; selon l' « International Diabetes Federation », 80% des diabétiques sont en surpoids (IMC>=25) ou obèses (IMC>=30). La Région Nord-Pas-de-Calais est particulièrement affectée par ces problèmes de santé publique puisque nous nous plaçons en tête en ce qui concerne le diabète de type 2 et l'obésité respectivement avec des taux de prévalence de 4,8% et 20,5% contre 3,9% et 16,9% au niveau national.

Une des causes de ces pathologies est un dérèglement du métabolisme glucido-lipidique dû à une alimentation trop riche en sucres et en graisses et à une vie sédentaire. Après un repas, l'organisme active, en particulier, deux voies principales que sont la glycolyse et la lipogenèse pour équilibrer la glycémie (Girard et al., 1994). Plus particulièrement, deux enzymes sont activées : la GlucoKinase (GK) et la Fatty Acid Synthase (FAS) entraînant l'augmentation de la biosynthèse des acides gras.

Une autre voie métabolique du glucose est la voie de biosynthèse des hexosamines. Cette voie conduit à la formation de l'UDP-GlcNAc, nucléotide sucre, à l'origine de la *O*-GlcNAcylation, glycosylation réversible des protéines cytosoliques, nucléaires et mitochondriales (Torres and Hart, 1984b). L'UDP-GlcNAc, nucléotide sucre substrat des réactions de *O*-GlcNAcylation, est un carrefour métabolique. En effet, sa biosynthèse est dépendante des métabolismes des glucides, des acides aminés, des acides gras et des nucléotides (Wang et al., 1998). Les enzymes responsables du cycle *O*-GlcNAcylation/dé-*O*-GlcNAcylation sont l'OGT (*O*-GlcNAc Transférase) et l'OGA (*O*-GlcNAcase). Les glycosylations constituent, avec les phosphorylations, deux groupes de modifications post-traductionnelles très répandues. Ces deux modifications, affectant des groupements hydroxyles, peuvent entrer en compétition sur un même résidu de sérine ou de thréonine d'une protéine ou sur des résidus adjacents.



## Figure 39 : Régulation hypothétique de la GK et de la FAS par O-GlcNAcylation.

Le glucose entre dans la cellule et suit diverses voies métaboliques, parmi lesquelles la voie de biosynthèse des hexosamines (à l'origine de la formation de l'UDP-GlcNAc) et la glycolyse qui, dans certaines conditions physiologiques, est suivie de la lipogenèse. Le but de ce projet est d'étudier l'impact de la *O*-GlcNAcylation sur la régulation de la GK et de la FAS, enzymes essentielles de la glycolyse et de la lipogenèse.

<u>Abréviations</u> : Glc : glucose, Fru : fructose, GlcNH<sub>2</sub> : glucosamine, G3P : glycéraldéhyde-3-phosphate, DHAP : dihydroxyacétone phosphate, AcCoA : acétyl-CoA, MalCoA : malonyl-CoA, UDP-GlcNAc : uridine diphospho-GlcNAc, TG : triglycérides, OGT : *O*-GlcNAc transférase, OGA : *O*-GlcNAcase.

Des perturbations des niveaux de *O*-GlcNAcylation, en corrélation, le plus souvent, avec un changement de profil de phosphorylation sont associées à de nombreuses pathologies comme les maladies cardiovasculaires, neurodégénératives, le cancer ou le diabète de type 2 (Lefebvre et al., 2010b).

## II. <u>Hypothèse de travail</u>

De nombreuses études tendent à établir un lien entre les désordres métaboliques et les dérèglements des niveaux de *O*-GlcNAcylation. Il a été démontré qu'en réponse au glucose, la *O*-GlcNAcylation des facteurs de transcription LXR et ChREBP augmente la transcription de leurs gènes cibles en particulier la FAS se traduisant par une biosynthèse accrue d'AG (Anthonisen et al., 2010; Guinez et al., 2011) . La voie des hexosamines étant elle-même directement dépendante des concentrations en glucose, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle la *O*-GlcNAcylation régulerait la glycolyse et la lipogenèse en contrôlant l'expression et l'activité catalytique de la GK et de la FAS (Figure 39).

Les objectifs de cette partie étaient de :

- Déterminer si la GK et la FAS étaient O-GlcNAcylées
- Déterminer l'impact de la O-GlcNAcylation sur l'expression et l'activité de ces protéines
- Déterminer la présence ou non d'une corrélation entre les niveaux de *O*-GlcNAcylation et la production accrue d'acides gras.

## III. <u>Etude du rôle de la O-GlcNAcylation sur les propriétés</u> <u>de la GK et de la FAS hépatiques</u>

## A. La glucokinase

## 1. Introduction

La phosphorylation du glucose est la première étape du métabolisme du glucose dans toutes les cellules. Chez les mammifères, elle est catalysée par les hexokinases. Dans le foie et le pancréas, l'hexokinase IV, la glucokinase (GK), est un senseur majeur des taux de glucose. Les patients diabétiques de type 2 caractérisés par une défaillance dans la régulation de la glycémie présentent une dérégulation de la GK, en grande partie, due à l'émergence de l'hyperglycémie. Par conséquent, cette enzyme est une cible pour le développement de traitements anti-hyperglycémiques (Matschinsky et al., 2006). La compréhension des mécanismes régulant la GK est nécessaire pour le développement de nouveaux traitements. La GK est régulée en fonction des conditions nutritionnelles de façon transcriptionnelle et post-traductionnelle (cf partie II,C page 82) (Massa et al., 2011).

La transcription de la GK est dépendante exclusivement de l'insuline. En effet, la stimulation à l'insuline de cultures primaires d'hépatocytes de rat induit une augmentation des niveaux d'ARNm de la GK de façon dose-dépendante (Narkewicz et al., 1990). Les effets de l'insuline sont régulés par la voie PI3K/Akt (Roth et al., 2004) permettant l'activation et la fixation du facteur de transcription SREBP-1c sur le promoteur de la GK.

Au niveau de sa régulation post-traductionnelle, la régulation de la GK implique son interaction avec la protéine régulatrice, GKRP (GlucoKinase Regulatory Protein). A glycémie physiologique (1 g.L<sup>-1</sup>), la GKRP et la GK forment un complexe qui migre au niveau du noyau rendant la GK inactive. En période post-prandiale, le fructose 1-phosphate dissocie le complexe GK/GKRP. Ainsi, la GK migre au cytoplasme où elle phosphoryle le glucose en glucose 6-phosphate (de la Iglesia et al., 1999).

La *O*-GlcNAcylation est une modification post-traductionnelle également dépendante des taux de glucose et qui régule l'expression et les propriétés biologiques de nombreuses protéines. Les objectifs de cette partie étaient de caractériser la *O*-GlcNAcylation de la GK et d'étudier le rôle de la *O*-GlcNAcylation sur l'expression de la GK.

## 2. <u>Résultats</u>

Dans cette partie de ma thèse, nous avons démontré que l'expression de la GK est corrélée avec les niveaux de *O*-GlcNAcylation dans un modèle physiopathologique : les souris ob/ob. De plus, nous avons démontré par enrichissement des protéines *O*-GlcNAcylées sur la lectine sWGA (succinyl wheat germ agglutinin) et par click chemistry que la GK est *O*-GlcNAcylée. De façon plus spécifique, nous avons observé l'augmentation de l'expression de la GK chez des souris ayant reçu des injections de Thiamet G (inhibiteur de l'OGA).
Ensuite, par une approche de siRNA nous avons observé qu'une diminution d'expression d'OGT se répercute sur une baisse des niveaux de *O*-GlcNAcylation et d'expression de la GK par rapport aux cellules contrôles.

## Ces résultats ont fait l'objet de la publication d'un article :

**Baldini, S.F.,** Steenackers, A., Olivier-Van Stichelen, S., Mir, A.-M., Mortuaire, M., Lefebvre, T., and Guinez, C. (2016). Glucokinase expression is regulated by glucose through O-GlcNAc glycosylation. Biochem. Biophys. Res. Commun. *478*, 942-948.

a) Publication

Contents lists available at ScienceDirect

**Biochemical and Biophysical Research Communications** 

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc

## Glucokinase expression is regulated by glucose through O-GlcNAc glycosylation

Steffi F. Baldini, Agata Steenackers, Stéphanie Olivier-Van Stichelen<sup>3</sup>, Anne-Marie Mir, Marlène Mortuaire. Tony Lefebvre<sup>1</sup>, Céline Guinez<sup>\*, 1, 2</sup>

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

### ARTICLE INFO

Article history: Received 21 July 2016 Accepted 8 August 2016 Available online 9 August 2016

Keywords: Glucokinase **O-GlcNAcylation** Liver Mouse siOGT Glucose metabolism

### ABSTRACT

Blood glucose fluctuates with the fasting-feeding cycle. One of the liver's functions is to maintain blood glucose concentrations within a physiological range. Glucokinase (GCK) or hexokinase IV, is the main enzyme that regulates the flux and the use of glucose in the liver leading to a compensation of hyperglycemia. In hepatocytes, GCK catalyzes the phosphorylation of glucose into glucose-6-phosphate. This critical enzymatic reaction is determinant for the metabolism of glucose in the liver which includes glycogen synthesis, glycolysis, lipogenesis and gluconeogenesis. In liver, simultaneous increase of glucose and insulin enhances GCK activity and gene expression, changes its subcellular location and interaction with regulatory proteins. The post-translational O-linked  $\beta$ -N-acetylglucosaminylation (O-GlcNAcylation) acts as a glucose-sensitive modification and is believed to take part in hepatic glucose sensing by modifying key regulatory proteins. Therefore, we aimed to determine whether GCK is modified by O-GlcNAcylation in the liver of mice and investigated the role that this modification plays in regulating GCK protein expression. We demonstrated that endogenous GCK expression correlated with O-GlcNAc levels in the pathophysiological model ob/ob mice. More specifically, in response to the pharmacological inhibition of O-GlcNAcase (OGA) contents of GCK increased. Using the GlcNAc specific lectin succinylated-WGA and click chemistry labeling approaches, we demonstrated that GCK is modified by O-GlcNAcylation. Further, we demonstrated that siRNA-mediated Ogt knock-down not only decreases O-GlcNAc content but also GCK protein level. Altogether, our in vivo and in vitro results demonstrate that GCK expression is regulated by nutrient-sensing O-GlcNAc cycling in liver.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

#### 1. Introduction

Glucose phosphorylation is the initial event in glucose metabolism in all cells and tissue types. In mammalian cells, phosphorylation of glucose in glucose-6-P is catalyzed by hexokinases [1]. The hexokinase IV, commonly called glucokinase or GCK, acts as a glucose sensor in liver and in pancreatic  $\beta$  cells for the maintenance of glucose homeostasis. When glycaemia rises after consumption of carbohydrates GCK reaches its highest activity [2]. As a major regulator of glucose metabolism, GCK deregulation has been associated with development of hyperglycemia in type 2 diabetes. Indeed, Gck mutations either lowering enzyme affinity for glucose or decreasing GCK expression, cause diabetes whereas activating mutations lower blood glucose [3,4]. As a major actor of glucose homeostasis, GCK is currently considered as a strong candidate target for anti-hyperglycemic drugs for type 2 diabetes [5]. Thus, it is critical to fully understand GCK regulations at both the cellular and molecular levels.

Hepatic GCK expression and activity are regulated by both transcriptional and post-transcriptional mechanisms and depend on the fasting and refeeding states of the organism [6]. In contrast to glycolytic genes (L-pyruvate kinase, L-pk) or lipogenic genes (fatty acid synthase, Fas) whose transcription depends on insulin and glucose, Gck transcription is exclusively stimulated by insulin. For example, GCK mRNA and protein levels decrease in liver of insulin-deficient rats and are restored after insulin treatment [7].





<sup>\*</sup> Corresponding author.

E-mail address: celine.guinez@univ-lille1.fr (C. Guinez).

Equally contribute.

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Present address: Univ. Lille, EA4489, Équipe Malnutrition Maternelle et Programmation des Maladies Métaboliques, F 59000, Lille, France.

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Present address: Laboratory of Cellular and Molecular Biology, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, National Institute of Health, Bethesda, MD, 20892, USA.

Moreover, addition of insulin in primary cultures of rat hepatocytes induces *Gck* mRNA in a dose-dependent manner [8]. The insulin effect is mediated by the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/ protein kinase B (PKB or Akt) pathway [9], which triggers SREBP1c binding onto the *Gck* gene promoter. At the post-transcriptional level, the regulation of hepatic GCK involves the interaction with regulatory proteins like the glucokinase regulatory protein, GKRP. At basal glucose concentrations, around 5 mM, GKRP sequesters GCK in the nucleus in an inactive state. Following high glucose exposure (10–30 mM) or fructose (50  $\mu$ M–1 mM), GK is released from GKRP and translocates to the cytoplasm [10].

The post-translational modification O-GlcNAcylation is also dependent upon glucose fluctuations. O-GlcNAcylation has been linked to insulin resistance and glucose toxicity in diabetes and its comorbidities [11]. O-GlcNAcylation is a dynamic modification tightly regulated by the nutritional sensor UDP-GlcNAc levels. This glycosylation consists of the addition of N-acetyl-beta-D-glucosamine through an O-linkage to serine or threonine of numerous nuclear, cytosolic and mitochondrial proteins [12,13]. The reaction is catalyzed by the O-linked N-acetylglucosamine transferase (OGT) and dynamically reversed by the N-acetylglucosaminidase (OGA) [14]. Interestingly, O-GlcNAc is analogous to phosphorylation, with which it can competes for the same or adjacent phosphorylation sites [15]. Identified on over 4000 proteins, O-GlcNAcylation plays a critical role in the regulation of cell cycle progression and proliferation [16,17], stress response [18,19], protein turn over [20] and transcription [21]. Nevertheless. disturbance of O-GlcNAcvlation modification on proteins is implicated in the emergence of several pathologies such as cancer, neurodegenerative diseases and diabetes [22].

In this study, we investigated the nutrient-dependent modification of hepatic glucokinase by O-GlcNAcylation and its role on GCK expression in physiological and pathological conditions (hyperglycemia and insulin resistance). The present study leads to the discovery of a new nutrient-dependent regulation of GCK, improving basic knowledge of this critical glucose homeostasis enzyme, and may be critical to optimize the design of novel molecules for treating type 2 diabetes and other metabolic pathologies.

#### 2. Material and methods

#### 2.1. Ethics statement

Animal use accreditation by the French Ministry of Agriculture (No. 04860) has been granted to our laboratory for experimentation with mice. Experiments were conducted in accordance with the principles of laboratory animal care (European Communities Council Directive of 1986, 86/609/EEC) and received approval from the "Région Nord-Pas de Calais" Ethical Committee for Animal Experimentation. All surgery was performed under ketamine anesthesia, and all efforts were made to minimize suffering.

### 2.2. Animals and treatments

Animals were 8/9-week old male C57BL/6J or ob/ob mice (Charles River). Mice were maintained in a 12 h light/dark cycle with *ad libitum* water and regular diet (SAFE).

For chronic Thiamet-G treatment, mice were intraperitoneally injected daily with Thiamet-G (20 mg kg<sup>-1</sup> in phosphate buffer saline, PBS) or with PBS for control mice during a 15 days period.

One day prior the sacrifice, mice were fasted (24 h) or fasted and refed (24 h/18 h) with regular diet and 20% (w/v) glucose in water. Glycaemia was measured using an Accu-Chek apparatus (Roche). Mice were sacrificed and livers were flash-frozen and stored at -80 °C.

#### 2.3. HepG2 cell culture conditions

HepG2 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (FCS), 2 mM L-glutamine, 5 IU/ml penicillin, and 50  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> streptomycin at 37 °C in a humidified atmosphere enriched with 5% CO<sub>2</sub>. HepG2 cell culture dishes (diameter 100 mm) were preliminarily coated with 0.1% (w/v) porcine gelatin (Sigma-Aldrich). Cells were incubated under low glucose concentrations (5 mM of glucose, G5) for 24 h and NButGT (100  $\mu$ M) was added for the last 18 h.

#### 2.4. Small interfering RNA

HepG2 cells were reverse-transfected for 72 h with RNAiMax according to manufacturer's instructions using 10 nM siRNA targeting *Ogt* [20] or a scrambled control sequence (siCtrl) as previously described [23].

#### 2.5. Liver and cell lysates

Mouse tissues or cells were lysed with radioimmunoproteinassay (RipA) buffer (10 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1% (v/v) Triton X-100, 0.5% (w/v) sodium deoxycholate, 0.1% (w/v) sodium dodecyl sulfate and protease inhibitors, pH 7.4). Cell extracts were then centrifuged at 20,000 g for 10 min at 4 °C). Lysates were used for SDS-PAGE, click chemistry and WGA purification.

#### 2.6. Analysis of mRNA expression by real-time quantitative PCR

Total cellular RNAs were extracted and reverse transcribed. mRNA levels were measured using a Stratagene Cycler. Primers used were: cyclophilin 5'-ATGGCACTGGTGGCAAGTCC-3' (sense), 5'- TTGCCATTCCTGGACCCAAA-3' (antisense); GK 5'- AAGGA-CAGGGACCTGGGTTCCA-3'(sense), 5'- TCACTGGCTGACTTGGCTTG CA-3'(antisense). The quantification gene was corrected to the cyclophilin mRNA values. Levels of expression were quantified by the relative standard curve method.

#### 2.7. Succinyl-WGA purification

For sWGA enrichment, cells were lysed with RIPA buffer and extracts (1 mg of proteins) were incubated with 100  $\mu$ g of sWGA agarose beads (Vector Laboratories) for 2 h at 4 °C. sWGA-bound proteins were collected, washed three times with washing buffer (10 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 0.4% (w/v) sodium deoxycholate, 0.3% (w/v) sodium dodecyl sulfate, 0.2% (v/v) Nonidet P-40, pH 7.5). Proteins were then eluted from the beads in 2X Laemmli buffer and resolved by SDS-PAGE.

## 2.8. O-GlcNAcylated-GCK labeling by click-chemistry and enrichment on avidin beads

O-GlcNAc-bearing proteins from livers of mice receiving PBS or Thiamet-G were labeled by GalNAz and biotin alkyne by using the Click-it O-GlcNAc enzymatic labeling system and the Click-it Glycoprotein detection kit (Biotin alkyne) according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). After labeling [24] the proteins were precipitated using the methanol/chloroform kit protocol and resuspended in 50  $\mu$ l of Tris/HCl, pH 8.0, containing 0.1% (w/v) SDS. 700  $\mu$ l of enrichment buffer (1% (v/v) Triton X-100, 0.1% (w/v) SDS in PBS) were added to the sample before incubating with 50  $\mu$ l of avidin-coupled beads (1 h at 4 °C). The avidin-bound proteins were collected, washed three times with the enrichment buffer and resuspended in Laemmli buffer for Western blot analysis.

#### 944

#### 2.9. Immunoblotting experiments

Whole cell and tissue lysates (50  $\mu$ g) were analyzed using antibodies directed against: rabbit polyclonal anti-GCK (1:2000, Abcam), mouse monoclonal anti-O-GlcNAc (1:2000, VWR), rabbit polyclonal anti-OGT (1:5000, Sigma), rabbit polyclonal anti-GAPDH (1:5000, Abcam) followed by the secondary antibodies: goat antimouse or rabbit IgG HRP (1:10000, GE Healthcare). The detection was carried out with enhanced chemiluminescence (GE Healthcare). Band intensities were quantified by optical densitometry using the free software Image J Tool.

#### 2.10. Statistical analyses

Results are reported as mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software by one-way analysis of variance (ANOVA test). Differences were considered statistically significant at P < 0,05. All *in vitro* experiments were performed on at least three independent occasions and *in vivo* experiments were performed on 4 or 5 animals.

#### 3. Results

## 3.1. Global O-GlcNAcylation increase in fasted ob/ob mice's liver correlates with increased GCK expression

We first examined the impact of nutritional status in vivo on O-GlcNAcvlation and GCK expression using fasted control and *ob/ob* mice. Briefly, control C57BL6 mice were first fasted for 24 h and refed or not for 18 h. Ob/ob mice were fasted for 24 h. Liver protein extracts of control mice vs ob/ob mice were analyzed by Western blot according to the O-GlcNAc content and GCK expression (4 mice/group) (Fig. 1A). Glycaemia of fasted and refed conditions were also measured (Fig. 1B). As expected, fasting (low glycaemia) resulted in low levels of O-GlcNAcylation (Fig. 1A/B), GCK protein and GCK mRNA (Fig. 1A/C) in C57BL6 control mice. Contrarily, refeeding resulted in increasing plasma glucose concentrations and O-GlcNAcylation levels compared to fasted control mice (Fig. 1A/B). As expected, GCK protein level also increased (Fig. 1A) and was associated with elevated mRNA levels (Fig. 1C). In another hand, fasted ob/ob mice had similar O-GlcNAcylation levels than refed C57BL6 control mice (Fig. 1A). Surprisingly, the elevated amount of GCK protein in fasted *ob/ob* mice can not only be attributed to an increase of its mRNA level (Fig. 1C). Consequently, these data suggested that a supplementary mechanism to gene regulation might be responsible for GCK protein increased in fasted ob/ob group and we thought of a post-translational regulation.

## 3.2. Increased O-GlcNAcylation enhances GK protein expression in vivo

In order to evaluate the specific role of *O*-GlcNAcylation on GCK expression, the selective and potent *O*-GlcNAcase inhibitor Thiamet-G (TG), was injected daily to C57BL6 mice for 15 days resulting in a global increase of *O*-GlcNAc levels (Fig. 2A). Control mice were injected with PBS (Fig. 2A). Total liver protein analysis confirmed that *in vivo* inhibition of OGA increased *O*-GlcNAc levels compared to PBS fasted mice (Fig. 2A). While Thiamet-G treatment did not affect plasma glucose concentrations, both *O*-GlcNAc levels and GCK expression were elevated (Fig. 2B). These data were consistent with those collected on *ob/ob* mice, for which elevated levels of *O*-GlcNAc were associated with increased GCK expression without any changes in plasma glucose concentrations. While in refed mice high level of GCK protein could be explained by an increase in *Gck* mRNA levels, elevated GCK in fasted TG group was not

correlated with an elevated transcription (Fig. 2C). Consequently, we might attribute this increase to post-translational regulation.

#### 3.3. GCK is O-GlcNAcylated in the liver of mice

Since TG-treated mice exhibited elevated GCK protein level independently of an increase of transcription, we investigated the potential regulation of GCK by the post-translational modification *O*-GlcNAcylation. Therefore we examined modification of endogenous GCK by *O*-GlcNAcylation. We first observed the binding ability of GCK on succinyl-*Wheat Germ Agglutinin* lectin (sWGA), which binds specifically GlcNAc residues. Specific *O*-GlcNAcylated GCK was successfully detected in liver of refed mice injected with PBS or fasted TG-injected mice (Fig. 2D). *O*-GlcNAcylation of GCK followed the global *O*-GlcNAcylation profile previously observed, *i.e.*, increased in refed mice compared to fasted mice and in fasted TGmice mice compared to C57 fasted mice (Fig. 2A).

Using an alternative enzymatic/chemical approach, we confirmed the *O*-GlcNAcylation modification of GCK in mice liver (Fig. 2E). Briefly total liver proteins were first labeled with GalNAz and then incubated with biotin-alkyne, creating *O*-GlcNAc-GalNAz-biotin proteins. Labeled proteins were enriched on avidin-coupled beads and analyzed by Western blot according to the GCK content. Specificity of the labeling was first controlled using the *O*-GlcNAcylated protein  $\alpha$ -crystallin (Fig. 2E-right panel). As a negative control, labelling was done in refed injected with PBS but without GalNAz. As expected, GCK was detected by Western blot after avidin pull-down in refed and fasted mice with or without TG. Taken together, the Click chemistry and lectin approaches confirmed that GCK was *O*-GlcNAcylated.

#### 3.4. O-GlcNAcylation regulates the stability of glucokinase

As described on many proteins, OGT is able to control protein expression by modifying its targets with GlcNAc residues. To confirm the importance of modulating OGT activity for GK protein expression, Ogt expression was silenced using siRNA in HepG2 cells (Fig. 3). Cells were then cultured in basal glucose concentrations (G5) supplemented or not with the specific OGA inhibitor, NButGT (NBut). Total protein extracts were then analyzed by Western blot for their O-GlcNAc and GK protein contents. The efficiency of Ogt knockdown was validated by the quasi-absence of OGT and the low level of O-GlcNAcylation (Fig. 3). We first observed that NbutGT led to an increase of O-GlcNAcylation levels compare to non-treated conditions (G5). Accordingly, total GCK protein level was also markedly increased compared to G5 conditions, following the O-GlcNAc flux. Importantly, siRNA-mediated Ogt knock-down decreased O-GlcNAc and GCK protein level compared with control.

Altogether, our *in vivo* and *in vitro* experiments demonstrated that GCK expression is regulated by OGT in the liver.

#### 4. Discussion

GCK plays a critical role in glucose homeostasis by mediating efficient hepatic extraction of glucose postprandially. Numerous studies demonstrated that liver GCK exerts dominant control on glycogen synthesis and glycolysis. Overexpression of GCK in hepatocytes increase glycogen synthesis related to an increase in the cellular content of glucose-6-phosphate and allosteric activation of glycogen synthase [25]. GCK overexpression also resulted in stimulation of glycolytic flux [26]. Since type 2 diabetes is associated with an impairment of glycogen synthesis, resulting in a decrease of glucose utilization by the liver, GCK was pointed out in these disorders. Evidence for mutations in GCK gene have been associated A



**Fig. 1.** *O*-GlcNAcylation and GCK levels increased in liver of fasted ob/ob mice. **(A)** Livers from 24 h fasted or 18 h refed (after fasting) C57BL6 control or 24 h fasted *ob/ob* mice were analyzed by Western blot for *O*-GlcNAcylation and GCK protein contents. GAPDH was indicated as a loading control, n = 4 animals/group, representative Western blots are shown. **(B)** Glycaemia (mg.dl<sup>-1</sup>) was measured for the different nutritional states. **(C)** qRT-PCR analyses of GCK of fasted or refed C57BL6 and fasted *ob/ob* mice. For this current and subsequent figures, the P value was determined using a one-way ANOVA test (NS: P > 0.05; \*:P < 0.05; \*:P < 0.01; \*\*\*: P < 0.001 compared to fasted control mice). Results are the mean  $\pm$  S.E., n = 4/group.

with maturity onset diabetes of the young type 2 (MODY2) and overexpression of GCK in diabetic hepatocytes from Zucker diabetic rats improved glucose utilization and storage [27].

In the past years, considerable efforts have been made to understand the molecular mechanisms leading to insulin resistance and its subsequent chronic hyperglycemia and hepatic steatosis. Specifically studies have focused the role of O-GlcNAcylation on several transcription factors implicated in lipogenesis (ChREBP), gluconeogenesis (FOXO1 and TORC2) and insulin signaling (insulin receptor substrate, IRS, glycogen synthase, GS and Akt) (for review [21,28]). Recent studies from our laboratory have shown that the liver fatty acid synthase (FAS) lipogenic enzyme is O-GlcNAcylated providing a new regulatory mechanism for the biosynthesis of lipids in the liver [29]. The current study was undertaken to determine whether O-GlcNAcylation could process on the first regulating enzymes for glucose metabolism, GCK.

Considering obesity predisposition modulation by hepatic glucokinase [30] and the fact that O-GlcNAc is abnormally increased in the cells and tissues of diabetic animals and humans, we undertook the study of O-GlcNAcylation levels and GCK expression in a model of human obesity-associated diabetes, the ob/ob mice. In agreement with previous reports, we found an increase in GCK mRNA and protein expression in refed mice. Indeed liver GCK gene expression depends on the fasting refeeding states through insulin which is considered as the primary up-regulator for GCK transcription [31]. Concomitantly an increase in hepatic glucose flux used up to 2 to 3% by the hexosamine biosynthesis pathway lead to increased levels of overall O-GlcNAcylation. The finding of an increased level of Gck mRNA in livers of ob/ob strengthens the observation of Schimomura et al. [32]. Since GCK protein increase is partly explained by a transcriptional mechanism and GCK protein expression is correlated to high O-GlcNAc level, we

А



**Fig. 2.** *In vivo* OGA inhibition increases the level of GCK which is 0-GlcNAcylated in liver. **(A)** Livers were analyzed by Western blot for their 0-GlcNAcylation and GCK protein contents. GAPDH was indicated as a loading control, n = 5 animals/group. **(B)** Glycaemia (mg/dl) were measured **(C)** qRT-PCR analyses of *Gck* mRNA levels. Results are the mean  $\pm$  S.E., n = 5/group. **(D)** 0-GlcNAcylated forms of GCK obtained by incubation with succinyl-WGA agarose. Whole cell extracts (50 µg) and bound proteins were analyzed by Western blot with GCK antibodies. **(E)** 0-GlcNAcylated proteins of liver lysates were labelled using the Click-it 0-GlcNAc enzymatic labeling system and the Click-it glycoprotein detection kit. Labeled proteins were then enriched on avidin beads and bound proteins were analyzed by Western blot.  $\alpha$ -Crystallin was used as a positive control.



**Fig. 3.** Interfering with OGT expression leads to a decrease of GCK protein content in HepG2 cells. HepG2 cells were reverse-transfected for 72 h with siRNA targeting OGT or a scrambled control sequence (siCtrl). Cells were incubated for 24 h under basal glucose concentrations (G5) supplemented or not with 100  $\mu$ M of NbutGT for the last 18 hours. Left panel: Representative Western blots of *O*-GlcNAcylated proteins and total OGT and GCK protein are shown. *n* = 3 independent cultures. Right panel: Quantification of total GCK expression in siCtrl or siOGT conditions. Data are means ± SEM. *n* = 3 independent experiments.

focused on the role of this post-translational modification on GCK protein expression. In order to determinate whether *O*-GlcNAc could impact on GCK expression, we used a potent OGA inhibitor, Thiamet-G, to increase *O*-GlcNAc content in liver of fasted mice. Increasing *O*-GlcNAcylation level also increases GCK protein level in fasted condition. This observation suggests that *O*-GlcNAcylation itself is able to increase GCK protein content independently of glucose input. We also demonstrated that GCK is modified in liver by *O*-GlcNAcylation directly after glucose input. Therefore, we suggest that *O*-GlcNAc cycling on GCK is a novel way to regulate GCK expression and increase glucose entry into liver cells. Moreover, in both experiments, increase of GCK protein level is not

correlated to gene upregulation suggesting that GCK may be stabilized by *O*-GlcNAcylation. To finally confirm this statement, we knock-down *Ogt* and confirmed that increased GCK content is dependent of OGT presence and activity. Taken together, this study proposes a new pathway of short-term regulation of GCK in response to glucose (Fig. 4). Indeed, until now, the well-described GCK regulation involved two mechanisms. The long-term regulation promotes GCK transcription and translation following glucose input and insulin-dependent stimulation. The short-term regulation is faster and regulated by binding of regulatory proteins. Importantly, interaction with the nuclear regulatory protein, GKRP is constitutive in low glucose whereas glucose input dissociates the



Fig. 4. Liver regulation of GCK. 2–3% of glucose input in liver is used to 0-GlcNAcylate proteins, such as GCK. 0-GlcNAc cycling onto GCK leads to the stabilization of the protein. Glucose induces the dissociation of the GKRP/GCK complex, leading to the release and translocation of GCK into the cytoplasm. Both mechanisms are responsible for short term GCK activation. As a long term dependent mechanism, insulin promotes GCK transcription.

complex, allowing GCK to translocate into the cytoplasm where its activity is carried. So this study reveals a new short term regulation of GCK expression through *O*-GlcNAc pathway. All regulatory process aims to metabolize quickly and efficiently glucose input.

In conclusion, we provided the first evidence of a modification and regulation of GCK by O-GlcNAc modification that until now was not explored. This discovery provides important clues in the prevention of hyperglycemia and development of novel therapeutic drugs to treat type 2 diabetes.

#### Acknowledgments

We are indebted to the Research Federation FRABio (Univ. Lille, CNRS, FR 3688, FRABio, Biochimie Structurale et Fonctionnelle des Assemblages Biomoléculaires) for providing the scientific and technical environment conducive to achieving this work. We would like to thank Pr. D. Vocadlo (Simon Fraser University) who provided us NButGT. SB is a recipient of a fellowship from the "gs2:Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche"and from the "Région Nord-Pas de Calais".

#### **Transparency document**

Transparency document related to this article can be found online at http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.08.056.

#### References

- [1] M.L. Cardenas, A. Cornish-Bowden, T. Ureta, Evolution and regulatory role of the hexokinases, Biochim. Biophys. Acta 1401 (1998) 242–264.
- [2] P.B. lynedjian, Molecular physiology of mammalian glucokinase, Cell Mol. Life Sci. 66 (1) (2009) 27–42. Review.
- [3] A.L. Gloyn, S. Odili, D. Zelent, C. Buettger, H.A. Castleden, A.M. Steele, A. Stride, C. Shiota, M.A. Magnuson, et al., Insights into the structure and regulation of glucokinase from a novel mutation (V62M), which causes maturity-onset diabetes of the young, J. Biol. Chem. 280 (14) (2005) 14105–14113.
- [4] A.L. Gloyn, K. Noordam, M.A.A.P. Willemsen, S. Ellard, W.W.K. Lam, I.W. Campbell, et al., Insights into the biochemical and genetic basis of glucokinase activation from naturally occurring hypoglycemia mutations, Diabetes 52 (2003) 2433–2440.
- [5] F.M. Matschinsky, Bogumil Zelent, Nicolai Doliba, Changhong Li, Jane M. Vanderkooi, Ali Naji, Ramakanth Sarabu, Joseph Grimsby, Glucokinase activators for diabetes therapy, Diabetes care 34 (2) (2011).
- [6] M.L. Massa, J.J. Gagliardino, F. Francini, Liver glucokinase: an overview on the regulatory mechanisms of its activity, IUBMB Life 63 (1) (2011) 1–6. Review.
- [7] P.B. Iynedjian, A. Gjinovci, A.E. Renold, Stimulation by insulin of glucokinase gene transcription in liver of diabetic rats, J. Biol. Chem. 263 (1988) 740–744.
- [8] M.R. Narkewicz, P.B. lynedjian, P. Ferre, J. Girard, Insulin and tri-iodothyronine induce glucokinase mRNA in primary cultures of neonatal rat hepatocytes, Biochem. J. 271 (3) (1990) 585–589.
- [9] U. Roth, K. Curth, T.G. Unterman, T. Kietzmann, The transcription factors HIF-1 and HNF-4 and the coactivator p300 are involved in insulin-regulated glucokinase gene expression via the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway, J. Biol. Chem. 279 (4) (2004) 2623–2631.
- [10] D. Farrelly, K.S. Brown, A. Tieman, J. Ren, S.A. Lira, D. Hagan, R. Gregg, K.A. Mookhtiar, N. Hariharan, Mice mutant for glucokinase regulatory protein exhibit decreased liver glucokinase: a sequestration mechanism in metabolic regulation, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96 (25) (1999) 14511–14516.
- [11] J. Ma, G.W. Hart, Protein O-GlcNAcylation in diabetes and diabetic complications, Expert Rev. Proteom. 10 (4) (2013) 365–380.
- [12] G.W. Hart, M.P. Housley, C. Slawson, Cycling of O-linked beta-Nacetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins, Nature 446 (7139) (2007)

1017-1022, 2007.

- [13] Y. Hu, J. Suarez, E. Fricovsky, H. Wang, et al., Increased enzymatic O-GlcNAcylation of mitochondrial proteins impairs mitochondrial function in cardiac myocytes exposed to high glucose, J. Biol. Chem. 284 (1) (2009) 547–555.
- [14] D.J. Vocadlo, O-GlcNAc processing enzymes: catalytic mechanisms, substrate specificity, and enzyme regulation, Curr. Opin. Chem. Biol. 16 (5–6) (2012) 488–497.
- [15] G.W. Hart, C. Slawson, G. Ramirez-Correa, O. Lagerlof, Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease, Annu. Rev. Biochem. 80 (2011) 825–858. Review.
- [16] L. Drougat, S. Olivier-Van Stichelen, M. Mortuaire, F. Foulquier, A.S. Lacoste, J.C. Michalski, T. Lefebvre, Characterization of O-GlcNAc cycling and proteomic identification of differentially O-GlcNAcylated proteins during g1/s transition, Biochim. Biophys. Acta 1820 (2012) 1839–1848.
- [17] S.F. Baldini, T. Lefebvre, O-GlcNAcylation and the metabolic shift in highproliferating cells: all the evidence suggests that sugars dictate the flux of lipid biogenesis in tumor processes, Front. Oncol. 6 (2016 Jan 22) 6, http:// dx.doi.org/10.3389/fonc.2016.00006 eCollection 2016.
- [18] C. Guinez, A.M. Mir, Y. Leroy, R. Cacan, J.C. Michalski, T. Lefebvre, Hsp70-GlcNAc-binding activity is released by stress, proteasome inhibition, and protein misfolding, Biochem. Biophys. Res. Commun. 361 (2007) 414–420.
  [19] C. Guinez, M.E. Losfeld, R. Cacan, J.C. Michalski, T. Lefebvre, Modulation of
- [19] C. Guinez, M.E. Losfeld, R. Cacan, J.C. Michalski, T. Lefebvre, Modulation of HSP70 GlcNAc-directed lectin activity by glucose availability and utilization, Glycobiology 16 (2006) 22–28.
- [20] C. Guinez, A.M. Mir, Y. Leroy, R. Cacan, A. Harduin-Lepers, J.C. Michalski, T. Lefebvre, Protein ubiquitination is modulated by O-GlcNAc glycosylation, FASEB J. 22 (2008) 2901–2911.
- [21] S. Ozcan, S.S. Andrali, J.E. Cantrell, Modulation of transcription factor function by O-GlcNAc modification, Biochim. Biophys. Acta 1799 (5–6) (2010) 353–364. Review.
- [22] S. Hardivillé, G.W. Hart, Nutrient regulation of signaling, transcription, and cell physiology by O-GlcNAcylation, Cell Metab. 20 (2) (2014) 208–213.
- [23] S. Olivier-Van Stichelen, C. Guinez, A.M. Mir, Y. Perez-Cervera, C. Liu, J.C. Michalski, T. Lefebvre, The hexosamine biosynthetic pathway and O-GlcNAcylation drive the expression of β-catenin and cell proliferation, Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 302 (4) (2012) E417–E424.
- [24] V. Dehennaut, M.C. Slomianny, A. Page, A.S. Vercoutter-Edouart, et al., Identification of structural and functional O-linked N-acetylglucosamine-bearing proteins in Xenopus laevis oocyte, Mol. Cell Proteom. 7 (11) (2008) 2229–2245.
- [25] J. Seoane, A.M. Gómez-Foix, R.M. O'Doherty, C. Gómez-Ara, C.B. Newgard, J.J. Guinovart, Glucose 6-phosphate produced by glucokinase, but not hexokinase I, promotes the activation of hepatic glycogen synthase, J. Biol. Chem. 271 (39) (1996 Sep 27) 23756–23760.
- [26] R.M. O'Doherty, D.L. Lehman, J. Seoane, A.M. Gómez-Foix, J.J. Guinovart, C.B. Newgard, Differential metabolic effects of adenovirus-mediated glucokinase and hexokinase I overexpression in rat primary hepatocytes, J. Biol. Chem. 271 (34) (1996 Aug 23) 20524–20530.
- [27] J. Seoane, A. Barberà, S. Télémaque-Potts, C.B. Newgard, J.J. Guinovart, Glucokinase overexpression restores glucose utilization and storage in cultured hepatocytes from male Zucker diabetic fatty rats, J. Biol. Chem. 274 (45) (1999 Nov 5) 31833–31838.
- [28] K. Zhang, R. Yin, X. Yang, O-GlcNAc: a bittersweet switch in liver, Front. Endocrinol. (Lausanne) 5 (2014 Dec 17) 221, http://dx.doi.org/10.3389/ fendo.2014.00221 eCollection 2014.
- [29] S.F. Baldini, C. Wavelet, I. Hainault, C. Guinez, T. Lefebvre, The nutrientdependent O-GIcNAc modification controls the expression of liver Fatty Acid Synthase, J. Mol. Biol. (2016 May 13) pii: S0022-2836(16)30149-8. http:// dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2016.04.035.
- [30] S. Tsukita, T. Yamada, K. Uno, K. Takahashi, K. Kaneko, Y. Ishigaki, J. Imai, Y. Hasegawa, S. Sawada, H. Ishihara, Y. Oka, H. Katagiri, Hepatic glucokinase modulates obesity predisposition by regulating BAT thermogenesis via neural signals, Cell Metab. 16 (6) (2012 Dec 5) 825–832, http://dx.doi.org/10.1016/ j.cmet.2012.11.006.
- [31] P.B. lynedjian, Mammalian glucokinase and its gene, Biochem. J. 293 (Pt 1) (1993 Jul 1) 1–13. Review.
- [32] I. Shimomura, M. Matsuda, R.E. Hammer, Y. Bashmakov, M.S. Brown, J.L. Goldstein, Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice, Mol. Cell. 6 (1) (2000 Jul) 77–86.

Tableau 1 : Dilutions respectives des différents anticorps utilisés.

Anticorps primaires (Ac)	Dilution de l'Ac I <sup>aire</sup>	Origine de l'Ac I <sup>aire</sup>	Dilution de l'Ac Il <sup>aire</sup>
Anti-GKRP (santa-cruz)	1/2000	Polyclonal	1/10 000
Anti-GK (santa-cruz)	1/1000	Polyclonal	1/10 000
Anti-GAPDH (Abcam)	1/5000	Polyclonal	1/10 000
Anti-CD147 (santa- cruz)	1/2000	Polyclonal	1/10 000
Anti-H2B	1/3000	Polyclonal	1/10 000

## b) Résultats supplémentaires

## 1) <u>Matériels et méthodes spécifiques aux résultats</u> supplémentaires

## (a) Conditions de culture des cellules HepG2

Les cellules HepG2 ont été cultivées comme explicité dans la publication et ont été incubées 24 h en présence d'une concentration physiologique de glucose (5 mM de glucose, G5) ou en forte concentration en glucose (25 mM de glucose, G25). De l'insuline (100 nM) ou du Thiamet G (1 µM) ont été ajoutés les dernières 18 h.

## (b) Fractionnement subcellulaire

Les cellules HepG2 ont été fractionnées grâce au kit Subcellular Proteome Extraction kit (Calbiochem, Darmstadt, Germany) selon les instructions du manuel.

## (c) SDS-PAGE, Western Blot

A l'issue de l'extraction, les protéines ont été dosées grâce au kit BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL, USA) selon les recommandations du fabricant puis les échantillons ont été analysés pas Western-Blot dans des conditions réductrices. Les membranes ont été incubées avec les anticorps primaires (Tableau 1) une nuit à 4°C dans la solution de saturation. Elles ont ensuite été lavées au TBS-Tween puis incubées avec l'anticorps secondaire anti-souris ou antilapin couplé à la peroxidase pendant 1 h dans la solution de saturation (Tableau 1). Les membranes ont été à nouveau lavées au TBS-Tween. La révélation a été effectuée par chimioluminescence avec une solution d'ECL (Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate).



**Figure 40** : Localisation subcellulaire de la GK et de la GKRP dans différentes conditions de *O*-GlcNAcylation.

Les cellules HepG2 sont cultivées dans du milieu contenant 5 mM de glucose (G5) ou 25 mM de glucose et 400 nM d'insuline (G25i). Les niveaux de *O*-GlcNAcylation ont été modulés par l'utilisation de ThiametG (TG) à 100  $\mu$ M. Le fractionnement cellulaire a été réalisé afin de séparer les fractions nucléaires (N), cytoplasmiques (C) et membranaires (M). Le profil d'expression de la GKRP, GK, GAPDH, CD147 et H2B a été réalisé par WB.

<u>Abréviations</u>: G5 : 5 Mm de glucose, G25i : 25 Mm de glucose plus de l'insuline, GKRP : glucokinase regulatory protein, GK : glucokinase, H2B : histone 2B, CD147 : cluster of differentiation 147, GAPDH : glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase, TG : thiametG.

## 2) <u>Résultats préliminaires</u>

(a) Rôle de la O-GlcNAcylation sur la localisation de la GK et de la GKRP

L'activité de la GK est surtout régulée par sa localisation cellulaire. A jeun, le glucagon induit la séquestration nucléaire de la GK par la protéine régulatrice, GKRP. Au contraire, en période post-prandiale, la GK est relarguée dans le cytoplasme et phosphoryle le glucose.

Afin de vérifier si la localisation subcellulaire de la GK et de la GKRP est *O*-GlcNAc dépendante, des expériences de fractionnements cellulaires ont été réalisées dans des conditions variables de niveaux de *O*-GlcNAcylation (Figure 40).

Des cellules HepG2 ont été traitées soit en condition physiologique de glucose (5 mM) supplémenté ou non de Thiamet G (TG) (inhibiteur de l'OGA) soit en fortes concentrations en glucose (25 mM) plus insuline (G25i). Un fractionnement subcellulaire a été réalisé afin de séparer les fractions nucléaires, cytoplasmiques et membranaires.

On remarque que la GK et la GKRP sont présentes au niveau du noyau en condition G5 mais pas en condition G25i. En effet, de fortes concentrations en glucose et insuline induisent la dissociation du complexe GK/GKRP et les protéines sont transportées dans le cytoplasme de manière préférentielle. De plus, l'augmentation des niveaux de *O*-GlcNAcylation semble empêcher la translocation au noyau des deux protéines (Figure 40). Le profil d'expression de la GAPDH (glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase), de CD147 (cluster of differentiation 147) et de l'histone H2B permet de vérifier la purification respectivement de la fraction cytoplasmique, membranaire et nucléaire.

# (b) Position des sites potentiels de O-GlcNAcylation sur la structure tridimensionnelle du complexe GK/GKRP

Les sites potentiels de *O*-GlcNAcylation présents sur la GK sont déterminés grâce aux logiciels prédictifs de sites de *O*-GlcNAcylation, YinOYang et dbOGAP. La sérine en position 308 est retrouvée comme étant potentiellement *O*-GlcNAcylée sur les deux logiciels. En collaboration avec le Pr Gérard Vergotten, des études *in silico* par modélisation moléculaire ont décrit la présence de cette sérine dans le domaine d'interaction entre la GK et la GKRP.

176



**Figure 41** : Modélisation moléculaire représentant la position du site potentiellement *O*-GlcNAcylé sur la structure tridimensionnelle du complexe GK/GKRP.

La sérine 308 potentiellement *O*-GlcNAcylée est retrouvée dans le domaine d'interaction entre la GK et la GKRP. La *O*-GlcNAcylation de ce site pourrait moduler l'interaction entre les deux protéines.

La *O*-GlcNAcylation potentielle de ce site pourrait empêcher l'interaction entre les deux protéines. Il serait intéressant de réaliser une mutation de ce site et d'étudier la *O*-GlcNAcylation et la localisation de la GK dans les cellules présentant la mutation et également l'interaction entre la GK et la GKRP (Figure 41).

## 3. <u>Conclusion/Discussion</u>

La GK joue un rôle majeur dans l'homéostasie glucidique puisqu'elle intervient dans la première étape du métabolisme du glucose. Elle piège le glucose dans le cytoplasme en le phosphorylant en G6P. De plus, le G6P est au carrefour de nombreuses voies métaboliques : la glycolyse, la glycogénogenèse, la voies de pentose phosphates mais également la voie de biosynthèse des hexosamines, conduisant à la *O*-GlcNAcylation des protéines.

En effet, la surexpression de la GK induit une augmentation de la glycogénogenèse et de la glycolyse (O'Doherty et al., 1996; Seoane et al., 1996).

La dérégulation de la GK est impliquée dans le développement du diabète de type 2. Une mutation dans le gène de la GK est associée au MODY (maturity onset diabetes of the young). Ainsi, la compréhension des mécanismes régulant son activité est primordiale.

Etant donné que chez les personnes diabétiques et atteintes d'obésité la dérégulation de la GK et des niveaux de *O*-GlcNAcylation sont deux phénomènes majeurs, nous avons évalué le rôle de la *O*-GlcNAcylation sur l'expression de la GK.

Premièrement, nous avons étudié les niveaux de *O*-GlcNAcylation et d'expression de la GK dans un modèle pathologique : les souris ob/ob. Comme attendu, l'augmentation de la GK (au niveau ARNm et protéique) est observée chez les souris renourries par rapport aux souris à jeun. En effet, la transcription de la GK est stimulée par l'insuline. Cependant, à jeun, l'augmentation de l'expression de la GK ne peut pas être expliquée à elle seule par l'augmentation de sa transcription. Au vu de la corrélation entre les niveaux de *O*-GlcNAcylation et d'expression de la GK, nous nous sommes intéressés au rôle de cette modification sur l'expression de la GK.

Pour se faire, nous avons étudié un modèle *in vivo* dans lequel seuls les niveaux de *O*-GlcNAcylation varient. Des souris C57Bl6 ont été injectées au Thiamet-G (inhibiteur de l'OGA) quotidiennement pendant 15 jours.

178

A jeun, l'augmentation de l'expression de la GK chez les souris présentant une inhibition de l'OGA par rapport aux souris contrôles indépendamment de sa transcription suggère que la *O*-GlcNAcylation joue un rôle non négligeable sur l'expression de la GK. Ainsi, nous avons démontré que la GK est *O*-GlcNAcylée.

La suite était de montrer le rôle de la *O*-GlcNAcylation sur l'expression de la GK. Pour vérifier cette hypothèse, la délétion de l'OGT a été réalisée dans des cellules hépatiques et on observe que l'augmentation de l'expression de la GK est OGT-dépendante.

Par conséquent, grâce à cette étude, nous proposons un nouveau mode de régulation de la GK en réponse au glucose. Jusqu'à présent, la régulation de la GK était connue comme étant principalement transcriptionnelle. Une régulation à plus court terme s'effectue par la formation d'un complexe entre la GK et sa protéine régulatrice, la GKRP.

Ici, un nouveau mode de régulation à court terme de l'expression de la GK est décrit à travers sa modification post-traductionnelle par *O*-GlcNAcylation. Tous ces processus de régulation ont pour but de métaboliser rapidement et efficacement le glucose dès son entrée dans la cellule.

Cette nouvelle régulation complémente les connaissances précédentes sur la régulation de la GK nécessaire à la prévention de l'hyperglycémie et au développement de nouvelles drogues thérapeutiques pour traiter le diabète de type 2.

## B. La Fatty Acid Synthase

## 1. Introduction

Les acides gras jouent tout un ensemble de fonctions dans l'organisme. Ils entrent dans la composition des membranes biologiques et de toute sorte de molécules (eicosanoïdes et sphingosine), participent à la bonne transduction des signaux, et permettent le stockage du glucose en excès. Les acides gras peuvent provenir de l'alimentation, de la lipolyse du tissu adipeux mais également de la lipogenèse. La lipogenèse exacerbée peut entraîner une accumulation anormale d'acides gras hépatiques pouvant conduire à la stéatose hépatique. La stéatose hépatique peut dans un tiers des cas évoluer en cirrhose ou en hépatocarcinome (cf partie IV page 120).

Contrairement à sa modification post-traductionnelle, la régulation transcriptionnelle de la FAS est bien connue. Dans cette partie de ma thèse, nous avons vérifié si la FAS était régulée de façon post-traductionnelle par *O*-GlcNAcylation et si les niveaux de *O*-GlcNAcylation dans des conditions physiopathologiques (obésité ou régime riche en sucres) modifient l'expression de la FAS.

## Ces résultats ont fait l'objet d'une publication d'un article dans Journal of Molecular Biology :

**Baldini, S.F.**, Wavelet, C., Hainault, I., Guinez, C., and Lefebvre, T. (2016). The Nutrient-Dependent O-GlcNAc Modification Controls the Expression of Liver Fatty Acid Synthase. J. Mol. Biol. *428*, 3295-3304.

## 2. <u>Résultats</u>

a) Publication



## The Nutrient-Dependent *O*-GlcNAc Modification Controls the Expression of Liver Fatty Acid Synthase

# Steffi F. Baldini<sup>1</sup>, Cindy Wavelet<sup>1</sup>, Isabelle Hainault<sup>2</sup>, Céline Guinez<sup>3,†</sup> and Tony Lefebvre<sup>1†</sup>

 Univ. Lille, CNRS, UMR 8576, UGSF, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, 59000 Lille, France
 Institute of Cardiometabolism and Nutrition, Université Pierre et Marie Curie, INSERM, UMR\_S1138, Centre de Recherche des Cordeliers, 75006 Paris, France

3 - Univ. Lille, EA4489, Environnement Périnatal et Croissance, Equipe dénutritions maternelles périnatales, 59000 Lille, France

Correspondence to Tony Lefebvre: tony.lefebvre@univ-lille1.fr http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2016.04.035 Edited by W Hart Gerald

## Abstract

Liver Fatty Acid Synthase (FAS) is pivotal for *de novo* lipogenesis. Loss of control of this metabolic pathway contributes to the development of liver pathologies ranging from steatosis to nonalcoholic steatohepatitis (NASH) which can lead to cirrhosis and, less frequently, to hepatocellular carcinoma. Therefore, deciphering the molecular mechanisms governing the expression and function of key enzymes such as FAS is crucial. Herein, we link the availability of this lipogenic enzyme to the nutrient-dependent post-translational modification O-GlcNAc that is thought to be deregulated in metabolic diseases (diabetes, obesity, and metabolic syndrome). We demonstrate that expression and activity of liver FAS correlate with O-GlcNAcylation contents in ob/ob mice and in mice fed with a high-carbohydrate diet both in a transcription-dependent and -independent manner. More importantly, inhibiting the removal of O-GlcNAc residues in mice intraperitoneally injected with the selective and potent O-GlcNAcase (OGA) inhibitor Thiamet-G increases FAS expression. FAS and O-GlcNAc transferase (OGT) physically interact, and FAS is O-GlcNAc modified. Treatment of a liver cell line with drugs or nutrients that elevate the O-GlcNAcylation interferes with FAS expression. Inhibition of OGA increases the interaction between FAS and the deubiquitinase Ubiquitin-specific protease-2a (USP2A) in vivo and ex vivo, providing mechanistic insights into the control of FAS expression through O-GlcNAcylation. Together, these results reveal a new type of regulation of FAS, linked to O-GlcNAcylation status, and advance our knowledge on deregulation of lipogenesis in diverse forms of liver diseases.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Fatty acids have a large range of functions in all living beings. In animals, they are major components of biological membranes, govern essential biological functions including signal transduction and cell signaling, and are the major form of energy storage [1]. Fatty acids are provided either by diet or *de novo* synthesis called lipogenesis. Following a highcarbohydrate diet (HCD), the rate of lipogenesis in liver is increased by a rate of five- to sixfold and contributes to hypertriglyceridemia [2]. The accumulation of triglycerides in the liver can be associated with insulin resistance, obesity, and type 2 diabetes, and it also leads to nonalcoholic fatty acid liver disease (NAFLD), the most common form of chronic liver disease of which nonalcoholic steatohepatitis (NASH) is the most severe form. Moreover, NASH is a potential starting point to cirrhosis and hepatocellular carcinoma.

Lipogenesis plays a predominant role in the development of fatty liver as it contributes to up to one quarter of triglycerides storage in the liver of obese patients with NAFLD [3].

Glucose, the main substrate of lipogenesis, is metabolized into pyruvate, the end product of glycolysis that enters the mitochondria to be activated into acetyl-CoA. Acetyl-CoA is then released into the cytosol via the Lardy cycle, and lipogenesis takes place, driven by three enzymes, acetyl-CoA carboxylase (ACC), fatty acid synthase (FAS), and stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1). Acetyl-CoA and the product of its carboxylation, malonyl-CoA, are the substrates of FAS that generates palmitoyl-CoA (C16:0) through the oxidation of NADPH provided by the pentose phosphate pathway and the Lardy cycle. Longer fatty acids (e.g., stearic acid, C18:0, arachidic acid, C20:0, behenic acid, C22:0) are produced by elongases. SCD1 allows the desaturation of palmitoic acid into palmitoleoyl-CoA (C16:1) and stearic acid into oleoyl-CoA (C18:1). Then, fatty acids are esterified into triglycerides, the main form of lipid storage. Also, it has been estimated that a small fraction of glucose entering the cell is metabolized via the hexosamine biosynthesis pathway (HBP) to produce UDP-GlcNAc [4,5]. UDP-GlcNAc participates in the biosynthesis of almost all glycosylation types including O-GlcNAcylation [5,6]. O-GlcNAcylation is a highly

dynamic post-translational modification (PTM) controlled by two antagonistic enzymes: *O*-GlcNAc transferase (OGT) that transfers the GlcNAc group onto serine or threonine residues of nucleocytoplasmic [7] and mitochondrial proteins [8], and *O*-GlcNAcase (OGA), which removes the sugar moiety [9]. Thus, *O*-GlcNAcylation regulates diverse biological processes in a nutrient-dependent manner [5], and a deregulation of this PTM homeostasis leads to metabolic disorders such as diabetes and obesity [10–12].

We therefore hypothesized that FAS, lipogenesis, and *O*-GlcNAcylation were all upregulated in the model of obese mice ob/ob. To test our hypothesis, we started by comparing the expression of FAS and the levels of *O*-GlcNAcylation in livers of ob/ob and C57BL/6 mice (Fig. 1a). Ob/ob and C57BL/6 mice

Fig. 1. FAS and O-GIcNAcylation levels are elevated in ob/ob mice, in mice fed an HCD and in mice injected with Thiamet-G. Male C57BL/6 J and ob/ob mice were purchased from elevage Charles River (Saint-Germain sur l'Arbresle). Mice were maintained in a 12 h light/dark cycle and adapted to the environment for 1 week before the study. Procedures were carried out according to the French guidelines for the care of experimental animals. (a-c) Livers from C57BL/6 J and ob/ob mice were collected, washed in cold-PBS (phosphate-buffered saline), and homogenized in 1 ml of lysis buffer 1 [10 mM Tris/HCI, 150 mM NaCI, 1% Triton X-100 (vol/vol), 0.5% sodium deoxycholate (wt/vol), 0.1% sodium dodecyl sulfate (wt/vol), and proteases inhibitors (pH 7.4)]. (a) Under reducing conditions, 50 µg of proteins were resolved by 6 or 10% SDS-PAGE and electroblotted onto nitrocellulose sheets (GE Healthcare). Equal loading and transfer efficiency were checked by Ponceau red staining. Membranes were saturated for 45 min with 5% (wt/vol) nonfatty acid milk in Tris-buffered saline (TBS)-Tween buffer [15 mM Tris/HCI, 140 mM NaCI, and 0.05% Tween20 (vol/vol) (pH 8.0)]. Membranes were incubated with the different antibodies overnight at 4 °C: mouse monoclonal anti-O-GlcNAc (RL2, VWR) and rabbit polyclonal anti-FAS (from the UMR\_S1138, INSERM) were used at a dilution of 1:3000, and rabbit polyclonal anti-GAPDH (Abcam) was used at a dilution of 1:5000. Membranes were then washed three times with TBS-Tween for 10 min and incubated with either an anti-rabbit or an anti-mouse horseradish peroxidase-labeled secondary antibody at a dilution of 1:10,000 for 1 h. Finally, three washes of 10 min each were performed with TBS-Tween, and the detection was carried out by chemiluminescence imaging (Fusion Solo system, Vilber Lourmat). The average ratios ± S.D. of FAS/ GAPDH and O-GlcNAc/GAPDH are represented as histograms. (b) FAS catalytic activity was measured as follows: 30 mg of mice liver were lysed in a buffer containing 10 mM Tris, 1 mM EDTA, and 250 mM sucrose (pH 7.4) and centrifuged at 150.000 g for 5 min. FAS activity was assessed at 340 nm at 37 °C. Then, 2.5 µl of samples were added at 125 µl of buffer A [0.1 M K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1 mM NADPH and 25 µM acetylCoA (pH 6.5)]. Reaction was stabilized for 15 min at 37 °C. NAPDH oxidation was followed for 15 min after the addition of 25 µl of buffer B [K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 M and 60 µM malonylCoA (pH 6.5)]. A correlation between FAS expression and oxidation of NADPH is shown at the right as a trend line. (c) Quantification of the mRNA encoding FAS was performed by quantitative PCR (gPCR). Total RNA was isolated from liver of mice using the NucleoSpin\_RNA II extraction kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). For cDNA synthesis, RNA was subjected to reverse transcription in the presence of a 1:1 ratio of oligo-dT and hexameric random primer (Maxima First Strand cDna Synthesis Kit for RT-gPCR, Thermo Scientific) in a final volume of 20 µL according to the manufacturer's instructions. The transcripts of FAS were analyzed by gPCR using the Mx3005p Quantitative System (Stratagene, La Jolla, CA, USA). PCR reaction (25 µL) contained 12.5 µL of the 2X Brilliant SYBR Green qPCR Mastermix (Thermo Fischer Scientific, Rockford, USA), 300 nM of primers, and 4 µL of cDNA. DNA amplification was performed using the following primers: FAS forward (5'-TTGCCATTCCTGGACCCAAA-3') and FAS reverse (5'- TCGAAGGCTACACAAGCTCCAAAAGAATA-3'). Cyclophilin gene was used to normalize the expression of FAS gene using the following primers: cyclophilin forward (5'-ATGGCACTGGTGGCAAGTCC-3') and cyclophilin reverse (5'- TTGCCATTCCTGGACCCAAA-3'). PCR conditions were as follows: 95 °C for 30 s, 58 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s (40 cycles). The analysis of amplification was performed using the Mx3005p software. Experiments were performed in triplicate using five different biological samples. (d-f) Mice were placed with SD (65% carbohydrate, 11% fat, and 24% protein) or HCD [75% carbohydrate, 3% fat, and 22% protein, (SAFE)] for 12 weeks. At the end of the experiment, mice were either fasted for 24 h or refed with the appropriate diet for 18 h (after the fasted period). (d) Livers were collected and analyzed by Western blot according to the expression of FAS and the O-GIcNAcylation levels. Equal loading was checked by using an anti-GAPDH. (e) FAS catalytic activities were measured, the correlation between FAS activity and ratios of FAS/GAPDH expression were represented, and (f) the mRNA levels were quantified by RT-qPCR. (g-i) Mice were intraperitoneally injected daily with Thiamet-G (Sigma-Aldrich, 20 mg/kg/d in PBS) or with PBS during a 15-day period. At the end of the experiment, mice were either fasted for 24 h or refed for 18 h (after the fasted period). (g) Livers were collected and analyzed by Western blot according to the expression of FAS and to the O-GlcNAcylation levels. Equal loading was checked by using an anti-GAPDH. (h) FAS catalytic activities were measured, the correlation between FAS activity and ratios of FAS/GAPDH expression were represented, and (i) the mRNA levels were quantified by RT-qPCR. Student's t test (Excel) was used for statistical analysis; p values were calculated and reported accordingly (\*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001).





IP IgG

нср

170 100

qo/qo

170 130-

were fasted for 24 h before the livers were collected and analyzed by Western blot (Fig. 1a). We observed that ob/ob mice expressed higher levels of O-GlcNAcylation and FAS compared to C57BL/6, in correlation with an increased catalytic activity of the lipogenic enzyme (Fig. 1b). RT-gPCR showed that the transcript levels of FAS were significantly higher in ob/ ob mice (Fig. 1c), indicating that overexpression of FAS in ob/ob is principally due to an elevation of its transcription rate. This is in agreement with several previous reports, which show that transcription factors governing FAS transcription are under the control of O-GlcNAcylation [13-22]. Carbohydrate-responsive element-binding protein (ChREBP) mediates glucose-induced gene expression including the lipogenic genes ACC and FAS. Its activity and expression are involved in metabolic diseases such as hepatic steatosis [13]. ChREBP interacts with OGT and is O-GlcNAcylated in liver cells. Upregulation of O-GlcNAcylation increased the transcriptional activity of ChREBP in response to high glucose [14]. Intriguingly, penis vein injection of Adenoviruses encoding OGA in db/db mice decreased the expression of FAS; consequently, hepatic steatosis was improved in correlation with a decrease of ChREBP O-GlcNAcylation [14,15]. Liver X receptors (LXRs), together with 9-cis retinoic acid receptor, promote the expression of FAS either directly, by binding to its promoter, or indirectly, by upregulating the transcription of ChREBP and sterol regulatory element-binding protein (SREBP) 1c, another transcription factor controlling the expression of FAS [16-18]. O-GlcNAcylation of LXRs enhances their ability to regulate FAS expression directly and indirectly through the activation of ChREBP and SREBP1c [19,20]. Lastly, the promoter region of FAS contains a FXR-responsive element. Contrary to ChREBP, SREBP, and LXR, FXR downregulates the expression of FAS [21], and *O*-GlcNAcylation of FXR enhances its transcriptional activity and stability [22].

Like ChREBP and FXR, many proteins escape the degradation in an O-GlcNAc-dependent manner [23]. This is the case for  $\beta$ -catenin [24], PGC-1 $\alpha$  [25], Snail [26], and MLL5 [27]. To test whether expression of FAS is dependent upon O-GlcNAcylation but independent of transcriptional processes, we placed C57BL/6 (day/night inverted cycle) on an HCD (animal food was purchased from SAFE, Scientific Animal Food & Engineering) versus a standard diet (SD) for 12 weeks. Then, mice were either fasted (to minimize the transcriptional processes) at 10 o'clock in the morning for 24 h or, for refed mice, mice were first fasted at four o'clock in the afternoon and refed 24 h later for 18 h. Livers from fasted and refed mice were all collected the next day at 10 o'clock in the morning and analyzed according to the expression of FAS and O-GlcNAcylation contents (Fig. 1d), and FAS activity was measured (Fig. 1e). Interestingly, we noticed that in refed mice, enhanced FAS expression partly followed by an increase of FAS mRNA but not in the fasted mice (Fig. 1f). This observation is in agreement with a previous report showing that under fasted conditions ChREBP was cytosolic [14]. This indicates that the level of FAS is not only dependent upon the level of transcripts. We then tested whether the half-life of FAS also depends on increased O-GlcNAcylation. The potent OGA inhibitor, Thiamet-G, was peritoneally injected daily for 2 weeks in comparison with vehicle-injected mice. Livers were collected and analyzed by Western blot (Fig. 1g).

Fig. 2. FAS interacts with OGT and is O-GlcNAc modified. (a) OGT interacts directly with FAS. After a wash with cold PBS, livers from ob/ob mice versus C57BL/6 J and from mice fed HCD versus mice fed SD were homogenized on ice with lysis buffer 2 [50 mM Tris/HCI, 150 mM NaCI, 0.5% NP-40 (vol/vol), and proteases inhibitors (pH 8.0)]. Liver extracts were centrifuged at 20.000 X g for 10 min at 4 °C. Supernatants were first pre-cleared with Sepharose-labeled protein A (GE Healthcare) for 1 h. After discarding the beads, supernatants were incubated with 5 µg for 1 mg of proteins of rabbit polyclonal anti-OGT antibody (TI14, Sigma) and placed at 4 °C overnight. Controls for immunoprecipitation specificities were performed with non-immune rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology). Antibody bound proteins were recovered after adding 50 µL of Sepharose-labeled protein A for 1 h at 4 °C. Bound proteins were washed four times with lysis buffer 2, eluted by boiling in Laemmli buffer, and analyzed by Western blot with anti-OGT (TI14) and anti-FAS antibodies. (b) FAS binds to WGA beads. Mice livers were washed in cold PBS and then homogenized in lysis buffer 3 [10 mM Tris/HCI, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.5% (vol/vol) Triton X-100, and proteases inhibitors (pH 7.5)]. After centrifugation at 20.000 X g, supernatants were collected, assayed for their protein contents, and diluted into homogenization buffer until reaching a final dilution of 1 mg of protein per mL. Then, samples were incubated with 60 µl of WGA-agarose beads (Sigma) with or without 0.5 M GlcNAc to check specificity. WGA-bounds proteins were collected, washed four times with washing buffer [10 mM Tris/HCI, 100 mM NaCI, 0.4% (wt/vol) sodium deoxycholate, 0.3% (wt/vol) SDS, and 0.2% (vol/vol) NP-40 (pH 7.5)], resuspended in Laemmli buffer, boiled, resolved by SDS-PAGE, and analyzed by Western blot with anti-FAS and anti-O-GlcNAc antibodies. (c) FAS is O-GlcNAcylated. O-GlcNAc-bearing proteins from livers of mice fed an HCD versus an SD were labeled by GalNAz and biotin alkyne by using the Click-it O-GlcNAc enzymatic labeling system and the Click-it Glycoprotein detection kit (Biotin alkyne) according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). Then, 20 µg of bovine α-crystallin were used as a positive control. After labeling, the proteins were precipitated using the methanol/ chloroform kit protocol and resuspended in 50 µL of Tris/HCl (pH 8.0) containing 0.1% (wt/vol) SDS. We added 700 µL of enrichment buffer (1% (vol/vol) Triton X-100 and 0.1% (wt/vol) SDS in PBS) to the sample before incubating with 50 µL of avidin-coupled beads (1 h, 4 °C). The avidin-bound proteins were collected, washed three times with the enrichment buffer, resuspended in Laemmli buffer, boiled, and analyzed by Western blot with anti-FAS antibodies and avidin-HRP.

Catalytic activity of FAS (Fig. 1h) [28] and FAS transcript levels were measured (Fig. 1i). We observed that increased expression of FAS correlated with an acceleration of oxidation of NADPH. More importantly, no significant increase in FAS mRNA was observed in fasted mice injected with Thiamet-G, while the transcript levels dramatically increased for the refed mice (Fig. 1i). These data clearly demonstrate that the expression of FAS can be promoted by pharmacologically increasing *O*-GlcNAcylation independent of its transcription.

The next step of the study was to determine whether FAS was O-GlcNAc modified. Little is known about the PTM of FAS. FAS is phosphorylated by AMP-activated protein kinase (AMPK) in 3 T3-L1 cells [29], and the use of AMPK activators reduces FAS activity independently of its expression level. FAS is also tyrosine phosphorylated in breast cancer cells where it is found in complex with human epidermal growth factor receptor-2 [30]. Regarding O-GlcNAcylation, nothing is known on FAS. To remedy to this lack of data, we first wondered whether FAS and OGT were directly interacting. In ob/ob mice and in C57BL/6 mice profiled on SD or on HCD, we used OGT as "bait" (Fig. 2a). In both models, FAS was specifically and significantly detected in the OGT's immunoprecipitates. Moreover, we conducted experiments of WGA-beads enrichments: FAS was specifically detected among WGA-enriched proteins,

since addition of free GlcNAc abolished the interaction of FAS with WGA (Fig. 2b). To push these investigations further, we used a click-chemistry approach (Fig. 2c). After enzymatic labeling of GlcNAc residues with GalNAz and chemical labeling with biotin alkyne, modified proteins were enriched using avidin beads. Probing the immobilized proteins with an anti-FAS antibody revealed that the lipogenic enzyme is *O*-GlcNAcylated in mice livers.

Thus, the role of O-GlcNAcylation level on FAS expression was determined in the immortalized human hepatocytes (IHH) cell line cultured in various conditions. Cells were incubated in either physiological (5 mM) or high (25 mM) glucose concentrations in conjunction or not with insulin, and with drugs or nutrients upregulating the O-GlcNAcylation levels: fructose, glucosamine and glutamine, substrates of the HBP, and Thiamet-G and NButGT, two potent and selective inhibitors of OGA. First, we observed that insulin induced the expression of FAS (Fig. 3a) mainly through a transcriptional activation (Fig. 3b), while O-GlcNAcylation was also increased following the hormonal stimulation (Fig. 3a) as previously observed [31]. In contrast, OGA inhibitors, fructose, glutamine, glucosamine, and high glucose increased FAS expression and interaction with sWGA without significantly affecting its transcription level (Fig. 3a and b). UDP-GlcNAc, the substrate for the O-GlcNAcylation processes, is provided by the HBP whose rate-limiting

Fig. 3. Increase in O-GlcNAcylation is accompanied by an increased expression of FAS in IHH cells independent of transcriptional activation. (a-b) IHH cells were maintained in Williams' Medium (Sigma) supplemented with 10% fetal calf serum (vol/vol) and 2 mM L-Glutamine at 37 °C in a humidified atmosphere enriched with 5% CO2 (vol/vol). IHH cell culture dishes were preliminary coated with 0.1% (wt/vol) porcine gelatin (Sigma). Cells were cultured under physiological glucose concentration (5 mM) or high glucose concentration (25 mM) in Dulbecco's modified Eagle's medium for 24 h. Fru, Gln, and Glucosamine (GlcNH<sub>2</sub>) were used at a final concentration of 5 mM, NButGT at 100 µM, Thiamet-G at 1 µM, and insulin at 100 nM for 18 h. (a) Cells were washed twice in cold PBS and lysed with lysis buffer 1. Cell extracts were then centrifuged at 20.000 X g for 10 min at 4 °C. Lysates were either analyzed by Western blot to evaluate the expression of FAS and the O-GlcNAcylation levels. Equal loading was checked with an anti-GAPDH. The average ratios ± S.D. of FAS/GAPDH and O-GlcNAc/GAPDH are represented as histograms (n = 3). FAS was enriched by using sWGA beads. For this, 1 mg of protein per mL were prepared. Then, samples were incubated with 60 µl of sWGA-agarose beads (Vector Laboratories) without or with 0.5 M GlcNAc (only for the condition where cells were treated under high glucose concentration and with insulin) to check specificity. sWGA-bound proteins were collected, washed four times with washing buffer [10 mM Tris/HCI, 100 mM NaCI, 0.4% (wt/vol) sodium deoxycholate, 0.3% (wt/vol) SDS, and 0.2% (vol/vol) NP-40 (pH 7.5)], resuspended in Laemmli buffer, boiled, resolved by SDS-PAGE, and analyzed by Western blot with anti-FAS and anti-O-GlcNAc proteins antibodies. (b) mRNA levels were measured by RT-qPCR as described in Fig. 1. Primers used were FAS forward (5'- TTCTTCGGAGTCCACCCCA - 3') and FAS reverse (5'- TCCTCGGAGTGAATCTGGGT - 3'), and HPRT was used to normalize the expression of FAS gene using the following primers: HPRT forward (5'-GCCAGACTTTGTTGGATTTG-3') and HPRT reverse (5'-CTCTCATCTTAGGCTTTGTATTTTG -3'). PCR conditions were: 95 °C for 30 s, 56 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s (40 cycles). Experiments were performed in triplicate using three different biological samples. ANOVA test (Graphpad Prism) was used for statistical analysis; p values were calculated and reported accordingly (\*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001). (c-d) HepG2 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum (vol/vol) and 2 mM L-Glutamine at 37 °C in a humidified atmosphere enriched with 5% CO<sub>2</sub> (vol/vol). HepG2 cell culture dishes were preliminary coated with 0.1% (wt/vol) porcine gelatin (Sigma). (c) Glucosamine (GlcNH<sub>2</sub>) were used at a final concentration of 5 mM and DON at 75 µM for 18 h. Cell extracts were analyzed by Western blot to evaluate the expression of FAS and the O-GlcNAcylation levels. Equal loading was checked with an anti-GAPDH. The average ratios ± S.D. of FAS/GAPDH and O-GlcNAc/GAPDH are represented as histograms (n = 3). Student's t test (Excel) was used for statistical analysis; p values were calculated and reported accordingly (\*, P < 0.05; \*\*\*, P < 0.001; NS, Not Significant). (d) For kinetic experiment, cells were cultured under low glucose concentrations and cycloheximide at a final concentration of 20 µg/ml in conjunction or not with NButGT at a final concentration of 100 µM for the indicated time periods. The average ratios ± S.D. of FAS/GAPDH and O-GlcNAc/GAPDH are represented as histograms (n = 3).





**Fig. 4.** Inhibition of OGA increases the interaction between FAS and the deubiquitinating enzyme USP2. For co-immunoprecipitation, livers from mice intraperitoneally injected with Thiamet-G *versus* control mice (a) and HepG2 cells treated as indicated (b) were lysed on ice in lysis buffer 2. Cell extracts were centrifuged at 20.000 X g for 10 min at 4 °C, supernatants were collected, and immunoprecipitation were performed on 1 mg of proteins. Then, 3 µL of anti-FAS antibodies were added overnight, followed by an incubation with Sepharose-labeled protein A for 1 h at 4 °C. Controls for immunoprecipitation specificities were performed with non-immune rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology). Bound proteins were washed four times with lysis buffer 2 and analyzed by Western blot with a rabbit polyclonal anti-USP2A (Santa Cruz Biotechnologies) and a rabbit polyclonal anti-ubiquitin (Enzo Life Sciences) used both at a dilution of 1:2000 and an anti-FAS as described previously. An enrichment with sWGA beads was done, and proteins interacting with the beads were resolved by SDS-PAGE and analyzed by Western blot with anti-FAS and anti-*O*-GlcNAc proteins antibodies. (c) Scheme depicting our findings. FAS interacts with OGT; the elevation of the *O*-GlcNAcylation levels potentiates the interaction of the former with the deubiquitinase USP2a rendering the lipogenic enzyme less sensitive to the degradation.

enzyme is glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase (GFAT). We tested the effect of 6-diazo-5-oxonorleucine (DON), an inhibitor of GFAT, and found that it reduced the expression of FAS (Fig. 3c). When glucosamine (which bypasses GFAT in the HBP) was incubated in conjunction with DON, the expression of FAS was rescued, providing further support for a role of this pathway in the expression of FAS. In another set of experiments, cells were incubated with cycloheximide with or without NButGT. The FAS content was then assessed for increasing periods of time (Fig. 3d). We observed that the inhibition of OGA compensates the effect of cycloheximide on the expression of FAS. These results demonstrated that *O*-GlcNAcylation prevents the degradation of FAS.

Lastly, in an attempt to provide a mechanistic insight into the control of FAS expression by O-GlcNAcylation, we undertook to visualize the interaction between FAS and the deubiquitinating enzyme ubiquitin-specific protease-2a (USP2A) [32]. USP2A binds to FAS in the context of prostate cancer and protects the lipogenic enzyme from degradation [33]. Moreover, overexpression of USP2A protects prostate cancer cells from apoptosis [34]. Livers of fasted C57BL/6 that were intraperitoneally injected with Thiamet-G displayed a higher interaction between FAS and USP2A than those injected with vehicle (Fig. 4a). The same observation was done with refed mice. Staining of FAS immunoprecipitates with an anti-ubiquitin antibody showed a signal only for fasted mice injected with vehicle, whereas no ubiquitinated FAS was detected for mice injected with the OGA inhibitor or for refed mice. The human hepatocarcinoma cell line HepG2 was cultured under various conditions: 5 mM of alucose, 5 mM of alucose plus Thiamet-G or insulin. or 25 mM glucose (Fig. 4b). As observed in in vivo experiments, USP2A and FAS physically interacted when OGA was inhibited, in conditions where insulin was present at high glucose concentration. This correlated with an increased interaction of FAS with sWGA-beads. These last results reveal that one way by which O-GlcNAcylation interferes with the expression of FAS is by promoting the interaction of the lipogenic enzyme with the deubiquitinating enzyme USP2A.

We conclude that *O*-GlcNAcylation level directly impacts the expression of FAS *in vivo* and *ex vivo*. Our data provide a novel regulatory mechanism for the biosynthesis of fatty acids by a nutrient-dependent PTM (Fig. 4c). This suggests that a deregulation of *O*-GlcNAc homeostasis might interfere with the development of metabolic disorders.

### Acknowledgments

The authors thank the University of Lille and the "Centre National de la Recherche Scientifique" (CNRS)" for their financial support, FRABio FR 3688, and Dr. David Vocadlo (Simon Fraser University, Burnaby, BC, Canada) for providing OGA inhibitors. The authors are also grateful to Dr. Catherine Postic (Cochin Institute, Paris), Pr. Didier Vieau (University of Lille) and Dr. Stéphanie Olivier-Van Stichelen (NIDDK, NIH, Bethesda) for their constant support, and to the English Language Editing service from Elsevier. SB is a recipient of a fellowship from the "Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche"and from the "Région Nord-Pas de Calais".

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

Received 28 January 2016; Received in revised form 27 April 2016; Accepted 29 April 2016 Available online 13 May 2016

### Keywords:

FAS; O-GlcNAcylation; liver; ob/ob mice; lipogenesis

†C.G. and T.L. contributed equally to this work.

### Abbreviations used:

HCD, high-carbohydrate diet; FAS, fatty acid synthase; HBP, hexosamine biosynthesis pathway; PTM, post-translational modification; OGT, O-GlcNAc transferase; OGA, O-GlcNAcase; ChREBP, carbohydrate responsive element-binding protein; LXR, liver X receptor; SREBP, sterol regulatory element-binding protein; SD, standard diet; IHH, immortalized human hepatocytes; GFAT, glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase; DON, 6-diazo-5-oxonorleucine; USP2A, ubiquitin-specific protease-2a; PBS, phosphate-buffered saline; TBS, Tris-buffered saline; qPCR, quantitative PCR; sWGA, succinyl-WGA.

### References

- P.C. Calder, Functional roles of fatty acids and their effects on human health, J. Parenter. Enter. Nutr. 39 (2015) 18S–32S.
- [2] J. Girard, D. Perdereau, F. Foufelle, C. Prip-Buus, P. Ferré, Regulation of lipogenic enzyme gene expression by nutrients and hormones, FASEB J. 8 (1994) 36–42.
- [3] K.L. Donnelly, C.I. Smith, S.J. Schwarzenberg, J. Jessurun, M.D. Boldt, E.J. Parks, Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease, J. Clin. Invest. 115 (2005) 1343–1351.

- [4] S. Marshall, V. Bacote, R.R. Traxinger, Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance, J. Biol. Chem. 266 (1991) 4706–4712.
- [5] J.A. Hanover, M.W. Krause, D.C. Love, The hexosamine signaling pathway: *O*-GlcNAc cycling in feast or famine, Biochim. Biophys. Acta. 1800 (2010) 80–95.
- [6] C.R. Torres, G.W. Hart, Topography and polypeptide distribution of terminal *N*-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc, J. Biol. Chem. 259 (1984) 3308–3317.
- [7] L.K. Kreppel, M.A. Blomberg, G.W. Hart, Dynamic glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Cloning and characterization of a unique O-GlcNAc transferase with multiple tetratricopeptide repeats, J. Biol. Chem. 272 (1997) 9308–9315.
- [8] Y. Hu, J. Suarez, E. Fricovsky, H. Wang, B.T. Scott, S.A. Trauger, et al., Increased enzymatic O-GlcNAcylation of mitochondrial proteins impairs mitochondrial function in cardiac myocytes exposed to high glucose, J. Biol. Chem. 284 (2009) 547–555.
- [9] Y. Gao, L. Wells, F.I. Comer, G.J. Parker, G.W. Hart, Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: cloning and characterization of a neutral, cytosolic beta-*N*acetylglucosaminidase from human brain, J. Biol. Chem. 276 (2001) 9838–9845.
- [10] T. Lefebvre, V. Dehennaut, C. Guinez, S. Olivier, L. Drougat, A.–.M. Mir, et al., Dysregulation of the nutrient/stress sensor O-GlcNAcylation is involved in the etiology of cardiovascular disorders, type-2 diabetes and Alzheimer's disease, Biochim. Biophys. Acta. 1800 (2010) 67–79.
- [11] H.B. Ruan, J.P. Singh, M.D. Li, J. Wu, X. Yang, Cracking the O-GlcNAc code in metabolism, Trends Endocrinol. Metab. 24 (2013) 301–309.
- [12] H.B. Ruan, M.O. Dietrich, Z.W. Liu, M.R. Zimmer, M.D. Li, J.P. Singh, et al., O-GlcNAc transferase enables AgRP neurons to suppress browning of white fat, Cell. 159 (2014) 306–317.
- [13] P.–.D. Denechaud, R. Dentin, J. Girard, C. Postic, Role of ChREBP in hepatic steatosis and insulin resistance, FEBS Lett. 582 (2008) 68–73.
- [14] C. Guinez, G. Filhoulaud, F. Rayah-Benhamed, S. Marmier, C. Dubuquoy, R. Dentin, et al., O-GlcNAcylation increases ChREBP protein content and transcriptional activity in the liver, Diabetes. 60 (2011) 1399–1413.
- [15] H. Sakiyama, N. Fujiwara, T. Noguchi, H. Eguchi, D. Yoshihara, K. Uyeda, K. Suzuki, The role of O-linked GlcNAc modification on the glucose response of ChREBP, Biochem. Biophys. Res. Commun. 402 (2010) 784–789.
- [16] J.J. Repa, G. Liang, J. Ou, Y. Bashmakov, J.M. Lobaccaro, I. Shimomura, et al., Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta, Genes Dev. 14 (2000) 2819–2830.
- [17] J.-.Y. Cha, J.J. Repa, The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR, J. Biol. Chem. 282 (2007) 743–751.
- [18] F. Diraison, E. Motakis, L.E. Parton, G.P. Nason, I. Leclerc, G.A. Rutter, Impact of adenoviral transduction with SREBP1c or AMPK on pancreatic islet gene expression profile: analysis with oligonucleotide microarrays, Diabetes. 53 (2004) S84–591.
- [19] C. Bindesbøll, Q. Fan, R.C. Nørgaard, L. MacPherson, H.–.B. Ruan, J. Wu, et al., Liver X receptor regulates hepatic nuclear

*O*-GlcNAc signaling and carbohydrate responsive elementbinding protein activity, J. Lipid Res. 56 (2015) 771–785.

- [20] E.H. Anthonisen, L. Berven, S. Holm, M. Nygård, H.I. Nebb, L.M. Grønning-Wang, Nuclear receptor liver X receptor is *O*-GlcNAc-modified in response to glucose, J. Biol. Chem. 285 (2010) 1607–1615.
- [21] L.–.L. Shen, H. Liu, J. Peng, L. Gan, L. Lu, Q. Zhang, et al., Effects of farnesoid X receptor on the expression of the fatty acid synthetase and hepatic lipase, Mol. Biol. Rep. 38 (2011) 553–559.
- [22] W. Berrabah, P. Aumercier, C. Gheeraert, H. Dehondt, E. Bouchaert, J. Alexandre, et al., Glucose sensing O-GlcNAcylation pathway regulates the nuclear bile acid receptor farnesoid X receptor (FXR), Hepatology. 59 (2014) 2022–2033.
- [23] H.–.B. Ruan, Y. Nie, X. Yang, Regulation of protein degradation by O-GlcNAcylation: crosstalk with ubiquitination, Mol. Cell. Proteomics. 12 (2013) 3489–3497.
- [24] S. Olivier-Van Stichelen, V. Dehennaut, A. Buzy, J.–.L. Zachayus, C. Guinez, A.–.M. Mir, et al., O-GlcNAcylation stabilizes β-catenin through direct competition with phosphorylation at threonine 41, FASEB J. 28 (2014) 3325–3338.
- [25] H.–.B. Ruan, X. Han, M.–.D. Li, J.P. Singh, K. Qian, S. Azarhoush, et al., *O*-GlcNAc transferase/host cell factor C1 complex regulates gluconeogenesis by modulating PGC-1α stability, Cell Metab. 16 (2012) 226–237.
- [26] S.Y. Park, H.S. Kim, N.H. Kim, S. Ji, S.Y. Cha, J.G. Kang, et al., Snail1 is stabilized by *O*-GlcNAc modification in hyperglycaemic condition, EMBO J. 29 (2010) 3787–3796.
- [27] X. Ding, W. Jiang, P. Zhou, L. Liu, X. Wan, X. Yuan, et al., Mixed lineage leukemia 5 (MLL5) protein stability is cooperatively regulated by *O*-GlcNAc transferase (OGT) and ubiquitin specific protease 7 (USP7), PLoS One 10 (12) (2015), e0145023, http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0145023.
- [28] G. Zheng, L. Lin, S. Zhong, Q. Zhang, D. Li, Effects of puerarin on lipid accumulation and metabolism in high-fat diet-fed mice, PLoS One 10 (3) (2015), e0122925, http://dx. doi.org/10.1371/journal.pone.0122925.
- [29] Z. An, H. Wang, P. Song, M. Zhang, X. Geng, M.-H. Zou, Nicotine-induced activation of AMP-activated protein kinase inhibits fatty acid synthase in 3T3L1 adipocytes a ROLE FOR OXIDANT STRESS, J. Biol. Chem. 282 (2007) 26,793–26,801.
- [30] Q. Jin, L.X. Yuan, D. Boulbes, J.M. Baek, Y.N. Wang, D. Gomez-Cabello, et al., Fatty acid synthase phosphorylation: a novel therapeutic target in HER2-overexpressing breast cancer cells, Breast Cancer Res. 12 (2010) R96.
- [31] Y. Perez-Cervera, V. Dehennaut, M. Aquino Gil, K. Guedri, C.J. Solórzano Mata, S. Olivier-Van Stichelen, et al., Insulin signaling controls the expression of *O*-GlcNAc transferase and its interaction with lipid microdomains, FASEB J. 27 (2013) 3478–3486.
- [32] S.F. Baldini, T. Lefebvre, O-GlcNAcylation and the metabolic shift in high-proliferating cells: all the evidence suggests that sugars dictate the flux of lipid biogenesis in tumor processes, Front. Oncol. 6 (2016) 6.
- [33] E. Graner, D. Tang, S. Rossi, A. Baron, T. Migita, L.J. Weinstein, et al., The isopeptidase USP2a regulates the stability of fatty acid synthase in prostate cancer, Cancer Cell. 5 (2004) 253–261.
- [34] C. Priolo, D. Tang, M. Brahamandan, B. Benassi, E. Sicinska, S. Ogino, et al., The isopeptidase USP2a protects human prostate cancer from apoptosis, Cancer Res. 66 (2006) 8625–8632.

### b) Résultats supplémentaires

## 1) Matériels et méthodes

## (a) Culture primaire d'hépatocytes

Les souris à l'état postprandial ont été anesthésiées au mélange kétamine/xylazine/eau stérile (1/1/8, v/v/v). Les foies ont été perfusés au niveau de la veine cave par un tampon de perfusion complet (470 mL de tampon HBSS (Hank's Balanced Salt Solution), 25 mL HEPES (1 M), 5 mL EGTA (1 M), pH 7.4). Le foie a ensuite été désagrégé grâce à un tampon collagénase (80 mL de tampon HBSS, 10 mL CaCl<sub>2</sub> (50 mM), 5 mL HEPES (1 M) et 14 mg de collagénase (Sigma Aldrich), pH 7.4). Les foies ont été récupérés, dilacérés, et les cellules ont été reprises dans du milieu M199 (Invitrogen) supplémenté de 5UI/mL de pénicilline, 5 µg/L de streptomycine et 2 mM de glutamine. Le pourcentage de viabilité a été ensuite déterminé par la méthode au bleu trypan. Les cellules ont été ensemencées sur boites de Pétri de 60 mm de diamètre à hauteur de 2.10<sup>6</sup> cellules par boite. Le lendemain, les cellules ont été stimulées soit avec du milieu contenant 5 mM de glucose, soit avec du milieu contenant 25 mM de glucose supplémenté par 400 nM d'insuline (insuline humaine, Sigma Aldrich). Seize heures plus tard, les cellules ont été traitées avec différents composés : 5 mM de fructose, 5 mM de glutamine, 5 mM de glucosamine ou des inhibiteurs d'OGA, NButGT (1,2-dideoxy-2'-propyl-αd-glucopyranoso-[2,1-d]- $\Delta 2'$ -thiazoline) (100  $\mu$ M) ou ThiametG (2-(ethylamino)-3aR,6S,7R, 7aR-tetrahydro-5R-(hydroxymethyl)-5H-pyrano[3,2-d]thiazole-6,7-diol) (100 μM). Les cellules ont également été traitées avec un inhibiteur protéasomale : le MG132 à 1  $\mu$ M.

### (b) Lyse des hépatocytes primaires de souris et western blot

Après 24 h de stimulation avec les composés ou drogues, les cellules ont été lysées avec 100  $\mu$ L de tampon RIPA (Radio ImmunoPrecipitation Assay) (0.01 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 0.001 M EDTA, 1% (v/v) Triton X100, 0.5% (m/v) NaDOC (désoxycholate de sodium), 0.1% (m/v) SDS, inhibiteur de protéases, pH 7.4). Les lysats ont ensuite été centrifugés à 10.000 g pendant 10 min à 4°C. Le dosage des protéines a été réalisé sur le surnageant à l'aide du kit Micro BCA (BiCinchoninic Acid) Protein Assay Kit (Thermo scientific) selon les instructions du manuel.

Les échantillons ont été repris dans du tampon Laemmli 5X (Tris-HCl 0.5 M, 60% (v/v) glycérol, 2-mercapto-éthanol, 0.001% (m/v) bleu de bromophénol, 20% (m/v) SDS pH 6.8) et placés à 100°C pendant 10 min.

(c) Mise en évidence des acides gras

## (i) Coloration à l'huile rouge

La solution de stock est composée de 0.5% (m/v) de poudre Oil-Red O (Sigma Aldrich), de 60% (v/v) de triéthyl-phosphate, et de 40% (v/v) d'eau. Extemporanément, la solution de travail d'huile rouge a été préparée (60% (v/v) de solution stock et 40% (v/v) d'eau distillée) puis filtrée. Les cellules ont été rincées au PBS puis fixées avec 4% (v/v) de PFA (paraformaldéhyde) pendant 20 min à 4°C. Après trois lavages au PBS, l'excès de PFA a été neutralisé par une solution de NH<sub>4</sub>Cl (50 mM dans du PBS) pendant 10 min puis perméabilisées avec 0.1% (v/v) de Triton dans du PBS pendant 4 min. Les cellules ont ensuite été lavées avec de l'eau distillée puis colorées avec la solution d'Oil Red O pendant 30 min à 37°C et de nouveau rincées avec de l'eau distillée. Les lipides ont été visualisés sous microscope et les images acquises à partir d'une caméra Nikon (Digital sight DS-L1).

## (ii) Dosage des triglycérides

30 mg de foie ou 10  $\mu$ L de sérum ont été homogénéisés toute la nuit à 4°C avec 300  $\mu$ L d'acétone. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 10.000 g à 4°C pendant 10 min. Le dosage des triglycérides a été effectué sur le surnageant à l'aide du kit *Triglycérides FS (Diasys)* selon les instructions du manuel. La présence de triglycérides a été détectée au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 500 nm.

## (iii) Dosage des acides gras par GC-MS

30 mg de foie ont été broyés dans 300  $\mu$ L d'acétone. Les échantillons ont ensuite été placés sur la roue pendant une nuit à 4°C puis centrifugés à 10.000 g 10 minutes. Le surnageant a été évaporé à sec sous azote. Le résidu est repris dans 300  $\mu$ L de MeOH/HCl à 0.5 N puis mis à l'étuve à 80°C pendant 45 min. La solution méthanolique est évaporée à sec sous azote. Le résidu est repris 100  $\mu$ L d'étalon interne C17 :0 sont ajoutés.

186



**Figure 42** : Dosage des triglycérides hépatiques chez les souris C57Bl6 contrôles (C57) ou chez les souris obèses (ob/ob).

L'extraction des triglycérides a été réalisée à partir de 30 mg de foie ou 10  $\mu$ l de sérum. Ces triglycérides ont été ensuite dosés. Les données sont représentatives de 5 échantillons de foies de souris par groupe.

<u>Abréviations</u>: TG : triglycérides, AJ : à jeun, RN : renourri, C57 : C57Bl6.

Un μL de la solution est injecté en GC/MS simple quadripôle (GC Focus/DSQ II) sur une colonne Supelco SLB-5MS.

## (d) Traitement à la $\beta$ -N-acétylglucosaminidase

30 mg de foie ont été homogénéisés dans du tampon d'homogénéisation (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, sucrose 250 mM, pH 7.4). Les homogénats ont ensuite été centrifugés à 150.000 g pendant 5 min. Les échantillons ont été incubés avec 1 unité de  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase (produite chez *Canavalia ensiformis (Jack bean)*, Sigma Aldrich) pendant 4 h à 37°C. Les protéines ont été reprises par du tampon Laemmli 5X et chauffées à 100°C pendant 10 min. 80 µg de protéines ont été déposés sur gel.

## 2) <u>Résultats supplémentaires</u>

(a) Validation des modèles in vivo

*(i)* Accumulation de triglycérides hépatiques dans les souris ob/ob versus les souris contrôles

Afin de déterminer s'il existe un lien entre l'activation anormale de la lipogenèse et la *O*-GlcNAcylation, les niveaux de *O*-GlcNAcylation et d'expression de la FAS ont été mesurés dans un modèle *in vivo* physiopathologique : les souris ob/ob déficientes en leptine, hormone de la satiété. Ces souris présentent une lipogenèse exacerbée induisant la stéatose hépatique. Macroscopiquement, la stéatose hépatique est observée chez ces souris et l'accumulation anormale de triglycérides hépatiques a été mesurée (Figure 42). Ainsi, on observe une augmentation de la quantité de triglycérides au niveau du foie chez les souris ob/ob par rapport aux souris contrôles, qu'elles soient à jeun ou renourries. Afin de déterminer si les triglycérides produits sont stockés dans le foie ou exportés, les triglycérides du sérum ont été dosés.

Chez les souris à jeun, on observe la même quantité de triglycérides dans le sérum chez les souris ob/ob par rapport aux souris contrôles. Par contre, chez les souris renourries, on observe une diminution de la quantité de triglycérides du sérum chez les souris ob/ob versus les souris contrôles (Figure 42).



**Figure 43** : Dosage des triglycérides hépatiques chez les souris soumises à un régime normal (CD) ou à un régime riche en sucres (HCD).

(A) Les souris ont été soumises à un régime normal ou riche en sucres pendant 12 semaines. A l'issue de ces 12 semaines, les souris ont été mises à jeun 24 h ou mise à jeun 24 h puis renourries 18 h après la période de jeûne. (B) L'extraction des triglycérides a été réalisée à partir de 30 mg de foie. Ces triglycérides ont été ensuite dosés. Les données sont représentatives de 5 échantillons de foies de souris par groupe.

<u>Abréviations</u>: AJ : à jeun, RN : renourri, CD : chow diet, HCD : high carbohydrate diet.
Par conséquent, l'augmentation de la quantité de triglycérides hépatiques observée chez les souris ob/ob n'est pas exportée hors du foie et s'accumulent ainsi de façon anormale dans le foie, contribuant au développement de la stéatose hépatique.

#### (ii) Efficacité du régime riche en sucres

Pour notre étude, des souris C57BL/6 ont été soumises soit à un régime classique (CD) soit à un régime riche en sucres (HCD), puis pour chaque groupe, les souris ont été soit mises à jeun pendant 24 h, soit mises à jeun pendant 24 h puis renourries pendant 18 h afin de stimuler la lipogenèse (Figure 43a). Un régime riche en sucres induit une accumulation de triglycérides dans le foie de souris normales (Surwit *et al.*, 1995). Pour valider l'efficacité du régime, nous avons dosé les triglycérides intra-hépatiques dans ce modèle (Figure 43b). Chez les souris à jeun CD, la présence de triglycérides hépatiques est due au captage des acides gras par le foie provenant de la lipolyse du tissu adipeux, alors que chez les souris renourries CD, les triglycérides hépatiques résultent de la lipogenèse. Chez les souris renourries HCD, on remarque une augmentation significative des triglycérides hépatiques par rapport aux souris CD due, en partie, à une augmentation de la lipogenèse. Les souris semblent donc avoir bien répondu au régime en stockant l'excès de glucose sous la forme d'acides gras, ce qui reflète une augmentation de la lipogenèse par rapport aux souris CD (Figure 43b).

#### (b) Dosage des acides gras par GC/MS

Dans la publication, nous avons démontré qu'une augmentation des niveaux de *O*-GlcNAcylation *in vivo* est en corrélation avec une augmentation de l'activité de la FAS. La FAS permet, principalement, la formation de palmitate (C16:0). Ensuite, le palmitate peut être allongé en stéarate (C18:0) et ces deux composés peuvent être désaturés respectivement en acide palmitoléique (C16:1) et acide oléique (C18:1). Par conséquent, ces différentes entités ont été dosées par GC-MS dans les foies de souris à jeun ou renourries soumises à un régime normal ou riche en sucres en collaboration avec le Dr. Anne Delmont (Figure 44).

A jeun, on observe une diminution de la quantité d'acides palmitique et stéarique lorsque les souris sont soumises à un régime riche en sucres par rapport aux souris contrôles.





Les souris ont été soumises à un régime normal ou riche en sucres. (A) Dosage des entités lipidiques hépatiques C16:0, C18:0 et C18:1 par GC-MS chez les souris soumises à un régime normal (CD) ou à un régime riche en sucres (HCD). (B) le dosage des ARNm de la stéaroyl-CoA désaturase 1 a été réalisé par Q-PCR.

<u>Abréviations</u>: AJ : à jeun, RN : renourri, CD : chow diet, HCD : high carbohydrate diet, SCD1 : stéaroyl-COA désaturase 1.

Chez les souris à jeun contrôles, les acides gras hépatiques proviennent, en majorité, de la lipolyse du tissu adipeux. Chez les souris soumises à un régime riche en sucres on suppose une inhibition de la lipolyse du tissu adipeux et une augmentation de la lipogenèse en corrélation avec l'augmentation de l'activité de la FAS décrite dans la publication.

De plus, chez les souris soumises à un régime riche en sucres, on observe une augmentation de la présence de C18:1 par rapport aux souris nourries normalement. Ces acides gras désaturés permettent la formation de triglycérides accumulés au niveau du foie (Figure 44a). L'enzyme permettant la désaturation des entités lipidiques C16:0 et C18:0 est la stéaroyl-CoA désaturase 1 (SCD1). Ainsi, nous avons mesuré les ARNm codant cette protéine par RT-Q-PCR. Par conséquent, nous observons une augmentation de l'expression transcriptionnelle de SCD1 chez les souris soumises à un régime riche en sucres pouvant expliquer l'augmentation de la désaturation de la négime riche en sucres pouvant expliquer l'augmentation de la désaturation de la niveau transcriptionnel et favoriserait son activité enzymatique (Figure 44b).

Une autre manière de mesurer la présence d'acides gras dans les hépatocytes est la coloration à l'huile rouge. Cette technique a été réalisée sur des hépatocytes issues de cultures primaires d'hépatocytes de souris traités avec différentes drogues ou composés susceptibles d'augmenter les niveaux de *O*-GlcNAcylation.

# (c) Rôle de la O-GlcNAcylation sur l'expression de la FAS dans des hépatocytes de souris

Contrairement aux expériences réalisées sur les souris, les cultures primaires d'hépatocytes de souris nous permettent de contrôler aisément les niveaux de *O*-GlcNAcylation. Afin de vérifier que les cellules répondent correctement aux concentrations en glucose, deux conditions contrôles ont été utilisées : les cellules sont soit cultivées en présence de glucose à 5 mM (G5), soit en présence de 25 mM de glucose et stimulées par 400 nM d'insuline (G25i).

Pour augmenter les niveaux de *O*-GlcNAcylation, différentes drogues ou composés ont été ajoutés dans le milieu de culture G5. Ces molécules agissent à différents niveaux de la voie de biosynthèse des hexosamines (Figure 25 et 32) :

• Le fructose (Fru) après phosphorylation par la fructokinase est le substrat de la GFAT, enzyme clé et limitante de la voie des hexosamines.



**Figure 45:** Incidence de la *O*-GlcNAcylation sur l'expression de la FAS au niveau protéique et sur l'accumulation de lipides dans des hépatocytes primaires de souris.

La culture primaire d'hépatocytes a été réalisée à partir d'une souris à l'état postprandial. Les cellules ont été cultivées dans du milieu contenant 5 mM de glucose (G5) ou 25 mM de glucose et 400 nM d'insuline (G25i). Les niveaux de *O*-GlcNAcylation ont été modulés par l'utilisation de fructose, de GlcNH<sub>2</sub> et de glutamine à 5 mM, de ThiametG ou de NButGT à 100  $\mu$ M. (A) Le profil d'expression de la FAS et des protéines *O*-GlcNAcylées totales a été réalisé par WB. (B) L'accumulation de lipides dans la cellule a été mise en évidence par la technique de la coloration à l'huile rouge.

<u>Abréviations</u>: G5 : 5 mM de glucose, G25i : 25 mM de glucose plus insuline, Fru : fructose, GlcNH<sub>2</sub> : glucosamine, Gln : glutamine, TG : ThiametG, FAS : fatty acid synthase, GAPDH : glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase.

• La glucosamine (GlcNH<sub>2</sub>) après phosphorylation en position 6, est le substrat de la glucosamine-6-phosphate acétyltransférase. Son utilisation augmente rapidement les niveaux d'UDP-GlcNAc, et donc de *O*-GlcNAcylation, puisqu'elle contourne la GFAT.

- La glutamine (Gln) est le second substrat de la GFAT et permet dans une certaine mesure d'augmenter les niveaux de *O*-GlcNAcylation.
- Le Thiamet G (TG) et le NButGT, analogues de la GlcNAc, sont des inhibiteurs de l'OGA (Macauley et al., 2005; Yuzwa et al., 2008).

Nous avons d'abord analysé les niveaux de *O*-GlcNAcylation totaux et les niveaux d'expression de la FAS dans les deux conditions contrôles G5 et G25i (Figure 45). Dans la condition de culture G5, on remarque une faible quantité de protéines *O*-GlcNAcylées et de la FAS. Au contraire, en présence d'une forte concentration en glucose et d'insuline, G25i, les niveaux de *O*-GlcNAcylation des protéines et l'expression de la FAS sont augmentés par rapport au G5. Ces observations indiquent que les cellules primaires répondent au glucose en présence d'insuline, et permettent de valider ce modèle expérimental.

Lorsque les cellules primaires sont traitées avec l'un des composés (GlcNH<sub>2</sub>, Gln) ou inhibiteur de l'OGA (TG, NButGT), on observe une augmentation des niveaux totaux de *O*-GlcNAcylation des protéines de façon plus ou moins marquée (Figure 45a). Néanmoins, on remarque que l'augmentation des niveaux de *O*-GlcNAcylation est en corrélation avec une augmentation de l'expression de la FAS (Figure 45a). Ces résultats sont en corrélation avec les résultats obtenus à partir des foies de souris publiés dans l'article Baldini et al. J. Mol. Biol., 2016.

Afin de vérifier, dans ces conditions, que l'augmentation de l'expression de la FAS s'accompagne ou non d'une accumulation de lipides dans l'hépatocyte, nous avons réalisé des colorations de lipides neutres à l'huile rouge (Figure 45b). Comme attendu, dans les conditions contrôles nous observons une accumulation de lipides en G25i par rapport à la condition G5. En effet, en condition d'hyperglycémie, les cellules mettent en place des mécanismes moléculaires pour stocker le glucose en partie sous forme de lipides. Lorsque les cellules sont traitées avec les différents composés ou drogues, nous observons une accumulation de lipides identique à celle observée en G25i, et ceci en corrélation avec une augmentation de lipides libertation de lipides.



Figure 46 : Effet de la O-GlcNAcylation sur l'expression de la FAS.

Des homogénats de foie provenant de souris à jeun ou renourries ont été traitées avec 1 unité de  $\beta$  N-acétylglucosaminidase. Les niveaux d'expression de la FAS et des protéines *O*-GlcNAcylées sont évalués par Western Blot.

<u>Abréviations</u> : AJ : à jeun, RN : renourri, FAS : fatty acid synthase, GAPDH : glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase.

Dans les hépatocytes primaires, l'augmentation de l'expression de la FAS, induite par une augmentation du niveau de *O*-GlcNAcylation, se traduit donc par une accumulation de lipides.

Afin de comprendre comment la *O*-GlcNAcylation interfère avec cette expression, nous avons émis l'hypothèse que la FAS pourrait être stabilisée, de manière post-traductionnelle, par *O*-GlcNAcylation comme c'est le cas par exemple pour c-myc (Itkonen et al., 2013) et la  $\beta$ -caténine (Olivier-Van Stichelen et al., 2012b).

#### (d) Stabilisation de la FAS par O-GlcNAcylation

Dans le travail publié dans J. Mol. Biol., nous avons montré *in vitro* sur une lignée cancéreuse hépatique, les HepG2, que la FAS est stabilisée lorsque les niveaux de *O*-GlcNAcylation sont augmentés.

En effet, l'utilisation d'un inhibiteur de l'enzyme limitante de la voie de biosynthèse des hexosamines, le DON, diminue l'expression de la FAS. De plus, l'incubation des cellules avec de la glucosamine, qui contourne la GFAT, en conjonction avec le DON permet la restauration de l'expression de la FAS. Une autre expérience sur les mêmes cellules a été réalisée. Ces cellules ont été traitées avec un inhibiteur de la traduction, le cycloheximide, supplémenté ou non de NButGT. En présence de cycloheximide seul, nous observons la dégradation de la FAS au cours du temps. En présence de NButGT, la dégradation de la FAS semble être ralentie.

Nous avons recherché à évaluer la stabilité de la FAS en fonction des niveaux de *O*-GlcNAcylation, *in vivo*. Des homogénats de foies de souris à jeun ou renourries ont été traités avec la  $\beta$  N-acétylglucosaminidase afin de cliver les motifs GlcNAc. En présence de l'enzyme, le niveau global de *O*-GlcNAcylation des protéines est fortement diminué attestant de l'activité de la glucosaminidase sur les tissus hépatiques (Figure 46). En ce qui concerne l'expression de la FAS, elle est diminuée suite au traitement à la glucosaminidase. Il semble que la dégradation de la FAS soit accélérée lorsque les niveaux de *O*-GlcNAcylation sont diminués. Ce résultat renforce l'idée selon laquelle la *O*-GlcNAcylation de la FAS entraîne sa stabilisation.

Par conséquent, nous avons montré qu'une augmentation des niveaux de *O*-GlcNAcylation induit une augmentation de l'expression de la FAS.



Figure 47 : Mise en évidence de la dégradation protéasomale de la FAS au niveau du foie.

La culture primaire d'hépatocytes a été réalisée à partir d'une souris à l'état postprandial. Les cellules ont été cultivées dans du milieu contenant 5 mM de glucose (G5) ou 25 mM de glucose et 400 nM d'insuline (G25i). Les niveaux de *O*-GlcNAcylation ont été modulés par l'utilisation de GlcNH<sub>2</sub> à 5 mM et la dégradation protéasomale a été inhibée par le MG132 à 1  $\mu$ M 18 h. Le profil d'expression de la FAS, des protéines *O*-GlcNAcylées et ubiquitinylées totales et de la GAPDH a été réalisé par WB.

<u>Abréviations</u>: G5 : 5 mM de glucose, G25i : 25 mM de glucose plus insuline, GlcNH<sub>2</sub> : glucosamine, ub : protéines ubiquitinylées, FAS : fatty acid synthase, GAPDH : glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase.

Nous avons alors émis l'hypothèse selon laquelle la dégradation de la FAS serait inhibée lorsque les niveaux de *O*-GlcNAcylation étaient augmentés.

#### (e) Etude de la dégradation de la FAS

Une seule étude a montré la dégradation protéasomale de la FAS dans des cellules prostatiques (Graner et al., 2004) mais aucune n'a été réalisée dans le foie. Au cours de ma thèse, nous avons mis en évidence, dans des hépatocytes issus de cultures primaires de souris, la dégradation protéasomale de la FAS. En effet, le MG132, inhibiteur du protéasome, réduit la dégradation de la FAS en condition G5 et G5 supplémenté de glucosamine similaire à la condition G25i, deux conditions particulièrement efficaces pour augmenter l'expression de la FAS (Figure 47).

Concernant le mode de dégradation de la FAS, une étude a démontré dans des conditions de faible concentration en glucose que la FAS interagit l'ubiquitine ligase COP1 induisant sa dégradation (Yu et al., 2013). Concernant sa stabilisation, d'autres auteurs ont montré que, dans des lignées cancéreuses de prostate, l'interaction entre la FAS et la déubiquitinylase USP2a était très forte. Cette interaction entraîne la déubiquitinylation de la FAS, sa stabilisation et est favorable à la survie des cellules tumorales (Graner et al., 2004). L'hypothèse serait que des niveaux de *O*-GlcNAcylation élevés favoriseraient l'interaction entre la FAS et USP2a. Cette hypothèse a été validée dans la publication Baldini et al. J. Mol. Biol., 2016.

#### 3. <u>Discussion</u>

Une accumulation aberrante de lipides dans le foie responsable de la stéatose hépatique est souvent observée chez les patients diabétiques de type 2 ou les personnes atteintes d'obésité, et est souvent liée au développement de l'insulinorésistance (Postic and Girard, 2008). Jusqu'à ce jour, ce phénomène était expliqué par une augmentation anormale de la transcription des gènes codant des enzymes du métabolisme glucido-lipidique. Néanmoins, il a été montré que les modifications post-traductionnelles sont activement impliquées dans le développement de la stéatose hépatique. Par exemple, la *O*-GlcNAcylation de ChREBP augmente son activité transcriptionnelle en stabilisant la protéine.

De plus, deux autres facteurs de transcription impliqués dans la néoglucogenèse, FOXO1 et TORC2 sont stabilisés par *O*-GlcNAcylation augmentant la production de glucose hépatique. Ils interviennent dans le phénomène de glucotoxicité (Dentin et al., 2008; Issad and Kuo, 2008; Kuo et al., 2008).

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la FAS. Concernant sa régulation, elle est essentiellement connue comme étant régulée de manière transcriptionnelle par, en particulier, le statut nutritionnel et les hormones. En effet, le glucose induit ChREBP, l'insuline induit SREBP-1c et USF, et les oxystérols activent LXR se traduisant par une augmentation de l'expression de la FAS. Cependant, l'extinction de ces facteurs de transcription n'abolit pas totalement l'expression de la FAS, suggérant l'existence d'un autre mécanisme régulant l'expression de la FAS (Dentin et al., 2006; Rippmann et al., 2009; Haas et al., 2012). Cependant, peu de choses ont été reportées sur sa régulation post-traductionnelle. Pour pallier ce manque de connaissance, nos travaux ont porté sur un mode original de contrôle : la régulation par *O*-GlcNAcylation, une modification post-traductionnelle intimement liée aux conditions nutritionnelles. La *O*-GlcNAcylation de la FAS semble réguler certaines de ses propriétés, en particulier sa stabilité et son activité.

# a) Les niveaux d'expression des protéines *O*-GlcNAcylées et de la FAS varient en fonction des conditions nutritionnelles

Nous avons montré que quel que soit le régime nutritionnel des souris C57BL/6, normal (CD) ou riche en sucres (HCD), ou leur état pathologique (ob/ob), l'expression de la FAS est augmentée chez les souris renourries par rapport aux souris à jeun. Cette augmentation d'expression de la FAS est due à une augmentation de la quantité de ses ARNm. En effet, pour répondre à un apport en glucose et le stocker sous forme d'acides gras, l'insuline et le glucose conduisent, entres autres, à l'activation respectivement de SREBP-1c et ChREBP. Ces facteurs de transcription se fixent sur le promoteur de la FAS est également augmentée dans le foie des souris à jeun ob/ob, sous régime HCD ou présentant une inhibition de l'OGA, comparé aux souris à jeun contrôles. Cependant les niveaux d'ARNm de la FAS, dans les deux expériences *in vivo* (souris soumises à un régime normal ou riche en sucre ou présentant ou non une inhibition de l'OGA) sont comparables.

Ainsi, il semblerait qu'un mécanisme, autre que transcriptionnel, soit à l'origine de la régulation de l'expression de la FAS. Ce mécanisme étant dépendant de l'apport en glucose nous avons émis l'hypothèse selon laquelle la FAS est régulée au niveau post-traductionnel par *O*-GlcNAcylation, modification elle-même dépendante de l'apport en glucose (Marshall *et al.*, 1991).

# b) Mise en évidence de l'interaction FAS/OGT et de la *O*-GlcNAcylation de la FAS

Dans un premier temps, une interaction entre la FAS et l'OGT a été recherchée. Dans ce sens, nous avons montré que les deux protéines co-immunoprécipitent confirmant que la FAS et l'OGT sont des partenaires d'interaction.

Afin de mettre en évidence la *O*-GlcNAcylation de la FAS, nous avons utilisé deux approches expérimentales, couramment utilisées pour étudier les protéines *O*-GlcNAcylées : la purification des protéines *O*-GlcNAcylées sur billes de lectine WGA (ou de succinyl-WGA) (Guinez et al., 2006) et l'utilisation de la *Click-chemistry* après transfert enzymatique de GalNAz (Dehennaut et al., 2008). Nous avons ainsi montré l'existence de formes *O*-GlcNAcylées de la FAS. La glycosylation de l'enzyme dépend des conditions nutritionnelles puisque la FAS est davantage *O*-GlcNAcylée dans le foie de souris renourries comparé au foie de souris à jeun et dans le foie de souris sous régime riche en sucres ou ob/ob comparé aux souris sous régime normal. La *O*-GlcNAcylation de la FAS est en corrélation avec son niveau d'expression.

Afin d'approfondir ces résultats, il serait intéressant de déterminer les sites de *O*-GlcNAcylation de la FAS par spectrométrie de masse en mode ETD (Myers et al., 2013). Une méthode complémentaire pour déterminer le nombre de sites de *O*-GlcNAcylation sur une protéine consiste à réaliser un marquage par le polyéthyléne glycol (PEG) fonctionnalisé sous la forme d'alcyne (Rexach et al., 2010). Pour cela, chaque site *O*-GlcNAcylé est substitué par une molécule de GalNAz grâce à une galactosyltransférase mutée. Un résidu de PEG-alcyne est ensuite greffé sur le groupement azide apportant ainsi un incrément de masse visible par Western blot.

La PEGylation permet donc de déterminer approximativement le nombre de sites de *O*-GlcNAcylation portés par la protéine et de calculer le rapport des formes *O*-GlcNAcylées d'une protéine sur la forme non glycosylée. Cette approche pourra être utilisée sur la FAS.

#### c) Rôles de la O-GlcNAcylation sur les propriétés de la FAS

#### 1) <u>Rôle sur l'expression de la FAS</u>

Afin de déterminer le rôle de la *O*-GlcNAcylation sur l'expression de la FAS, nous avons modulé les niveaux de *O*-GlcNAcylation sur des HepG2 et sur des hépatocytes de souris issus de cultures primaires.

Nous avons montré qu'en présence de glucosamine, de glutamine, et des inhibiteurs d'OGA, NButGT et ThiametG, que les niveaux de *O*-GlcNAcylation sont augmentés et corrélés à une augmentation de l'expression de la FAS indépendamment d'une régulation de sa transcription. Contrairement à la glucosamine et à la glutamine, le fructose ne semble pas, de la même façon, interférer avec l'expression de la FAS. La consommation de fructose est associée à la stéatose hépatique par des mécanismes encore mal établis (Zhang et al., 2012). Nos résultats montrent que le fructose induit bien une accumulation de gouttelettes lipidiques mais que cet effet n'est pas totalement dépendant de la *O*-GlcNAcylation et de l'expression de la FAS. Dans le foie, le fructose est phosphorylé en fructose-1-phosphate puis clivé pour donner du DHAP (dihydroxyacétone-3-phosphate) rejoignant la glycolyse.

De manière intéressante, nos résultats montrent l'existence d'une corrélation entre l'augmentation de l'expression de la FAS, les niveaux de *O*-GlcNAcylation et l'accumulation de lipides neutres dans les hépatocytes primaires. Cependant la technique de coloration à l'huile rouge ne permet pas de détecter toutes les gouttelettes lipidiques caractéristiques de la stéatose hépatique (Mehlem et al., 2013). En effet, les gouttelettes lipidiques se caractérisent par un ensemble de lipides neutres recouverts de protéines et de lipides polaires. Or l'huile rouge permet la fixation uniquement des lipides les plus hydrophobes et des lipides neutres (tri- et diglycérides, ...) et non des lipides polaires (phospholipides, sphingolipides et céramides...).

Afin de déterminer très précisément l'impact de la *O*-GlcNAcylation sur la biosynthèse des différentes espèces lipidiques, des cellules cultivées en présence d'acétate (précurseur de l'acétyl-CoA) radiomarqué pourront être transfectées avec des siRNA visant à bloquer l'expression de l'OGT ou de la FAS (contrôle positif). Les lipides seront ensuite extraits puis les différentes espèces lipidiques seront séparées par chromatographie sur couche mince puis quantifiées par comptage radioactif.

#### 2) <u>Rôle sur la stabilité de la FAS</u>

De nombreuses études ont démontré le rôle de la *O*-GlcNAcylation sur la stabilité de certaines protéines : c'est le cas de la ß-caténine (Olivier-Van Stichelen et al., 2012b), de la delta-lactoferrine (Hardivillé et al., 2010) ou encore du récepteur aux œstrogènes murin (Cheng and Hart, 2000).

Afin d'étudier l'effet de la *O*-GlcNAcylation sur la stabilité de la FAS, une cinétique en cycloheximide seul ou en présence de NButGT a été réalisée *ex vivo* sur des cellules HepG2. Une autre expérience a été réalisée avec un inhibiteur de la GFAT, le DON. Un traitement à la  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase a été effectué sur des homogénats de foie de souris. Ces expériences nous ont permis de démontrer que la *O*-GlcNAcylation interfère avec l'expression de la FAS.

Cependant ces expériences ne permettent pas de prouver, de façon directe, le rôle de la *O*-GlcNAcylation sur la stabilité de la FAS. L'obtention des sites de *O*-GlcNAcylation par spectrométrie de masse nous permettrait d'effectuer une mutagenèse dirigée sur un plasmide d'expression codant la FAS humaine étiquetée par une séquence poly-histidines fourni par le Dr. Jung (Jung et al., 2012). L'état de *O*-GlcNAcylation de la FAS ainsi que son expression seront analysés chez les mutants, ce qui permettra de définir l'impact direct de la *O*-GlcNAcylation sur la stabilité de la FAS et ce en fonction de chaque site de O-GlcNAcylation (si la FAS en présente plusieurs).

Plusieurs études ont montré qu'il existe une compétition entre la *O*-GlcNAcylation et la phosphorylation des protéines, les deux modifications jouant un rôle antagoniste sur leur stabilité (Figure 35). Par exemple, la protéine p53 est stabilisée sous sa forme *O*-GlcNAcylée. En effet, la *O*-GlcNAcylation sur la sérine 149 bloquerait la phosphorylation de la thréonine 155, indispensable à sa dégradation protéasomale (Yang et al., 2006).

Concernant la FAS, nous avons montré que, dans le foie, sa dégradation est protéasomale (Figure 47). Un type de régulation similaire à celui de la protéine p53 pourrait exister : la *O*-GlcNAcylation de la FAS empêcherait sa phosphorylation et donc sa dégradation subséquente (Figure 35). Nous avons ainsi mis en évidence que l'augmentation des niveaux de *O*-GlcNAcylation induit une nteraction entre la FAS et la déubiquitinylase USP2a : cela se traduit par la déubiquitinylation de la FAS, ce qui la protège de la dégradation.

De la même façon, il serait intéressant d'étudier l'interaction entre la FAS et l'ubiquitine ligase COP1 en fonction des niveaux de *O*-GlcNAcylation.

#### 3) Rôle sur l'activité de la FAS

Afin de relier la *O*-GlcNAcylation de la FAS, sa stabilisation et l'accumulation de lipides dans le foie, nous avons mesuré l'activité de la FAS dans des conditions de niveaux de *O*-GlcNAcylation variables. Pour mesurer l'activité de la FAS, nous avons utilisé deux approches différentes. Dans un premier temps, en collaboration avec le Dr. Anne Delmont, nous avons dosé par GC-MS (gas chromatography–mass spectrometry) les différentes espèces lipidiques présentes dans les homogénats de foies des souris. Cependant, le dosage des AG présents dans le foie n'est pas uniquement le reflet de la lipogenèse et de l'activité de la FAS. En effet, les AG peuvent également provenir, entre autres, de la lipolyse du tissu adipeux.

Nous avons mis au point le dosage de l'activité enzymatique de la FAS par spectrophotométrie. L'ajout du NADPH,H<sup>+</sup> dans les homogénats de foie permet de suivre l'activité de la FAS par décroissance de la densité optique due à son oxydation (formation de NADP<sup>+</sup>). Toutefois, d'autres enzymes comme la glutathion réductase ou encore la HMG-CoA réductase ont pour co-facteur le NADPH. C'est pourquoi, une étape de stabilisation de la DO après l'ajout du NADPH,H<sup>+</sup> est nécessaire. Puis le deuxième substrat de la FAS, le malonyl CoA est ajouté afin de mesurer spécifiquement son activité. Par cette technique, nous avons démontré que l'activité de la FAS corrèle avec ses niveaux de *O*-GlcNAcylation. Cependant une question subsiste : l'augmentation de l'activité de la FAS est-elle directement due à une augmentation de sa *O*-GlcNAcylation ou/et est-elle due à une augmentation de sa stabilisation par *O*-GlcNAcylation ?



**Figure 48 :** Représentation schématique de la séquence protéique de la FAS et modélisation moléculaire de la position d'un site potentiellement *O*-GlcNAcylé sur la structure 3D de l'activité b-cétoacylsynthase de la FAS.

(A) Les différentes activités de la FAS sont schématisées. Les sites prédictifs de *O*-GlcNAcylation obtenus par les sites YinOYang et dbOGAP sont marqués d'une flèche et les sites actifs en rouge. (B) La modélisation moléculaire a été réalisée à partir de la structure 3D de la  $\beta$ -cétoacyl synthase.

Afin de répondre à cette question, il serait intéressant de renouveler l'expérience de déglycosylation de la FAS par la  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase puis de mesurer l'activité des formes déglycosylées. Or cette expérience a permis d'établir que l'expression de la FAS est diminuée lorsque celle-ci est déglycosylée. Elle sera donc réalisée en présence de MG132 afin d'inhiber la dégradation des formes déglycosylées de la FAS et de doser l'activité résiduelle des formes non *O*-GlcNAcylées.

Nous avons entrepris des études *in silico* afin de déterminer le rôle potentiel de la *O*-GlcNAcylation de certains résidus fondamentaux pour l'activité de la FAS. Nous avons, dans un premier temps, utilisé deux serveurs de prédiction des sites de *O*-GlcNAcylation (dbOGAP et YinOYang) pour déterminer les résidus potentiels *O*-GlcNAcylés sur la séquence de la FAS murine.

Nous nous sommes focalisés sur les sites potentiels de O-GlcNAcylation localisés au niveau de deux activités de la FAS : la  $\beta$ -cétoacyl synthase et la thioestérase. En effet, la  $\beta$ -cétoacyl synthase, présente dans la partie N-terminale de la protéine, constitue la première activité de la FAS en condensant l'acétylCoA et le malonylCoA. La thioestérase, quant à elle positionnée en position C-terminale, est la dernière activité de la FAS responsable du relargage de l'acylCoA formé. Au niveau de la β-cétoacyl synthase, deux sites sont potentiellement O-GlcNAcylés : la sérine 162 et la sérine 347. Au niveau de la thioestérase, la sérine 2500 est un candidat potentiel de O-GlcNAcylation. En collaboration avec le Pr. Gérard Vergoten, nous avons déterminé, par modélisation moléculaire l'emplacement des sites potentiellement O-GlcNAcylés sur la structure tridimensionnelle des différentes activités de la FAS (Figure 48). La cristallisation de la protéine dans son ensemble n'étant pas faisable (la partie C-terminale étant trop labile), seule la cristallisation de chacune des activités a pu être réalisée. De manière intéressante, la sérine en position 162 se trouve dans un environnement très proche du site actif de la  $\beta$ -cétoacyl synthase contenant un groupement SH (Figure 48). Nous pouvons alors émettre l'hypothèse que la présence d'un résidu O-GlcNAc proche du site actif module l'activité de l'enzyme.



**Figure 49** : Schéma hypothétique de la régulation de la GK et de la FAS en condition pathologique d'hyperglycémie à jeun.

En condition pathologique, hyperglycémie à jeun, il est possible que l'augmentation anormale des niveaux de *O*-GlcNAcylation conduise à une *O*-GlcNAcylation anormale de la GK et de la FAS. La *O*-GlcNAcylation de ces protéines stabilise leur expression. De plus, l'augmentation des niveaux de *O*-GlcNAcylation est en corrélation avec l'augmentation de l'activité enzymatique de la FAS conduisant à une production anormale d'acides gras au niveau du foie pouvant induire la stéatose hépatique.

<u>Abréviations</u> : AMPK : AMP-activated protein kinase, GK : glucokinase, GKRP : glucokinase regulatory protein, NLS: nuclear localization signal, G6P : glucose-6-phosphate, HBP : hexosamine biosynthesis pathway, FAS : fatty acid synthase.

# IV. Conclusion

Pour résumer, à jeun, la GK interagit avec sa protéine régulatrice, la GKRP et est inactive. Concernant la FAS, elle est peu produite (niveaux d'ARNm et protéique faibles) et par conséquent peu active.

A l'état nourri, la GK est *O*-GlcNAcylée. Nous pouvons imaginer que sa *O*-GlcNAcylation empêche l'interaction entre la GK et la GKRP ou induit le relargage de la GK dans le cytoplasme où l'enzyme produit le G6P. Dans le même temps, nous avons également montré que la FAS est *O*-GlcNAcylée et qu'une augmentation des niveaux de *O*-GlcNAcylation rend la FAS plus active.

Une des caractéristiques de certaines pathologies telles que l'obésité ou le diabète de type 2 est une hyperglycémie à jeun. La *O*-GlcNAcylation étant dépendante des taux de glucose, l'hyperglycémie induit une augmentation des niveaux de *O*-GlcNAcylation.

Nous avons montré, au cours de ma thèse, qu'une augmentation des niveaux de *O*-GlcNAcylation conduit à la stabilité de la GK et de la FAS et à l'augmentation de l'activité enzymatique de la FAS. Par conséquent, dans ces pathologies (obésité, diabète de type 2) il est probable que l'augmentation aberrante des niveaux de *O*-GlcNAcylation soit en partie responsable de l'augmentation du flux de glucose vers la lipogenèse et la production anormale d'acides gras, caractéristiques de la stéatose hépatique (Figure 49).

Perspectives de recherche :

Régulation de la 7AS par

0-GlcNAcylation au cours

du cycle cellulaire.

## I. <u>Contexte de l'étude</u>

Dans la première partie de ma thèse, nous avons évalué le rôle de la *O*-GlcNAcylation sur l'expression de la FAS dans un contexte de lipogenèse. Cependant, il serait également intéressant d'étudier le rôle de cette modification sur l'expression de la FAS au cours de la prolifération cellulaire.

L'implication de la *O*-GlcNAcylation au cours du cycle cellulaire a été proposée très tôt. En effet, de nombreuses protéines sont *O*-GlcNAcylées en réponse aux facteurs mitogéniques. Dans notre équipe, le rôle essentiel de la *O*-GlcNAcylation au cours du cycle cellulaire a été montré en utilisant comme modèle les ovocytes de Xénope. Les auteurs ont montré une augmentation des niveaux de *O*-GlcNAcylation au cours de la phase G2/M (Lefebvre 2004 Dehennaut et al., 2007, 2008b) et une diminution globale des niveaux de *O*-GlcNAcylation pendant la phase G1/S probablement concécutive à une augmentation de l'activité de l'OGA (Drougat et al., 2012). Enfin, une étude a montré que l'expression et l'activité catalytique de l'OGT sont essentielles pour la transition G0/G1 (Olivier-Van Stichelen et al., 2012a).

Concernant le rôle de la FAS au cours de la prolifération, il est essentiel. En effet, la FAS contrôle de manière indirecte la biosynthèse des phospholipides nécessaires à la formation des membranes biologiques. De plus, elle joue un rôle majeur dans la composition des « lipides rafts » nécessaires pour la localisation correcte et l'activité des récepteurs impliqués dans l'activation des voies de signalisation en réponse aux facteurs mitogènes.

Au vu du rôle de la *O*-GlcNAcylation et de la FAS au cours du cycle cellulaire, le but à long terme du projet serait de trouver un lien entre les désordres nutritionnels, les niveaux de *O*-GlcNAcylation aberrants, l'expression de la FAS et une prolifération anormale.

Sur ce sujet, nous avons publié une perspective regroupant l'ensemble des données et des hypothèses sur la régulation de la FAS par *O*-GlcNAcylation dans les cellules cancéreuses. En effet, une augmentation des niveaux de *O*-GlcNAcylation et une surexpression de la FAS sont deux caractéristiques des cellules cancéreuses et plusieurs voies régulant la FAS par l'OGT et la *O*-GlcNAcylation sont envisageables.

En effet, la *O*-GlcNAcylation régule la FAS à un niveau transcriptionnel et en modifiant, sa localisation, son homodimérisation et sa dégradation engendrant la modulation de son activité enzymatique.

**Baldini, S.F**., and Lefebvre, T. (2016). O-GlcNAcylation and the Metabolic Shift in High-Proliferating Cells: All the Evidence Suggests that Sugars Dictate the Flux of Lipid Biogenesis in Tumor Processes. Front. Oncol. *6:6*.





# O-GlcNAcylation and the Metabolic Shift in High-Proliferating Cells: All the Evidence Suggests that Sugars Dictate the Flux of Lipid Biogenesis in Tumor Processes

#### Steffi F. Baldini and Tony Lefebvre\*

University Lille, CNRS, UMR 8576, UGSF, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Lille, France

#### OPEN ACCESS

#### Edited by:

Leonardo Freire-de-Lima, Federal University of Rio de Janeiro. Brazil

#### Reviewed by:

Claire Perks, University of Bristol, UK Alexandre Morrot, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil

#### \*Correspondence:

Tony Lefebvre tony.lefebvre@univ-lille1.fr

#### Specialty section:

This article was submitted to Molecular and Cellular Oncology, a section of the journal Frontiers in Oncology

Received: 25 November 2015 Accepted: 08 January 2016 Published: 22 January 2016

#### Citation:

Baldini SF and Lefebvre T (2016) O-GlcNAcylation and the Metabolic Shift in High-Proliferating Cells: All the Evidence Suggests that Sugars Dictate the Flux of Lipid Biogenesis in Tumor Processes. Front. Oncol. 6:6. doi: 10.3389/fonc.2016.00006 Cancer cells are characterized by their high capability to proliferate. This imposes an accelerated biosynthesis of membrane compounds to respond to the need for increasing the membrane surface of dividing cells and remodeling the structure of lipid microdomains. Recently, attention has been paid to the upregulation of *O*-GlcNAcylation processes observed in cancer cells. Although *O*-GlcNAcylation of lipogenic transcriptional regulators is described in the literature (e.g., FXR, LXR, ChREBP), little is known about the regulation of the enzymes that drive lipogenesis: acetyl co-enzyme A carboxylase and fatty acid synthase (FAS). The expression and catalytic activity of both FAS and *O*-GlcNAc transferase (OGT) are high in cancer cells but the reciprocal regulation of the two enzymes remains unexplored. In this perspective, we collected data linking FAS and OGT and, in so doing, pave the way for the exploration of the intricate functions of these two actors that play a central role in tumor growth.

#### Keywords: FAS, O-GlcNAcylation, OGT, cancer, cell proliferation

Fatty acids are not only a form of energy storage but are also major components of biological membranes that delimit cells and organelles. They also govern essential biological functions, which include signal transduction and cell signaling, by forming exchange platforms between extracellular and intracellular media, in which signaling proteins are anchored.

Fatty acids are provided either by diet or *de novo* synthesis from carbohydrates. This metabolic pathway, called lipogenesis, is governed by fatty acid synthase (FAS), an enzyme upregulated in cancer. The activity and expression of O-GlcNAc transferase (OGT) that catalyzes O-GlcNAcylation processes in a nutrient-dependent manner are also increased in tumor cells. Consequently, increases in fatty acids production and O-GlcNAcylation levels are observed in cancer. Both enzymes indirectly use the same substrate, glucose, whose flux is potentiated in cancer cells. Moreover, FAS and a fraction of OGT are in close proximity at the plasma membrane. Therefore, a cross-regulation between FAS and OGT is likely to exist.

### FAS AND OGT ARE UPREGULATED IN CANCER

In physiological conditions, circulating lipids supply most human tissues with fatty acids. In striking contrast, high-proliferating cancer cells use increased fatty acid synthesis to support their rate of division (1, 2). *De novo* lipogenesis converts glucose to fatty acids. First, glucose is metabolized

into pyruvate, the end product of glycolysis that in turn enters the mitochondria to be activated into acetyl-CoA (**Figure 1**). The Lardy cycle enables the release of acetyl-CoA in the cytosol where lipogenesis takes place. Acetyl-CoA is carboxylated by Acetyl-CoA Carboxylase (ACC) to form malonyl-CoA. Malonyl-CoA and acetyl-CoA are the substrates of FAS that forms the final product, palmitoyl-CoA (C16:0). Longer fatty acids (e.g., stearic acid, C18:0) are produced by elongases, and mono-insaturated palmitoleoyl-CoA (C16:1) and oleyl-CoA (C18:1) are produced by SCD-1 (Stearoyl-CoA desaturase 1). ACC, FAS, and SCD-1 are the main enzymes that control lipogenesis (3–6).

Overexpression of FAS and enhancement of its activity represent one of the most frequent phenotypic alterations in tumor cells. FAS is overexpressed in several human carcinomas, such as breast (7), colon (8), esophageal (9), lung (10), melanoma (11), ovarian (12), pancreatic (13), prostate (14), and stomach (15) cancers. Injection of transgenic mice with prostate cancer cells overexpressing FAS leads to the development of adenocarcinomas (16). On the contrary, the FAS inhibitor C75 drives apoptosis in human breast cancer cells (17, 18). ACC is overexpressed in breast (19) and prostate cancers, and blockade of its expression induces growth inhibition of cancer cells (20). Additionally, an elevated SCD-1 expression results in cancer cell proliferation (21), whereas its decrease results in cell death (22).

Long-chain saturated fatty acids (LCSFA) are crucial for the building of lipid microdomains, or detergent-resistant membranes (DRMs). DRMs ensure the correct localization and activation of receptors that potentiate signaling pathway activation and, consequently, cell proliferation (1, 23). Moreover, the switch from polyunsaturated to saturated and mono-unsaturated fatty acids in the composition of their membranes endows cancer cells with a better resistance to lipid peroxidation and, therefore, to oxidative stress-induced cell death (24). Furthermore, the increase in membrane density and compaction limits drug entry, rendering tumor cells more resistant to therapy. Finally, fatty acids contribute to the production of secondary messengers, such as phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3) and lysophosphatic acid (LPA), that activate, respectively, the mitogenic PI3-kinase/Akt pathway (25) and G protein coupled-receptors that promote cancer aggressiveness (26). Consequently, fatty acids confer survival, resistance to damage, and aggressiveness on cancer cells.



**FIGURE 1** | **Regulation of fatty acid synthase by O-GlcNAcylation,** *Terra incognita.* FAS expression and O-GlcNAcylation levels are dependent on glucose concentrations. Following its entry into the cell, glucose can engage in different metabolic pathways depending on the cell type and the physiological context (glycolysis, glycogenogenesis, pentose phosphate pathway, etc.). HBP converts a fraction of glucose into UDP-GlcNAc, the donor for O-GlcNAcylation processes. Either for storing energy or for the biosynthesis of membranes of proliferating cells, a large pool of glucose can be used for making fatty acids of which FAS (fatty acid synthase) is a key enzyme. FAS forms a head-to-head X-shaped homodimer. Each 273 kDa-subunit of FAS is an assembly line of fatty acids endowed with seven different catalytic activities. First, the acetyl moiety provided by acetyl-CoA is transferred to the thiol group of the phosphopantetheine part of ACP (acyl carrier protein) that transports the growing fatty acid chain from one catalytic domain to another via the acetyltransferase (AT); it is presented to ketoacylsynthase (KS). Then, malonyl transferase (MT) transfers the malonyl moiety from malonyl-CoA to ACP, and KS condensates the malonyl and acetyl groups. The  $\beta$ -ketoacyl-ACP is modified by a succession of three reactions. Ketoreductase (KR) reduces  $\beta$ -ketoacyl to a  $\beta$ -hydroxyl intermediate; a dehydratase (DH) produces a  $\beta$ -enoyl-ACP, which is reduced by the enoyl reductase (ER) to supply a saturated acyl chain elongated by a two-carbon unit. This product is finally released by the thoesterase activity (TE). Since there is a close Relationship between intracellular glucose, *O*-GlcNAcylation levels, and activation of glucido-lipidic metabolism, a link between OGT, O-GlcNAcylation level, expression, and activity of FAS should exist. In cancer cells, the increased expression of OGT in the close proximity of FAS increasing its activity and, thus, to an expansion of membrane surface necessary for cell proliferation.

Glucose consumption is vital for most living cells. In normal cells, glucose is catabolized to pyruvate through glycolysis (**Figure 1**). Then, pyruvate is converted to acetyl-CoA and oxidized to carbon dioxide via the mitochondrial tricarboxylic acid (TCA) cycle for maximal energy production. Cancer cells exhibit a deregulated glucido-lipidic metabolism. Indeed, cancer cells import glucose at a higher rate than non-cancer cells and prefer to use glycolytic metabolism instead of oxidative phosphorylation even in the presence of oxygen. This choice enables most cancer cells to produce the elementary building-bricks they need to divide (amino-acids, nucleotides, fatty acids,... etc.). Consequently, glycolytic enzymes and glucose transporters are upregulated. This adaptive metabolic shift is called the "Warburg effect" (27).

Interestingly, 2–3% of glucose coming into the cell enters the HBP (hexosamine biosynthesis pathway) whose end product is UDP-GlcNAc. This nucleotide sugar is at the crossroads of many metabolic pathways: carbohydrates, glutamine, glucogenic and ketogenic amino-acids, nucleotides, and fatty acids. UDP-GlcNAc is a substrate for almost all glycosylations, including O-GlcNAcylation (28, 29). O-GlcNAcylation is a highly dynamic PTM (posttranslational modification) controlled by two antagonistic enzymes: OGT transfers the GlcNAc group onto serine or threonine residues of nucleocytoplasmic (30) and mitochondrial (31) proteins, and O-GlcNAcase removes the sugar (32). Thus, O-GlcNAcylation regulates diverse biological processes in a nutrient-dependent manner. O-GlcNAcylation occurs on several hundred proteins, which are mainly phosphoproteins. Accordingly, O-GlcNAcylation and phosphorylation can antagonize each other, at the same site or at an adjacent one, or act in concert (33). Moreover, a deregulation of O-GlcNAcylation homeostasis leads to disorders, such as diabetes, cancer, neurological, or cardiovascular diseases (34). Since, cancer cells accelerate the uptake of glucose and glutamine, an increase in HBP flux and aberrant O-GlcNAcylation contents result. Elevation of O-GlcNAcylation levels is observed in several kinds of cancers, such as breast (35), lung (36), colorectal (37), liver (38), bladder (39), prostate (40), chronic lymphocytic leukemia (CCL) (41), and pancreatic (42) cancers, suggesting that hyper-O-GlcNAcylation precedes or accompanies tumor emergence and contributes to cell transformation. The O-GlcNAcylation elevation observed in cancer cells seems also to be caused by an increased OGT expression. Indeed, OGT is overexpressed in breast (35), prostate (40), colorectal (36, 43), and pancreatic cancer cells (42). Interestingly, the inhibition of OGT in breast cancer cells induces a reduction in cell proliferation, invasion, and migration, and a decrease in tumor growth (35, 44).

An upregulation of FAS and OGT, and consequently an elevated production of fatty acids combined with an increase in the O-GlcNAcylation level are observed in cancer. Both enzymes indirectly use the same substrate, glucose, and glutamine for OGT, the fluxes of which are accelerated in tumor cells (**Figure 1**). Moreover, FAS and a fraction of OGT are in close proximity at the plasma membrane. Therefore, we postulate that FAS favors the interaction of OGT with phosphoinositides via its PPO (PIP-binding activity of OGT) domain and in turn OGT controls the expression and catalytic activity of FAS (**Figure 1**).

### **FUTURE DIRECTIONS**

Glucose and insulin control the expression of FAS at the transcriptional level through the activity of four transcription factors: carbohydrate-responsive element-binding protein (ChREBP), liver X receptors (LXR), farnesoid X receptor (FXR), and sterol regulatory element-binding proteins (SREBP) (Figure 2, pathway 1). ChREBP is a transcription factor that mediates glucose-induced gene expression, including those encoding the glycolytic enzyme L-pyruvate kinase (L-PK) and lipogenic enzymes, ACC, and FAS. Glucose activates ChREBP by controlling its nuclear import (45) and ChREBP plays an essential role in the regulation of energy metabolism. A deregulation of ChREBP activity or its expression is involved in metabolic diseases, such as hepatic steatosis (46). Moreover, a deregulation of ChREBP is described in colorectal cancer and hepatoblastoma. A suppression of ChREBP decreases aerobic glycolysis, de novo lipogenesis, and nucleotide biosynthesis (47). Since cancer cells overconsume glucose and increase the biosynthesis of fatty acids, the role of ChREBP as a key-mediator of glucose-induced lipogenic gene expression was explored in the context of tumor metabolism (48). In response to high glucose influx as observed in cancer cells, ChREBP is activated in two distinct ways. First, controversial studies reported that Xu5P and Glc6P, two glucose metabolites, promote the translocation of ChREBP into the nucleus and binding to response elements (49). Second, ChREBP physically interacts with OGT and is O-GlcNAcylated in liver cells (50). Inhibition of OGA, or overexpression of OGT, significantly increases the transcriptional activity of ChREBP in response to high glucose. OGA-treated db/db mice display a decrease in FAS expression and escape hepatic steatosis in correlation with a downregulation of the O-GlcNAcylation of ChREBP (50, 51). LXRs belong to the superfamily of nuclear hormone receptors activated by the natural ligands oxysterols (52). LXRs bind to LXR-responsive elements (LXRE) in cooperation with RXR (9-cis retinoic acid receptor) and activate FAS transcription. LXRs either directly bind to the promoter of FAS, or indirectly increases the expression of FAS by upregulating the transcription of ChREBPa, the short isoform ChREBPß and SREBP1c (53, 54). LXRs are O-GlcNAc-modified (55, 56) and O-GlcNAcylation enhances their ability to regulate FAS expression. Furthermore, O-GlcNAcylated LXRs have increased capability to activate the transcription of SREBP1c and ChREBP, which reinforces the expression of FAS. Regarding SREBPs less is known about their potential regulation by O-GlcNAcylation. Of the three isoforms documented, SREBP1a, SREBP1c and SREBP2 (57), only SREBP1c is involved in the expression of FAS (58). No studies have focused on the regulation of SREBP by O-GlcNAcylation, while it is thought that GFAT-1, the rate-limiting enzyme of HBP, interferes with the activity of SREBP1 and FAS (59). Interestingly, an FXR response element is found in the promoter region of FAS. FXR is another member of the nuclear receptor superfamily and is activated by bile acids, chenodeoxycholic acid being the most potent. Unlike other transcription factors, FXR downregulates FAS expression (60). It was recently shown that FXR and OGT interact (61). FXR is O-GlcNAcylated and this modification enhances FXR transcriptional activity and stability. Interestingly, FXR interacts with ChREBP through its ATF-1 domain, which also bears the



*O*-GlcNAcylation site (61, 62). However, the biological relevance of FXR *O*-GlcNAcylation in the context of its interaction with ChREBP remains to be elucidated. Transcriptional processes may account for a large part of the upregulation of FAS in cancer. What we do not know is whether, and if so, how, an elevation of the *O*-GlcNAcylation status of ChREBP, SREBP, and LXR, all driving FAS transcription, mediates the lipogenic enzyme overexpression in cancer cells, and, on the opposite, if *O*-GlcNAcylation of FXR reduces its expression. Further studies are necessary to highlight this intriguing problem.

O-GlcNAcylation and phosphorylation are two PTMs occurring on serine and threonine residues of nucleocytoplasmic proteins. They not only can compete at the same or at adjacent sites of the same protein in a reciprocal manner, but can also act synergistically: treatment of neuroblastoma cells with the wide range phosphatase inhibitor okadaic acid reduces O-GlcNAcylation (64), while inhibition of GSK3 $\beta$  increases O-GlcNAcylation of heat shock and cytoskeletal proteins but decreases the O-GlcNAcylation of other proteins such as transcription factors (65). These observations prove that the interplay between phosphorylation and O-GlcNAcylation is complex and should result from diverse complexes, including OGT, OGA, kinases, and phosphatases (66). Little is known about the regulation of FAS by PTMs. FAS is phosphorylated by AMP-activated protein kinase (AMPK) in 3T3-L1 cells and the use of AMPK activators reduces FAS activity without affecting its expression level (67). An upregulation of FAS by occupation of the AMPK phosphorylation site by O-GlcNAc is hypothetical, but deserves to be explored (Figure 2, pathway 2). In addition, OGT is a substrate of AMPK (at T444) and reciprocally, AMPK is O-GlcNAcylated on at least two of its subunits (68). The potential occurrence of a ternary complex FAS-OGT-AMPK may explain how the lipogenic enzyme is regulated by phosphorylation and O-GlcNAcylation either directly, involving modification by AMPK-directed phosphorylation and/or O-GlcNAcylation, or indirectly, with phosphorylation by AMPK through a preliminary O-GlcNAcylation of the kinase or

O-GlcNAcylation by OGT following a preliminary modification of the glycosyltransferase by AMPK (pT444).

O-GlcNAc transferase and FAS might reciprocally regulate each other in lipid microdomains and O-GlcNAcylation might interfere with FAS subcellular localization. It was demonstrated that FAS is tyrosine-phosphorylated when in a complex with HER-2 (human epidermal growth factor receptor-2) in breast cancer cells (69). Phosphorylation of FAS by HER-2 leads to an increase in FAS catalytic activity. OGT is also tyrosine-phosphorylated and it was proposed that the insulin receptor is responsible for this modification (70). Moreover, OGT interacts with the plasma membrane via the PPO domain (71) and more particularly with DRMs in response to insulin (72). DRMs, also known as lipid microdomains or lipid rafts, are membrane domains enriched with cholesterol, sphingolipids, and gangliosides that concentrate modulators of signal transduction, trafficking, and cell signaling. Lipid rafts are fundamental for cell adhesion, migration, and proliferation in physiological conditions and in cancer (73). FAS controls the production of phospholipids found in DRMs of cancer cells (1) and a subset of FAS itself is resident in these rafts (74). Consequently, in response to insulin or to any other mitogenic signal, FAS might be activated by tyrosine-phosphorylation. In turn, raft-specific phospholipids and more precisely phosphoinositides might be produced, offering an interaction surface for OGT (Figure 2, pathway 3). FAS and OGT might physically interact: OGT may modify FAS and signaling components to upregulate their activities. This interaction could induce an increase in FAS activity in lipid microdomains and allow the formation of a larger cluster of signaling receptors and a more significant activation of signaling pathways, leading to an increase in cell proliferation, contributing to the development of cancer. It would be of interest to determine whether a synergistic effect between FAS and OGT exists in lipid rafts, accentuating their respective activities. This hypothesis is supported by reports showing that, in Drosophila (75), HepG2 cells (72), MCF7 cells (76), and recently in human gastric cancer cells (77), OGT activity is crucial for activating mitogen signaling pathways.

Another question remains open: does O-GlcNAcylation regulate FAS catalytic activity? FAS is only enzymatically active in the form of a dimer (78), the dissociation of the enzyme into monomers rendering it inactive (79). The assembly of the two subunits is promoted by a high concentration of fructose-2,6-bisphosphate (F2,6BP), a metabolic cue. Therefore, since in cancer cells glucose uptake is increased, the rate of production of F2,6BP is enhanced, promoting FAS assembly and activity. A parallel can be drawn with Phosphofructokinase-1 (PFK-1) whose allosteric activity is positively regulated by F2,6BP. O-GlcNAcylation of PFK-1 blocks the interaction with F2,6BP preventing the oligomerization of the enzyme and the flux of glucose is rerouted to the pentose phosphate pathway (63). Conversely, a regulation of FAS activity by promoting its dimerization by O-GlcNAcylation could be envisioned (Figure 2, pathway 4). O-GlcNAcylation can impact the function of FAS by directly modifying residues crucial for one or several of its seven catalytic activities. In our hands, in silico studies of the 3D structure of FAS have indicated a potential O-GlcNAcylation site in close proximity to the ketoacylsynthase (KS) active site (Figure 2, pathway 5). As discussed

above, these studies must be pushed forward by identifying the O-GlcNAcylation sites through mass spectrometry.

Lastly, O-GlcNAcylation might regulate the fate of FAS. FAS is targeted for degradation by interacting with the E3-ubiquitin ligase p38-phosphorylated COP1 and the adapter protein Srchomology 2 (SH2) domain-containing tyrosine phosphatase Shp2 (80). To escape the ubiquitination pathway, FAS interacts with the ubiquitin-specific protease-2a USP2a, a member of the DUB (deubiquitinating enzyme) family. By binding to FAS, USP2a increases the half-life of the enzyme in prostate cancer and, therefore, plays a prominent role in cancer progression (81). In addition, USP2a overexpression protects human prostate cancer from apoptosis (82). Altogether, these observations indicate that USP2a and FAS contribute to tumorigenesis. Like USP2a, OGT is also protective against protein degradation for a subset of proteins [for review, see Ref. (83)] among which  $\beta$ -catenin (43) and PGC-1 $\alpha$  (84). O-GlcNAcylation of  $\beta$ -catenin at T41 prevents the phosphorylation of the D-box (43) and potentially the subsequent recruitment of the E3-ubiquitin ligase  $\beta$ -TrCp. The host cell factor C1 (HCF-1) recruits OGT to O-GlcNAcylate PGC-1α (84); the O-GlcNAcylation facilitates the recruitment of BAP1 to deubiquitinate PGC-1 $\alpha$ , thereby stabilizing its expression level. Nevertheless, unlike  $\beta$ -catenin, the sequential events that decide the fate of FAS are poorly understood; it is not known, for example, whether phosphorylation of FAS promotes its ubiquitination. Also, since FAS is not a short half-life protein, it is unlikely that a PEST sequence or a D-box regulates the proteasomal degradation of the protein. Accordingly, it might be proposed that OGT interacts with FAS either to promote the recruitment of USP2a or to prevent ubiquitination by COP1, both effects leading to increased-FAS half-life (Figure 2, pathway 6).

### CONCLUSION

Cancer cells are characterized by their high capacity for division. To supply their need for carbon elements, these cells increase the uptake of glucose and move from oxidative to glycolytic metabolism. This metabolic shift leads to the overexpression of lipogenic enzymes, especially FAS. In addition, through the increased flux of HBP, cancer cells display higher levels of OGT and, therefore, of *O*-GlcNAcylation. Here, we have attempted to compile potential cross-regulations between FAS and OGT. We have identified pathways to explore that may highlight how the lipogenic enzyme could be finely tuned by *O*-GlcNAcylation.

First, upregulating glycolysis impacts the production of the allosteric activator F2,6BP. Checking whether this metabolic cue controls the homodimerization of FAS in an O-GlcNAc-dependent manner should be of great interest considering its impact on the oligomerization of another pivotal metabolic enzyme, PFK-1. However, at this time, no information about the O-GlcNAc modification of FAS is available. This lack of data may result from the high molecular weight of the enzyme: analyzing the status of O-GlcNAcylation and, what is more, mapping sites of modification on a protein containing nearly 3000 amino-acids is challenging. If such a modification of FAS occurs, the consequent regulation of one or more of its catalytic activities is conceivable.

Regulation of FAS expression is tightly correlated to its mRNA level. Transcription of FAS is principally under the control of glucose and insulin. Glucose activates ChREBP that in turn induces FAS transcription in cooperation with insulin-activated SREBP1c. LXR also increases FAS expression by binding to the promoters of FAS and SREBP1c. ChREBP, SREBP1c, and LXR are activated by O-GlcNAc modification, either directly or indirectly. By contrast, FXR downregulates FAS transcription and it is suggested that O-GlcNAcylation of this nuclear receptor potentiates ChREBP activity and, accordingly, FAS expression. Overall, it appears that O-GlcNAcylation drives the transcription of FAS positively.

The reciprocal interplay between phosphorylation and O-GlcNAcylation modulates the properties of numerous proteins. FAS activity is regulated at the posttranslational level by AMPK-mediated phosphorylation; thus, the complex OGT-AMPK-FAS might exist but remains to be explored.

Fatty acid synthase and a small subset of OGT are resident in lipid microdomains. This common localization suggests that the two enzymes can be modified and, therefore, activated by tyrosine-phosphorylation. Also, a modification of FAS by OGT is not at all unlikely. Moreover, the production of lipid raft-specific fatty acids may contribute to the recruitment of OGT and speed up the sub-localization of the putative partners and the activation of mitogen signaling. Finally, as described for several proteins, *O*-GlcNAcylation of FAS could be protective against ubiquitindependent degradation, by promoting interaction with USP2a or by preventing interaction with COP1.

#### REFERENCES

- Swinnen JV, Van Veldhoven PP, Timmermans L, De Schrijver E, Brusselmans K, Vanderhoydonc F, et al. Fatty acid synthase drives the synthesis of phospholipids partitioning into detergent-resistant membrane microdomains. *Biochem Biophys Res Commun* (2003) **302**:898–903. doi:10.1016/ S0006-291X(03)00265-1
- Jackowski S. Coordination of membrane phospholipid synthesis with the cell cycle. J Biol Chem (1994) 269:3858–67.
- Szutowicz A, Kwiatkowski J, Angielski S. Lipogenetic and glycolytic enzyme activities in carcinoma and nonmalignant diseases of the human breast. Br J Cancer (1979) 39:681–7. doi:10.1038/bjc.1979.120
- Kuhajda FP. Fatty-acid synthase and human cancer: new perspectives on its role in tumor biology. *Nutrition* (2000) 16:202–8. doi:10.1016/ S0899-9007(99)00266-X
- Mounier C, Bouraoui L, Rassart E. Lipogenesis in cancer progression (review). Int J Oncol (2014) 45:485–92. doi:10.3892/ijo.2014.2441
- Swinnen JV, Brusselmans K, Verhoeven G. Increased lipogenesis in cancer cells: new players, novel targets. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* (2006) 9:358–65. doi:10.1097/01.mco.0000232894.28674.30
- Milgraum LZ, Witters LA, Pasternack GR, Kuhajda FP. Enzymes of the fatty acid synthesis pathway are highly expressed in in situ breast carcinoma. *Clin Cancer Res* (1997) 3:2115–20.
- Rashid A, Pizer ES, Moga M, Milgraum LZ, Zahurak M, Pasternack GR, et al. Elevated expression of fatty acid synthase and fatty acid synthetic activity in colorectal neoplasia. *Am J Pathol* (1997) 150:201–8.
- Orita H, Coulter J, Tully E, Abe M, Montgomery E, Alvarez H, et al. High levels of fatty acid synthase expression in esophageal cancers represent a potential target for therapy. *Cancer Biol Ther* (2010) 10:549–54. doi:10.4161/ cbt.10.6.12727
- Visca P, Sebastiani V, Botti C, Diodoro MG, Lasagni RP, Romagnoli F, et al. Fatty acid synthase (FAS) is a marker of increased risk of recurrence in lung carcinoma. *Anticancer Res* (2004) 24:4169–73.

To date, the regulation of FAS activity and fate by *O*-GlcNAcylation, and even more so its crosstalk with OGT, have been neglected. Nevertheless, we consider this field of investigation of crucial importance since such a regulatory mechanism might confer a proliferative advantage on cells and induce tumor emergence.

#### **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

SB and TL contributed equally to the writing of the manuscript.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the University of Lille and the "Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)" for their financial support. SB is a recipient of a fellowship from the "Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche" and from the "Région Nord-Pas de Calais". The authors also wish to thank FRABio FR 3688 and Dr. Raymond J. Pierce (English native speaker from the Center for Infection & Immunity of Lille (CIIL), INSERM U1019 – CNRS UMR 8204, University of Lille, Pasteur Institute of Lille) for English editing of the paper.

#### FUNDING

University of Lille and Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).

- Innocenzi D, Alò PL, Balzani A, Sebastiani V, Silipo V, La Torre G, et al. Fatty acid synthase expression in melanoma. *J Cutan Pathol* (2003) 30:23–8. doi:10.1034/j.1600-0560.2003.300104.x
- Veigel D, Wagner R, Stübiger G, Wuczkowski M, Filipits M, Horvat R, et al. Fatty acid synthase is a metabolic marker of cell proliferation rather than malignancy in ovarian cancer and its precursor cells. *Int J Cancer* (2015) 136:2078–90. doi:10.1002/ijc.29261
- Alo PL, Amini M, Piro F, Pizzuti L, Sebastiani V, Botti C, et al. Immunohistochemical expression and prognostic significance of fatty acid synthase in pancreatic carcinoma. *Anticancer Res* (2007) 27:2523–7.
- Swinnen JV, Roskams T, Joniau S, Van Poppel H, Oyen R, Baert L, et al. Overexpression of fatty acid synthase is an early and common event in the development of prostate cancer. *Int J Cancer* (2002) **98**:19–22. doi:10.1002/ ijc.10127
- Kusakabe T, Nashimoto A, Honma K, Suzuki T. Fatty acid synthase is highly expressed in carcinoma, adenoma and in regenerative epithelium and intestinal metaplasia of the stomach. *Histopathology* (2002) 40:71–9. doi:10.1046/j.1365-2559.2002.01289.x
- Migita T, Ruiz S, Fornari A, Fiorentino M, Priolo C, Zadra G, et al. Fatty acid synthase: a metabolic enzyme and candidate oncogene in prostate cancer. J Natl Cancer Inst (2009) 101:519–32. doi:10.1093/jnci/djp030
- Zhou W, Simpson PJ, McFadden JM, Townsend CA, Medghalchi SM, Vadlamudi A, et al. Fatty acid synthase inhibition triggers apoptosis during S phase in human cancer cells. *Cancer Res* (2003) 63:7330–7.
- Kuhajda FP, Pizer ES, Li JN, Mani NS, Frehywot GL, Townsend CA. Synthesis and antitumor activity of an inhibitor of fatty acid synthase. *Proc Natl Acad Sci* U S A (2000) 97:3450–4. doi:10.1073/pnas.97.7.3450
- Ma J, Yan R, Zu X, Cheng J-M, Rao K, Liao D-F, et al. Aldo-keto reductase family 1 B10 affects fatty acid synthesis by regulating the stability of acetyl-CoA carboxylase-alpha in breast cancer cells. *J Biol Chem* (2008) 283:3418–23. doi:10.1074/jbc.M707650200
- 20. Brusselmans K, De Schrijver E, Verhoeven G, Swinnen JV. RNA interference-mediated silencing of the acetyl-CoA-carboxylase-alpha gene induces
growth inhibition and apoptosis of prostate cancer cells. *Cancer Res* (2005) **65**:6719–25. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0571

- Scaglia N, Caviglia JM, Igal RA. High stearoyl-CoA desaturase protein and activity levels in simian virus 40 transformed-human lung fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* (2005) 1687:141–51. doi:10.1016/j.bbalip.2004.11.015
- Scaglia N, Chisholm JW, Igal RA. Inhibition of stearoylCoA desaturase-1 inactivates acetyl-CoA carboxylase and impairs proliferation in cancer cells: role of AMPK. *PLoS One* (2009) 4:e6812. doi:10.1371/journal.pone.0006812
- Helms JB, Zurzolo C. Lipids as targeting signals: lipid rafts and intracellular trafficking. *Traffic* (2004) 5:247–54. doi:10.1111/j.1600-0854.2004.0181.x
- Rysman E, Brusselmans K, Scheys K, Timmermans L, Derua R, Munck S, et al. De novo lipogenesis protects cancer cells from free radicals and chemotherapeutics by promoting membrane lipid saturation. *Cancer Res* (2010) 70:8117–26. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3871
- Faes S, Dormond O. PI3K and AKT: unfaithful partners in cancer. Int J Mol Sci (2015) 16:21138–52. doi:10.3390/ijms160921138
- Ren J, Xiao Y, Singh LS, Zhao X, Zhao Z, Feng L, et al. Lysophosphatidic acid is constitutively produced by human peritoneal mesothelial cells and enhances adhesion, migration, and invasion of ovarian cancer cells. *Cancer Res* (2006) 66:3006–14. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1292
- Warburg O. On the origin of cancer cells. Science (1956) 123:309–14. doi:10.1126/science.123.3191.309
- Marshall S, Bacote V, Traxinger RR. Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. *J Biol Chem* (1991) 266:4706–12.
- 29. Torres CR, Hart GW. Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc. *J Biol Chem* (1984) **259**:3308–17.
- Kreppel LK, Blomberg MA, Hart GW. Dynamic glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Cloning and characterization of a unique O-GlcNAc transferase with multiple tetratricopeptide repeats. J Biol Chem (1997) 272:9308–15. doi:10.1074/jbc.272.14.9308
- Hu Y, Suarez J, Fricovsky E, Wang H, Scott BT, Trauger SA, et al. Increased enzymatic O-GlcNAcylation of mitochondrial proteins impairs mitochondrial function in cardiac myocytes exposed to high glucose. *J Biol Chem* (2009) 284:547–55. doi:10.1074/jbc.M808518200
- Gao Y, Wells L, Comer FI, Parker GJ, Hart GW. Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: cloning and characterization of a neutral, cytosolic beta-N-acetylglucosaminidase from human brain. J Biol Chem (2001) 276:9838–45. doi:10.1074/jbc.M010420200
- Wang Z, Gucek M, Hart GW. Cross-talk between GlcNAcylation and phosphorylation: site-specific phosphorylation dynamics in response to globally elevated O-GlcNAc. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2008) 105:13793–8. doi:10.1073/pnas.0806216105
- Lefebvre T, Dehennaut V, Guinez C, Olivier S, Drougat L, Mir A-M, et al. Dysregulation of the nutrient/stress sensor O-GlcNAcylation is involved in the etiology of cardiovascular disorders, type-2 diabetes and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* (2010) 1800:67–79. doi:10.1016/j.bbagen.2009.08.008
- Caldwell SA, Jackson SR, Shahriari KS, Lynch TP, Sethi G, Walker S, et al. Nutrient sensor O-GlcNAc transferase regulates breast cancer tumorigenesis through targeting of the oncogenic transcription factor FoxM1. *Oncogene* (2010) 29:2831–42. doi:10.1038/onc.2010.41
- Mi W, Gu Y, Han C, Liu H, Fan Q, Zhang X, et al. O-GlcNAcylation is a novel regulator of lung and colon cancer malignancy. *Biochim Biophys Acta* (2011) 1812:514–9. doi:10.1016/j.bbadis.2011.01.009
- Yehezkel G, Cohen L, Kliger A, Manor E, Khalaila I. O-linked β-N-acetylglucosaminylation (O-GlcNAcylation) in primary and metastatic colorectal cancer clones and effect of N-acetyl-β-d-glucosaminidase silencing on cell phenotype and transcriptome. *J Biol Chem* (2012) 287:28755–69. doi:10.1074/ jbc.M112.345546
- Zhu Q, Zhou L, Yang Z, Lai M, Xie H, Wu L, et al. O-GlcNAcylation plays a role in tumor recurrence of hepatocellular carcinoma following liver transplantation. *Med Oncol* (2011) 29:985–93. doi:10.1007/s12032-011-9912-1
- Rozanski W, Krzeslak A, Forma E, Brys M, Blewniewski M, Wozniak P, et al. Prediction of bladder cancer based on urinary content of MGEA5 and OGT mRNA level. *Clin Lab* (2012) 58:579–83.
- Lynch TP, Ferrer CM, Jackson SR, Shahriari KS, Vosseller K, Reginato MJ. Critical role of O-linked β-N-acetylglucosamine transferase in prostate cancer

invasion, angiogenesis, and metastasis. J Biol Chem (2012) 287:11070-81. doi:10.1074/jbc.M111.302547

- Shi Y, Tomic J, Wen F, Shaha S, Bahlo A, Harrison R, et al. Aberrant O-GlcNAcylation characterizes chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* (2010) 24(9):1588–98. doi:10.1038/leu.2010.152
- Ma Z, Vocadlo DJ, Vosseller K. Hyper-O-GlcNAcylation is anti-apoptotic and maintains constitutive NF-κB activity in pancreatic cancer cells. *J Biol Chem* (2013) 288:15121–30. doi:10.1074/jbc.M113.470047
- 43. Olivier-Van Stichelen S, Dehennaut V, Buzy A, Zachayus J-L, Guinez C, Mir A-M, et al. O-GlcNAcylation stabilizes  $\beta$ -catenin through direct competition with phosphorylation at threonine 41. *FASEB J* (2014) **28**:3325–38. doi:10.1096/fj.13-243535
- 44. Gu Y, Mi W, Ge Y, Liu H, Fan Q, Han C, et al. GlcNAcylation plays an essential role in breast cancer metastasis. *Cancer Res* (2010) 70:6344–51. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1887
- 45. Kawaguchi T, Takenoshita M, Kabashima T, Uyeda K. Glucose and cAMP regulate the L-type pyruvate kinase gene by phosphorylation/dephosphorylation of the carbohydrate response element binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2001) **98**:13710–5. doi:10.1073/pnas.231370798
- Denechaud P-D, Dentin R, Girard J, Postic C. Role of ChREBP in hepatic steatosis and insulin resistance. *FEBS Lett* (2008) 582:68–73. doi:10.1016/j. febslet.2007.07.084
- Tong X, Zhao F, Mancuso A, Gruber JJ, Thompson CB. The glucose-responsive transcription factor ChREBP contributes to glucose-dependent anabolic synthesis and cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2009) **106**:21660–5. doi:10.1073/pnas.0911316106
- Baraille F, Planchais J, Dentin R, Guilmeau S, Postic C. Integration of ChREBP-mediated glucose sensing into whole body metabolism. *Physiology* (2015) 30:428–37. doi:10.1152/physiol.00016.2015
- Filhoulaud G, Guilmeau S, Dentin R, Girard J, Postic C. Novel insights into ChREBP regulation and function. *Trends Endocrinol Metab* (2013) 24:257–68. doi:10.1016/j.tem.2013.01.003
- Guinez C, Filhoulaud G, Rayah-Benhamed F, Marmier S, Dubuquoy C, Dentin R, et al. O-GlcNAcylation increases ChREBP protein content and transcriptional activity in the liver. *Diabetes* (2011) 60:1399–413. doi:10.2337/ db10-0452
- Sakiyama H, Fujiwara N, Noguchi T, Eguchi H, Yoshihara D, Uyeda K, et al. The role of O-linked GlcNAc modification on the glucose response of ChREBP. *Biochem Biophys Res Commun* (2010) **402**:784–9. doi:10.1016/j. bbrc.2010.10.113
- Chen W, Chen G, Head DL, Mangelsdorf DJ, Russell DW. Enzymatic reduction of oxysterols impairs LXR signaling in cultured cells and the livers of mice. *Cell Metab* (2007) 5:73–9. doi:10.1016/j.cmet.2006.11.012
- Repa JJ, Liang G, Ou J, Bashmakov Y, Lobaccaro JM, Shimomura I, et al. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev* (2000) 14:2819–30. doi:10.1101/gad.844900
- Cha J-Y, Repa JJ. The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. *J Biol Chem* (2007) 282:743–51. doi:10.1074/jbc.M605023200
- Bindesbøll C, Fan Q, Nørgaard RC, MacPherson L, Ruan H-B, Wu J, et al. Liver X receptor regulates hepatic nuclear O-GlcNAc signaling and carbohydrate responsive element-binding protein activity. J Lipid Res (2015) 56:771–85. doi:10.1194/jlr.M049130
- Anthonisen EH, Berven L, Holm S, Nygård M, Nebb HI, Grønning-Wang LM. Nuclear receptor liver X receptor is O-GlcNAc-modified in response to glucose. *J Biol Chem* (2010) 285:1607–15. doi:10.1074/jbc. M109.082685
- Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* (2002) 109:1125–31. doi:10.1172/JCI0215593
- Diraison F, Motakis E, Parton LE, Nason GP, Leclerc I, Rutter GA. Impact of adenoviral transduction with SREBP1c or AMPK on pancreatic islet gene expression profile: analysis with oligonucleotide microarrays. *Diabetes* (2004) 53(Suppl 3):S84–91. doi:10.2337/diabetes.53.suppl\_3.S84
- Hsieh T-J, Lin T, Hsieh P-C, Liao M-C, Shin S-J. Suppression of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase-1 inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. J Cell Physiol (2012) 227:108–15. doi:10.1002/ jcp.22707

- Shen L-L, Liu H, Peng J, Gan L, Lu L, Zhang Q, et al. Effects of farnesoid X receptor on the expression of the fatty acid synthetase and hepatic lipase. *Mol Biol Rep* (2011) 38:553–9. doi:10.1007/s11033-010-0140-0
- Berrabah W, Aumercier P, Gheeraert C, Dehondt H, Bouchaert E, Alexandre J, et al. Glucose sensing O-GlcNAcylation pathway regulates the nuclear bile acid receptor farnesoid X receptor (FXR). *Hepatology* (2014) 59:2022–33. doi:10.1002/hep.26710
- Caron S, Huaman Samanez C, Dehondt H, Ploton M, Briand O, Lien F, et al. Farnesoid X receptor inhibits the transcriptional activity of carbohydrate response element binding protein in human hepatocytes. *Mol Cell Biol* (2013) 33:2202–11. doi:10.1128/MCB.01004-12
- Yi W, Clark PM, Mason DE, Keenan MC, Hill C, Goddard WA, et al. Phosphofructokinase 1 glycosylation regulates cell growth and metabolism. *Science* (2012) 337:975–80. doi:10.1126/science.1222278
- Lefebvre T, Alonso C, Mahboub S, Dupire MJ, Zanetta JP, Caillet-Boudin ML, et al. Effect of okadaic acid on O-linked N-acetylglucosamine levels in a neuroblastoma cell line. *Biochim Biophys Acta* (1999) 1472:71–81. doi:10.1016/ S0304-4165(99)00105-1
- Wang Z, Pandey A, Hart GW. Dynamic interplay between O-linked N-acetylglucosaminylation and glycogen synthase kinase-3-dependent phosphorylation. *Mol Cell Proteomics* (2007) 6:1365–79. doi:10.1074/mcp. M600453-MCP200
- Slawson C, Lakshmanan T, Knapp S, Hart GW. A mitotic GlcNAcylation/ phosphorylation signaling complex alters the posttranslational state of the cytoskeletal protein vimentin. *Mol Biol Cell* (2008) 19:4130–40. doi:10.1091/ mbc.E07-11-1146
- An Z, Wang H, Song P, Zhang M, Geng X, Zou M-H. Nicotine-induced activation of AMP-activated protein kinase inhibits fatty acid synthase in 3T3L1 adipocytes: a role for oxidant stress. *J Biol Chem* (2007) 282:26793–801. doi:10.1074/jbc.M703701200
- Bullen JW, Balsbaugh JL, Chanda D, Shabanowitz J, Hunt DF, Neumann D, et al. Cross-talk between two essential nutrient-sensitive enzymes: O-GlcNAc transferase (OGT) and AMP-activated protein kinase (AMPK). *J Biol Chem* (2014) 289:10592–606. doi:10.1074/jbc.M113.523068
- Jin Q, Yuan LX, Boulbes D, Baek JM, Wang YN, Gomez-Cabello D, et al. Fatty acid synthase phosphorylation: a novel therapeutic target in HER2-overexpressing breast cancer cells. *Breast Cancer Res* (2010) 12:R96. doi:10.1186/bcr2777
- Whelan SA, Lane MD, Hart GW. Regulation of the O-linked beta-N-acetylglucosamine transferase by insulin signaling. *J Biol Chem* (2008) 283:21411–7. doi:10.1074/jbc.M800677200
- Yang X, Ongusaha PP, Miles PD, Havstad JC, Zhang F, So WV, et al. Phosphoinositide signalling links O-GlcNAc transferase to insulin resistance. *Nature* (2008) 451:964–9. doi:10.1038/nature06668
- Perez-Cervera Y, Dehennaut V, Aquino Gil M, Guedri K, Solórzano Mata CJ, Olivier-Van Stichelen S, et al. Insulin signaling controls the expression of O-GlcNAc transferase and its interaction with lipid microdomains. *FASEB J* (2013) 27:3478–86. doi:10.1096/fj.12-217984
- Mollinedo F, Gajate C. Lipid rafts as major platforms for signaling regulation in cancer. Adv Biol Regul (2015) 57:130–46. doi:10.1016/j.jbior.2014.10.003

- Di Vizio D, Adam RM, Kim J, Kim R, Sotgia F, Williams T, et al. Caveolin-1 interacts with a lipid raft-associated population of fatty acid synthase. *Cell Cycle* (2008) 7:2257–67. doi:10.4161/cc.7.14.6475
- Sekine O, Love DC, Rubenstein DS, Hanover JA. Blocking O-linked GlcNAc cycling in *Drosophila* insulin-producing cells perturbs glucose-insulin homeostasis. *J Biol Chem* (2010) 285:38684–91. doi:10.1074/jbc. M110.155192
- Olivier-Van Stichelen S, Guinez C, Mir A-M, Perez-Cervera Y, Liu C, Michalski J-C, et al. The hexosamine biosynthetic pathway and O-GlcNAcylation drive the expression of β-catenin and cell proliferation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* (2012) 302:E417–24. doi:10.1152/ajpendo.00390.2011
- Zhang N, Chen X. Potential role of O-GlcNAcylation and involvement of PI3K/Akt1 pathway in the expression of oncogenic phenotypes of gastric cancer cells in vitro. *Biotechnol Appl Biochem* (2015). doi:10.1002/ bab.1441
- Stoops JK, Ross P, Arslanian MJ, Aune KC, Wakil SJ, Oliver RM. Physicochemical studies of the rat liver and adipose fatty acid synthetases. J Biol Chem (1979) 254:7418–26.
- Lornitzo FA, Qureshi AA, Porter JW. Subunits of fatty acid synthetase complexes. Enzymatic activities and properties of the half-molecular weight nonidentical subunits of pigeon liver fatty acid synthetase. *J Biol Chem* (1975) 250:4520–9.
- Yu J, Deng R, Zhu HH, Zhang SS, Zhu C, Montminy M, et al. Modulation of fatty acid synthase degradation by concerted action of p38 MAP kinase, E3 ligase COP1, and SH2-tyrosine phosphatase Shp2. J Biol Chem (2013) 288:3823–30. doi:10.1074/jbc.M112.397885
- Graner E, Tang D, Rossi S, Baron A, Migita T, Weinstein LJ, et al. The isopeptidase USP2a regulates the stability of fatty acid synthase in prostate cancer. *Cancer Cell* (2004) 5:253–61. doi:10.1016/S1535-6108(04)00055-8
- Priolo C, Tang D, Brahamandan M, Benassi B, Sicinska E, Ogino S, et al. The isopeptidase USP2a protects human prostate cancer from apoptosis. *Cancer Res* (2006) 66:8625–32. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1374
- Ruan H-B, Nie Y, Yang X. Regulation of protein degradation by O-GlcNAcylation: crosstalk with ubiquitination. *Mol Cell Proteomics* (2013) 12:3489–97. doi:10.1074/mcp.R113.029751
- Ruan H-B, Han X, Li M-D, Singh JP, Qian K, Azarhoush S, et al. O-GlcNAc transferase/host cell factor C1 complex regulates gluconeogenesis by modulating PGC-1α stability. *Cell Metab* (2012) 16:226–37. doi:10.1016/j. cmet.2012.07.006

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

Copyright © 2016 Baldini and Lefebvre. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



**Figure 50:** Régulation de l'expression de la FAS par la voie PI3K/Akt et crosstalk OGT/Akt/mTORC1.

La transcription de la FAS est régulée par le facteur SREBP1c synthétisé par la voie PI3K/Akt durant la phase G1 et réprimé par l'inhibition de mTORC2 durant la transition G1/S.

<u>Abréviations</u> : PI3K : phosphatidylinositol-3-kinase, mTORC : mammalian target of rapamycin complex, SREBP1c : sterol regulatory element-binding protein, GSK3 : glycogène synthase kinase 3, OGT : *O*-GlcNAc transférase.

### II. <u>Hypothèse de travail</u>

Au cours du cycle cellulaire, la biosynthèse des lipides est accrue en phase G1 puis diminue en phase S (Kaplon et al., 2015). Ces variations peuvent être dues à des variations d'expression de la FAS.

La régulation de la FAS au cours du cycle cellulaire se fait essentiellement via l'activation ou l'inhibition des voies de signalisation, en particulier la voie PI3K/Akt. En réponse à l'insuline ou aux facteurs de croissance, l'activation de la voie PI3K/Akt induit, entre autres, mTORC1 permettant, via p70S6K, la synthèse de SREBP1c, activant la FAS (cf partie III,C,1 page 102). La protéine mTORC2 activée elle aussi par un signal mitogène, par un mécanisme inconnu, est également capable d'induire directement ou indirectement, l'activation de SREBP1c (Figure 50).

En fin de phase G1, Akt phosphoryle la kinase GSK3 et inhibe son activité. Ce mécanisme diminue fortement la dégradation de la  $\beta$ -caténine induisant l'activation de la cycline D1. En retour, la cycline D1 inactive SREBP1c réduisant l'expression de la FAS (Figure 50).

De plus, il existe un lien entre l'OGT, la *O*-GlcNAcylation et la voie de signalisation PI3K/Akt. Après stimulation par l'insuline ou par les facteurs de croissance, l'expression de l'OGT est augmentée et son activité catalytique est nécessaire à l'activation de la voie.

En réponse à l'insuline, l'OGT est adressée aux lipides rafts. En retour, la PI3K induit la synthèse de l'OGT et son interaction avec la membrane plasmique (Olivier-Van Stichelen et al., 2012a; Perez-Cervera et al., 2013). Il existe un crosstalk entre la phosphorylation et la *O*-GlcNAcylation d'Akt. En effet, la *O*-GlcNAcylation d'Akt sur les résidus T305 et T312 inhibe sa phosphorylation sur le résidu T308 (Wang et al., 2012). De plus, la *O*-GlcNAcylation de T430 et T479 sur la protéine Akt induit la phosphorylation d'Akt sur la S473 et son activation (Heath et al., 2014). Notre équipe a, dans ce sens, montré que dans des cellules cancéreuses du sein MCF-7, la transfection de siOGT bloque la phosphorylation et l'activation d'Akt (**Figure 50**).

Récemment, des études ont mis en évidence un lien direct entre l'OGT et mTOR. L'inhibition de l'activité catalytique de mTOR diminue la *O*-GlcNAcylation totale des protéines et l'expression de l'OGT. De plus, l'activation de mTOR et Akt est suffisante pour induire l'expression d'OGT (Park et al., 2014; Sodi et al., 2015) (Figure 50).

222

Ainsi, le but de cette perspective est de déterminer le rôle de l'OGT et de la *O*-GlcNAcylation sur l'expression de la FAS au cours du cycle cellulaire.

## III. <u>Résultats préliminaires</u>

## A. Matériels et méthodes

### 1. <u>Culture cellulaire</u>

Les lignées HCT116 (carcinome de côlon) et HT29 (adénocarcinome de côlon) sont cultivées dans du DMEM en présence de SVF décomplémenté. Les IHH (cellules humaines hépatiques immortalisées non cancéreuses) sont cultivées dans du milieu William's (Gibco) contenant 2 g/L de glucose et supplémenté avec 2 mM de L-Glutamine, 20 mU/mL d'insuline bovine (sigma) et de 50 nM de dexaméthasone (sigma). Les cellules épithéliales de côlon fœtal humain CCD841CoN, équivalents normaux des HCT116 et HT29 sont cultivées dans un milieu complet EMEM (Eagle's Minimal Essential Medium) (Lonza) contenant 1 g/L de glucose et 25 mM d'HEPES, enrichi de 10% (v/v) de SVF. Les cellules sont incubées à 37°C, sous atmosphère humide enrichie avec 5% (v/v) de CO<sub>2</sub>.

### 2. <u>Synchronisation et cinétique de SVF</u>

Afin de synchroniser les cellules pour une meilleure réponse aux facteurs mitogènes du sérum, les cellules sont privées de sérum. Le lendemain de l'ensemencement, le tapis cellulaire est rincé deux fois avec du DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) puis placé dans le milieu de sevrage (exempt de SVF) pendant 24 h. Les cellules sont ensuite stimulées 30 min, 2, 4, 8, 12, 15, 18 ou 24 heures par du milieu de culture à 10% de SVF (v/v) pour permettre la reprise du cycle cellulaire et l'activation des voies de signalisation mitogènes.

### 3. <u>Traitement à la rapamycine</u>

Afin d'inhiber l'activation de la voie de signalisation mTOR, les cellules sont traitées 48 h avec 50 nM de rapamycine (Life Technologie). Pour bloquer l'activité catalytique de l'OGT, les cellules sont traitées avec de l'acétyl 5S GlcNAc (50 μM) pendant les temps indiqués.



Figure 51 : Effet de l'inhibition de mTOR sur l'expression de l'OGT et de la FAS.

Les lignées coliques ont été traitées à la rapamycine (50 nM) pendant 48 h ou non avant d'être lysées et les protéines d'intérêt analysées par électrophorèse SDS-PAGE.

<u>Abréviations</u>: FAS: fatty acid synthase, OGT: *O*-GlcNAc transférase, GAPDH: glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase.

### B. <u>Résultats préliminaires</u>

Dans un premier temps, nous avons voulu déterminer si l'OGT et la FAS pouvaient être des cibles de la voie PI3K/Akt/mTOR. Par conséquent, les cellules HCT116 (carcinome de côlon), HT29 (adénocarcinome de côlon) et CCD841 CoN (cellules fœtales coliques non cancéreuses) ont été traitées avec de la rapamycine, inhibiteur spécifique de l'activité catalytique de mTOR (Figure 51).

L'expression de la FAS est en corrélation avec celle de l'OGT et ces deux enzymes sont plus exprimées dans les cellules cancéreuses par rapport aux cellules normales. De plus, on note une augmentation de l'expression de la FAS des cellules normales CCD841CoN vers les cellules cancéreuses de bas grade HT29 puis de haut grade HCT116 (Figure 51).

Dans ces lignées, la rapamycine diminue la phosphorylation de p70s6K confirmant l'efficacité du traitement. Ainsi, l'expression de l'OGT mais surtout de la FAS diminue suite au traitement à la rapamycine. Ces résultats montrent bien que la voie de signalisation mTOR régule l'expression de ces deux protéines (Figure 51).

Pour déterminer l'expression de la FAS au cours du cycle cellulaire, des IHH sont cultivées en milieu normo-glucosés (1 g.L<sup>-1</sup>), sevrées pendant 48 h puis une cinétique de remise en sérum a été effectuée jusque 24 h de stimulation. Ainsi, on observe une augmentation de l'expression de la FAS au cours du temps jusque 12 h de stimulation correspondant à la phase G1, déterminée par l'expression de la cycline D1. En effet, la cycline D1 a une expression croissante en début de phase G1/S.

Suite à 15 h de stimulation, on observe une diminution de l'expression de la FAS en corrélation avec la phase S (Figure 52).

Après 18 h de stimulation, l'expression de la FAS est de nouveau augmentée en corrélation avec l'entrée en phase G2 déterminée grâce à l'expression de la cycline A. En effet, la cycline A s'exprime en fin de phase S et en début de phase G2.

Par conséquent, cette expérience nous a permis de mettre en évidence l'expression cyclique de la FAS au cours des différentes phases du cycle cellulaire (Figure 52).

226



Figure 52 : Etude de l'expression de la FAS au cours d'une cinétique de remise en sérum.

Les cellules IHH ont été sevrées 48 h puis stimulées par du sérum pendant les temps indiqués. Les cellules ont été lysées et l'expression de la FAS, de l'OGT, de phospho-Akt, des cyclines A et D, des protéines *O*-GlcNAcylées totales et de la GAPDH a été mesurée par WB.

<u>Abréviations</u>: IHH : immortalized human hepatocytes, FAS : fatty acid synthase, OGT : *O*-GlcNAc transférase, cyc : cycline, GAPDH : glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase.

Afin de déterminer le rôle de l'OGT sur l'expression de la FAS au cours du cycle cellulaire, la même expérience que précédemment a été réalisée sur des cellules HepG2 en présence ou non d'un inihibiteur de l'OGT : l'acétyl-5S-GlcNAc (Ac5S). L'efficacité de l'inhibiteur est vérifiée par WB. En présence d'Ac5S, le niveau global de protéines *O*-GlcNAcylées diminue au cours du temps (Figure 53). La détection des cyclines A et D permet d'observer que le cycle est retardé en présence de l'inhibiteur d'OGT (Figure 53).

En condition contrôle, on observe une augmentation de l'expression de la FAS à partir de 2 h et jusque 13 h de stimulation puis une diminution à 18 h. En présence d'Ac5S, l'expression de la FAS augmente uniquement à partir de 13 h de stimulation au SVF. Cette expérience montre que l'expression de la FAS est retardée lorsque l'OGT est inhibée (Figure 53). Il nous faudra déterminer si la FAS est retardée parce qu'elle est moins O-GlcNAcylée ou/et parce que l'inhibition de l'OGT bloque le cycle suite au manque, entre autres, d'activation des voies mitogéniques.

### IV. <u>Perspectives de recherche</u>

Il serait intéressant de réitérer l'expérience de cinétique en SVF supplémenté ou non d'un inhibiteur de l'OGT, l'Ac5SGlcNAc, dans des cellules IHH immortalisées mais non cancéreuses afin de déterminer si la régulation de l'expression de la FAS en fonction des niveaux de *O*-GlcNAcylation est la même quel que soit le type cellulaire étudié.

Dans ces mêmes conditions, nous vérifierons également l'expression des ARNm de ChREBP, SREBP1c et de la FAS au cours du temps en présence ou non d'inhibiteur d'OGT.

Afin de discriminer le rôle des deux enzymes du cycle *O*-GlcNAcylation/dé-*O*-GlcNAcylation sur l'expression de la FAS au cours du cycle cellulaire, la même expérience pourrait être réalisée en présence de siOGT et siOGA.

Sachant que l'OGT est relocalisée au niveau de la membrane plasmique suite à une stimulation par l'insuline et que son expression varie au cours d'une cinétique de stimulation au SVF, l'hypothèse émise est que, suite à une stimulation par l'insuline, la FAS serait relocalisée au niveau membranaire proche de l'OGT. Ainsi, l'OGT peut moduler l'expression et l'activité de la FAS en fonction des différentes phases du cycle cellulaire. Un fractionnement subcellulaire pourrait être réalisé au cours de la cinétique de remise en sérum pour tenter de répondre à cette question.



Figure 53 : Rôle de l'inhibition de l'OGT sur l'expression de la FAS au cours du cycle cellulaire.

Les cellules HepG2 ont été sevrées 48 h puis stimulées grâce au sérum pendant les temps indiqués. Les cellules ont été lysées et l'expression de la FAS, de l'OGT, de phospho-Akt, des cyclines A et D, des protéines *O*-GlcNAcylées totales et de la GAPDH a été mesurée par WB.

<u>Abréviations</u>: FAS: fatty acid synthase, OGT: *O*-GlcNAc transférase, cyc: cycline, Ac5S: acétyl5S-GlcNAc.

Conclusion générale



#### Figure 54 : Vie et mort de la FAS au cours du cycle cellulaire.

La FAS montre une expression variable au cours du cycle cellulaire. En début de phase G1, son expression est augmentée par l'activation de mTORC1 et mTORC2 responsable de la traduction de SREBP1c et de la FAS elle-même. La FAS exprimée est ensuite stabilisée par *O*-GlcNAcylation grâce à la formation d'un complexe OGT/FAS/USP2a. En phase S, e complexe se dissocierait induisant une dégradation protéasomale de la FAS. Au cours de ma thèse, qui peut être divisée en deux parties, nous avons évalué la *O*-GlcNAcylation de la Glucokinase et de la Fatty Acid Synthase ainsi que le rôle de cette modification post-traductionnelle sur leur expression. Une augmentation des niveaux de *O*-GlcNAcylation augmente leur stabilité et induit une augmentation de l'activité catalytique de la FAS permettant d'expliquer la biosynthèse accrue des AG responsable de la stéatose hépatique. Ces deux parties ont été réalisées dans un contexte physiopathologique où les niveaux de glycolyse et de lipogenèse sont augmentés. Par conséquent, nous nous sommes focalisés sur le rôle de la *O*-GlcNAcylation sur les propriétés de la GK et de la FAS dans le stockage du glucose en excès sous forme d'acides gras.

En condition de normo glycémie, la FAS joue un rôle primordial dans la biosynthèse des AG, composants majeurs des membranes plasmiques. Par conséquent, la régulation de la FAS est de première importance dans un contexte de prolifération anormale, caractéristique des cellules cancéreuses. Pour cela, les cellules passent d'un métabolisme oxydatif à un métabolisme glycolytique, shift métabolique accompagné d'une augmentation de l'expression de la FAS. De plus, ces cellules présentent une augmentation globale des protéines *O*-GlcNAcylées et une augmentation de l'expression de l'OGT.

En perspectives de recherche, les premiéres observations confirment que, dans les cellules hépatiques, la FAS a une expression variable au cours du cycle cellulaire. De manière très intéressante, les résultats préliminaires montrent que l'OGT et la *O*-GlcNAcylation jouent probablement un rôle sur cette expression puisque l'utilisation d'un inhibiteur de l'OGT dérégule les variations de l'expression de la FAS au cours des différentes phases du cycle.

Ce phénomène pourrait s'expliquer de la manière suivante : en phase G1, l'expression de la FAS augmente grâce à l'activation d'Akt qui agit à deux niveaux, en inhibant GSK3β, elle-même inhibitrice de mTORC2 (facteur induisant l'expression de SREBP1c) et en induisant mTORC1 activateur de l'expression transcriptionnelle de la FAS (Figure 54). En parallèle, l'OGT est activée par mTORC1 ce qui promeut la formation d'un complexe FAS/OGT/USP2a et la *O*-GlcNAcylation de la FAS, la stabilisant (Baldini et al., 2016). (Figure 54). L'activation de l'OGT et l'augmentation de *O*-GlcNAcylation sont potentialisées par l'apport en acides aminés, glucose, acides gras et nucléotides (Figure 54), cruciaux en phase G1. En fin de phase G1, le complexe se dissocie, la FAS est ubiquitinylée et dégradée (Figure 54).

234

En conclusion, au cours de cette thèse, nous avons montré que la *O*-GlcNAcylation joue un rôle primordial sur l'expression de la Glucokinase et de la Fatty Acid Synthase pour le stockage du glucose sous forme d'acides gras. Ces acides gras néosynthétisés contribuent, en partie, à l'émergence ou au développement de la stéatose hépatique, affection hépatique pouvant évoluer en NASH ou encore en hépatocarcinome.

En perspectives de recherche, nos résultats préliminaires montrent que la *O*-GlcNAcylation et l'OGT jouent un rôle sur l'expression de la FAS au cours du cycle cellulaire. Les cellules cancéreuses présentent un niveau global de *O*-GlcNAcylation, d'OGT et de FAS augmenté. Ainsi, la *O*-GlcNAcylation et l'OGT pourraient contribuer, en partie, à l'expression de la FAS, caractéristique des cellules cancéreuses.

Bibliographie

A L OLSON, and AND J.E. PESSIN. 1996. Structure, Function, and Regulation of the Mammalian Facilitative Glucose Transporter Gene Family. *Annual Review of Nutrition* 16: 235–256.

ABU-ELHEIGA, L., M.M. MATZUK, K.A. ABO-HASHEMA, and S.J. WAKIL. 2001. Continuous fatty acid oxidation and reduced fat storage in mice lacking acetyl-CoA carboxylase 2. *Science (New York, N.Y.)* 291: 2613–2616.

ABU-ELHEIGA, L., M.M. MATZUK, P. KORDARI, W. OH, T. SHAIKENOV, Z. GU, and S.J. WAKIL. 2005. Mutant mice lacking acetyl-CoA carboxylase 1 are embryonically lethal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 12011–12016.

ADEVA-ANDANY, M.M., M. GONZALEZ-LUCAN, C. DONAPETRY-GARCIA, C. FERNANDEZ-FERNANDEZ, and E. AMENEIROS-RODRIGUEZ. 2016. Glycogen metabolism in humans. *BBA Clinical* 5: 85–100.

AGIUS, L. 2008. Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism. *The Biochemical Journal* 414: 1–18.

AKIMOTO, Y., L.K. KREPPEL, H. HIRANO, and G.W. HART. 1999. Localization of the O-linked N-acetylglucosamine transferase in rat pancreas. *Diabetes* 48: 2407–2413.

ALFARO, J.F., C.-X. GONG, M.E. MONROE, J.T. ALDRICH, T.R.W. CLAUSS, S.O. PURVINE, Z. WANG, ET AL. 2012. Tandem mass spectrometry identifies many mouse brain O-GlcNAcylated proteins including EGF domain-specific O-GlcNAc transferase targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 7280–7285.

ALLAN, R.K., and T. RATAJCZAK. 2011. Versatile TPR domains accommodate different modes of target protein recognition and function. *Cell Stress & Chaperones* 16: 353–367.

AN, Z., H. WANG, P. SONG, M. ZHANG, X. GENG, and M.-H. ZOU. 2007. Nicotine-induced Activation of AMP-activated Protein Kinase Inhibits Fatty Acid Synthase in 3T3L1 Adipocytes A ROLE FOR OXIDANT STRESS. *Journal of Biological Chemistry* 282: 26793–26801.

ANDRALI, S.S., Q. QIAN, and S. OZCAN. 2007. Glucose mediates the translocation of NeuroD1 by O-linked glycosylation. *The Journal of Biological Chemistry* 282: 15589–15596.

ANGELOVA, M., R.F. ORTIZ-MEOZ, S. WALKER, and D.M. KNIPE. 2015. Inhibition of O-Linked N-Acetylglucosamine Transferase Reduces Replication of Herpes Simplex Virus and Human Cytomegalovirus. *Journal of Virology* 89: 8474–8483.

ANTHONISEN, E.H., L. BERVEN, S. HOLM, M. NYGÅRD, H.I. NEBB, and L.M. GRØNNING-WANG. 2010. Nuclear receptor liver X receptor is O-GlcNAc-modified in response to glucose. *The Journal of biological chemistry* 285: 1607–1615.

ARDEN, C., S. BALTRUSCH, and L. AGIUS. 2006. Glucokinase regulatory protein is associated with mitochondria in hepatocytes. *FEBS Letters* 580: 2065–2070.

ARDEN, C., S.J. TUDHOPE, J.L. PETRIE, Z.H. AL-OANZI, K.S. CULLEN, A.J. LANGE, H.C. TOWLE, and L. AGIUS. 2012. Fructose 2,6-bisphosphate is essential for glucose-regulated gene transcription of glucose-6-phosphatase and other ChREBP target genes in hepatocytes. *The Biochemical Journal* 443: 111–123.

ARNOLD, C.S., G.V. JOHNSON, R.N. COLE, D.L. DONG, M. LEE, and G.W. HART. 1996. The microtubule-associated protein tau is extensively modified with O-linked N-acetylglucosamine. *The Journal of Biological Chemistry* 271: 28741–28744.

ASSIMACOPOULOS-JEANNET, F., and B. JEANRENAUD. 1990. Insulin activates 6-phosphofructo-2-kinase and pyruvate kinase in the liver. Indirect evidence for an action via a phosphatase. *The Journal of Biological Chemistry* 265: 7202–7206.

ATSUMI, T., T. NISHIO, H. NIWA, J. TAKEUCHI, H. BANDO, C. SHIMIZU, N. YOSHIOKA, ET AL. 2005. Expression of Inducible 6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2,6-Bisphosphatase/PFKFB3 Isoforms in Adipocytes and Their Potential Role in Glycolytic Regulation. *Diabetes* 54: 3349– 3357.

## B

BALDINI, S.F., C. WAVELET, I. HAINAULT, C. GUINEZ, and T. LEFEBVRE. 2016. The Nutrient-Dependent O-GlcNAc Modification Controls the Expression of Liver Fatty Acid Synthase. *Journal of Molecular Biology*.

BALL, L.E., M.N. BERKAW, and M.G. BUSE. 2006. Identification of the major site of O-linked beta-N-acetylglucosamine modification in the C terminus of insulin receptor substrate-1. *Molecular & cellular proteomics: MCP* 5: 313–323.

BALTRUSCH, S., S. LENZEN, D.A. OKAR, A.J. LANGE, and M. TIEDGE. 2001. Characterization of glucokinase-binding protein epitopes by a phage-displayed peptide library. Identification of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase as a novel interaction partner. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 43915–43923.

BEAUSOLEIL, S.A., M. JEDRYCHOWSKI, D. SCHWARTZ, J.E. ELIAS, J. VILLEN, J. LI, M.A. COHN, ET AL. 2004. Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 12130–12135.

BEAVEN, S.W., A. MATVEYENKO, K. WROBLEWSKI, L. CHAO, D. WILPITZ, T.W. HSU, J. LENTZ, ET AL. 2013. Reciprocal regulation of hepatic and adipose lipogenesis by liver X receptors in obesity and insulin resistance. *Cell Metabolism* 18: 106–117.

BEIGNEUX, A.P., C. KOSINSKI, B. GAVINO, J.D. HORTON, W.C. SKARNES, and S.G. YOUNG. 2004. ATP-citrate lyase deficiency in the mouse. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 9557–9564.

BELFORT, R., S.A. HARRISON, K. BROWN, C. DARLAND, J. FINCH, J. HARDIES, B. BALAS, ET AL. 2006. A placebo-controlled trial of pioglitazone in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *The New England Journal of Medicine* 355: 2297–2307.

BERTRAM, L., D. BLACKER, K. MULLIN, D. KEENEY, J. JONES, S. BASU, S. YHU, ET AL. 2000. Evidence for genetic linkage of Alzheimer's disease to chromosome 10q. *Science (New York, N.Y.)* 290: 2302–2303.

BEZY, O., T.T. TRAN, J. PIHLAJAMÄKI, R. SUZUKI, B. EMANUELLI, J. WINNAY, M.A. MORI, ET AL. 2011. PKCδ regulates hepatic insulin sensitivity and hepatosteatosis in mice and humans. *The Journal of Clinical Investigation* 121: 2504–2517.

BIESSELS, G.J., S. STAEKENBORG, E. BRUNNER, C. BRAYNE, and P. SCHELTENS. 2006. Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. *The Lancet. Neurology* 5: 64–74.

BIRKENFELD, A.L., and G.I. SHULMAN. 2014. Non Alcoholic Fatty Liver Disease, Hepatic Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 59: 713–723.

BOEHMELT, G., I. FIALKA, G. BROTHERS, M.D. MCGINLEY, S.D. PATTERSON, R. MO, C.C. HUI, ET AL. 2000. Cloning and characterization of the murine glucosamine-6-phosphate acetyltransferase EMeg32. Differential expression and intracellular membrane association. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 12821–12832.

BOEHMELT, G., A. WAKEHAM, A. ELIA, T. SASAKI, S. PLYTE, J. POTTER, Y. YANG, ET AL. 2000. Decreased UDP-GlcNAc levels abrogate proliferation control in EMeg32-deficient cells. *The EMBO journal* 19: 5092–5104.

BOND, M.R., and J.A. HANOVER. 2013. O-GlcNAc Cycling: A Link Between Metabolism and Chronic Disease. *Annual Review of Nutrition* 33: 205–229.

BORGHGRAEF, P., C. MENUET, C. THEUNIS, J.V. LOUIS, H. DEVIJVER, H. MAURIN, C. SMET-NOCCA, ET AL. 2013. Increasing brain protein O-GlcNAc-ylation mitigates breathing defects and mortality of Tau.P301L mice. *PloS One* 8: e84442.

Bosco, D., P. MEDA, and P.B. IYNEDJIAN. 2000. Glucokinase and glucokinase regulatory protein: mutual dependence for nuclear localization. *The Biochemical Journal* 348 Pt 1: 215–222.

BRICAMBERT, J., J. MIRANDA, F. BENHAMED, J. GIRARD, C. POSTIC, and R. DENTIN. 2010. Saltinducible kinase 2 links transcriptional coactivator p300 phosphorylation to the prevention of ChREBP-dependent hepatic steatosis in mice. *The Journal of Clinical Investigation* 120: 4316– 4331.

BROSCHAT, K.O., C. GORKA, J.D. PAGE, C.L. MARTIN-BERGER, M.S. DAVIES, H. HUANG HC, E.A. GULVE, ET AL. 2002. Kinetic characterization of human glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase I: potent feedback inhibition by glucosamine 6-phosphate. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 14764–14770.

BROWNING, J.D. 2013. Common genetic variants and nonalcoholic Fatty liver disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association* 11: 1191–1193.

BULLEN, J.W., J.L. BALSBAUGH, D. CHANDA, J. SHABANOWITZ, D.F. HUNT, D. NEUMANN, and G.W. HART. 2014. Cross-talk between two essential nutrient-sensitive enzymes: O-GlcNAc transferase (OGT) and AMP-activated protein kinase (AMPK). *The Journal of Biological Chemistry* 289: 10592–10606.

# С

CALDWELL, S.A., S.R. JACKSON, K.S. SHAHRIARI, T.P. LYNCH, G. SETHI, S. WALKER, K. VOSSELLER, and M.J. REGINATO. 2010. Nutrient sensor O-GlcNAc transferase regulates breast cancer tumorigenesis through targeting of the oncogenic transcription factor FoxM1. *Oncogene* 29: 2831–2842.

CANTAREL, B.L., P.M. COUTINHO, C. RANCUREL, T. BERNARD, V. LOMBARD, and B. HENRISSAT. 2009. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Research* 37: D233–D238.

CAPOTOSTI, F., S. GUERNIER, F. LAMMERS, P. WARIDEL, Y. CAI, J. JIN, J.W. CONAWAY, ET AL. 2011. O-GlcNAc Transferase Catalyzes Site-Specific Proteolysis of HCF-1. *Cell* 144: 376–388.

CAPUTTO, R., L.F. LELOIR, C.E. CARDINI, and A.C. PALADINI. 1950. Isolation of the coenzyme of the galactose phosphate-glucose phosphate transformation. *The Journal of Biological Chemistry* 184: 333–350.

CARDENAS, M.L., A. CORNISH-BOWDEN, and T. URETA. 1998. Evolution and regulatory role of the hexokinases. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1401: 242–264.

CASADO, M., V.S. VALLET, A. KAHN, and S. VAULONT. 1999. Essential role in vivo of upstream stimulatory factors for a normal dietary response of the fatty acid synthase gene in the liver. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 2009–2013.

CEULEMANS, H., W. STALMANS, and M. BOLLEN. 2002. Regulator-driven functional diversification of protein phosphatase-1 in eukaryotic evolution. *BioEssays* 24: 371–381.

CHA, J.-Y., and J.J. REPA. 2007. The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. *The Journal of biological chemistry* 282: 743–751.

CHAKERA, A.J., G. SPYER, N. VINCENT, S. ELLARD, A.T. HATTERSLEY, and F.P. DUNNE. 2014. The 0.1% of the population with glucokinase monogenic diabetes can be recognized by clinical characteristics in pregnancy: the Atlantic Diabetes in Pregnancy cohort. *Diabetes Care* 37: 1230–1236.

CHAKERA, A.J., A.M. STEELE, A.L. GLOYN, M.H. SHEPHERD, B. SHIELDS, S. ELLARD, and A.T. HATTERSLEY. 2015. Recognition and Management of Individuals With Hyperglycemia Because of a Heterozygous Glucokinase Mutation. *Diabetes Care* 38: 1383–1392.

CHAKRAVARTHY, M.V., I.J. LODHI, L. YIN, R.R.V. MALAPAKA, H.E. XU, J. TURK, and C.F. SEMENKOVICH. 2009. Identification of a physiologically relevant endogenous ligand for PPARalpha in liver. *Cell* 138: 476–488.

CHAKRAVARTHY, M.V., Z. PAN, Y. ZHU, K. TORDJMAN, J.G. SCHNEIDER, T. COLEMAN, J. TURK, and C.F. SEMENKOVICH. 2005. "New" hepatic fat activates PPARalpha to maintain glucose, lipid, and cholesterol homeostasis. *Cell Metabolism* 1: 309–322.

CHAMPATTANACHAI, V., P. NETSIRISAWAN, P. CHAIYAWAT, T. PHUEAOUAN, R. CHAROENWATTANASATIEN, D. CHOKCHAICHAMNANKIT, P. PUNYARIT, ET AL. 2013. Proteomic analysis and abrogated expression of O-GlcNAcylated proteins associated with primary breast cancer. *Proteomics* 13: 2088–2099.

CHANG, Q., K. SU, J.R. BAKER, X. YANG, A.J. PATERSON, and J.E. KUDLOW. 2000. Phosphorylation of human glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase by cAMP-dependent protein kinase at serine 205 blocks the enzyme activity. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 21981–21987.

CHEN, G., G. LIANG, J. OU, J.L. GOLDSTEIN, and M.S. BROWN. 2004. Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 11245–11250.

CHEN, G., P. LIU, D.C. THURMOND, and J.S. ELMENDORF. 2003. Glucosamine-induced insulin resistance is coupled to O-linked glycosylation of Munc18c. *FEBS letters* 534: 54–60.

CHEN, Q., Y. CHEN, C. BIAN, R. FUJIKI, and X. YU. 2013. TET2 promotes histone O-GlcNAcylation during gene transcription. *Nature* 493: 561–564.

CHENG, X., and G.W. HART. 2001. Alternative O-glycosylation/O-phosphorylation of serine-16 in murine estrogen receptor beta: post-translational regulation of turnover and transactivation activity. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 10570–10575.

CHENG, X., and G.W. HART. 2000. Glycosylation of the murine estrogen receptor-alpha. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 75: 147–158.

CHEUNG, W.D., and G.W. HART. 2008. AMP-activated Protein Kinase and p38 MAPK Activate O-GlcNAcylation of Neuronal Proteins during Glucose Deprivation. *Journal of Biological Chemistry* 283: 13009–13020.

CHEUNG, W.D., K. SAKABE, M.P. HOUSLEY, W.B. DIAS, and G.W. HART. 2008. O-linked beta-N-acetylglucosaminyltransferase substrate specificity is regulated by myosin phosphatase targeting and other interacting proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 283: 33935– 33941.

CHIRALA, S.S., H. CHANG, M. MATZUK, L. ABU-ELHEIGA, J. MAO, K. MAHON, M. FINEGOLD, and S.J. WAKIL. 2003. Fatty acid synthesis is essential in embryonic development: fatty acid synthase null mutants and most of the heterozygotes die in utero. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 6358–6363.

CHIRALA, S.S., and S.J. WAKIL. 2004. Structure and function of animal fatty acid synthase. *Lipids* 39: 1045–1053.

CHOU, T.Y., C.V. DANG, and G.W. HART. 1995. Glycosylation of the c-Myc transactivation domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 4417–4421.

CHOU, T.Y., G.W. HART, and C.V. DANG. 1995. c-Myc is glycosylated at threonine 58, a known phosphorylation site and a mutational hot spot in lymphomas. *The Journal of Biological Chemistry* 270: 18961–18965.

CHU, C.-S., P.-W. LO, Y.-H. YEH, P.-H. HSU, S.-H. PENG, Y.-C. TENG, M.-L. KANG, ET AL. 2014. O-GlcNAcylation regulates EZH2 protein stability and function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111: 1355–1360.

CLARKE, A.J., R. HURTADO-GUERRERO, S. PATHAK, A.W. SCHÜTTELKOPF, V. BORODKIN, S.M. SHEPHERD, A.F.M. IBRAHIM, and D.M.F. VAN AALTEN. 2008. Structural insights into mechanism and specificity of O-GlcNAc transferase. *The EMBO journal* 27: 2780–2788.

COHEN, P., M. MIYAZAKI, N.D. SOCCI, A. HAGGE-GREENBERG, W. LIEDTKE, A.A. SOUKAS, R. SHARMA, ET AL. 2002. Role for stearoyl-CoA desaturase-1 in leptin-mediated weight loss. *Science* (*New York, N.Y.*) 297: 240–243.

COLEMAN, R.A., T.M. LEWIN, C.G.V. HORN, and M.R. GONZALEZ-BARO. 2002. Do Long-Chain Acyl-CoA Synthetases Regulate Fatty Acid Entry into Synthetic Versus Degradative Pathways? *The Journal of Nutrition* 132: 2123–2126.

COMER, F.I., and G.W. HART. 1999. O-GlcNAc and the control of gene expression. *Biochimica et biophysica acta* 1473: 161–171.

COMER, F.I., and G.W. HART. 2001. Reciprocity between O-GlcNAc and O-phosphate on the carboxyl terminal domain of RNA polymerase II. *Biochemistry* 40: 7845–7852.

COMTESSE, N., E. MALDENER, and E. MEESE. 2001. Identification of a nuclear variant of MGEA5, a cytoplasmic hyaluronidase and a beta-N-acetylglucosaminidase. *Biochemical and biophysical research communications* 283: 634–640.

COREY, K.E., and M.E. RINELLA. 2016. Medical and Surgical Treatment Options for Nonalcoholic Steatohepatitis. *Digestive Diseases and Sciences* 61: 1387–1397.

COSTA LEITE, T., D. DA SILVA, R. GUIMARÃES COELHO, P. ZANCAN, and M. SOLA-PENNA. 2007. Lactate favours the dissociation of skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase tetramers down-regulating the enzyme and muscle glycolysis. *Biochemical Journal* 408: 123–130.

## D

D'ALESSANDRIS, C., F. ANDREOZZI, M. FEDERICI, M. CARDELLINI, A. BRUNETTI, M. RANALLI, S. DEL GUERRA, ET AL. 2004. Increased O-glycosylation of insulin signaling proteins results in their impaired activation and enhanced susceptibility to apoptosis in pancreatic beta-cells. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18: 959–961.

D'ANDREA, L.D., and L. REGAN. 2003. TPR proteins: the versatile helix. *Trends in Biochemical Sciences* 28: 655–662.

DANIAL, N.N., C.F. GRAMM, L. SCORRANO, C.-Y. ZHANG, S. KRAUSS, A.M. RANGER, S.R. DATTA, ET AL. 2003. BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. *Nature* 424: 952–956.

DAUPHINEE, S.M., M. MA, and C.K.L. TOO. 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: 579–588.

DEHAVEN, J.E., K.A. ROBINSON, B.A. NELSON, and M.G. BUSE. 2001. A novel variant of glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase-1 (GFAT1) mRNA is selectively expressed in striated muscle. *Diabetes* 50: 2419–2424.

DEHENNAUT, V., X. HANOULLE, J.-F. BODART, J.-P. VILAIN, J.-C. MICHALSKI, I. LANDRIEU, G. LIPPENS, and T. LEFEBVRE. 2008. Microinjection of recombinant O-GlcNAc transferase potentiates Xenopus oocytes M-phase entry. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 369: 539–546.

DEHENNAUT, V., T. LEFEBVRE, C. SELLIER, Y. LEROY, B. GROSS, S. WALKER, R. CACAN, ET AL. 2007. O-linked N-acetylglucosaminyltransferase inhibition prevents G2/M transition in Xenopus laevis oocytes. *The Journal of biological chemistry* 282: 12527–12536.

DEHENNAUT, V., M.-C. SLOMIANNY, A. PAGE, A.-S. VERCOUTTER-EDOUART, C. JESSUS, J.-C. MICHALSKI, J.-P. VILAIN, ET AL. 2008. Identification of structural and functional O-linked N-acetylglucosamine-bearing proteins in Xenopus laevis oocyte. *Molecular & cellular proteomics: MCP* 7: 2229–2245.

DELGADO, T.C., D. PINHEIRO, M. CALDEIRA, M.M.C.A. CASTRO, C.F.G.C. GERALDES, P. LOPEZ-LARRUBIA, S. CERDAN, and J.G. JONES. 2009. Sources of hepatic triglyceride accumulation during high-fat feeding in the healthy rat. *NMR in biomedicine* 22: 310–317.

DENTIN, R., F. BENHAMED, I. HAINAULT, V. FAUVEAU, F. FOUFELLE, J.R.B. DYCK, J. GIRARD, and C. POSTIC. 2006. Liver-specific inhibition of ChREBP improves hepatic steatosis and insulin resistance in ob/ob mice. *Diabetes* 55: 2159–2170.

DENTIN, R., S. HEDRICK, J. XIE, J. YATES 3RD, and M. MONTMINY. 2008. Hepatic glucose sensing via the CREB coactivator CRTC2. *Science (New York, N.Y.)* 319: 1402–1405.

DENTIN, R., Y. LIU, S.-H. KOO, S. HEDRICK, T. VARGAS, J. HEREDIA, J. YATES, and M. MONTMINY. 2007. Insulin modulates gluconeogenesis by inhibition of the coactivator TORC2. *Nature* 449: 366–369.

DENTIN, R., L. TOMAS-COBOS, F. FOUFELLE, J. LEOPOLD, J. GIRARD, C. POSTIC, and P. FERRE. 2012. Glucose 6-phosphate, rather than xylulose 5-phosphate, is required for the activation of ChREBP in response to glucose in the liver. *Journal of hepatology* 56: 199–209.

DIAS, W.B., W.D. CHEUNG, Z. WANG, and G.W. HART. 2009. Regulation of calcium/calmodulin-dependent kinase IV by O-GlcNAc modification. *The Journal of Biological Chemistry* 284: 21327–21337.

DIRAISON, F., and M. BEYLOT. 1998. Role of human liver lipogenesis and reesterification in triglycerides secretion and in FFA reesterification. *The American Journal of Physiology* 274: E321-327.

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. *The Journal of Biological Chemistry* 269: 19321–19330.

DONNELLY, K.L., C.I. SMITH, S.J. SCHWARZENBERG, J. JESSURUN, M.D. BOLDT, and E.J. PARKS. 2005. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of Clinical Investigation* 115: 1343–1351.

DORFMUELLER, H.C., V.S. BORODKIN, M. SCHIMPL, S.M. SHEPHERD, N.A. SHPIRO, and D.M.F. VAN AALTEN. 2006. GlcNAcstatin: a picomolar, selective O-GlcNAcase inhibitor that modulates intracellular O-glcNAcylation levels. *Journal of the American Chemical Society* 128: 16484–16485.

DORFMUELLER, H.C., V.S. BORODKIN, M. SCHIMPL, X. ZHENG, R. KIME, K.D. READ, and D.M.F. VAN AALTEN. 2010. Cell-penetrant, nanomolar O-GlcNAcase inhibitors selective against lysosomal hexosaminidases. *Chemistry & Biology* 17: 1250–1255.

DROUGAT, L., S. OLIVIER-VAN STICHELEN, M. MORTUAIRE, F. FOULQUIER, A.-S. LACOSTE, J.-C. MICHALSKI, T. LEFEBVRE, and A.-S. VERCOUTTER-EDOUART. 2012. Characterization of O-GlcNAc cycling and proteomic identification of differentially O-GlcNAcylated proteins during G1/S transition. *Biochimica et biophysica acta* 1820: 1839–1848.

DURGAN, D.J., B.M. PAT, B. LACZY, J.A. BRADLEY, J.-Y. TSAI, M.H. GRENETT, W.F. RATCLIFFE, ET AL. 2011. O-GlcNAcylation, novel post-translational modification linking myocardial metabolism and cardiomyocyte circadian clock. *The Journal of Biological Chemistry* 286: 44606–44619.

DURNING, S.P., H. FLANAGAN-STEET, N. PRASAD, and L. WELLS. 2016. O-Linked  $\beta$ -N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) Acts as a Glucose Sensor to Epigenetically Regulate the Insulin Gene in Pancreatic Beta Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 291: 2107–2118.

## E

EISENBERG, M.L., A.V. MAKER, L.A. SLEZAK, J.D. NATHAN, K.C. SRITHARAN, B.P. JENA, J.P. GEIBEL, and D.K. ANDERSEN. 2005. Insulin receptor (IR) and glucose transporter 2 (GLUT2) proteins form a complex on the rat hepatocyte membrane. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* 15: 51–58.

ELLIS, J.M., J.L. FRAHM, L.O. LI, and R.A. COLEMAN. 2010. Acyl-coenzyme A synthetases in metabolic control. *Current opinion in lipidology* 21: 212–217.

## F

FARRELLY, D., K.S. BROWN, A. TIEMAN, J. REN, S.A. LIRA, D. HAGAN, R. GREGG, ET AL. 1999. Mice mutant for glucokinase regulatory protein exhibit decreased liver glucokinase: a sequestration mechanism in metabolic regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 14511–14516.

FERRER, J.C., C. FAVRE, R.R. GOMIS, J.M. FERNANDEZ-NOVELL, M. GARCÍA-ROCHA, N. DE LA IGLESIA, E. CID, and J.J. GUINOVART. 2003. Control of glycogen deposition. *FEBS Letters* 546: 127–132.

FINZEL, K., D.J. LEE, and M.D. BURKART. 2015. Using modern tools to probe the structure-function relationship of fatty acid synthases. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 16: 528–547.

FLEISCHMANN, M., and P.B. IYNEDJIAN. 2000. Regulation of sterol regulatory-element binding protein 1 gene expression in liver: role of insulin and protein kinase B/cAkt. *The Biochemical Journal* 349: 13–17.

FORETZ, M., C. GUICHARD, P. FERRE, and F. FOUFELLE. 1999. Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 12737–12742.

FORSYTHE, M.E., D.C. LOVE, B.D. LAZARUS, E.J. KIM, W.A. PRINZ, G. ASHWELL, M.W. KRAUSE, and J.A. HANOVER. 2006. Caenorhabditis elegans ortholog of a diabetes susceptibility locus: oga-1 (O-GlcNAcase) knockout impacts O-GlcNAc cycling, metabolism, and dauer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 11952–11957.

FRANGIOUDAKIS, G., J.G. BURCHFIELD, S. NARASIMHAN, G.J. COONEY, M. LEITGES, T.J. BIDEN, and C. SCHMITZ-PEIFFER. 2009. Diverse roles for protein kinase C delta and protein kinase C epsilon in the generation of high-fat-diet-induced glucose intolerance in mice: regulation of lipogenesis by protein kinase C delta. *Diabetologia* 52: 2616–2620.

FRICOVSKY, E.S., J. SUAREZ, S.-H. IHM, B.T. SCOTT, J.A. SUAREZ-RAMIREZ, I. BANERJEE, M. TORRES-GONZALEZ, ET AL. 2012. Excess protein O-GlcNAcylation and the progression of diabetic cardiomyopathy. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 303: R689-699.

FROGUEL, P., H. ZOUALI, N. VIONNET, G. VELHO, M. VAXILLAIRE, F. SUN, S. LESAGE, ET AL. 1993. Familial hyperglycemia due to mutations in glucokinase. Definition of a subtype of diabetes mellitus. *The New England Journal of Medicine* 328: 697–702.

FUJIKI, R., W. HASHIBA, H. SEKINE, A. YOKOYAMA, T. CHIKANISHI, S. ITO, Y. IMAI, ET AL. 2011. GlcNAcylation of histone H2B facilitates its monoubiquitination. *Nature* 480: 557–560.

FUKAO, T., G.D. LOPASCHUK, and G.A. MITCHELL. 2004. Pathways and control of ketone body metabolism: on the fringe of lipid biochemistry. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 70: 243–251.

FUTAMURA, M., H. HOSAKA, A. KADOTANI, H. SHIMAZAKI, K. SASAKI, S. OHYAMA, T. NISHIMURA, ET AL. 2006. An Allosteric Activator of Glucokinase Impairs the Interaction of Glucokinase and

Glucokinase Regulatory Protein and Regulates Glucose Metabolism. *Journal of Biological Chemistry* 281: 37668–37674.

## G

GAGNON, J., S. DAOU, N. ZAMORANO, N.V.G. IANNANTUONO, I. HAMMOND-MARTEL, N. MASHTALIR, E. BONNEIL, ET AL. 2015. Undetectable histone O-GlcNAcylation in mammalian cells. *Epigenetics* 10: 677–691.

GAMBETTA, M.C., K. OKTABA, and J. MÜLLER. 2009. Essential role of the glycosyltransferase sxc/Ogt in polycomb repression. *Science (New York, N.Y.)* 325: 93–96.

GANDY, J.C., A.E. ROUNTREE, and G.N. BIJUR. 2006. Akt1 is dynamically modified with O-GlcNAc following treatments with PUGNAc and insulin-like growth factor-1. *FEBS letters* 580: 3051–3058.

GAO, Y., J. MIYAZAKI, and G.W. HART. 2003. The transcription factor PDX-1 is posttranslationally modified by O-linked N-acetylglucosamine and this modification is correlated with its DNA binding activity and insulin secretion in min6 beta-cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 415: 155–163.

GAO, Y., G.J. PARKER, and G.W. HART. 2000. Streptozotocin-induced beta-cell death is independent of its inhibition of O-GlcNAcase in pancreatic Min6 cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 383: 296–302.

GAO, Y., L. WELLS, F.I. COMER, G.J. PARKER, and G.W. HART. 2001. Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: cloning and characterization of a neutral, cytosolic beta-N-acetylglucosaminidase from human brain. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 9838–9845.

GARWIN, J.L., A.L. KLAGES, and J.E. CRONAN. 1980. Beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase II of Escherichia coli. Evidence for function in the thermal regulation of fatty acid synthesis. *The Journal of Biological Chemistry* 255: 3263–3265.

GATENBY, R.A., and R.J. GILLIES. 2004. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature Reviews Cancer* 4: 891–899.

GEWINNER, C., G. HART, N. ZACHARA, R. COLE, C. BEISENHERZ-HUSS, and B. GRONER. 2004. The coactivator of transcription CREB-binding protein interacts preferentially with the glycosylated form of Stat5. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 3563–3572.

GIMENO, R.E., and J. CAO. 2008. Thematic Review Series: Glycerolipids. Mammalian glycerol-3-phosphate acyltransferases: new genes for an old activity. *Journal of Lipid Research* 49: 2079–2088.

GIRARD, J., D. PERDEREAU, F. FOUFELLE, C. PRIP-BUUS, and P. FERRE. 1994. Regulation of lipogenic enzyme gene expression by nutrients and hormones. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 8: 36–42.

GLATZ, J.F.C., and G.J. VAN DER VUSSE. 1996. Cellular fatty acid-binding proteins: Their function and physiological significance. *Progress in Lipid Research* 35: 243–282.

GLOSTER, T.M., W.F. ZANDBERG, J.E. HEINONEN, D.L. SHEN, L. DENG, and D.J. VOCADLO. 2011. Hijacking a biosynthetic pathway yields a glycosyltransferase inhibitor within cells. *Nature chemical biology* 7: 174–181.

GOLDSTEIN, J.L., R.B. RAWSON, and M.S. BROWN. 2002. Mutant mammalian cells as tools to delineate the sterol regulatory element-binding protein pathway for feedback regulation of lipid synthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 397: 139–148.

GOLKS, A., T.-T.T. TRAN, J.F. GOETSCHY, and D. GUERINI. 2007. Requirement for O-linked N-acetylglucosaminyltransferase in lymphocytes activation. *The EMBO journal* 26: 4368–4379.

GONZALEZ-RODRIGUEZ, Á., C. NEVADO, F. ESCRIVA, G. SESTI, C.M. RONDINONE, M. BENITO, and Á.M. VALVERDE. 2008. PTP1B deficiency increases glucose uptake in neonatal hepatocytes: involvement of IRA/GLUT2 complexes. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 295: G338–G347.

GRAHAM, D.L., A.J. GRAY, J.A. JOYCE, D. YU, J. O'MOORE, G.A. CARLSON, M.S. SHEARMAN, ET AL. 2014. Increased O-GlcNAcylation reduces pathological tau without affecting its normal phosphorylation in a mouse model of tauopathy. *Neuropharmacology* 79: 307–313.

GRANER, E., D. TANG, S. ROSSI, A. BARON, T. MIGITA, L.J. WEINSTEIN, M. LECHPAMMER, ET AL. 2004. The isopeptidase USP2a regulates the stability of fatty acid synthase in prostate cancer. *Cancer Cell* 5: 253–261.

GRANNER, D., T. ANDREONE, K. SASAKI, and E. BEALE. 1983. Inhibition of transcription of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene by insulin. *Nature* 305: 549–551.

GREENE, M.W., C.M. BURRINGTON, Y. LUO, M.S. RUHOFF, D.T. LYNCH, and N. CHAITHONGDI. 2014. PKCδ is activated in the liver of obese Zucker rats and mediates diet-induced whole body insulin resistance and hepatocyte cellular insulin resistance. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 25: 281–288.

GREIS, K.D., W. GIBSON, and G.W. HART. 1994. Site-specific glycosylation of the human cytomegalovirus tegument basic phosphoprotein (UL32) at serine 921 and serine 952. *Journal of Virology* 68: 8339–8349.

GRIFFITH, L.S., and B. SCHMITZ. 1999. O-linked N-acetylglucosamine levels in cerebellar neurons respond reciprocally to pertubations of phosphorylation. *European journal of biochemistry / FEBS* 262: 824–831.

GUINEZ, C., G. FILHOULAUD, F. RAYAH-BENHAMED, S. MARMIER, C. DUBUQUOY, R. DENTIN, M. MOLDES, ET AL. 2011. O-GlcNAcylation increases ChREBP protein content and transcriptional activity in the liver. *Diabetes* 60: 1399–1413.

GUINEZ, C., J. LEMOINE, J.-C. MICHALSKI, and T. LEFEBVRE. 2004. 70-kDa-heat shock protein presents an adjustable lectinic activity towards O-linked N-acetylglucosamine. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 319: 21–26.

GUINEZ, C., A.-M. MIR, V. DEHENNAUT, R. CACAN, A. HARDUIN-LEPERS, J.-C. MICHALSKI, and T. LEFEBVRE. 2008. Protein ubiquitination is modulated by O-GlcNAc glycosylation. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22: 2901–2911.

GUINEZ, C., A.-M. MIR, Y. LEROY, R. CACAN, J.-C. MICHALSKI, and T. LEFEBVRE. 2007. Hsp70-GlcNAc-binding activity is released by stress, proteasome inhibition, and protein misfolding. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 361: 414–420.

## Η

HAAS, J.T., J. MIAO, D. CHANDA, Y. WANG, E. ZHAO, M.E. HAAS, M. HIRSCHEY, ET AL. 2012. Hepatic insulin signaling is required for obesity-dependent expression of SREBP-1c mRNA but not for feeding-dependent expression. *Cell Metabolism* 15: 873–884.

HALL, A.M., K. KOU, Z. CHEN, T.A. PIETKA, M. KUMAR, K.M. KORENBLAT, K. LEE, ET AL. 2012. Evidence for regulated monoacylglycerol acyltransferase expression and activity in human liver. *Journal of Lipid Research* 53: 990–999.

HALTIWANGER, R.S., M.A. BLOMBERG, and G.W. HART. 1992. Glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins. Purification and characterization of a uridine diphospho-N-acetylglucosamine:polypeptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase. *The Journal of Biological Chemistry* 267: 9005–9013.

HALTIWANGER, R.S., K. GROVE, and G.A. PHILIPSBERG. 1998. Modulation of O-linked Nacetylglucosamine 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. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 3611–3617.

HALTIWANGER, R.S., G.D. HOLT, and G.W. HART. 1990. Enzymatic addition of O-GlcNAc to nuclear and cytoplasmic proteins. Identification of a uridine diphospho-N-acetylglucosamine:peptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase. *The Journal of biological chemistry* 265: 2563–2568.

HAN, H.-S., G. KANG, J.S. KIM, B.H. CHOI, and S.-H. KOO. 2016. Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective. *Experimental & Molecular Medicine* 48: e218.

HANOVER, J.A., C.K. COHEN, M.C. WILLINGHAM, and M.K. PARK. 1987. O-linked N-acetylglucosamine is attached to proteins of the nuclear pore. Evidence for cytoplasmic and nucleoplasmic glycoproteins. *The Journal of Biological Chemistry* 262: 9887–9894.

HANOVER, J.A., Z. LAI, G. LEE, W.A. LUBAS, and S.M. SATO. 1999. Elevated O-linked N-acetylglucosamine metabolism in pancreatic beta-cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 362: 38–45.

HANOVER, J.A., S. YU, W.B. LUBAS, S.H. SHIN, M. RAGANO-CARACCIOLA, J. KOCHRAN, and D.C. LOVE. 2003. Mitochondrial and nucleocytoplasmic isoforms of O-linked GlcNAc transferase encoded by a single mammalian gene. *Archives of biochemistry and biophysics* 409: 287–297.

HANSON, R.W., and L. RESHEF. 1997. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. *Annual Review of Biochemistry* 66: 581–611.

HARDIVILLE, S., E. HOEDT, C. MARILLER, M. BENAÏSSA, and A. PIERCE. 2010. O-GlcNAcylation/phosphorylation cycling at Ser10 controls both transcriptional activity and stability of delta-lactoferrin. *The Journal of biological chemistry* 285: 19205–19218.

HARRIS, T.E., T.A. HUFFMAN, A. CHI, J. SHABANOWITZ, D.F. HUNT, A. KUMAR, and J.C. LAWRENCE. 2007. Insulin controls subcellular localization and multisite phosphorylation of the phosphatidic acid phosphatase, lipin 1. *The Journal of Biological Chemistry* 282: 277–286.

HART, G.W., L.K. KREPPEL, F.I. COMER, C.S. ARNOLD, D.M. SNOW, Z. YE, X. CHENG, ET AL. 1996. O-GlcNAcylation of key nuclear and cytoskeletal proteins: reciprocity with O-phosphorylation and putative roles in protein multimerization. *Glycobiology* 6: 711–716.

HARTWECK, L.M., R.K. GENGER, W.M. GREY, and N.E. OLSZEWSKI. 2006. SECRET AGENT and SPINDLY have overlapping roles in the development of Arabidopsis thaliana L. Heyn. *Journal of Experimental Botany* 57: 865–875.

HARTWECK, L.M., C.L. SCOTT, and N.E. OLSZEWSKI. 2002. Two O-linked N-acetylglucosamine transferase genes of Arabidopsis thaliana L. Heynh. have overlapping functions necessary for gamete and seed development. *Genetics* 161: 1279–1291.

HEATH, J.M., Y. SUN, K. YUAN, W.E. BRADLEY, S. LITOVSKY, L.J. DELL'ITALIA, J.C. CHATHAM, ET AL. 2014. Activation of AKT by O-linked N-acetylglucosamine induces vascular calcification in diabetes mellitus. *Circulation Research* 114: 1094–1102.

HEBERT, L.F., M.C. DANIELS, J. ZHOU, E.D. CROOK, R.L. TURNER, S.T. SIMMONS, J.L. NEIDIGH, ET AL. 1996. Overexpression of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase in transgenic mice leads to insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation* 98: 930–936.
HEGARTY, B.D., A. BOBARD, I. HAINAULT, P. FERRE, P. BOSSARD, and F. FOUFELLE. 2005. Distinct roles of insulin and liver X receptor in the induction and cleavage of sterol regulatory elementbinding protein-1c. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 791–796.

HERMAN, M.A., O.D. PERONI, J. VILLORIA, M.R. SCHÖN, N.A. ABUMRAD, M. BLÜHER, S. KLEIN, and B.B. KAHN. 2012. A novel ChREBP isoform in adipose tissue regulates systemic glucose metabolism. *Nature* 484: 333–338.

HERZIG, S., F. LONG, U.S. JHALA, S. HEDRICK, R. QUINN, A. BAUER, D. RUDOLPH, ET AL. 2001. CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature* 413: 179–183.

HOLT, G.D., C.M. SNOW, A. SENIOR, R.S. HALTIWANGER, L. GERACE, and G.W. HART. 1987. Nuclear pore complex glycoproteins contain cytoplasmically disposed O-linked Nacetylglucosamine. *The Journal of Cell Biology* 104: 1157–1164.

HORTON, J.D., Y. BASHMAKOV, I. SHIMOMURA, and H. SHIMANO. 1998. Regulation of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and refed mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 5987–5992.

HOUSLEY, M.P., J.T. RODGERS, N.D. UDESHI, T.J. KELLY, J. SHABANOWITZ, D.F. HUNT, P. PUIGSERVER, and G.W. HART. 2008. O-GlcNAc regulates FoxO activation in response to glucose. *The Journal of biological chemistry* 283: 16283–16292.

HOUSLEY, M.P., N.D. UDESHI, J.T. RODGERS, J. SHABANOWITZ, P. PUIGSERVER, D.F. HUNT, and G.W. HART. 2009. A PGC-1alpha-O-GlcNAc transferase complex regulates FoxO transcription factor activity in response to glucose. *The Journal of Biological Chemistry* 284: 5148–5157.

HU, Y., L. RIESLAND, A.J. PATERSON, and J.E. KUDLOW. 2004. Phosphorylation of mouse glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase 2 (GFAT2) by cAMP-dependent protein kinase increases the enzyme activity. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 29988–29993.

HUA, X., J. WU, J.L. GOLDSTEIN, M.S. BROWN, and H.H. HOBBS. 1995. Structure of the human gene encoding sterol regulatory element binding protein-1 (SREBF1) and localization of SREBF1 and SREBF2 to chromosomes 17p11.2 and 22q13. *Genomics* 25: 667–673.

HUANG, W., R. BANSODE, M. MEHTA, and K.D. MEHTA. 2009. Loss of protein kinase Cbeta function protects mice against diet-induced obesity and development of hepatic steatosis and insulin resistance. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 49: 1525–1536.

HUANG, X., Q. PAN, D. SUN, W. CHEN, A. SHEN, M. HUANG, J. DING, and M. GENG. 2013. O-GlcNAcylation of cofilin promotes breast cancer cell invasion. *The Journal of Biological Chemistry* 288: 36418–36425.

HUNTER, T. 2007. The Age of Crosstalk: Phosphorylation, Ubiquitination, and Beyond. *Molecular Cell* 28: 730–738.

HUSSAIN, M.M., J. SHI, and P. DREIZEN. 2003. Microsomal triglyceride transfer protein and its role in apoB-lipoprotein assembly. *Journal of Lipid Research* 44: 22–32.

HUTTON, J.C., and R.M. O'BRIEN. 2009. Glucose-6-phosphatase Catalytic Subunit Gene Family. *Journal of Biological Chemistry* 284: 29241–29245.

DE LA IGLESIA, N., M. VEIGA-DA-CUNHA, E. VAN SCHAFTINGEN, J.J. GUINOVART, and J.C. FERRER. 1999. Glucokinase regulatory protein is essential for the proper subcellular localisation of liver glucokinase. *FEBS letters* 456: 332–338.

IIZUKA, K., R.K. BRUICK, G. LIANG, J.D. HORTON, and K. UYEDA. 2004. Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 7281–7286.

IIZUKA, K., B. MILLER, and K. UYEDA. 2006. Deficiency of carbohydrate-activated transcription factor ChREBP prevents obesity and improves plasma glucose control in leptindeficient (ob/ob) mice. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 291: E358-364.

ISHII, K. 2014. PET approaches for diagnosis of dementia. *AJNR. American journal of neuroradiology* 35: 2030–2038.

ISSAD, T., and M. KUO. 2008. O-GlcNAc modification of transcription factors, glucose sensing and glucotoxicity. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 19: 380–389.

ITKONEN, H.M., S. MINNER, I.J. GULDVIK, M.J. SANDMANN, M.C. TSOURLAKIS, V. BERGE, A. SVINDLAND, ET AL. 2013. O-GlcNAc transferase integrates metabolic pathways to regulate the stability of c-MYC in human prostate cancer. *Cancer research*.

IYNEDJIAN, P.B. 1993. Mammalian glucokinase and its gene. *The Biochemical Journal* 293 (Pt 1): 1–13.

IYNEDJIAN, P.B., A. GJINOVCI, and A.E. RENOLD. 1988. Stimulation by insulin of glucokinase gene transcription in liver of diabetic rats. *The Journal of Biological Chemistry* 263: 740–744.

JACKOWSKI, S., C.M. MURPHY, J.E. CRONAN, and C.O. ROCK. 1989. Acetoacetyl-acyl carrier protein synthase. A target for the antibiotic thiolactomycin. *The Journal of Biological Chemistry* 264: 7624–7629.

JACKSON, S.P., and R. TJIAN. 1988. O-glycosylation of eukaryotic transcription factors: implications for mechanisms of transcriptional regulation. *Cell* 55: 125–133.

JAMES, W.P.T. 2008. The epidemiology of obesity: the size of the problem. *Journal of Internal Medicine* 263: 336–352.

JANOWSKI, B.A., P.J. WILLY, T.R. DEVI, J.R. FALCK, and D.J. MANGELSDORF. 1996. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR $\alpha$ . *Nature* 383: 728–731.

JAYAKUMAR, A., M.H. TAI, W.Y. HUANG, W. AL-FEEL, M. HSU, L. ABU-ELHEIGA, S.S. CHIRALA, and S.J. WAKIL. 1995. Human fatty acid synthase: properties and molecular cloning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 8695–8699.

JENKINS, C.M., J. YANG, H.F. SIMS, and R.W. GROSS. 2011. Reversible High Affinity Inhibition of Phosphofructokinase-1 by Acyl-CoA A MECHANISM INTEGRATING GLYCOLYTIC FLUX WITH LIPID METABOLISM. *Journal of Biological Chemistry* 286: 11937–11950.

JIANG, M.H., J. FEI, M.S. LAN, Z.P. LU, M. LIU, W.W. FAN, X. GAO, and D.R. LU. 2008. Hypermethylation of hepatic Gck promoter in ageing rats contributes to diabetogenic potential. *Diabetologia* 51: 1525–1533.

JIANG, W., S. WANG, M. XIAO, Y. LIN, L. ZHOU, Q. LEI, Y. XIONG, ET AL. 2011. Acetylation regulates gluconeogenesis by promoting PEPCK1 degradation via recruiting the UBR5 ubiquitin ligase. *Molecular cell* 43: 33–44.

JIN, Q., L.X. YUAN, D. BOULBES, J.M. BAEK, Y.N. WANG, D. GOMEZ-CABELLO, D.H. HAWKE, ET AL. 2010. Fatty acid synthase phosphorylation: a novel therapeutic target in HER2-overexpressing breast cancer cells. *Breast Cancer Research : BCR* 12: R96.

JINEK, M., J. REHWINKEL, B.D. LAZARUS, E. IZAURRALDE, J.A. HANOVER, and E. CONTI. 2004. The superhelical TPR-repeat domain of O-linked GlcNAc transferase exhibits structural similarities to importin alpha. *Nature Structural & Molecular Biology* 11: 1001–1007.

JUNG, S.-Y., H.-K. JEON, J.-S. CHOI, and Y.-J. KIM. 2012. Reduced expression of FASN through SREBP-1 down-regulation is responsible for hypoxic cell death in HepG2 cells. *Journal of cellular biochemistry* 113: 3730–3739.

#### K

KAASIK, K., S. KIVIMÄE, J.J. ALLEN, R.J. CHALKLEY, Y. HUANG, K. BAER, H. KISSEL, ET AL. 2013. Glucose sensor O-GlcNAcylation coordinates with phosphorylation to regulate circadian clock. *Cell Metabolism* 17: 291–302.

KABASHIMA, T., T. KAWAGUCHI, B.E. WADZINSKI, and K. UYEDA. 2003. Xylulose 5-phosphate mediates glucose-induced lipogenesis by xylulose 5-phosphate-activated protein phosphatase in rat liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 5107–5112.

KAMATA, K., M. MITSUYA, T. NISHIMURA, J.-I. EIKI, and Y. NAGATA. 2004. Structural basis for allosteric regulation of the monomeric allosteric enzyme human glucokinase. *Structure (London, England: 1993)* 12: 429–438.

KAPLON, J., L. VAN DAM, and D. PEEPER. 2015. Two-way communication between the metabolic and cell cycle machineries: the molecular basis. *Cell Cycle* 14: 2022–2032.

KAPURIA, V., U.F. RÖHRIG, T. BHUIYAN, V.S. BORODKIN, D.M.F. VAN AALTEN, V. ZOETE, and W. HERR. 2016. Proteolysis of HCF-1 by Ser/Thr glycosylation-incompetent O-GlcNAc transferase:UDP-GlcNAc complexes. *Genes & Development* 30: 960–972.

KARIM, S., D.H. ADAMS, and P.F. LALOR. 2012. Hepatic expression and cellular distribution of the glucose transporter family. *World Journal of Gastroenterology : WJG* 18: 6771–6781.

KAWAGUCHI, T., M. TAKENOSHITA, T. KABASHIMA, and K. UYEDA. 2001. Glucose and cAMP regulate the L-type pyruvate kinase gene by phosphorylation/dephosphorylation of the carbohydrate response element binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 13710–13715.

KAZEMI, Z., H. CHANG, S. HASERODT, C. MCKEN, and N.E. ZACHARA. 2010. O-linked beta-Nacetylglucosamine (O-GlcNAc) regulates stress-induced heat shock protein expression in a GSK-3beta-dependent manner. *The Journal of Biological Chemistry* 285: 39096–39107.

KEBEDE, M., M. FERDAOUSSI, A. MANCINI, T. ALQUIER, R.N. KULKARNI, M.D. WALKER, and V. POITOUT. 2012. Glucose activates free fatty acid receptor 1 gene transcription via phosphatidylinositol-3-kinase-dependent O-GlcNAcylation of pancreas-duodenum homeobox-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 2376–2381.

KEEMBIYEHETTY, C.N., A. KRZESLAK, D.C. LOVE, and J.A. HANOVER. 2011. A lipid-droplettargeted O-GlcNAcase isoform is a key regulator of the proteasome. *Journal of Cell Science* 124: 2851–2860.

KELLY, W.G., M.E. DAHMUS, and G.W. HART. 1993. RNA polymerase II is a glycoprotein. Modification of the COOH-terminal domain by O-GlcNAc. *The Journal of Biological Chemistry* 268: 10416–10424.

KELLY, W.G., and G.W. HART. 1989. Glycosylation of chromosomal proteins: localization of O-linked N-acetylglucosamine in Drosophila chromatin. *Cell* 57: 243–251.

KEPPENS, S., A. VANDEKERCKHOVE, H. MOSHAGE, S.H. YAP, R. AERTS, and H. DE WULF. 1993. Regulation of glycogen phosphorylase activity in isolated human hepatocytes. *Hepatology* 17: 610–614.

KHIDEKEL, N., S.B. FICARRO, P.M. CLARK, M.C. BRYAN, D.L. SWANEY, J.E. REXACH, Y.E. SUN, ET AL. 2007. Probing the dynamics of O-GlcNAc glycosylation in the brain using quantitative proteomics. *Nature Chemical Biology* 3: 339–348.

KIETZMANN, T., U. ROTH, S. FREIMANN, and K. JUNGERMANN. 1997. Arterial oxygen partial pressures reduce the insulin-dependent induction of the perivenously located glucokinase in rat hepatocyte cultures: mimicry of arterial oxygen pressures by H2O2. *The Biochemical Journal* 321 (Pt 1): 17–20.

KIM, J.B., P. SARRAF, M. WRIGHT, K.M. YAO, E. MUELLER, G. SOLANES, B.B. LOWELL, and B.M. SPIEGELMAN. 1998. Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. *The Journal of Clinical Investigation* 101: 1–9.

KIM, S.-Y., H. KIM, T.-H. KIM, S.-S. IM, S.-K. PARK, I.-K. LEE, K.-S. KIM, and Y.-H. AHN. 2004. SREBP-1c mediates the insulin-dependent hepatic glucokinase expression. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 30823–30829.

KIM, T.-H., H. KIM, J.-M. PARK, S.-S. IM, J.-S. BAE, M.-Y. KIM, H.-G. YOON, ET AL. 2009. Interrelationship between Liver X Receptor  $\alpha$ , Sterol Regulatory Element-binding Protein-1c, Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$ , and Small Heterodimer Partner in the Transcriptional Regulation of Glucokinase Gene Expression in Liver. *Journal of Biological Chemistry* 284: 15071–15083.

KLEINER, D.E., E.M. BRUNT, M. VAN NATTA, C. BEHLING, M.J. CONTOS, O.W. CUMMINGS, L.D. FERRELL, ET AL. 2005. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 41: 1313–1321.

Конліма, М., М. Емлол, N. Нідисні, М. Като, К. Котон, Т. Yoshimoto, T. Fujino, ет Al. 2007. Re-evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease. *International Journal of Molecular Medicine* 20: 351–358.

KONRAD, R.J., F. ZHANG, J.E. HALE, M.D. KNIERMAN, G.W. BECKER, and J.E. KUDLOW. 2002. Alloxan is an inhibitor of the enzyme O-linked N-acetylglucosamine transferase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 293: 207–212.

KOO, S.-H., L. FLECHNER, L. QI, X. ZHANG, R.A. SCREATON, S. JEFFRIES, S. HEDRICK, ET AL. 2005. The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism. *Nature* 437: 1109–1111. KORENBLAT, K.M., E. FABBRINI, B.S. MOHAMMED, and S. KLEIN. 2008. Liver, muscle, and adipose tissue insulin action is directly related to intrahepatic triglyceride content in obese subjects. *Gastroenterology* 134: 1369–1375.

KORNFELD, R. 1967. Studies on L-glutamine D-fructose 6-phosphate amidotransferase. I. Feedback inhibition by uridine diphosphate-N-acetylglucosamine. *The Journal of Biological Chemistry* 242: 3135–3141.

KÖTZLER, M.P., and S.G. WITHERS. 2016. Proteolytic Cleavage Driven by Glycosylation. *Journal of Biological Chemistry* 291: 429–434.

KREPPEL, L.K., M.A. BLOMBERG, and G.W. HART. 1997. Dynamic glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Cloning and characterization of a unique O-GlcNAc transferase with multiple tetratricopeptide repeats. *The Journal of Biological Chemistry* 272: 9308–9315.

KREPPEL, L.K., and G.W. HART. 1999. Regulation of a Cytosolic and Nuclear O-GlcNAc Transferase ROLE OF THE TETRATRICOPEPTIDE REPEATS. *Journal of Biological Chemistry* 274: 32015–32022.

KUO, M., V. ZILBERFARB, N. GANGNEUX, N. CHRISTEFF, and T. ISSAD. 2008. O-glycosylation of FoxO1 increases its transcriptional activity towards the glucose 6-phosphatase gene. *FEBS letters* 582: 829–834.

LAIRSON, L.L., B. HENRISSAT, G.J. DAVIES, and S.G. WITHERS. 2008. Glycosyltransferases: Structures, Functions, and Mechanisms. *Annual Review of Biochemistry* 77: 521–555.

LAMBERT, J.E., M.A. RAMOS-ROMAN, J.D. BROWNING, and E.J. PARKS. 2014. Increased de novo lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 146: 726–735.

LATASA, M.-J., M.J. GRIFFIN, Y.S. MOON, C. KANG, and H.S. SUL. 2003. Occupancy and function of the -150 sterol regulatory element and -65 E-box in nutritional regulation of the fatty acid synthase gene in living animals. *Molecular and Cellular Biology* 23: 5896–5907.

LAZARUS, M.B., J. JIANG, T.M. GLOSTER, W.F. ZANDBERG, G.E. WHITWORTH, D.J. VOCADLO, and S. WALKER. 2012. Structural snapshots of the reaction coordinate for O-GlcNAc transferase. *Nature Chemical Biology* 8: 966–968.

LAZARUS, M.B., J. JIANG, V. KAPURIA, T. BHUIYAN, J. JANETZKO, W.F. ZANDBERG, D.J. VOCADLO, ET AL. 2013. HCF-1 is cleaved in the active site of O-GlcNAc transferase. *Science (New York, N.Y.)* 342: 1235–1239.

LAZARUS, M.B., Y. NAM, J. JIANG, P. SLIZ, and S. WALKER. 2011. Structure of human O-GlcNAc transferase and its complex with a peptide substrate. *Nature* 469: 564–567.

LAZO, M., R. HERNAEZ, M.S. EBERHARDT, S. BONEKAMP, I. KAMEL, E. GUALLAR, A. KOTEISH, ET AL. 2013. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in the United States: the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *American Journal of Epidemiology* 178: 38–45.

LEE, S., J. LEE, S.-K. LEE, and J.W. LEE. 2008. Activating signal cointegrator-2 is an essential adaptor to recruit histone H3 lysine 4 methyltransferases MLL3 and MLL4 to the liver X receptors. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 22: 1312–1319.

LEE, Y.J., E.H. KO, J.E. KIM, E. KIM, H. LEE, H. CHOI, J.H. YU, ET AL. 2012. Nuclear receptor PPARy-regulated monoacylglycerol O-acyltransferase 1 (MGAT1) expression is responsible for the lipid accumulation in diet-induced hepatic steatosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 13656–13661.

LEFEBVRE, P., B. CARIOU, F. LIEN, F. KUIPERS, and B. STAELS. 2009. Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiological reviews* 89: 147–191.

LEFEBVRE, T., C. ALONSO, S. MAHBOUB, M.J. DUPIRE, J.P. ZANETTA, M.L. CAILLET-BOUDIN, and J.C. MICHALSKI. 1999. Effect of okadaic acid on O-linked N-acetylglucosamine levels in a neuroblastoma cell line. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1472: 71–81.

LEFEBVRE, T., C. CIENIEWSKI, J. LEMOINE, Y. GUERARDEL, Y. LEROY, J.P. ZANETTA, and J.C. MICHALSKI. 2001. Identification of N-acetyl-d-glucosamine-specific lectins from rat liver cytosolic and nuclear compartments as heat-shock proteins. *The Biochemical Journal* 360: 179–188.

LEFEBVRE, T., V. DEHENNAUT, C. GUINEZ, S. OLIVIER, L. DROUGAT, A.-M. MIR, M. MORTUAIRE, ET AL. 2010a. Dysregulation of the nutrient/stress sensor O-GlcNAcylation is involved in the etiology of cardiovascular disorders, type-2 diabetes and Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1800: 67–79.

LEFEBVRE, T., V. DEHENNAUT, C. GUINEZ, S. OLIVIER, L. DROUGAT, A.-M. MIR, M. MORTUAIRE, ET AL. 2010b. Dysregulation of the nutrient/stress sensor O-GlcNAcylation is involved in the etiology of cardiovascular disorders, type-2 diabetes and Alzheimer's disease. *Biochimica et biophysica acta* 1800: 67–79.

LEFEBVRE, T., C. GUINEZ, V. DEHENNAUT, O. BESEME-DEKEYSER, W. MORELLE, and J.-C. MICHALSKI. 2005. Does O-GlcNAc play a role in neurodegenerative diseases? *Expert Review of Proteomics* 2: 265–275. LEFEBVRE, T., S. PINTE, C. GUERARDEL, S. DELTOUR, N. MARTIN-SOUDANT, M.-C. SLOMIANNY, J.-C. MICHALSKI, and D. LEPRINCE. 2004. The tumor suppressor HIC1 (hypermethylated in cancer 1) is O-GlcNAc glycosylated. *European journal of biochemistry / FEBS* 271: 3843–3854.

LEFEBVRE, T., N. PLANQUE, D. LELEU, M. BAILLY, M.-L. CAILLET-BOUDIN, S. SAULE, and J.-C. MICHALSKI. 2002. O-glycosylation of the nuclear forms of Pax-6 products in quail neuroretina cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 85: 208–218.

LEHMAN, D.M., D.-J. FU, A.B. FREEMAN, K.J. HUNT, R.J. LEACH, T. JOHNSON-PAIS, J. HAMLINGTON, ET AL. 2005. A single nucleotide polymorphism in MGEA5 encoding O-GlcNAc-selective Nacetyl-beta-D glucosaminidase is associated with type 2 diabetes in Mexican Americans. *Diabetes* 54: 1214–1221.

LEITE, N.C., G.F. SALLES, A.L.E. ARAUJO, C.A. VILLELA-NOGUEIRA, and C.R.L. CARDOSO. 2009. Prevalence and associated factors of non-alcoholic fatty liver disease in patients with type-2 diabetes mellitus. *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver* 29: 113–119.

LETURQUE, A., E. BROT-LAROCHE, and M.L. GALL. 2009. GLUT2 mutations, translocation, and receptor function in diet sugar managing. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 296: E985–E992.

LEWIN, T.M., N.M.J. SCHWERBROCK, D.P. LEE, and R.A. COLEMAN. 2004. Identification of a new glycerol-3-phosphate acyltransferase isoenzyme, mtGPAT2, in mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 13488–13495.

LI, M.-D., H.-B. RUAN, M.E. HUGHES, J.-S. LEE, J.P. SINGH, S.P. JONES, M.N. NITABACH, and X. YANG. 2013. O-GlcNAc signaling entrains the circadian clock by inhibiting BMAL1/CLOCK ubiquitination. *Cell Metabolism* 17: 303–310.

LI, M.-D., H.-B. RUAN, J.P. SINGH, L. ZHAO, T. ZHAO, S. AZARHOUSH, J. WU, ET AL. 2012. O-GlcNAc Transferase Is Involved in Glucocorticoid Receptor-mediated Transrepression. *Journal of Biological Chemistry* 287: 12904–12912.

LI, M.V., B. CHANG, M. IMAMURA, N. POUNGVARIN, and L. CHAN. 2006. Glucose-dependent transcriptional regulation by an evolutionarily conserved glucose-sensing module. *Diabetes* 55: 1179–1189.

LI, S., M.S. BROWN, and J.L. GOLDSTEIN. 2010. Bifurcation of insulin signaling pathway in rat liver: mTORC1 required for stimulation of lipogenesis, but not inhibition of gluconeogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 3441–3446.

LI, X., F. LU, J.-Z. WANG, and C.-X. GONG. 2006. Concurrent alterations of O-GlcNAcylation and phosphorylation of tau in mouse brains during fasting. *The European Journal of Neuroscience* 23: 2078–2086.

LI, Y., C. ROUX, S. LAZEREG, J.-P. LECAER, O. LAPREVOTE, B. BADET, and M.-A. BADET-DENISOT. 2007. Identification of a novel serine phosphorylation site in human glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase isoform 1. *Biochemistry* 46: 13163–13169.

LIU, J., Y. YU, Y. FAN, H. CHANG, H. LIU, Y. CUI, Q. CHEN, and R. WANG. 2005. Cardiovascular effects of endomorphins in alloxan-induced diabetic rats. *Peptides* 26: 607–614.

LIU, L.-Z., H.-L. ZHAO, J. ZUO, S.K.S. HO, J.C.N. CHAN, Y. MENG, F.-D. FANG, and P.C.Y. TONG. 2006. Protein kinase Czeta mediates insulin-induced glucose transport through actin remodeling in L6 muscle cells. *Molecular Biology of the Cell* 17: 2322–2330.

LOVE, D.C., J. KOCHRAN, R.L. CATHEY, S.-H. SHIN, and J.A. HANOVER. 2003. Mitochondrial and nucleocytoplasmic targeting of O-linked GlcNAc transferase. *Journal of Cell Science* 116: 647–654.

LUBAS, W.A., D.W. FRANK, M. KRAUSE, and J.A. HANOVER. 1997a. O-Linked GlcNAc transferase is a conserved nucleocytoplasmic protein containing tetratricopeptide repeats. *The Journal of Biological Chemistry* 272: 9316–9324.

LUBAS, W.A., D.W. FRANK, M. KRAUSE, and J.A. HANOVER. 1997b. O-Linked GlcNAc Transferase Is a Conserved Nucleocytoplasmic Protein Containing Tetratricopeptide Repeats. *Journal of Biological Chemistry* 272: 9316–9324.

LUBAS, W.A., and J.A. HANOVER. 2000. Functional Expression of O-linked GlcNAc Transferase DOMAIN STRUCTURE AND SUBSTRATE SPECIFICITY. *Journal of Biological Chemistry* 275: 10983–10988.

LYNCH, T.P., C.M. FERRER, S.R. JACKSON, K.S. SHAHRIARI, K. VOSSELLER, and M.J. REGINATO. 2012. Critical role of O-Linked β-N-acetylglucosamine transferase in prostate cancer invasion, angiogenesis, and metastasis. *The Journal of Biological Chemistry* 287: 11070–11081.

### Μ

MA, Z., D.J. VOCADLO, and K. VOSSELLER. 2013. Hyper-O-GlcNAcylation is anti-apoptotic and maintains constitutive NF-κB activity in pancreatic cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry* 288: 15121–15130.

MACAULEY, M.S., A.K. BUBB, C. MARTINEZ-FLEITES, G.J. DAVIES, and D.J. VOCADLO. 2008. Elevation of global O-GlcNAc levels in 3T3-L1 adipocytes by selective inhibition of O-GlcNAcase does not induce insulin resistance. *The Journal of Biological Chemistry* 283: 34687–34695.

MACAULEY, M.S., G.E. WHITWORTH, A.W. DEBOWSKI, D. CHIN, and D.J. VOCADLO. 2005. O-GlcNAcase uses substrate-assisted catalysis: kinetic analysis and development of highly selective mechanism-inspired inhibitors. *The Journal of biological chemistry* 280: 25313–25322.

EL-MAGHRABI, M.R., A.J. LANGE, L. KÜMMEL, and S.J. PILKIS. 1991. The rat fructose-1,6-bisphosphatase gene. Structure and regulation of expression. *Journal of Biological Chemistry* 266: 2115–2120.

MAGNUSON, M.A. 1990. Glucokinase gene structure. Functional implications of molecular genetic studies. *Diabetes* 39: 523–527.

MAIER, T., S. JENNI, and N. BAN. 2006. Architecture of mammalian fatty acid synthase at 4.5 A resolution. *Science (New York, N.Y.)* 311: 1258–1262.

MANGONE, M., M.P. MYERS, and W. HERR. 2010. Role of the HCF-1 basic region in sustaining cell proliferation. *PloS One* 5: e9020.

MAO, J., S.S. CHIRALA, and S.J. WAKIL. 2003. Human acetyl-CoA carboxylase 1 gene: Presence of three promoters and heterogeneity at the 5'-untranslated mRNA region. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 7515–7520.

MAO, J., F.J. DEMAYO, H. LI, L. ABU-ELHEIGA, Z. GU, T.E. SHAIKENOV, P. KORDARI, ET AL. 2006. Liver-specific deletion of acetyl-CoA carboxylase 1 reduces hepatic triglyceride accumulation without affecting glucose homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 8552–8557.

MARILLER, C., S. HARDIVILLE, E. HOEDT, I. HUVENT, S. PINA-CANSECO, and A. PIERCE. 2012. Deltalactoferrin, an intracellular lactoferrin isoform that acts as a transcription factor. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire* 90: 307–319.

MAROTTA, N.P., C.A. CHERWIEN, T. ABEYWARDANA, and M.R. PRATT. 2012. O-GlcNAc modification prevents peptide-dependent acceleration of  $\alpha$ -synuclein aggregation. *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology* 13: 2665–2670.

MAROTTA, N.P., Y.H. LIN, Y.E. LEWIS, M.R. AMBROSO, B.W. ZARO, M.T. ROTH, D.B. ARNOLD, ET AL. 2015. O-GlcNAc modification blocks the aggregation and toxicity of the protein  $\alpha$ -synuclein associated with Parkinson's disease. *Nature Chemistry* 7: 913–920.

MARSHALL, S., V. BACOTE, and R.R. TRAXINGER. 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. *The Journal of Biological Chemistry* 266: 4706–4712.

MARTINEZ-FLEITES, C., M.S. MACAULEY, Y. HE, D.L. SHEN, D.J. VOCADLO, and G.J. DAVIES. 2008. Structure of an O-GlcNAc transferase homolog provides insight into intracellular glycosylation. *Nature Structural & Molecular Biology* 15: 764–765.

MÄRZ, P., J. STETEFELD, K. BENDFELDT, C. NITSCH, J. REINSTEIN, R.L. SHOEMAN, B. DIMITRIADES-SCHMUTZ, ET AL. 2006. Ataxin-10 Interacts with O-Linked  $\beta$ -N-Acetylglucosamine Transferase in the Brain. *Journal of Biological Chemistry* 281: 20263–20270.

MASSA, L., S. BALTRUSCH, D.A. OKAR, A.J. LANGE, S. LENZEN, and M. TIEDGE. 2004. Interaction of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFK-2/FBPase-2) with glucokinase activates glucose phosphorylation and glucose metabolism in insulin-producing cells. *Diabetes* 53: 1020–1029.

MASSA, M.L., J.J. GAGLIARDINO, and F. FRANCINI. 2011. Liver glucokinase: An overview on the regulatory mechanisms of its activity. *IUBMB life* 63: 1–6.

MATSCHINSKY, F.M., M.A. MAGNUSON, D. ZELENT, T.L. JETTON, N. DOLIBA, Y. HAN, R. TAUB, and J. GRIMSBY. 2006. The network of glucokinase-expressing cells in glucose homeostasis and the potential of glucokinase activators for diabetes therapy. *Diabetes* 55: 1–12.

MATSUKUMA, K.E., M.K. BENNETT, J. HUANG, L. WANG, G. GIL, and T.F. OSBORNE. 2006. Coordinated control of bile acids and lipogenesis through FXR-dependent regulation of fatty acid synthase. *Journal of Lipid Research* 47: 2754–2761.

MATSUZAKA, T., A. ATSUMI, R. MATSUMORI, T. NIE, H. SHINOZAKI, N. SUZUKI-KEMURIYAMA, M. KUBA, ET AL. 2012. Elovl6 promotes nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 56: 2199–2208.

MATSUZAKA, T., H. SHIMANO, N. YAHAGI, T. KATO, A. ATSUMI, T. YAMAMOTO, N. INOUE, ET AL. 2007. Crucial role of a long-chain fatty acid elongase, Elovl6, in obesity-induced insulin resistance. *Nature Medicine* 13: 1193–1202.

MATTHEWS, J.A., M. ACEVEDO-DUNCAN, and R.L. POTTER. 2005. Selective decrease of membrane-associated PKC-alpha and PKC-epsilon in response to elevated intracellular O-GlcNAc levels in transformed human glial cells. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1743: 305–315.

MAUVOISIN, D., and C. MOUNIER. 2011. Hormonal and nutritional regulation of SCD1 gene expression. *Biochimie* 93: 78–86.

McGARRY, J.D., and N.F. BROWN. 1997. The Mitochondrial Carnitine Palmitoyltransferase System — From Concept to Molecular Analysis. *European Journal of Biochemistry* 244: 1–14.

MCVIE-WYLIE, A.J., D.R. LAMSON, and Y.T. CHEN. 2001. Molecular cloning of a novel member of the GLUT family of transporters, SLC2a10 (GLUT10), localized on chromosome 20q13.1: a candidate gene for NIDDM susceptibility. *Genomics* 72: 113–117.

MEHDY, A., W. MORELLE, C. ROSNOBLET, D. LEGRAND, T. LEFEBVRE, S. DUVET, and F. FOULQUIER. 2012. PUGNAc treatment leads to an unusual accumulation of free oligosaccharides in CHO cells. *Journal of Biochemistry* 151: 439–446.

MENENDEZ, J.A., and R. LUPU. 2007. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nature Reviews Cancer* 7: 763–777.

MI, W., Y. GU, C. HAN, H. LIU, Q. FAN, X. ZHANG, Q. CONG, and W. YU. 2011. O-GlcNAcylation is a novel regulator of lung and colon cancer malignancy. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1812: 514–519.

MILEWSKI, S. 2002. Glucosamine-6-phosphate synthase—the multi-facets enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1597: 173–192.

MITHIEUX, G. 1997. New knowledge regarding glucose-6 phosphatase gene and protein and their roles in the regulation of glucose metabolism. *European Journal of Endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 136: 137–145.

MITRO, N., P.A. MAK, L. VARGAS, C. GODIO, E. HAMPTON, V. MOLTENI, A. KREUSCH, and E. SAEZ. 2007. The nuclear receptor LXR is a glucose sensor. *Nature* 445: 219–223.

MIYAZAKI, M., M.T. FLOWERS, H. SAMPATH, K. CHU, C. OTZELBERGER, X. LIU, and J.M. NTAMBI. 2007. Hepatic stearoyl-CoA desaturase-1 deficiency protects mice from carbohydrate-induced adiposity and hepatic steatosis. *Cell Metabolism* 6: 484–496.

MOCHE, M., G. SCHNEIDER, P. EDWARDS, K. DEHESH, and Y. LINDQVIST. 1999. Structure of the complex between the antibiotic cerulenin and its target, beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 6031–6034.

MOON, Y.A., N.A. SHAH, S. MOHAPATRA, J.A. WARRINGTON, and J.D. HORTON. 2001. Identification of a mammalian long chain fatty acyl elongase regulated by sterol regulatory element-binding proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 45358–45366.

MOON, Y.S., M.J. LATASA, K.H. KIM, D. WANG, and H.S. SUL. 2000. Two 5'-regions are required for nutritional and insulin regulation of the fatty-acid synthase promoter in transgenic mice. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 10121–10127.

MORGAN, K., A. UYUNI, G. NANDGIRI, L. MAO, L. CASTANEDA, E. KATHIRVEL, S.W. FRENCH, and T.R. MORGAN. 2008. Altered expression of transcription factors and genes regulating lipogenesis in liver and adipose tissue of mice with high fat diet-induced obesity and

nonalcoholic fatty liver disease. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 20: 843–854.

MOULE, S.K., N.J. EDGELL, A.C. BORTHWICK, and R.M. DENTON. 1992. Coenzyme A is a potent inhibitor of acetyl-CoA carboxylase from rat epididymal fat-pads. *Biochemical Journal* 283: 35–38.

MOUNIER, C., L. BOURAOUI, and E. RASSART. 2014. Lipogenesis in cancer progression (review). *International Journal of Oncology* 45: 485–492.

MUKHTAR, M., M. STUBBS, and L. AGIUS. 1999. Evidence for glucose and sorbitol-induced nuclear export of glucokinase regulatory protein in hepatocytes. *FEBS letters* 462: 453–458.

MÜLLER, R., A. JENNY, and P. STANLEY. 2013. The EGF repeat-specific O-GlcNActransferase Eogt interacts with notch signaling and pyrimidine metabolism pathways in Drosophila. *PloS One* 8: e62835.

MUNDAY, M.R. 2002. Regulation of mammalian acetyl-CoA carboxylase. *Biochemical Society Transactions* 30: 1059–1064.

MUTHUSAMY, S., K.U. HONG, S. DASSANAYAKA, T. HAMID, and S.P. JONES. 2015. E2F1 Transcription Factor Regulates O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) Transferase and O-GlcNAcase Expression. *Journal of Biological Chemistry* 290: 31013–31024.

MYERS, A., P. HOLMANS, H. MARSHALL, J. KWON, D. MEYER, D. RAMIC, S. SHEARS, ET AL. 2000. Susceptibility locus for Alzheimer's disease on chromosome 10. *Science (New York, N.Y.)* 290: 2304–2305.

MYERS, S.A., B. PANNING, and A.L. BURLINGAME. 2011. Polycomb repressive complex 2 is necessary for the normal site-specific O-GlcNAc distribution in mouse embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 9490–9495.

#### N

NAGOSHI, E., N. IMAMOTO, R. SATO, and Y. YONEDA. 1999. Nuclear import of sterol regulatory element-binding protein-2, a basic helix-loop-helix-leucine zipper (bHLH-Zip)-containing transcription factor, occurs through the direct interaction of importin beta with HLH-Zip. *Molecular Biology of the Cell* 10: 2221–2233.

NAJAFI-SHOUSHTARI, S.H., F. KRISTO, Y. LI, T. SHIODA, D.E. COHEN, R.E. GERSZTEN, and A.M. NÄÄR. 2010. MicroRNA-33 and the SREBP host genes cooperate to control cholesterol homeostasis. *Science (New York, N.Y.)* 328: 1566–1569.

NAJJAR, S.M., Y. YANG, M.A. FERNSTRÖM, S.-J. LEE, A.M. DEANGELIS, G.A.A. RJAILY, Q.Y. AL-SHARE, ET AL. 2005. Insulin acutely decreases hepatic fatty acid synthase activity. *Cell Metabolism* 2: 43–53.

NANASHIMA, N., J. ASANO, M. HAYAKARI, T. NAKAMURA, H. NAKANO, T. YAMADA, T. SHIMIZU, ET AL. 2005. Nuclear localization of STAT5A modified with O-linked N-acetylglucosamine and early involution in the mammary gland of Hirosaki hairless rat. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 43010–43016.

NARKEWICZ, M.R., P.B. IYNEDJIAN, P. FERRE, and J. GIRARD. 1990. Insulin and triiodothyronine induce glucokinase mRNA in primary cultures of neonatal rat hepatocytes. *The Biochemical Journal* 271: 585–589.

NOLTE, D., S. NIEMANN, and U. MÜLLER. 2003. Specific sequence changes in multiple transcript system DYT3 are associated with X-linked dystonia parkinsonism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 10347–10352.

NORDLIE, R.C., AND J.D. FOSTER, and A.J. LANGE. 1999. Regulation of Glucose Production by the Liver. *Annual Review of Nutrition* 19: 379–406.

NTAMBI, J.M., S.A. BUHROW, K.H. KAESTNER, R.J. CHRISTY, E. SIBLEY, T.J. KELLY, and M.D. LANE. 1988. Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes. Characterization of a differentially expressed gene encoding stearoyl-CoA desaturase. *The Journal of Biological Chemistry* 263: 17291–17300.

NTAMBI, J.M., M. MIYAZAKI, J.P. STOEHR, H. LAN, C.M. KENDZIORSKI, B.S. YANDELL, Y. SONG, ET AL. 2002. Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 11482–11486.

#### 0

O'DOHERTY, R.M., D.L. LEHMAN, J. SEOANE, A.M. GOMEZ-FOIX, J.J. GUINOVART, and C.B. NEWGARD. 1996. Differential metabolic effects of adenovirus-mediated glucokinase and hexokinase I overexpression in rat primary hepatocytes. *The Journal of Biological Chemistry* 271: 20524–20530.

O'DONNELL, N., N.E. ZACHARA, G.W. HART, and J.D. MARTH. 2004. Ogt-dependent X-chromosome-linked protein glycosylation is a requisite modification in somatic cell function and embryo viability. *Molecular and Cellular Biology* 24: 1680–1690.

OGAWA, M., S. SAWAGUCHI, K. FURUKAWA, and T. OKAJIMA. 2015. N-acetylglucosamine modification in the lumen of the endoplasmic reticulum. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* - *General Subjects* 1850: 1319–1324.

OH, K.-J., H.-S. HAN, M.-J. KIM, and S.-H. KOO. 2013. CREB and FoxO1: two transcription factors for the regulation of hepatic gluconeogenesis. *BMB Reports* 46: 567–574.

OHN, T., N. KEDERSHA, T. HICKMAN, S. TISDALE, and P. ANDERSON. 2008. A functional RNAi screen links O-GlcNAc modification of ribosomal proteins to stress granule and processing body assembly. *Nature Cell Biology* 10: 1224–1231.

OKUYAMA, R., and S. MARSHALL. 2003. UDP-N-acetylglucosaminyl transferase (OGT) in brain tissue: temperature sensitivity and subcellular distribution of cytosolic and nuclear enzyme. *Journal of Neurochemistry* 86: 1271–1280.

OLIVIER-VAN STICHELEN, S., V. DEHENNAUT, A. BUZY, J.-L. ZACHAYUS, C. GUINEZ, A.-M. MIR, I. EL YAZIDI-BELKOURA, ET AL. 2014. O-GlcNAcylation stabilizes  $\beta$ -catenin through direct competition with phosphorylation at threonine 41. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 28: 3325–3338.

OLIVIER-VAN STICHELEN, S., L. DROUGAT, V. DEHENNAUT, I. EL YAZIDI-BELKOURA, C. GUINEZ, A.-M. MIR, J.-C. MICHALSKI, ET AL. 2012. Serum-stimulated cell cycle entry promotes ncOGT synthesis required for cyclin D expression. *Oncogenesis* 1: e36.

OLIVIER-VAN STICHELEN, S., C. GUINEZ, A.-M. MIR, Y. PEREZ-CERVERA, C. LIU, J.-C. MICHALSKI, and T. LEFEBVRE. 2012. The hexosamine biosynthetic pathway and O-GlcNAcylation drive the expression of  $\beta$ -catenin and cell proliferation. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 302: E417-424.

OOSTERVEER, M.H., C. MATAKI, H. YAMAMOTO, T. HARACH, N. MOULLAN, T.H. VAN DIJK, E. AYUSO, ET AL. 2012. LRH-1-dependent glucose sensing determines intermediary metabolism in liver. *The Journal of Clinical Investigation* 122: 2817–2826.

ORTIZ-MEOZ, R.F., J. JIANG, M.B. LAZARUS, M. ORMAN, J. JANETZKO, C. FAN, D.Y. DUVEAU, ET AL. 2015. A Small Molecule That Inhibits OGT Activity in Cells. *ACS Chemical Biology* 10: 1392–1397.

OWEN, J.L., Y. ZHANG, S.-H. BAE, M.S. FAROOQI, G. LIANG, R.E. HAMMER, J.L. GOLDSTEIN, and M.S. BROWN. 2012. Insulin stimulation of SREBP-1c processing in transgenic rat hepatocytes requires p70 S6-kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 16184–16189.

#### Ρ

PARK, S., J. PAK, I. JANG, and J.W. CHO. 2014. Inhibition of mTOR affects protein stability of OGT. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 453: 208–212.

PARK, S.Y., H.S. KIM, N.H. KIM, S. JI, S.Y. CHA, J.G. KANG, I. OTA, ET AL. 2010. Snail1 is stabilized by O-GlcNAc modification in hyperglycaemic condition. *The EMBO journal* 29: 3787–3796.

PARKER, G.J., K.C. LUND, R.P. TAYLOR, and D.A. MCCLAIN. 2003. Insulin resistance of glycogen synthase mediated by o-linked N-acetylglucosamine. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 10022–10027.

PATHAK, S., J. ALONSO, M. SCHIMPL, K. RAFIE, D.E. BLAIR, V.S. BORODKIN, A.W. SCHÜTTELKOPF, ET AL. 2015. The active site of O-GlcNAc transferase imposes constraints on substrate sequence. *Nature Structural & Molecular Biology* 22: 744–750.

PATHAK, S., H.C. DORFMUELLER, V.S. BORODKIN, and D.M.F. VAN AALTEN. 2008. Chemical dissection of the link between streptozotocin, O-GlcNAc, and pancreatic cell death. *Chemistry* & *Biology* 15: 799–807.

PAYNE, V.A., C. ARDEN, C. WU, A.J. LANGE, and L. AGIUS. 2005. Dual role of phosphofructokinase-2/fructose bisphosphatase-2 in regulating the compartmentation and expression of glucokinase in hepatocytes. *Diabetes* 54: 1949–1957.

PEREZ-CERVERA, Y., V. DEHENNAUT, M. AQUINO GIL, K. GUEDRI, C.J. SOLORZANO MATA, S. OLIVIER-VAN STICHELEN, J.-C. MICHALSKI, ET AL. 2013. Insulin signaling controls the expression of O-GlcNAc transferase and its interaction with lipid microdomains. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 27: 3478–3486.

PEREZ-CERVERA, Y., G. HARICHAUX, J. SCHMIDT, F. DEBIERRE-GROCKIEGO, V. DEHENNAUT, U. BIEKER, E. MEURICE, ET AL. 2011. Direct evidence of O-GlcNAcylation in the apicomplexan Toxoplasma gondii: a biochemical and bioinformatic study. *Amino Acids* 40: 847–856.

PETERSON, T.R., S.S. SENGUPTA, T.E. HARRIS, A.E. CARMACK, S.A. KANG, E. BALDERAS, D.A. GUERTIN, ET AL. 2011. mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. *Cell* 146: 408–420.

POSTIC, C., and J. GIRARD. 2008. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *The Journal of Clinical Investigation* 118: 829–838.

### Q

QURESHI, A.A., R.A. JENIK, M. KIM, F.A. LORNITZO, and J.W. PORTER. 1975. Separation of two active forms (holo-a and holo-b) of pigeon liver fatty acid synthetase and their interconversion by phosphorylation and dephosphorylation. *Biochemical and biophysical research communications* 66: 344–351.

#### R

RAMAKRISHNAN, B., E. BOEGGEMAN, and P.K. QASBA. 2002. Beta-1,4-galactosyltransferase and lactose synthase: molecular mechanical devices. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 291: 1113–1118.

RAO, F.V., A.W. SCHÜTTELKOPF, H.C. DORFMUELLER, A.T. FERENBACH, I. NAVRATILOVA, and D.M.F. VAN AALTEN. 2013. Structure of a bacterial putative acetyltransferase defines the fold of the human O-GlcNAcase C-terminal domain. *Open Biology* 3: 130021.

RAY, M.K., B. DATTA, A. CHAKRABORTY, A. CHATTOPADHYAY, S. MEZA-KEUTHEN, and N.K. GUPTA. 1992. The eukaryotic initiation factor 2-associated 67-kDa polypeptide (p67) plays a critical role in regulation of protein synthesis initiation in animal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 539–543.

RENCUREL, F., G. WAEBER, B. ANTOINE, F. ROCCHICCIOLI, P. MAULARD, J. GIRARD, and A. LETURQUE. 1996. Requirement of glucose metabolism for regulation of glucose transporter type 2 (GLUT2) gene expression in liver. *Biochemical Journal* 314: 903–909.

REPA, J.J., G. LIANG, J. OU, Y. BASHMAKOV, J.M. LOBACCARO, I. SHIMOMURA, B. SHAN, ET AL. 2000. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes & Development* 14: 2819–2830.

REPA, J.J., and AND D.J. MANGELSDORF. 2000. The Role of Orphan Nuclear Receptors in the Regulation of Cholesterol Homeostasis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 16: 459–481.

RIBAUX, P.G., and P.B. IYNEDJIAN. 2003. Analysis of the role of protein kinase B (cAKT) in insulin-dependent induction of glucokinase and sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP1) mRNAs in hepatocytes. *The Biochemical Journal* 376: 697–705.

RIDER, M.H., L. BERTRAND, D. VERTOMMEN, P.A. MICHELS, G.G. ROUSSEAU, and L. HUE. 2004. 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: head-to-head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis. *The Biochemical Journal* 381: 561–579.

RIPPMANN, J.F., C. SCHOELCH, T. NOLTE, H. PAVLISKA, A. VAN MARLE, H. VAN ES, and J. PRESTLE. 2009. Improved lipid profile through liver-specific knockdown of liver X receptor alpha in KKAy diabetic mice. *Journal of Lipid Research* 50: 22–31.

ROBINSON, K.A., L.E. BALL, and M.G. BUSE. 2007. Reduction of O-GlcNAc protein modification does not prevent insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 292: E884-890.

ROBLES-FLORES, M., L. MELENDEZ, W. GARCIA, G. MENDOZA-HERNANDEZ, T.T. LAM, C. CASTAÑEDA-PATLAN, and H. GONZALEZ-AGUILAR. 2008. Posttranslational modifications on protein kinase c isozymes. Effects of epinephrine and phorbol esters. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1783: 695–712.

ROOS, M.D., and J.A. HANOVER. 2000. Structure of O-linked GlcNAc transferase: mediator of glycan-dependent signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 271: 275–280.

ROOS, M.D., K. SU, J.R. BAKER, and J.E. KUDLOW. 1997. O glycosylation of an Sp1-derived peptide blocks known Sp1 protein interactions. *Molecular and Cellular Biology* 17: 6472–6480.

ROOS, M.D., W. XIE, K. SU, J.A. CLARK, X. YANG, E. CHIN, A.J. PATERSON, and J.E. KUDLOW. 1998. Streptozotocin, an analog of N-acetylglucosamine, blocks the removal of O-GlcNAc from intracellular proteins. *Proceedings of the Association of American Physicians* 110: 422–432.

ROTH, U., K. CURTH, T.G. UNTERMAN, and T. KIETZMANN. 2004. The transcription factors HIF-1 and HNF-4 and the coactivator p300 are involved in insulin-regulated glucokinase gene expression via the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 2623–2631.

ROTH, U., K. JUNGERMANN, and T. KIETZMANN. 2002. Activation of glucokinase gene expression by hepatic nuclear factor 4alpha in primary hepatocytes. *The Biochemical Journal* 365: 223–228.

RUAN, H.-B., X. HAN, M.-D. LI, J.P. SINGH, K. QIAN, S. AZARHOUSH, L. ZHAO, ET AL. 2012. O-GlcNAc Transferase/Host Cell Factor C1 Complex Regulates Gluconeogenesis by Modulating PGC-1α Stability. *Cell Metabolism* 16: 226–237.

RUHL, C.E., and J.E. EVERHART. 2003. Determinants of the association of overweight with elevated serum alanine aminotransferase activity in the United States. *Gastroenterology* 124: 71–79.

Rui, L. 2014. Energy Metabolism in the Liver. *Comprehensive Physiology* 4: 177–197.

RUSTAEUS, S., K. LINDBERG, P. STILLEMARK, C. CLAESSON, L. ASP, T. LARSSON, J. BOREN, and S.-O. OLOFSSON. 1999. Assembly of Very Low Density Lipoprotein: A Two-Step Process of Apolipoprotein B Core Lipidation. *The Journal of Nutrition* 129: 463–463.

#### S

SABBISETTI, V., A. DI NAPOLI, A. SEELEY, A.M. AMATO, E. O'REGAN, M. GHEBREMICHAEL, M. LODA, and S. SIGNORETTI. 2009. p63 promotes cell survival through fatty acid synthase. *PloS One* 4: e5877.

S J PILKIS, and AND T.H. CLAUS. 1991. Hepatic Gluconeogenesis/Glycolysis: Regulation and Structure/Function Relationships of Substrate Cycle Enzymes. *Annual Review of Nutrition* 11: 465–515.

SAKABE, K., Z. WANG, and G.W. HART. 2010. β-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) is part of the histone code. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 19915–19920.

SAKAIDANI, Y., T. NOMURA, A. MATSUURA, M. ITO, E. SUZUKI, K. MURAKAMI, D. NADANO, ET AL. 2011. O-linked-N-acetylglucosamine on extracellular protein domains mediates epithelial cell-matrix interactions. *Nature Communications* 2: 583.

SAMUEL, V.T., Z.-X. LIU, X. QU, B.D. ELDER, S. BILZ, D. BEFROY, A.J. ROMANELLI, and G.I. SHULMAN. 2004. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 32345–32353.

SAMUEL, V.T., Z.-X. LIU, A. WANG, S.A. BEDDOW, J.G. GEISLER, M. KAHN, X. ZHANG, ET AL. 2007. Inhibition of protein kinase Cepsilon prevents hepatic insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of Clinical Investigation* 117: 739–745.

SAPONARO, C., M. GAGGINI, F. CARLI, and A. GASTALDELLI. 2015. The Subtle Balance between Lipolysis and Lipogenesis: A Critical Point in Metabolic Homeostasis. *Nutrients* 7: 9453–9474.

SAVAGE, D.B., C.S. CHOI, V.T. SAMUEL, Z.-X. LIU, D. ZHANG, A. WANG, X.-M. ZHANG, ET AL. 2006. Reversal of diet-induced hepatic steatosis and hepatic insulin resistance by antisense oligonucleotide inhibitors of acetyl-CoA carboxylases 1 and 2. *Journal of Clinical Investigation* 116: 817–824.

SAYAT, R., B. LEBER, V. GRUBAC, L. WILTSHIRE, and S. PERSAD. 2008. O-GlcNAc-glycosylation of beta-catenin regulates its nuclear localization and transcriptional activity. *Experimental Cell Research* 314: 2774–2787.

SCHAFTINGEN, E.V., M. DETHEUX, and M.V. DA CUNHA. 1994. Short-term control of glucokinase activity: role of a regulatory protein. *The FASEB Journal* 8: 414–419.

SCHIMPL, M., X. ZHENG, V.S. BORODKIN, D.E. BLAIR, A.T. FERENBACH, A.W. SCHÜTTELKOPF, I. NAVRATILOVA, ET AL. 2012. O-GlcNAc transferase invokes nucleotide sugar pyrophosphate participation in catalysis. *Nature Chemical Biology* 8: 969–974.

SCHIRM, M., M. KALMOKOFF, A. AUBRY, P. THIBAULT, M. SANDOZ, and S.M. LOGAN. 2004. Flagellin from Listeria monocytogenes is glycosylated with beta-O-linked Nacetylglucosamine. *Journal of Bacteriology* 186: 6721–6727.

SCRUTTON, M.C., D.B. KEECH, and M.F. UTTER. 1965. Pyruvate Carboxylase IV. PARTIAL REACTIONS AND THE LOCUS OF ACTIVATION BY ACETYL COENZYME A. *Journal of Biological Chemistry* 240: 574–581.

SEKINE, O., D.C. LOVE, D.S. RUBENSTEIN, and J.A. HANOVER. 2010. Blocking O-linked GlcNAc cycling in Drosophila insulin-producing cells perturbs glucose-insulin homeostasis. *The Journal of Biological Chemistry* 285: 38684–38691.

SEMENKOVICH, C.F., T. COLEMAN, and F.T. FIEDOREK JR. 1995. Human fatty acid synthase mRNA: tissue distribution, genetic mapping, and kinetics of decay after glucose deprivation. *Journal of lipid research* 36: 1507–1521.

SEOANE, J., A.M. GOMEZ-FOIX, R.M. O'DOHERTY, C. GOMEZ-ARA, C.B. NEWGARD, and J.J. GUINOVART. 1996. Glucose 6-phosphate produced by glucokinase, but not hexokinase I, promotes the activation of hepatic glycogen synthase. *The Journal of Biological Chemistry* 271: 23756–23760.

SEPPÄLÄ-LINDROOS, A., S. VEHKAVAARA, A.-M. HÄKKINEN, T. GOTO, J. WESTERBACKA, A. SOVIJÄRVI, J. HALAVAARA, and H. YKI-JÄRVINEN. 2002. Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 87: 3023–3028.

SESMA, J.I., C.R. ESTHER, S.M. KREDA, L. JONES, W. O'NEAL, S. NISHIHARA, R.A. NICHOLAS, and E.R. LAZAROWSKI. 2009. Endoplasmic reticulum/golgi nucleotide sugar transporters contribute to the cellular release of UDP-sugar signaling molecules. *The Journal of Biological Chemistry* 284: 12572–12583.

SEYER, P., D. VALLOIS, C. POITRY-YAMATE, F. SCHÜTZ, S. METREF, D. TARUSSIO, P. MAECHLER, ET AL. 2013. Hepatic glucose sensing is required to preserve  $\beta$  cell glucose competence. *The Journal of Clinical Investigation* 123: 1662–1676.

SHAFI, R., S.P. IYER, L.G. ELLIES, N. O'DONNELL, K.W. MAREK, D. CHUI, G.W. HART, and J.D. MARTH. 2000. The O-GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 5735–5739.

SHANG, R., J. LIANG, Y. YI, Y. LIU, and J. WANG. 2015. Review of Platensimycin and Platencin: Inhibitors of  $\beta$ -Ketoacyl-acyl Carrier Protein (ACP) Synthase III (FabH). *Molecules* (*Basel, Switzerland*) 20: 16127–16141.

SHI, F.-T., H. KIM, W. LU, Q. HE, D. LIU, M.A. GOODELL, M. WAN, and Z. SONGYANG. 2013. Ten-eleven translocation 1 (Tet1) is regulated by O-linked N-acetylglucosamine transferase (Ogt) for target gene repression in mouse embryonic stem cells. *The Journal of Biological Chemistry* 288: 20776–20784.

SHIMOMURA, I., Y. BASHMAKOV, S. IKEMOTO, J.D. HORTON, M.S. BROWN, and J.L. GOLDSTEIN. 1999. Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocininduced diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 13656–13661.

SHIMOMURA, I., H. SHIMANO, J.D. HORTON, J.L. GOLDSTEIN, and M.S. BROWN. 1997. Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding

protein-1 in human and mouse organs and cultured cells. *The Journal of Clinical Investigation* 99: 838–845.

SHIOTA, C., J. COFFEY, J. GRIMSBY, J.F. GRIPPO, and M.A. MAGNUSON. 1999. Nuclear import of hepatic glucokinase depends upon glucokinase regulatory protein, whereas export is due to a nuclear export signal sequence in glucokinase. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 37125–37130.

SHIRASAKI, T., M. HONDA, T. SHIMAKAMI, R. HORII, T. YAMASHITA, Y. SAKAI, A. SAKAI, ET AL. 2013. MicroRNA-27a Regulates Lipid Metabolism and Inhibits Hepatitis C Virus Replication in Human Hepatoma Cells. *Journal of Virology* 87: 5270–5286.

SINAL, C.J., M. TOHKIN, M. MIYATA, J.M. WARD, G. LAMBERT, and F.J. GONZALEZ. 2000. Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. *Cell* 102: 731–744.

SINCLAIR, D.A.R., M. SYRZYCKA, M.S. MACAULEY, T. RASTGARDANI, I. KOMLJENOVIC, D.J. VOCADLO, H.W. BROCK, and B.M. HONDA. 2009. Drosophila O-GlcNAc transferase (OGT) is encoded by the Polycomb group (PcG) gene, super sex combs (sxc). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 13427–13432.

SLAWSON, C., T. LAKSHMANAN, S. KNAPP, and G.W. HART. 2008. A mitotic GlcNAcylation/phosphorylation signaling complex alters the posttranslational state of the cytoskeletal protein vimentin. *Molecular Biology of the Cell* 19: 4130–4140.

SLAWSON, C., N.E. ZACHARA, K. VOSSELLER, W.D. CHEUNG, M.D. LANE, and G.W. HART. 2005. Perturbations in O-linked β-N-Acetylglucosamine Protein Modification Cause Severe Defects in Mitotic Progression and Cytokinesis. *Journal of Biological Chemistry* 280: 32944–32956.

SMET-NOCCA, C., M. BRONCEL, J.-M. WIERUSZESKI, C. TOKARSKI, X. HANOULLE, A. LEROY, I. LANDRIEU, ET AL. 2011. Identification of O-GlcNAc sites within peptides of the Tau protein and their impact on phosphorylation. *Molecular bioSystems* 7: 1420–1429.

SODI, V.L., S. KHAKU, R. KRUTILINA, L.P. SCHWAB, D.J. VOCADLO, T.N. SEAGROVES, and M.J. REGINATO. 2015. mTOR/MYC Axis Regulates O-GlcNAc Transferase Expression and O-GlcNAcylation in Breast Cancer. *Molecular cancer research: MCR* 13: 923–933.

SOHN, K.-C., and S.-I. Do. 2005. Transcriptional regulation and O-GlcNAcylation activity of zebrafish OGT during embryogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 337: 256–263.

SOHN, K.-C., K.-Y. LEE, J.E. PARK, and S.-I. DO. 2004. OGT functions as a catalytic chaperone under heat stress response: a unique defense role of OGT in hyperthermia. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 322: 1045–1051.

SONG, M., H.-S. KIM, J.-M. PARK, S.-H. KIM, I.-H. KIM, S.H. RYU, and P.-G. SUH. 2008. o-GlcNAc transferase is activated by CaMKIV-dependent phosphorylation under potassium chloride-induced depolarization in NG-108-15 cells. *Cellular Signalling* 20: 94–104.

STEELE, A.M., B.M. SHIELDS, K.J. WENSLEY, K. COLCLOUGH, S. ELLARD, and A.T. HATTERSLEY. 2014. Prevalence of vascular complications among patients with glucokinase mutations and prolonged, mild hyperglycemia. *JAMA* 311: 279–286.

STEEN, E., B.M. TERRY, E.J. RIVERA, J.L. CANNON, T.R. NEELY, R. TAVARES, X.J. XU, ET AL. 2005. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease--is this type 3 diabetes? *Journal of Alzheimer's disease: JAD* 7: 63–80.

STOECKMAN, A.K., L. MA, and H.C. TOWLE. 2004. Mlx is the functional heteromeric partner of the carbohydrate response element-binding protein in glucose regulation of lipogenic enzyme genes. *The Journal of biological chemistry* 279: 15662–15669.

STOOPS, J.K., P. ROSS, M.J. ARSLANIAN, K.C. AUNE, S.J. WAKIL, and R.M. OLIVER. 1979. Physicochemical studies of the rat liver and adipose fatty acid synthetases. *Journal of Biological Chemistry* 254: 7418–7426.

STOOPS, J.K., and S.J. WAKIL. 1981. Animal fatty acid synthetase. A novel arrangement of the beta-ketoacyl synthetase sites comprising domains of the two subunits. *The Journal of Biological Chemistry* 256: 5128–5133.

STREMMEL, W., J. POHL, A. RING, and T. HERRMANN. 2001. A new concept of cellular uptake and intracellular trafficking of long-chain fatty acids. *Lipids* 36: 981–989.

SÜMEGI, M., E. HUNYADI-GULYAS, K.F. MEDZIHRADSZKY, and A. UDVARDY. 2003. 26S proteasome subunits are O-linked N-acetylglucosamine-modified in Drosophila melanogaster. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 312: 1284–1289.

SUN, L.-P., L. LI, J.L. GOLDSTEIN, and M.S. BROWN. 2005. Insig required for sterol-mediated inhibition of Scap/SREBP binding to COPII proteins in vitro. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 26483–26490.

SZABO, G., and S. BALA. 2013. MicroRNAs in liver disease. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* 10: 542–552.

# TAI, H.-C., N. KHIDEKEL, S.B. FICARRO, E.C. PETERS, and L.C. HSIEH-WILSON. 2004. Parallel identification of O-GlcNAc-modified proteins from cell lysates. *Journal of the American Chemical Society* 126: 10500–10501.

TANG, X., H. MA, Z. SHEN, S. ZOU, X. XU, and C. LIN. 2009. Dehydroepiandrosterone activates cyclic adenosine 3',5'-monophosphate/protein kinase A signalling and suppresses sterol regulatory element-binding protein-1 expression in cultured primary chicken hepatocytes. *The British Journal of Nutrition* 102: 680–686.

TARANTINO, G., P. CONCA, F. PASANISI, M. ARIELLO, M. MASTROLIA, A. ARENA, M. TARANTINO, ET AL. 2009. Could inflammatory markers help diagnose nonalcoholic steatohepatitis? *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 21: 504–511.

TEO, C.F., E.E. WOLLASTON-HAYDEN, and L. WELLS. 2010. Hexosamine flux, the O-GlcNAc modification, and the development of insulin resistance in adipocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology* 318: 44–53.

THORENS, B., Z.Q. CHENG, D. BROWN, and H.F. LODISH. 1990. Liver glucose transporter: a basolateral protein in hepatocytes and intestine and kidney cells. *The American Journal of Physiology* 259: C279-285.

TIEDGE, M., and S. LENZEN. 1995. Effects of glucose refeeding and glibenclamide treatment on glucokinase and GLUT2 gene expression in pancreatic B-cells and liver from rats. *The Biochemical Journal* 308 (Pt 1): 139–144.

TIPPETT, P.S., and K.E. NEET. 1982. Specific inhibition of glucokinase by long chain acyl coenzymes A below the critical micelle concentration. *Journal of Biological Chemistry* 257: 12839–12845.

TIWARI, S., and S.A. SIDDIQI. 2012. Intracellular Trafficking and Secretion of VLDL. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 32: 1079–1086.

TOLEMAN, C., A.J. PATERSON, T.R. WHISENHUNT, and J.E. KUDLOW. 2004. Characterization of the histone acetyltransferase (HAT) domain of a bifunctional protein with activable O-GlcNAcase and HAT activities. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 53665–53673.

TORRES, C.R., and G.W. HART. 1984a. Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc. *The Journal of biological chemistry* 259: 3308–3317.

TORRES, C.R., and G.W. HART. 1984b. Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc. *The Journal of biological chemistry* 259: 3308–3317.

TRAPANNONE, R., K. RAFIE, and D.M.F. VAN AALTEN. 2016. O-GlcNAc transferase inhibitors: current tools and future challenges. *Biochemical Society Transactions* 44: 88–93.

TRAXINGER, R.R., and S. MARSHALL. 1991. Coordinated regulation of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase activity by insulin, glucose, and glutamine. Role of hexosamine biosynthesis in enzyme regulation. *The Journal of Biological Chemistry* 266: 10148–10154. TSAI, W.-C., S.-D. HSU, C.-S. HSU, T.-C. LAI, S.-J. CHEN, R. SHEN, Y. HUANG, ET AL. 2012. MicroRNA-122 plays a critical role in liver homeostasis and hepatocarcinogenesis. *The Journal of Clinical Investigation* 122: 2884–2897.

#### U

UEBI, T., M. TAMURA, N. HORIKE, Y.K. HASHIMOTO, and H. TAKEMORI. 2010. Phosphorylation of the CREB-specific coactivator TORC2 at Ser(307) regulates its intracellular localization in COS-7 cells and in the mouse liver. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 299: E413-425.

#### V

VAGELOS, P.R., A.W. ALBERTS, and D.B. MARTIN. 1963. Studies on the Mechanism of Activation of Acetyl Coenzyme A Carboxylase by Citrate. *Journal of Biological Chemistry* 238: 533–540.

VAN SCHAFTINGEN, E. 1989. A protein from rat liver confers to glucokinase the property of being antagonistically regulated by fructose 6-phosphate and fructose 1-phosphate. *European journal of biochemistry / FEBS* 179: 179–184.

VAN SCHAFTINGEN, E., A. VANDERCAMMEN, M. DETHEUX, and D.R. DAVIES. 1992. The regulatory protein of liver glucokinase. *Advances in Enzyme Regulation* 32: 133–148.

VANDERFORD, N.L., S.S. ANDRALI, and S. OZCAN. 2007. Glucose induces MafA expression in pancreatic beta cell lines via the hexosamine biosynthetic pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 282: 1577–1584.

VARELA-REY, M., N. EMBADE, U. ARIZ, S.C. LU, J.M. MATO, and M.L. MARTINEZ-CHANTAR. 2009. Non-alcoholic steatohepatitis and animal models: understanding the human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41: 969–976.

VAULONT, S., A. MUNNICH, J.F. DECAUX, and A. KAHN. 1986. Transcriptional and posttranscriptional regulation of L-type pyruvate kinase gene expression in rat liver. *Journal of Biological Chemistry* 261: 7621–7625.

VERWOERT, I.I., E.F. VERHAGEN, K.H. VAN DER LINDEN, E.C. VERBREE, H.J. NIJKAMP, and A.R. STUITJE. 1994. Molecular characterization of an Escherichia coli mutant with a temperature-sensitive malonyl coenzyme A-acyl carrier protein transacylase. *FEBS letters* 348: 311–316.

VICART, A., T. LEFEBVRE, J. IMBERT, A. FERNANDEZ, and B. KAHN-PERLES. 2006. Increased chromatin association of Sp1 in interphase cells by PP2A-mediated dephosphorylations. *Journal of Molecular Biology* 364: 897–908.

VIRKAMÄKI, A., M.C. DANIELS, S. HÄMÄLÄINEN, T. UTRIAINEN, D. MCCLAIN, and H. YKI-JÄRVINEN. 1997. Activation of the hexosamine pathway by glucosamine in vivo induces insulin resistance in multiple insulin sensitive tissues. *Endocrinology* 138: 2501–2507.

VOSSELLER, K., L. WELLS, M.D. LANE, and G.W. HART. 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 of the United States of America* 99: 5313–5318.

#### W

WANG, D., and H.S. SUL. 1997. Upstream stimulatory factor binding to the E-box at -65 is required for insulin regulation of the fatty acid synthase promoter. *The Journal of Biological Chemistry* 272: 26367–26374.

WANG, D., H. YANG, K.C. DE BRAGANCA, J. LU, L. YU SHIH, P. BRIONES, T. LANG, and D.C. DE VIVO. 2008. The molecular basis of pyruvate carboxylase deficiency: Mosaicism correlates with prolonged survival. *Molecular Genetics and Metabolism* 95: 31–38.

WANG, J., R. LIU, M. HAWKINS, N. BARZILAI, and L. ROSSETTI. 1998. A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature* 393: 684–688.

WANG, J., S.M. SOISSON, K. YOUNG, W. SHOOP, S. KODALI, A. GALGOCI, R. PAINTER, ET AL. 2006. Platensimycin is a selective FabF inhibitor with potent antibiotic properties. *Nature* 441: 358–361.

WANG, J., M. TORII, H. LIU, G.W. HART, and Z.-Z. HU. 2011. dbOGAP - an integrated bioinformatics resource for protein O-GlcNAcylation. *BMC bioinformatics* 12: 91.

WANG, Q., L. JIANG, J. WANG, S. LI, Y. YU, J. YOU, R. ZENG, ET AL. 2009. Abrogation of hepatic ATP-citrate lyase protects against fatty liver and ameliorates hyperglycemia in leptin receptor-deficient mice. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 49: 1166–1175.

WANG, S., X. HUANG, D. SUN, X. XIN, Q. PAN, S. PENG, Z. LIANG, ET AL. 2012. Extensive crosstalk between O-GlcNAcylation and phosphorylation regulates Akt signaling. *PloS One* 7: e37427.

WANG, Y., R.H.F. WONG, T. TANG, C.S. HUDAK, D. YANG, R.E. DUNCAN, and H.S. SUL. 2013. Phosphorylation and recruitment of BAF60c in chromatin remodeling for lipogenesis in response to insulin. *Molecular Cell* 49: 283–297.

WANG, Z., M. GUCEK, and G.W. HART. 2008. Cross-talk between GlcNAcylation and phosphorylation: site-specific phosphorylation dynamics in response to globally elevated O-GlcNAc. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 13793–13798.

WANG, Z., A. PANDEY, and G.W. HART. 2007. Dynamic interplay between O-linked N-acetylglucosaminylation and glycogen synthase kinase-3-dependent phosphorylation. *Molecular & cellular proteomics: MCP* 6: 1365–1379.

WANG, Z., N.D. UDESHI, C. SLAWSON, P.D. COMPTON, K. SAKABE, W.D. CHEUNG, J. SHABANOWITZ, ET AL. 2010. Extensive Crosstalk Between O-GlcNAcylation and Phosphorylation Regulates Cytokinesis. *Sci. Signal.* 3: ra2-ra2.

WARBURG, O. 1956. On the origin of cancer cells. *Science (New York, N.Y.)* 123: 309–314.

WATANABE, M., S.M. HOUTEN, L. WANG, A. MOSCHETTA, D.J. MANGELSDORF, R.A. HEYMAN, D.D. MOORE, and J. AUWERX. 2004. Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c. *The Journal of Clinical Investigation* 113: 1408–1418.

WATSON, L.J., B.W. LONG, A.M. DEMARTINO, K.R. BRITTIAN, R.D. READNOWER, R.E. BRAINARD, T.D. CUMMINS, ET AL. 2014. Cardiomyocyte Ogt is essential for postnatal viability. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 306: H142-153.

WELLS, L., L.K. KREPPEL, F.I. COMER, B.E. WADZINSKI, and G.W. HART. 2004. O-GlcNAc transferase is in a functional complex with protein phosphatase 1 catalytic subunits. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 38466–38470.

WELLS, L., C. SLAWSON, and G.W. HART. 2011. The E2F-1 associated retinoblastomasusceptibility gene product is modified by O-GlcNAc. *Amino Acids* 40: 877–883.

WHELAN, S.A., W.B. DIAS, L. THIRUNEELAKANTAPILLAI, M.D. LANE, and G.W. HART. 2010. Regulation of insulin receptor substrate 1 (IRS-1)/AKT kinase-mediated insulin signaling by O-Linked beta-N-acetylglucosamine in 3T3-L1 adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry* 285: 5204–5211.

WHELAN, S.A., M.D. LANE, and G.W. HART. 2008. Regulation of the O-linked beta-N-acetylglucosamine transferase by insulin signaling. *The Journal of Biological Chemistry* 283: 21411–21417.

WHISENHUNT, T.R., X. YANG, D.B. BOWE, A.J. PATERSON, B.A. VAN TINE, and J.E. KUDLOW. 2006. Disrupting the enzyme complex regulating O-GlcNAcylation blocks signaling and development. *Glycobiology* 16: 551–563.

WHITMORE, T.E., S.L. MUDRI, and G.L. MCKNIGHT. 1995. Physical mapping of the human glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase gene (GFPT) to chromosome 2p13. *Genomics* 26: 422–423.

WILLY, P.J., K. UMESONO, E.S. ONG, R.M. EVANS, R.A. HEYMAN, and D.J. MANGELSDORF. 1995. LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes & development* 9: 1033–1045.

WILSON, A.C., M.G. PETERSON, and W. HERR. 1995. The HCF repeat is an unusual proteolytic cleavage signal. *Genes & Development* 9: 2445–2458.

WITHERS, S.G., and G.J. DAVIES. 2012. Glycobiology: The case of the missing base. *Nature Chemical Biology* 8: 952–953.

WITKOWSKI, A., A. GHOSAL, A.K. JOSHI, H.E. WITKOWSKA, F.J. ASTURIAS, and S. SMITH. 2004. Head-to-head coiled arrangement of the subunits of the animal fatty acid synthase. *Chemistry* & *biology* 11: 1667–1676.

WITTERS, L.A., and B.E. KEMP. 1992. Insulin activation of acetyl-CoA carboxylase accompanied by inhibition of the 5'-AMP-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* 267: 2864–2867.

WONG, R.H.F., I. CHANG, C.S.S. HUDAK, S. HYUN, H.-Y. KWAN, and H.S. SUL. 2009. A role of DNA-PK for the metabolic gene regulation in response to insulin. *Cell* 136: 1056–1072.

WRABL, J.O., and N.V. GRISHIN. 2001. Homology between O-linked GlcNAc transferases and proteins of the glycogen phosphorylase superfamily. *Journal of Molecular Biology* 314: 365–374.

WU, C., D.A. OKAR, C.B. NEWGARD, and A.J. LANGE. 2001. Overexpression of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase in mouse liver lowers blood glucose by suppressing hepatic glucose production. *The Journal of Clinical Investigation* 107: 91–98.

#### X

XU, H., D. WILCOX, P. NGUYEN, M. VOORBACH, T. SUHAR, S.J. MORGAN, W.F. AN, ET AL. 2006. Hepatic knockdown of mitochondrial GPAT1 in ob/ob mice improves metabolic profile. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 349: 439–448.

#### Y

YAMAMOTO, T., H. SHIMANO, N. INOUE, Y. NAKAGAWA, T. MATSUZAKA, A. TAKAHASHI, N. YAHAGI, ET AL. 2007. Protein kinase A suppresses sterol regulatory element-binding protein-1C expression via phosphorylation of liver X receptor in the liver. *The Journal of Biological Chemistry* 282: 11687–11695.

YANG, W.H., J.E. KIM, H.W. NAM, J.W. JU, H.S. KIM, Y.S. KIM, and J.W. CHO. 2006. Modification of p53 with O-linked N-acetylglucosamine regulates p53 activity and stability. *Nature cell biology* 8: 1074–1083. YANG, W.H., S.Y. PARK, H.W. NAM, D.H. KIM, J.G. KANG, E.S. KANG, Y.S. KIM, ET AL. 2008. NFkappaB activation is associated with its O-GlcNAcylation state under hyperglycemic conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 17345–17350.

YANG, X., P.P. ONGUSAHA, P.D. MILES, J.C. HAVSTAD, F. ZHANG, W.V. SO, J.E. KUDLOW, ET AL. 2008. Phosphoinositide signalling links O-GlcNAc transferase to insulin resistance. *Nature* 451: 964–969.

YATSUYA, H., T. NIHASHI, Y. LI, Y. HOTTA, K. MATSUSHITA, T. MURAMATSU, R. OTSUKA, ET AL. 2014. Independent association of liver fat accumulation with insulin resistance. *Obesity Research & Clinical Practice* 8: e350-355.

YECIES, J.L., H.H. ZHANG, S. MENON, S. LIU, D. YECIES, A.I. LIPOVSKY, C. GORGUN, ET AL. 2011. Akt stimulates hepatic SREBP1c and lipogenesis through parallel mTORC1-dependent and independent pathways. *Cell Metabolism* 14: 21–32.

YELLATURU, C.R., X. DENG, L.M. CAGEN, H.G. WILCOX, C.M. MANSBACH, S.A. SIDDIQI, E.A. PARK, ET AL. 2009. Insulin enhances post-translational processing of nascent SREBP-1c by promoting its phosphorylation and association with COPII vesicles. *The Journal of Biological Chemistry* 284: 7518–7532.

YELLATURU, C.R., X. DENG, E.A. PARK, R. RAGHOW, and M.B. ELAM. 2009. Insulin enhances the biogenesis of nuclear sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1c by posttranscriptional down-regulation of Insig-2A and its dissociation from SREBP cleavage-activating protein (SCAP).SREBP-1c complex. *The Journal of Biological Chemistry* 284: 31726–31734.

YI, W., P.M. CLARK, D.E. MASON, M.C. KEENAN, C. HILL, W.A. GODDARD, E.C. PETERS, ET AL. 2012. Phosphofructokinase 1 glycosylation regulates cell growth and metabolism. *Science* (*New York, N.Y.*) 337: 975–980.

YOSHIKAWA, T., H. SHIMANO, M. AMEMIYA-KUDO, N. YAHAGI, A.H. HASTY, T. MATSUZAKA, H. OKAZAKI, ET AL. 2001. Identification of liver X receptor-retinoid X receptor as an activator of the sterol regulatory element-binding protein 1c gene promoter. *Molecular and Cellular Biology* 21: 2991–3000.

YU, J., R. DENG, H.H. ZHU, S.S. ZHANG, C. ZHU, M. MONTMINY, R. DAVIS, and G.-S. FENG. 2013. Modulation of Fatty Acid Synthase Degradation by Concerted Action of p38 MAP Kinase, E3 Ligase COP1, and SH2-Tyrosine Phosphatase Shp2. *The Journal of Biological Chemistry* 288: 3823–3830.

YUZWA, S.A., M.S. MACAULEY, J.E. HEINONEN, X. SHAN, R.J. DENNIS, Y. HE, G.E. WHITWORTH, ET AL. 2008. A potent mechanism-inspired O-GlcNAcase inhibitor that blocks phosphorylation of tau in vivo. *Nature chemical biology* 4: 483–490.

ZACHARA, N.E., N. O'DONNELL, W.D. CHEUNG, J.J. MERCER, J.D. MARTH, and G.W. HART. 2004. Dynamic O-GlcNAc modification of nucleocytoplasmic proteins in response to stress. A survival response of mammalian cells. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 30133–30142.

ZEIDAN, Q., Z. WANG, A. DE MAIO, and G.W. HART. 2010. O-GlcNAc cycling enzymes associate with the translational machinery and modify core ribosomal proteins. *Molecular Biology of the Cell* 21: 1922–1936.

ZENTELLA, R., J. HU, W.-P. HSIEH, P.A. MATSUMOTO, A. DAWDY, B. BARNHILL, H. OLDENHOF, ET AL. 2016. O-GlcNAcylation of master growth repressor DELLA by SECRET AGENT modulates multiple signaling pathways in Arabidopsis. *Genes & Development* 30: 164–176.

ZHANG, C., X. CHEN, R.-M. ZHU, Y. ZHANG, T. YU, H. WANG, H. ZHAO, ET AL. 2012. Endoplasmic reticulum stress is involved in hepatic SREBP-1c activation and lipid accumulation in fructose-fed mice. *Toxicology letters* 212: 229–240.

ZHANG, F., K. SU, X. YANG, D.B. BOWE, A.J. PATERSON, and J.E. KUDLOW. 2003. O-GlcNAc modification is an endogenous inhibitor of the proteasome. *Cell* 115: 715–725.

ZHANG, H., G. GAO, and U.T. BRUNK. 1992. Extracellular reduction of alloxan results in oxygen radical-mediated attack on plasma and lysosomal membranes. *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 100: 317–325.

ZHANG, N., and X. CHEN. 2015. Potential role of O-GlcNAcylation and involvement of PI3K/Akt1 pathway in the expression of oncogenic phenotypes of gastric cancer cells in vitro. *Biotechnology and Applied Biochemistryn*/a-n/a.

ZHANG, Q., X. LIU, W. GAO, P. LI, J. HOU, J. LI, and J. WONG. 2014. Differential regulation of the ten-eleven translocation (TET) family of dioxygenases by O-linked β-N-acetylglucosamine transferase (OGT). *The Journal of Biological Chemistry* 289: 5986–5996.

ZHANG, X., L. MA, J. QI, H. SHAN, W. YU, and Y. GU. 2015. MAPK/ERK signaling pathwayinduced hyper-O-GlcNAcylation enhances cancer malignancy. *Molecular and Cellular Biochemistry* 410: 101–110.

ZHAO, S., W. XU, W. JIANG, W. YU, Y. LIN, T. ZHANG, J. YAO, ET AL. 2010. Regulation of Cellular Metabolism by Protein Lysine Acetylation. *Science* 327: 1000–1004.

ZHIVKOV, V., R. TOSHEVA, and Y. ZHIVKOVA. 1975. Concentration of uridine diphosphate sugars in various tissues of vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology. B, Comparative Biochemistry* 51: 421–424.

ZHOU, J., J.L. NEIDIGH, R. ESPINOSA, M.M. LEBEAU, and D.A. MCCLAIN. 1995. Human glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase: characterization of mRNA and chromosomal assignment to 2p13. *Human Genetics* 96: 99–101.

ZHU, L.-L., Y. LIU, A.-F. CUI, D. SHAO, J.-C. LIANG, X.-J. LIU, Y. CHEN, ET AL. 2010. PGC-1alpha coactivates estrogen-related receptor-alpha to induce the expression of glucokinase. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 298: E1210-1218.

ZHU, Q., L. ZHOU, Z. YANG, M. LAI, H. XIE, L. WU, C. XING, ET AL. 2012. O-GlcNAcylation plays a role in tumor recurrence of hepatocellular carcinoma following liver transplantation. *Medical Oncology (Northwood, London, England)* 29: 985–993.

ZHU, Y., X. SHAN, S.A. YUZWA, and D.J. VOCADLO. 2014. The emerging link between O-GlcNAc and Alzheimer disease. *The Journal of Biological Chemistry* 289: 34472–34481.



#### Detection and Identification of *O*-GlcNAcylated Proteins by Proteomic Approaches

Anne-Sophie Vercoutter-Edouart, Ikram El Yazidi-Belkoura, Céline Guinez, Steffi Baldini, Maïté Leturcq, Marlène Mortuaire, Anne-Marie Mir, Agata Steenackers, Vanessa Dehennaut, Annick Pierce and Tony Lefebvre

Unit of Structural and Functional Glycobiology, UMR CNRS no8576, IFR 147, University of Lille 1, 59655 Villeneuve d'Ascq, FRANCE

**Abbreviations:** BEMAD, beta-elimination followed by Michael addition with dithiothreitol; CAD, collision-activated dissociation; CAZy, carbohydrate-active enzymes; CID, collision-induced dissociation; ECD, electron-capture dissociation; ETD, electron-transfer dissociation; GaIT, galactosyltransferase; HBP, hexosamine biosynthetic pathway; HCD, High Energy C-Trap Dissociation; IP, immunoprecipitation; LWAC, Lectin Weak Affinity Chromatography; MS/MS, tandem mass spectrometry; OGA, *O*-GlcNAcase; OGT, *O*-GlcNAc transferase; PTM, post-translational modification; WGA, wheat germ agglutinin.

**Keywords:** *O*-GlcNAcylation, post-translational modification, mass spectrometry, proteome, *O*-GlcNAcome, site mapping

#### Abstract

**O**-GlcNAcylation (O-linked beta-Nacetylglucosaminylation) is a widespread posttranslational modification (PTM) confined within the nuclear, the cytosolic and the mitochondrial compartments of eukaryotes. Recently, O-GlcNAcylation has been also detected in the close vicinity of plasma membranes particularly in lipid microdomains. The detection of this PTM can be easily done if appropriate controls and precautions are taken using a wide variety of tools including lectins, antibodies or clickchemistry-based methods. In contrast, the identification of the proteins bearing O-GlcNAc moieties and the localization of the precise sites of O-GlcNAcylation remain challenging. This is due to the lability of the glycosidic bond between hydroxyl group of serine or threonine and N-acetylglucosamine using conventional fragmentation techniques such as collisioninduced dissociation (CID). To tentatively overcome this technical limitation, electroncapture dissociation (ECD) or electron-transfer dissociation (ETD) tandem mass spectrometry (MS/MS) are now used. Thanks to these

breakthroughs, a large number of *O*-GlcNAc sites have been identified to date but these methodologies remain far to be used in routine.

#### 1. O-GlcNAc in the world of PTMs

### 1.1. PTMs exponentially increase protein diversity and functionality

In parallel with Celera Genomics [1], the Human Genome Project launched in 1990 surprisingly revealed that the human DNA sequence (three billions base-pairs) only encoded third of the 100,000 protein-genes that were expected [2]. Since then, this number is constantly revised downwards: today it is estimated to be around 21,000 genes, as many as in mouse but less than in maize! Actually, the human proteome is larger than those of the majority of organisms because protein-encoding genes are able to give more than one single product, in part thanks to alternative splicing of primary transcripts. Also, it is considered that the post-translational modifications (PTM) exponentially increase protein isoforms and thus finely regulate signal transduction and cellular physiology: this endows a same protein with several functions as a consequence of modulating partner-partner interactions, stability or catalytic activity (Fig. 1). Amongst the hundreds of PTMs that exist in living beings, a large variety of glycosylations are found.

### **1.2.** *O*-GlcNAcylation is the sweetened counterpart of phosphorylation

In contrast with N- and O-glycosylations, O-GlcNAcylation is simple at the structural point of view since it consists in the transfer of a single Nacetylglucosamine moiety through a betalinkage onto serine and threonine residues (Fig. 2A). O-GlcNAcylation is confined within the nuclear, the cytosolic and the mitochondrial compartments of cells [3, 4] (Fig. 2B). A small fraction of the O-GlcNAcylated proteins is located at the cytoplasmic side of the plasma membrane and more especially in lipid microdomains or rafts [5]. Like phosphorylation with which it can compete, O-GlcNAcylation is reversible (Fig. 2A) [6]. The cycling of O-GlcNAcylation is controlled by OGT (O-GlcNAc transferase: GT41 in CAZy classification) that catalyzes the transfer of the GlcNAc group provided by UDP-GlcNAc, the end-product of HBP (hexosamine biosynthetic pathway), and OGA (O-GlcNAcase: GH84 family in CAZy classification) that hydrolyzes the residue [7]. O-GlcNAcylation not only interferes with phosphorylation but increasing evidences show that a crosstalk also exists with other PTMs including acetylation [8], methylation [8, 9], ubiquitination [10-12] and proteolysis process [13] (Fig. 2A). These interplays offer theoretically infinite combinations of PTMs on protein isoforms in the human proteome. The diversity of O-GlcNAcylated proteins, the dynamism of O-GlcNAcylation and its interaction with other PTMs make this glycosylation a regulator of most of the basic and fundamental cellular processes such as cell signaling [5, 6, 12, 14-17], cell cycle [18-21] and apoptosis [22, 23]. Deregulation of O-GlcNAc cycling has been linked with the etiology of diabetes [17, 24, 25], cancers [26, 27],

cardiovascular diseases [28, 29] and neuronal disorders [30].

Thus, elucidating the molecular and cellular processes regulated by *O*-GlcNAcylation is strongly supported by the characterization of the *O*-GlcNAcome based on the identification of *O*-GlcNAcylated proteins, the steady state level of *O*-GlcNAc proteins (i.e. quantification and cycling of *O*-GlcNAc/de-*O*-GlcNAc proteins' isoforms), and the mapping of the *O*-GlcNAc sites. In this review, we look over the various biochemical tools and approaches used to access to the O-GlcNAcome and we summarize advances in MS technology to localize O-GlcNAc sites. For more details, we refer to the original publications and recent reviews.

### 2. How to routinely visualize and analyze the *O*-GlcNAcome?

## 2.1. Detection and enrichment of *O*-GlcNAc proteins with antibodies and lectins.

#### 2.1.1 Antibodies

Since its first evidence in 1984 [31], different approaches have been developed to detect O-GlcNAcylation and to identify O-GlcNAcylated proteins. The elongation of O-GlcNAc residues by bovine GalT using UDP-[<sup>3</sup>H]-galactose was routinely used a few decades ago to detect O-GlcNAc. This strategy allowed the identification of one of the first described O-GlcNAcylated proteins, the Band 4.1 in erythrocyte [32]. At the same time, another group described a monoclonal antibody, originally raised against a subset of eight proteins localized to the nuclear pore complex [33] that in fact specifically recognizes O-GlcNAc residues [34]. Since then, the "RL2 antibody" is commonly used to detect O-GlcNAcylation by Western blotting or indirect immunofluorescence and to enrich 0-GlcNAcylated-proteins by immunoprecipitation. In this way it allows the identification of O-GlcNAc proteins involved in the translational machinery [35], cell cycle progression [20] and chromatin structure [11] (Table 1). Since RL2 monoclonal antibody shows restricted reactivity with O-GlcNAc-modified proteins, antibodies recognizing other O-GlcNAc epitopes were developed (CTD110.6 [36], 18B10.C7(#3)/9D1.E4(#10)/1F5.D6(#14) [37], and HGACs 39, 49, and 85 [38] (review in [39, 40]. Among them, CTD110.6 raised against the Cterminal domain of RNA polymerase II is also widely used to detect O-GlcNAc proteins in mammalian cells [41-43], and tissues [44-46]. To enrich O-GlcNAcylated proteins using CTD110.6 IgM antibody, it is necessary to covalently couple CTD110.6 antibody to cyanogen bromideactivated sepharose or agarose to perform the immunoaffinity chromatography [48, 49], as it has been done to enrich O-GlcNAc-modified proteins from rat brain [44] and COS-7 cells [47]. A mixture of anti-O-GlcNAc antibodies was also used to immunoprecipitate and identify more than two hundred O-GlcNAc proteins in HEK293 T cells [37]. This approach is useful to selectively enrich O-GlcNAcylated proteins in order to further map O-GlcNAc sites by MS/MS (Table 1) [50]. Recently, it was demonstrated that some of the antibodies raised against O-GlcNAc proteins, including CTD110.6 and 9D1.E4(#10), also detect *N*-linked GlcNAc<sub>2</sub> generated only under severe stress and nutrient deprivation conditions [51,52], terminal beta-GlcNAc and O-GlcNAc residues on membrane and secreted proteins containing EGF repeats [53]. Thus, precautions have to be taken by using appropriate experimental conditions and controls to specifically detect O-GlcNAc-modified proteins [39, 52]. Finally, O-GlcNAc antibodies were recently used in an innovative manner. By combining the use of human protein microarrays with in vitro OGT activity and CTD110.6 detection, Ortiz-Meoz and co-workers discovered novel OGT substrates including low abundant signaling and regulatory proteins [54].

#### 2.2.2 Lectins

Alternatively, the lectin prepared from *Triticum vulgaris*, WGA (Wheat Germ Agglutinin), is used to detect *O*-GlcNAc although it lacks specificity. This plant lectin also binds sialic acids and

terminal beta-GlcNAc on complex glycans. This tool was first used in various forms, rhodamin-, ferritin- and peroxidase-labeled, to detect O-GlcNAcylation of nuclear pore components [55]. The use of succinylated-WGA is preferable; this chemically modified-form of the lectin avoids the recognition of sialic acids [39, 56]. A lectin isolated from the mushroom Agrocybe aegerita, AAL2, was recently described [57]. It binds terminal non-reducing GlcNAc moieties and may also be useful to detect O-GlcNAcylation. Since both WGA and AAL2 do not discriminate terminal GlcNAc and single O-GlcNAc residues, their use needs to be proceeded with precautions: it is advised to treat samples with PNGase F to remove complex N-glycans and to perform a chemical or enzymatic desialylation before analysis [58-60]. The specificity of lectins can also be controlled by incubation with free GlcNAc that abrogates their interaction with glycosylated proteins [61]. To enrich O-GlcNAcylated proteins from complex samples, WGA affinity chromatography is currently used; the presence of membrane proteins modified by complex O- and N-glycans can be limited by subcellular fractionation [39, 58]. Moreover, this strategy can also be applied on O-GlcNAc peptides carrying few modifications, as discussed in section 3.2 [62].

Accordingly, antibodies and lectins are useful tools for studying the *O*-GlcNAcome but they exhibit variable specificity. To facilitate the study of the biological functions of *O*-GlcNAc, extensive development of site-specific antibodies is now needed [11, 63].

### 2.2. From the use of radioactive sugars to the way of click-chemistry

Historically, the first approach to detect *O*-GlcNAcylation consisted in the radiolabeling of GlcNAc moieties using UDP-[<sup>3</sup>H]-Galactose and milk galactosyltransferase (GalT, the enzyme that in partner with alpha-lactalbumin composed the lactose synthase in the Golgi lumen of the cells of the mammary gland)

followed by a beta-elimination and the analysis of the products by gel-filtration [31], high voltage paper electrophoresis [64] or HPLC [39, 61]. However this approach is time-consuming and requires large amount of radiolabeled UDP-Gal due to the low detection limit of the radioactive galactose. Since now ten years, this technique has evolved thanks to click-chemistry. A derivative of galactose is grafted onto GlcNAc moieties by an engineered modified GalT, the GalT1 Y289L that is able to use UDP-Gal analogs such as UDP-GalNAz and UDP-ketogalactose [65]. Transfer of GalNAz or ketogalactose is followed by the selective and specific chemical addition of biotin alkyne or aminoxy-biotin respectively. These probes allow the purification and detection of the tagged proteins or peptides by avidin/streptavidin affinity chromatography and identification of O-GlcNAc proteins and O-GlcNAcylation sites (Table 2) [66-68 and references in Table 2]. Alternative approaches consisting in the metabolic labeling of cultured cells with per-O-acetylated Nazidoacetylglucosamine (Ac<sub>4</sub>GlcNAz) (bioorthogonal conjugation of azide-tagged GlcNAc) [67-72] or per-O-acetylated N-alkyneacetylglucosamine (Ac<sub>4</sub>GlcNAlk) were also developed [73]. Taken together, these approaches, also known as tagging-via-substrate (TAS) strategies [69], are used to identify O-GlcNAc-tagged proteins and peptides by MS/MS (Table 2) [8, 47, 66, 70, 71, 73-76]. To improve the exact localization of GlcNAc sites on taggedpeptides, photocleavable biotin probes were developed [77, 78] and successfully allowed the mapping of 140 O-GlcNAc sites of proteins from the mitotic spindle in HeLa cells [19] and more than 350 sites on mouse neuronal proteins [78] (Table 2). More recently, a modified click chemistry based-strategy has been proposed to improve enrichment of O-GlcNAc proteins by using an alkyne-resin [72]. After metabolic labeling of cells by Ac<sub>4</sub>-GlcNAz, click chemistry on an alkyn-resin and MS/MS peptide sequencing on-resin trypsin proteolysis, allowed the

identification of around 1500 O-GlcNAc proteins. Subsequent elution of covalently resin bound O-GlcNAc peptides using selective  $\beta$ -elimination enabled the identification of 185 O-GlcNAc sites on 80 proteins from HEK 293 cells [72].

The stoichiometry of O-GlcNAcylated forms of a given protein remained difficult to estimate until 2010, when Rexach and coworkers synthesized a resolvable mass tag using amino-oxyfunctionalized polyethylene glycol molecules (PEG 2K or 5K) [79]. After chemoenzymatic labeling of proteins and reaction with the functionalized PEG tag, the labeled proteins are resolved by SDS-PAGE. The Western blot against the target protein and the molecular mass shift correlated to the number of PEG molecules grafted onto the protein of interest allows the relative quantification of detected bands [68, 79-81]. More recently an alternative strategy of PEGylation of the O-GlcNAc-modified proteins was developed. The metabolic incorporation of peracetylated azidogalactosamine (Ac<sub>4</sub>GalNAz) that can be metabolized in UDP-GlcNAz via the salvage pathway [76], was combined with a copper-free click chemistry-based strategy using azadibenzylcyclooctyne (DBCO)-conjugated PEG5k. This approach allowed the determination of the O-GlcNAcylated/unmodified protein ratio, as shown for the transcription factor Sp1 [82].

#### 2.3 BEMAD and beyond

While click-chemistry is a powerful tool to detect, enrich and identify O-GlcNAcylated proteins and peptides, this strategy is not so effective to map O-GlcNAcylation sites if a noncleavable probe is used. To overcome this lack, BEMAD (beta-elimination followed by Michael addition with dithiothreitol) was developed directly [39, 44, 83] or after chemoenzymatic labeling with sugar analogs [8, 47, 75]. BEMAD consists in a mild betaelimination of O-linked residues from the protein/peptide backbone and the addition of dithiothreitol (DTT) to the protein via a Michael addition (BEMAD). These modified
proteins/peptides are then enriched by thiolsepharose affinity chromatography [39, 44, 84]. The advantage of this technique is the high stability of the resulting chemical bond, allowing a more easily site mapping by mass spectrometry [44, 83]. However, since peptides initially modified by phosphorylation or other glycosylations can also react to BEMAD, controls with alkaline phosphatase and betahexosaminidase treatments are absolutely required to ensure that enriched peptides were originally O-GlcNAcylated [39]. Nevertheless, the total digestion by the one or the other enzyme cannot be guaranteed, requiring additional control experiments. To overcome this technical limitation, alternative strategies based on BEMAD were developed, relying on the selective and specific click chemistry-based strategy. After chemoenzymatic labeling of O-GlcNAc proteins with UDP-GalNAz, binding to biotin alkyne probe and affinity chromatography enrichment of tagged peptides, bound O-GlcNAc tagged peptides can be released directly from the streptavidin resin using BEMAD (Table 2) [8, 47, 75]. Another elegant adapted BEMAD strategy using a biotin-cystamine (biCy) tag was described [43]. The specificity of the reaction was controlled by differential isotopic labeling with either the light or deuterated tag (biCy $d^{0}/biCy-d^{4}$ ) allowing both the discrimination between unspecific and specific peptides and the relative quantification of the tagged peptides.

# 3. Use of MS techniques for identification of *O*-GlcNAcylated proteins and *O*-GlcNAc sites

## **3.1 Contribution of alternative** fragmentation methods

The mapping of *O*-GlcNAc sites remains challenging for two main reasons. First, the relative low abundance of the *O*-GlcNAc modified form of the protein, thus selective enrichment of modified proteins or peptides is required to simplify samples and successfully identify the *O*-GlcNAc peptides in a mixture of peptides by MS (Table 1). Second, mapping *O*-

GlcNAc site remains difficult because of the labile property of the glycosidic linkage between Ser/Thr residues and GlcNAc when using the collision-induced dissociation (CID) conventional peptide fragmentation technique in a mass spectrometry analysis [24, 41, 45, 85]. In the last decade, technological advances in the field of mass spectrometry including novel fragmentation methods significantly contribute to overcome O-GlcNAc site mapping. Electroncapture dissociation (ECD) and electron-transfer dissociation (ETD) fragmentation modes retain O-GlcNAc, but also other labile PTMs such as phosphorylation and acetylation on the modified amino acids [24, 86, 87]. ECD uses the partial neutralization of multiply-protonated ions with low energy electrons in the magnetic field of a FT-ICR mass spectrometer, allowing the labile modifications to remain intact during inter-residue backbone fragmentation. Thus, analysis of peptides from purified PKC proteins allowed the identification of 23 O-GlcNAc sites and 10 phosphorylation sites on seven PKC isoforms by combining CID and ECD fragmentations on a FT-ICR mass spectrometer [88]. ETD is similar but works in low-cost and low-maintenance ion trap mass spectrometers. ETD induces fragmentation of the peptide backbone by transferring an electron from a radical anion to a protonated peptide, causing cleavage of the C $\alpha$ -N bond, just as ECD does (Tables 1 and 2) [8, 42, 45, 50, 66, 77, 86, 89-91].

3.2 Enrichment of O-GlcNAc proteins and peptides without chemical derivatization Several tools are now available to enrich O-GlcNAc proteins before MS/MS analysis. Thanks to the use of lectins and the development of specific O-GlcNAc antibodies (see section 2.1.1), O-GlcNAc proteins can be enriched by lectin affinity chromatography or immunoprecipitated one or several antibodies before by identification by tandem mass spectrometry (Table 1) [35, 37, 44, 47, 49, 50]. Moreover, the combination of two-dimensional electrophoresis separation and anti-O-GlcNAc or WGA Western-blot helps in identifying O-GlcNAc spots modified protein [20, 46, 58]. Immunoprecipitation and lectin enrichment can allow the mapping of O-GlcNAc sites when properly combined with HCD (High Energy C-Trap Dissociation) fragmentation for the detection of HexNAc oxonium ion as a signature to target O-GlcNAc modified peptides and ETD fragmentation for peptide sequencing and site localization respectively [11, 50, 91]. As an example, the combination of HCD/ETD fragmentation allowed the identification of 83 O-GlcNAc sites (including 70 novel sites) from 13 HEK293T cells proteins in after immunoprecipitation of O-GlcNAcvlated proteins by a mixture of antibodies [50]. However, antibodies are not suitable to immunoprecipitate O-GlcNAc peptides and WGA-conjugated agarose beads are not effective for the binding and elution of O-GlcNAc peptides using a standard protocol, due to the between weak interaction а single Nacetylglucosamine moiety of O-GlcNAc and the lectin. Nevertheless, the separation of O-GlcNAc-modified peptides from unmodified peptides can be achieved through their retardation on a WGA long column during isocratic HPLC (Table 1) [24, 42, 83, 86, 91]. Such a weak affinity chromatography (LWAC) approach was successfully used for the enrichment of O-GlcNAc peptides prior to site mapping by MS/MS, as illustrated by the identification of 1750 O-GlcNAc sites from mouse synaptic proteins [90].

## **3.3 Enrichment of** *O***-GlcNAc proteins** and peptides with chemical derivatization

Thanks to the arsenal of chemical tools developed for studying the *O*-GlcNAcome, most of the O-GlcNAc sites are nowadays mapped after chemical derivatization [67, 68, 81]. Metabolic or chemoenzymatic labeling prior to avidin/streptavidin or other beads purification enable the elution of *O*-GlcNAc proteins or peptides before MS analysis (Table 2) [45, 47, 69, 70, 76, 92]. Moreover, the use of a

photocleavable probe that leaves a basic tag at the *O*-GlcNAc site improves the ETD fragmentation efficiency along the peptide backbone [18, 73]. These approaches can also be combined with beta-elimination or BEMAD treatment of bound tagged *O*-GlcNAc peptides to facilitate the exact identification of the modified amino acid in the peptide sequence [47, 72, 75].

## **3.4** Towards a quantitative approach of the *O*-GlcNAcome

The dynamic of O-GlcNAcylation in cells and organisms is tightly related to extracellular signals. Thus, accessing O-GlcNAc cycling is possible through quantitative proteomics albeit it is far to be routinely performed. The differential labeling of proteins can be achieved before cell lysis using SILAC (Stable Isotope Labeling with Amino Acids in Cell Culture) [93]. This approach was used to evaluate the O-GlcNAc changes upon GSK3 inhibition [47] and stress response [49] and to investigate the connection between OGT and the Polycomb repressive complex 2 in mouse embryonic stem cells [42]. In vitro labeling of peptides after the proteolysis step is another way to evaluate O-GlcNAc dynamics. The isotopic labeling of peptides using the iTRAQ (isobaric tags for relative and absolute quantification) strategy [94] coupled with the chemoenzymatic labeling enrichment was performed to identify proteins differentially O-GlcNAcylated between human normal and diabetic erythrocytes [75]. Alternatively to quantitative proteomic approaches, several differential isotopic labeling of chemical compounds used in O-GlcNAc targeted strategies have been developed. The comparison of the BEMAD-treated O-GlcNAc peptides using light DTT versus heavy deuterated DTT leads to the quantification of O-GlcNAcylation and phosphorylation in mouse neuronal proteins [84]. Khidekel and coworkers developed the QUIC-Tag strategy for quantitative O-GlcNAc proteomics [45]. This is based on the labeling of O-GlcNAc proteins by

enzymatic transfer of a ketogalactose biotin probe followed by proteolysis and reductive amination into the peptides in presence of either formaldehyde/NaCNBH<sub>3</sub> or deuterated formaldehyde/NaCNBD<sub>3</sub> before selective enrichment on an avidin column. The relative quantification of the O-GlcNAc peptides between the two cellular states is then determined by the MS analysis. Despite the development of elegant strategies, further effort is still needed to access more easily to the relative quantification of the O-GlcNAcome. An emerging field is undoubtedly the use of the targeted MS method, the Multiple Reaction Monitoring Mass Spectrometry (MRM-MS) to detect and quantify native O-GlcNAc modified peptides without labeling and enrichment [95].

#### 4. Concluding remarks

During this last decade much attention has been focused on O-GlcNAcylation. This modification is universally widespread in the living beings including viruses, and alterations in O-GlcNAc cycling contribute to the etiology of several human diseases. Therefore, defining the O-GlcNAcome of the studied cells or organisms is a prerequisite for the understanding of the biological functions played by this atypical glycosylation. Nowadays the main challenge is to identify the precise sites of protein O-GlcNAcylation in order to anticipate its functional roles. Enrichment of O-GlcNAc proteins using different biochemical tools and approaches as antibodies, metabolic or chemoenzymatic labeling combined with glycopeptide isolation and cutting-edge mass spectrometry approaches facilitate this research. Indeed the use of alternative fragmentation modes in MS such as ECD or ETD offers invaluable opportunities to precisely localize the sites of O-GlcNAcylation. There is no doubt that in the near future new technological breakthroughs will authorize the localization of O-GlcNAcylation sites in record time on very low quantities of either a purified protein or a protein mixture. Mapping O-GlcNAc sites may

give information about a potential competition with known phosphorylated amino acid residues, and allows the construction of glycosylation mutants for studying diverse molecular and cellular functions such subcellular localization, stability, catalytic activity and cellular properties. The site mapping of O-GlcNAc proteins is also a prerequisite for the development of site-specific O-GlcNAc antibodies that will facilitate this current research field. Additionally, as evidenced by a few recent studies [8, 9, 11, 12], the crosstalk between O-GlcNAcylation and other PTMs needs to be further elucidated to get an overview of the complex regulation of protein functionality in response to extracellular stimuli/signals.

#### Acknowledgements

The authors thank the "Ligue Contre le Cancer/Comité du Nord", the "Association pour la Recherche sur le Cancer", the Région Nord-Pas de Calais (Cancer Regional Program), the University of Sciences and Technologies of Lille and the "Centre National de la Recherche Scientifique" for their financial support. The authors are also grateful to the "Slte de Recherche Intégrée sur le Cancer" ONCOLille.

#### **Conflict of interest statement**

The authors declare no conflict of interest.

#### References

 Venters, J. C., Adams, M. D., Myers, E.
 W., Li, P. W., et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001, 291, 1304-1351

2. Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001, 409, 860-921

3. Hart, G. W., Housley, M. P., Slawson, C., Cycling of *O*-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature* 2007, 446, 1017-1022

4. Cao, W., Cao, J., Huang, J., Yao, J., et al. Discovery and confirmation of *O*-GlcNAcylated proteins in rat liver mitochondria by combination of mass spectrometry and immunological methods. *PLoS One* 2013, 8:e76399

5. Perez-Cervera, Y., Dehennaut, V., Aquino Gil, M., Guedri, K., et al. Insulin signaling controls the expression of *O*-GlcNAc transferase and its interaction with lipid microdomains. *FASEB J.* 2013, 27, 3478-3486

6. Butkinaree, C., Park, K., Hart, G.W. *O*linked beta-N-acetylglucosamine (*O*-GlcNAc): Extensive crosstalk with phosphorylation to regulate signaling and transcription in response to nutrients and stress. *Biochim Biophys Acta*. 2010, 1800, 96-106

7. Vocadlo DJ. *O*-GlcNAc processing enzymes: catalytic mechanisms, substrate specificity, and enzyme regulation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2012, 16, 488-497

8. Sakabe, K., Wang, Z., Hart, G. W. Beta-Nacetylglucosamine (*O*-GlcNAc) is part of the histone code. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2010, 107, 19915-19920

9. Deplus, R., Delatte, B., Schwinn, M.K., Defrance, M., et al. TET2 and TET3 regulate GlcNAcylation and H3K4 methylation through OGT and SET1/COMPASS. *EMBO J.* 2013, 32, 645-655

10. Guinez, C., Mir, A.M., Dehennaut, V., Cacan, R., et al. Protein ubiquitination is modulated by *O*-GlcNAc glycosylation. *FASEB J.* 2008, 22, 2901-2911

11. Fujiki, R., Hashiba, W., Sekine, H., Yokoyama, A., et al. GlcNAcylation of histone H2B facilitates its monoubiquitination. *Nature* 2011, 480, 557-560

12. Li, M.D., Ruan, H.B., Hughes, M.E., Lee, J.S., et al. *O*-GlcNAc signaling entrains the circadian clock by inhibiting BMAL1/CLOCK ubiquitination. *Cell. Metab.* 2013, 17, 303-310

13. Capotosti, F., Guernier, S., Lammers, F., Waridel, P., et al. *O*-GlcNAc transferase catalyzes site-specific proteolysis of HCF-1. *Cell* 2011, 14, 376-388

14. Olivier-Van Stichelen, S., Drougat, L.,Dehennaut, V., El Yazidi-Belkoura, I., et al.Serum-stimulated cell cycle entry promotes

ncOGT synthesis required for cyclin D expression. *Oncogenesis* 2012, 1:e36

15. Ding, F., Yu, L., Wang, M., Xu, S., et al. O-GlcNAcylation involvement in high glucoseinduced cardiac hypertrophy via ERK1/2 and cyclin D2. *Amino Acids* 2013, 45, 339-349

16. Bond, M.R., Hanover, J.A. *O*-GlcNAc cycling: a link between metabolism and chronic disease. *Annu. Rev. Nutr.* 2013, 33, 205-229

17. Hart, G.W., Slawson, C., Ramirez-Correa, G.A., Lagerlof, O. Cross talk between GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease. *Ann. Rev. Biochem.* 2011, 80, 825-58

Slawson, C., Lakshmanan, T., Knapp, S.,
Hart, G.W. A mitotic
GlcNAcylation/phosphorylation signaling
complex alters the posttranslational state of the
cytoskeletal protein vimentin. *Mol. Biol. Cell.*2008, 19, 4130-4140

19. Wang, Z., Udeshi, N. D., Slawson, C., Compton, P. D., et al. Extensive crosstalk between *O*-GlcNAcylation and phosphorylation regulates cytokinesis. *Sci. Signal.* 2010, 3:ra2

20. Drougat, L., Olivier-Van Stichelen, S., Mortuaire, M., Foulquier, F., et al. Characterization of *O*-GlcNAc cycling and proteomic identification of differentially *O*-GlcNAcylated proteins during G1/S transition. *Biochim. Biophys. Acta*. 2012, 1820, 1839-1848

21. Tan, E. P., Caro, S., Potnis, A., Lanza, C., Slawson, C. *O*-linked N-acetylglucosamine cycling regulates mitotic spindle organization. *J. Biol. Chem.* 2013, 288, 27085-27099

22. Ma, Z., Vocadlo, D.J., Vosseller, K. Hyper-*O*-GlcNAcylation is anti-apoptotic and maintains constitutive NF-κB activity in pancreatic cancer cells. *J. Biol. Chem.* 2013, 288, 15121-15130

23. Hardivillé, S., Escobar-Ramirez, A., Pina-Canceco, S., Elass, E., Pierce, A. Delta-lactoferrin induces cell death via the mitochondrial death signaling pathway by upregulating bax expression. *Biometals* 2014, 27, 875-889

24. Ma, J., Hart, G.W. Protein *O*-GlcNAcylation in diabetes and diabetic

complications. *Expert Rev. Proteomics.* 2013, 10, 365-380

25. Mellor, K. M., Brimble, M. A., Delbridge, L. M. Glucose as an agent of post-translational modification in diabetes-New cardiac epigenetic insights. *Life Sci* 2014, pii: S0024-3205

26. Fardini, Y., Dehennaut, V., Lefebvre, T., Issad, T. *O*-GlcNAcylation: a new cancer hallmark ? *Front. Endocrinol.* 2013, 4, 99

27. Ferrer, C. M., Lynch, T. P., Sodi, V. L., Falcone, J. N., et al. *O*-GlcNAcylation Regulates Cancer Metabolism and Survival Stress Signaling via Regulation of the HIF-1 Pathway. *Mol. Cell* 2014, 54, 1-12

28. Paruchuri, V.D., Zachara, N.E. Defining the heart and cardiovascular *O*-GlcNAcome: a review of approaches and methods. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2011, 4, 710-718

29. Dassanayaka, S., Jones, S. P. *O*-GlcNAc and the cardiovascular system. *Pharmacol. Ther.* 2014, 142, 62-71

30. Yuzwa, S. A., Vocadlo, D. J. *O*-GlcNAc and neurodegeneration: biochemical mechanisms and potential roles in Alzheimer's disease and beyond. *Chem. Soc. Rev.* 2014, 43, 6839-6858

31. Torres, C. R., Hart, G. W. Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for *O*-linked GlcNAc. *J. Biol. Chem.* 1984, 259, 3308-3317

32. Holt, G. D., Haltiwanger, R. S., Torres, C. R., Hart, G. W. Erythrocytes contain cytoplasmic glycoproteins. *O*-linked GlcNAc on Band 4.1. *J. Biol. Chem.* 1987, 262, 14847-14850

33. Snow, C. M., Senior, A., Gerace L. Monoclonal antibodies identify a group of nuclear pore complex glycoproteins. *J. Cell. Biol.* 1987, 104, 1143-1156

34. Holt, G.D., Snow, C.M., Senior, A., Haltiwanger, R.S., et al. Nuclear pore complex glycoproteins contain cytoplasmically disposed *O*-linked N-acetylglucosamine. *J. Cell. Biol.* 1987, 104, 1157-1164 35. Ohn, T., Kedersha, N., Hickman, T., Tisdale, S., Anderson, P. A functional RNAi screen links *O*-GlcNAc modification of ribosomal proteins to stress granule and processing body assembly. *Nat. Cell. Biol.* 2008, 10, 1224-31

36. Comer, F. I., Vosseller, K., Wells, L., Accavitti, M. A., Hart, G. W. Characterization of a mouse monoclonal antibody specific for *O*linked N-acetylglucosamine. *Anal. Biochem.* 2001, 293, 169-177

37. Teo, C. F., Ingale, S., Wolfert, M. A., Elsayed, G. A., et al., Glycopeptide-specific monoclonal antibodies suggest new roles for *O*-GlcNAc. *Nat. Chem. Biol.* 2010, 6, 338-343

38. Turner, J. R., Tartakoff, A. M., Greenspan, N. S. Cytologic assessment of nuclear and cytoplasmic O-linked N-acetylglucosamine distribution by using anti-streptococcal monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 1990, 87, 5608-5612

39. Zachara, N.E., Vosseller, K., Hart, G.W. Detection and analysis of proteins modified by *O*-linked N-acetylglucosamine. *Curr Protoc Protein Sci.* 2011, Chapt. 12:Unit12.8

40. Ma, J., Hart, G.W. *O*-GlcNAc profiling: from proteins to proteomes. *Clin. Proteomics.* 2014, 11, 8

41. Zeidan, Q., Wang Z., De Maio, A., Hart, G. W. *O*-GlcNAc cycling enzymes associate with the translational machinery and modify core ribosomal proteins. *Mol. Biol. Cell.* 2010, 21, 1922-1936

42. Myers, S. A., Panning, B., Burlingame, A. L. Polycomb repressive complex 2 is necessary for the normal site-specific O-GlcNAc distribution in mouse embryonic stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2011, 108, 9490-9495 43. Overath, T., Kuckelkorn, U., Henklein, P., Strehl, B., et al. Mapping of O-GlcNAc sites of 20 S proteasome subunits and Hsp90 by a novel biotin-cystamine tag. Mol. Cell. Proteomics 2012, 11, 467-477

44. Wells, L., Vosseller, K., Cole, R. N., Cronshaw, J. M., et al. Mapping sites of *O*-GlcNAc modification using affinity tags for serine and threonine post-translational modifications. *Mol. Cell. Proteomics* 2002, 1, 791-804

45. Khidekel, N, Ficarro, S. B., Clark, P. M., Bryan, M. C., et al. Probing the dynamics of *O*-GlcNAc glycosylation in the brain using quantitative proteomics. *Nat. Chem. Biol.* 2007, 3, 339–348

46. Champattanachai, V., Netsirisawan, P., Chaiyawat, P., Phueaouan, T., et al. Proteomic analysis and abrogated expression of *O*-GlcNAcylated proteins associated with primary breast cancer. *Proteomics*. 2013, 13, 2088-2099 47. Wang, Z., Pandey, A., Hart, G. W. Dynamic interplay between *O*-linked Nacetylglucosaminylation and glycogen synthase kinase-3-dependent phosphorylation. *Mol. Cell. Proteomics*. 2007, 6, 1365-1379

48. Zachara, N.E. Detection and Analysis of (*O*-linked beta-N-Acetylglucosamine)-Modified Proteins. The Nucleus: Vol.2 Chapter 13, 2008, Humana Press.

49. Zachara, N.E., Molina, H., Wong, K.Y., Pandey, A., Hart, G.W. The dynamic stressinduced "*O*-GlcNAc-ome" highlights functions for *O*-GlcNAc in regulating DNA damage/repair and other cellular pathways. *Amino Acids*. 2011, 40, 793-808

50. Zhao, P., Viner, R., Teo, C. F., Boons, G. J. et al. Combining high-energy C-trap dissociation and electron transfer dissociation for protein *O*-GlcNAc modification site assignment. *J. Proteome Res.* 2011, 10, 4088–4104

51. Isono T. *O*-GlcNAc-specific antibody CTD110.6 cross-reacts with N-GlcNAc2-modified proteins induced under glucose deprivation. *PLoS One* 2011, 6, e18959

52. Reeves R. A., Lee A., Henry, R., Zachara, N. E. Characterization of the specificity of *O*-GlcNAc reactive antibodies under conditions of starvation and stress. *Anal. Biochem.* 2014, 457, 8-18

53. Tashima, Y., Stanley, P. Antibodies that detect O-linked  $\beta$ -D-N-acetylglucosamine on the extracellular domain of cell surface

glycoproteins. J. Biol. Chem. 2014, 289, 11132-11142

54. Ortiz-Meoz, R.F., Merbl, Y., Kirschner, M.W., Walker, S. Microarray discovery of new OGT substrates: the medulloblastoma oncogene OTX2 is *O*-GlcNAcylated. *J. Am. Chem. Soc.* 2014, 136, 4845-4848

55. Hanover, J. A., Cohen, C. K., Willingham, M. C., Park, M. K. O-linked N-acetylglucosamine is attached to proteins of the nuclear pore. Evidence for cytoplasmic and nucleoplasmic glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 1987, 262, 9887-9894

56. Monsigny, M., Sene, C., Obrenovitch, A., Roche, A. C., et al. Properties of succinylated wheat-germ agglutinin. *Eur. J. Biochem.* 1979, 98, 39-45

57. Ren, X., Jiang, S., Li, D., Sun, H., Wang, D. Crystallization and preliminary crystallographic studies of AAL-2, a novel lectin from Agrocybe aegerita that binds nonreducing terminal Nacetylglucosamine. *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* 2013, 69, 650-652

58. Cieniewski-Bernard, C., Bastide, B., Lefebvre, T., Lemoine, J. et al. Identification of Olinked N-acetylglucosamine proteins in rat skeletal muscle using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*. 2004, 3, 577-585

59. Lefebvre, T., Baert, F., Bodart, J. F., Flament, S., et al. Modulation of *O*-GlcNAc glycosylation during Xenopus oocyte maturation. *J. Cell. Biochem*. 2004, 93, 999-1010 60. Zachara, N.E. Detecting the "*O*-GlcNAcome": detection, purification, and analysis of *O*-GlcNAc modified proteins. *Methods Mol. Biol.* 2009, 534, 251-279

61. Lefebvre, T., Pinte, S., Guérardel, C., Deltour, S., et al., The tumor suppressor HIC1 (hypermethylated in cancer 1) is *O*-GlcNAc glycosylated. *Eur. J. Biochem.* 2004, 271, 3843-3854

62. Ma, Z.Y., Skorobogatko, Y., Vosseller, K. Tandem lectin weak affinity *ch*romatography for glycoprotein enrichment. *Methods Mol Biol.* 2013, 951, 21-31

63. Yuzwa, S.A., Yadav, A.K., Skorobogatko, Y., Clark, T., et al. Mapping *O*-GlcNAc modification sites on tau and generation of a site-specific *O*-GlcNAc tau antibody. *Amino Acids.* 2011, 40, 857-868

64. Holt, G. D., Hart, G. W. The subcellular distribution of terminal N-acetylglucosamine moieties. Localization of a novel protein-saccharide linkage, *O*-linked GlcNAc. *J. Biol. Chem.* 1986, 261, 8049-8057

65. Ramakrishnan, B., Qasba, P. K. Structurebased design of beta 1,4-galactosyltransferase I (beta 4Gal-T1) with equally efficient Nacetylgalactosaminyltransferase activity: point mutation broadens beta 4Gal-T1 donor specificity. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 20833-20839

66. Khidekel, N., Ficarro, S. B., Peters, E. C., Hsieh-Wilson, L. C. Exploring the *O*-GlcNAc proteome: direct identification of *O*-GlcNAcmodified proteins from the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2004, 101, 13132-13137

67. Kim, E.J. Chemical arsenal for the study of *O*-GlcNAc. *Molecules* 2011, 16:1987-2022.

68. Cecioni, S., Vocadlo, D.J. Tools for probing and perturbing *O*-GlcNAc in cells and in vivo. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2013, 17, 719-728

69. Sprung, R., Nandi, A., Chen, Y., et al., Tagging-via-substrate strategy for probing O-GlcNAc modified proteins. *J. Proteome Res.* 2005, 4, 950-957

70. Nandi, A., Sprung, R., Barma, D. K., Zhao, Y., et al. Global identification of *O*-GlcNAcmodified proteins. *Anal. Chem.* 2006,78, 452-458

71. Gurcel, C., Vercoutter-Edouart, A. S., Fonbonne, C., Mortuaire, M., et al. Identification of new *O*-GlcNAc modified proteins using a clickchemistry-based tagging. *Anal. Bioanal. Chem.* 2008, 390, 2089-2097

72. Hahne, H., Sobotzki, N., Nyberg, T., Helm, D., et al. Proteome wide purification and identification of O-GlcNAc-modified proteins using click chemistry and mass spectrometry. *J. Proteome Res.* 2013, 12, 927-936

73. Zaro, B. W., Yang, Y. Y, Hang, H. C., Pratt, M. R Chemical reporters for fluorescent detection and identification of *O*-GlcNAcmodified proteins reveal glycosylation of the ubiquitin ligase NEDD4-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2011, 108, 8146–8151

74. Dehennaut, V., Slomianny, M. C, Page, A., Vercoutter-Edouart, A.S, et al., Identification of structural and functional *O*-linked Nacetylglucosamine-bearing proteins in Xenopus laevis oocyte. *Mol. Cell. Proteomics* 2008, 7, 2229-2245

75. Wang, Z., Park, K., Comer, F., Hsieh-Wilson, L.C., Site-specific GlcNAcylation of human erythrocyte proteins: potential biomarker(s) for diabetes. *Diabetes*. 2009, 58, 309-317

76. Boyce, M., Carrico, I. S., Ganguli, A. S., Yu, S. H., et al. Metabolic cross-talk allows labeling of *O*-linked beta-N-acetylglucosaminemodified proteins via the N-acetylgalactosamine salvage pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, 108, 3141-3146

77. Wang, Z. H., Wang, Z., Udeshi, N. D., O'Malley, M., et al. Enrichment and site mapping of *O*-linked N-acetylglucosamine by a combination of chemical/enzymatic tagging, photochemical cleavage, and electron transfer dissociation mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* 2010, 9, 153–160

78. Alfaro, J. F., Gong, C. X., Monroe, M. E., Aldrich, J. T., et al. Tandem mass spectrometry identifies many mouse brain *O*-GlcNAcylated proteins including EGF domain-specific *O*-GlcNAc transferase targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2012, 10, 7280-7285

79. Rexach, J. E., Rogers, C. J., Yu, S. H., Tao, J., et al. Quantification of *O*-glycosylation stoichiometry and dynamics using resolvable mass tags. *Nat. Chem. Biol.* 2010, 6, 645-651

80. Yi, W., Clark, P.M., Mason, D.E., Keenan,M.C., Phosphofructokinase 1 glycosylation

regulates cell growth and metabolism. *Science* 2012, 337, 975-80

81. Banerjee, P.S., Hart, G.W., Cho, J.W. Chemical approaches to study *O*-GlcNAcylation. *Chem. Soc. Rev.* 2013, 42, 4345-4357

82. Teo, C.F., Wells, L. Monitoring protein *O*-GlcNAc Status via metabolic labeling and copperfree click chemistry. *Anal. Biochem.* 2014 pii: S0003-2697(14)00261-9

83. Vosseller, K., Trinidad, J. C., Chalkley, R. J., Specht, C. G., et al. *O*-linked N-acetylglucosamine proteomics of postsynaptic density preparations using lectin weak affinity chromatography and mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics.* 2006, 5, 923-934

84. Vosseller, K., Hansen, K.C., Chalkley, R.J., Trinidad, J.C., et al. Quantitative analysis of both protein expression and serine / threonine posttranslational modifications through stable isotope labeling with dithiothreitol. *Proteomics* 2005, 5, 388-398

85. Chalkley, R.J., Burlingame, A.L. Identification of novel sites of *O*-Nacetylglucosamine modification of serum response factor using quadrupole time-of-flight mass spectrometry. Mol. Cell. Proteomics. 2003 2, 182-90

86. Chalkley, R. J., Thalhammer, A., Schoepfer, R., Burlingame, A. L. Identification of protein *O*-GlcNAcylation sites using electron transfer dissociation mass spectrometry on native peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009, 106, 8894–8899

87. Copeland, R.J., Han, G., Hart, G.W. *O*-GlcNAcomics-Revealing roles of *O*-GlcNAcylation in disease mechanisms and development of potential diagnostics. Proteomics: Clinical Applications 2013, 7:597-606

88. Robles-Flores, M., Meléndez, L., García,W., Mendoza-Hernández, G., et al.Posttranslational modifications on protein

kinase c isozymes. Effects of epinephrine and phorbol esters. *Biochim. Biophys. Acta*. 2008, 1783, 695-712

89. Olivier-Van Stichelen, S., Dehennaut, V., Buzy, A., Zachayus, J. L., et al. *O*-GlcNAcylation stabilizes  $\beta$ -catenin through direct competition with phosphorylation at threonine 41. *FASEB J.* 2014, 28, 3325-38.

90. Trinidad, J. C., Barkan, D. T., Gulledge, B. F., Thalhammer, A. et al. Global identification and characterization of both *O*-GlcNAcylation and phosphorylation at the murine synapse. *Mol. Cell. Proteomics*. 2012, 11, 215-229

91. Nagel, A.K., Schilling, M., Comte-Walters, S., Berkaw, M. N., Ball, L. E. Identification of *O*-linked N-acetylglucosamine (*O*-GlcNAc)-modified osteoblast proteins by electron transfer dissociation tandem mass spectrometry reveals proteins critical for bone formation. *Mol Cell Proteomics.* 2013, 12, 945-955

92. Parker, B.L., Gupta, P., Cordwell, S.J., Larsen, M.R., Palmisano, G. Purification and identification of *O*-GlcNAc-modified peptides using phosphate-based alkyne CLICK chemistry in combination with titanium dioxide chromatography and mass spectrometry. *J Proteome Res.* 2011, 10, 1449-58

93. Ong, S.E., Mann, M.: A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). *Nat. Protoc.* 2007, 1, 2650-60

94. Hughes, C., Krijgsveld, J. Developments in quantitative mass spectrometry for the analysis of proteome dynamics. *Trends Biotechnol.* 2012, 30, 668-76

95. Maury, J.J., Ng, D., Bi, X., Bardor, M., Choo, A.B. Multiple reaction monitoring mass spectrometry for the discovery and quantification of *O*-GlcNAc-modified proteins. *Anal Chem*. 2014, 86, 395-402.



**Figure 1- PTMs modulate partner-to-partner interactions and consequently are responsible for protein functions.** A protein can be modified by a large variety of PTMs (represented as symbols  $\coprod$ ,  $\Gamma$ , T, T, Y, ). A single PTM or a combination of PTMs modifies the local conformation of either regions or domains of a protein and therefore offers different interaction surfaces. As a consequence, a protein is able to interact with a plethora of partners that can change its localization, stability, interaction with other partners, and finally its activities.





A- Amongst the PTMs, *O*-GlcNAcylation is a dynamic glycosylation which is in close relationship with phosphorylation and also interplays with other PTMs. Compared to the 21,000 genes encoded by the genome, the human proteome is largely more complex, estimated to over 1 million proteins. In addition to transcriptional regulation, this complexity can be explained by the myriad of PTMs, some of them being reported on this figure. *O*-GlcNAcylation is a dynamic PTM like phosphorylation with which it can compete for the same or adjacent serine/threonine residues or act in synergy. The reversibility of this modification is regulated by a single couple of enzymes: OGT that transfers the GlcNAc group onto serines or threonines of substrates and OGA that removes it. *O*-GlcNAc cycling interplays also with acetylation, methylation, ubiquitination and proteolysis as indicated by an arrow.

PPase, phosphatase; Ac, acetylation; Me, methylation; SUMO, sumoylation; Ub, ubiquitination; ADP-Rib, ADP-ribosylation; NEDD8 (ubiquitin-like molecule), NEDDylation; SNOs, S-Nitrosylation; GPI, glycosyl phosphatidylinositol anchor; palmitoyl, S-palmitoylation; geranylgeranyl and farnesyl, S-prenylation.

**B-***O*-GlcNAcylation is confined within the cytoplasmic, nuclear and mitochondrial compartments. In contrast with complex glycosylations that occur in endoplasmic *reticulum*, Golgi apparatus and more largely along the secretory pathway, *O*-GlcNAcylated proteins are mainly located in the cytosol and nucleus. It has also been evidenced that *O*-GlcNAcylation occurs in mitochondria (an isoform of OGT, mOGT, has been described in mitochondria) and at the cytoplasmic face of the plasma membrane, in the close vicinity to lipid rafts.

References	cell type or tissue	Enrichment method	MS method	number of identified <i>O</i> - GlcNAc proteins	number of identified <i>O</i> -GlcNAc sites or peptides
Wells et al. , MCP 2002 [44]	rat brain	CTD110.6 Immunochromatography	MS/MS	30	
	rat brain and liver	BEMAD and thiol-sepharose	CID MS/MS	3	8 sites
Chalkley et al., 2003 [85]	human recombinant SRF purified		CID MS/MS	1	2 sites
Cieniewski-Bernard et al., 2004 [5	rat skeletal muscle	WGA beads and 2D-electrophoresis	MALDI-TOF MS	14	
Vosseller <i>et al.,</i> 2006 [83]	mouse brain (post- synaptic preparation	LWAC and BEMAD	CID/ECD MS/MS	18	65 peptides, 42 sites
Wang et al., 2007 [47]	COS7 cells	CTD110.6 Immunochromatography	MS/MS	45	
Robles-Flores et al., 2008 [88]	rat hepatocytes	PKC purification	CID/ECD MS/MS	7	34 peptides, 23 sites
Ohn <i>et al.,</i> 2008 [35]	UO2S cells (ribonucleoproteins granul	IP RL2	MS/MS	51	
Chalkley <i>et al.</i> , 2009 [86]	mouse brain (post- synaptic preparation	LWAC	CID/ETD MS/MS	15	58 sites
Teo <i>et al.,</i> 2010 [37]	HEK293T cells	IP O-GIcNAc (18B10.C7, 9D1.E4, 1F5.D6, CTD110.6)	MS/MS	215	
Zeidan <i>et al.,</i> 2010 [41]	Hela cells and rat liver	ribosome preparation	MS/MS	21	
	rat liver	ribosome preparation	CID MS/MS	4	4 sites
Fujiki <i>et al ,</i> 2011 [11]	HeLa cells (chromatin preparation)	WGA beads and IP RL2	Q-TOF MS/MS and ETD MS/MS	257	3 sites (H2B)
Myers <i>et al.,</i> 2011 [42]	mouse embryonic stem cells	LWAC	ETD-MS/MS	62	142 sites
Zachara <i>et al., 2011</i> [49]	Cos-7 cells	CTD110.6 Immunochromatography	Q-TOF MS/MS	30	7 peptides
Zhao <i>et al.,</i> 2011 [50]	HEK293T cells	IP O-GIcNAc (18B10.C7+9D1.E4+ 1F5.D6)	HCD/ETD MS/MS	186	83 (13 proteins)
Drougat et al., 2012 20]	MCF7 cells	2D-electrophoresis and Western-blot (RL2)	MS/MS	58	
Trinidad et al., 2012 [90]	mouse brain (synaptic membrane)	LWAC	CID/ETD MS/MS		1750
Champattanachai et al., 2013 [46]	breast tissue	2D-electrophoresis and Western-blot (CTD110.6)	MS/MS	29	
Nagel <i>et al., 2</i> 013 [91]	MC3T3E1 differentiated osteoblasts	LWAC	CID/ETD MS/MS and HCD/ETD MS/MS		23 sites
Olivier-Van Stichelen <i>et al.</i> , 2014	HT29 cells	IP beta-catenin	ETD MS/MS	1	4 sites

Table 2- Identification of *O*-GlcNAc proteins and *O*-GlcNAc sites using click-chemistry based methods: upper part, enzymatic transfer using GalT1Y289L and lower part, metabolic incorporation.

References	cell type or tissue	enzymatic transfert using GalT1Y289L	functionalized probe	affinity enrichment and post-treatment	MS method	number of identified O-GlcNAc proteins	number of identified O-GlcNAc sites or peptides
Khidekel <i>et al.</i> , 2004 [66]	rat brain	UDP-ketoGal	Aminoxy biotin	avidin beads	CID MS/MS	25	34 peptides
Khidekel <i>et al.,</i> 2007 [45]	cortical neurons from embryonic rats	UDP-ketoGal	Aminoxy biotin	avidin beads	CID/ETD MS/MS	26	29 peptides
Wang et al., 2007 [47]	COS7 cells	UDP-GalNAz	biotin alkyne	avidin beads and BEMAD	MS/MS		1 site
Dehennaut <i>et al.,</i> 2008 [74]	oocytes from Xenopus	UDP-GalNAz	biotin alkyne	avidin beads	MS/MS	24	1 site
Wang et al., 2009 [75]	human erythrocytes	UDP-ketoGal	Aminoxy biotin	streptavidin beads	MS/MS	25	
Wang et al., 2009 [75]	human erythrocytes	UDP-GalNAz	PEG-biotin alkyne	streptavidin beads and BEMAD	CID MS/MS	17	35 sites
Parker et al., 2011 [92]	HeLa cells (nuclear preparation) and mouse brain	UDP-GalNAz	phospho-alkyne	Titanium dioxyde beads	HCD/ETD MS/MS		31 sites and 11 peptides
Sakabe et al., 2010 [8]	HeLa cells (histone purification)	UDP-GalNAz	biotin alkyne	avidin beads and BEMAD	MS/MS	3	3 sites
Wang et al., 2010 [19]	HeLa cells (mitotic spindle preparation)	UDP-GalNAz	photocleavable biotin alkyne	avidin beads and UV cleavage	CID/ETD MS/MS	73	140 sites
Wang et al., 2010 [77]	rat brain	UDP-GalNAz	photocleavable PEG-biotin alkyne	avidin beads and UV cleavage	CID/ETD MS/MS	7	8 sites
Alfaro <i>et al.,</i> 2012 [78]	mouse cerebrocortical brain	UDP-GalNAz	photocleavable PEG-biotin alkyne	avidin beads and UV cleavage	HCD-CID/ETD MS/MS	249	358 sites
Overath et al., 2012 [43]	mouse brain, liver and spleen (20S proteasome and Hsp90 purification)		adapted BEMAD and biotin-cystamine tag-d <sup>0</sup> /d <sup>4</sup>	streptavidin beads	MALDI-TOF/TOF MS	8	11 sites
References	cell type or tissue	metabolic incorporation	functionalized probe	affinity enrichment and post-treatment	MS method	number of identified O-GlcNAc proteins	number of identified O-GlcNAc sites or peptides
Sprung <i>et al.</i> , 2005 [69]	Drosophila S2 cells	Ac4-GlcNAz	biotin phosphine	streptavidin beads	MS/MS	51	
Nandi <i>et al. ,</i> 2006 [70]	HeLa cells	Ac4-GlcNAz	biotin phosphine	streptavidin beads	MS/MS	199	
Gurcel <i>et al.,</i> 2008 [71]	MCF7 cells	Ac <sub>4</sub> -GlcNAz	biotin alkyne	streptavidin beads	MS/MS	32	
Boyce et al., 2011 [76]	HEK293T, Jurkat cells	Ac <sub>4</sub> -GalNAz	phosphine-FLAG-His6 or phosphine-biotin	IP FLAG and Ni-NTA column	MS/MS	18	
Zaro et al., 2011 [73]	NIH3T3 cells	Ac <sub>4</sub> -GlcNAlk	azido-azo-biotin	streptavidin beads and chemical cleavage	MS/MS	374 (142 with high confidence)	
Hahne et al., 2013 [72]	HEK293 cells	Ac <sub>4</sub> -GlcNAz	-	alkyne-agarose and beta-elimination	CID/HCD MS/MS	1535	85 sites





## Silencing the Nucleocytoplasmic O-GlcNAc Transferase Reduces Proliferation, Adhesion, and Migration of Cancer and Fetal Human Colon Cell Lines

Agata Steenackers<sup>1</sup>, Stéphanie Olivier-Van Stichelen<sup>1,2</sup>, Steffi F. Baldini<sup>1</sup>, Vanessa Dehennaut<sup>1,3</sup>, Robert-Alain Toillon<sup>4</sup>, Xuefen Le Bourhis<sup>4</sup>, Ikram El Yazidi-Belkoura<sup>1</sup> and Tony Lefebvre<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>CNRS, UMR 8576, UGSF, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, FRABio FR 3688, University of Lille, Lille, France, <sup>2</sup>Laboratory of Cellular and Molecular Biology, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA, <sup>3</sup>CNRS, UMR 8161, M3T, Mechanisms of Tumorigenesis and Targeted Therapies, «Institut de Biologie de Lille», Pasteur Institute of Lille, FRABio FR 3688, University of Lille, Lille Cedex, France, <sup>4</sup>U908, CPAC, Cell Plasticity and Cancer, INSERM, University of Lille, Lille, France

#### **OPEN ACCESS**

#### Edited by:

Ramasamy Paulmurugan, Stanford University, USA

#### Reviewed by:

Wendong Huang, Beckman Research Institute of City of Hope, USA Parasuraman Padmanabhan, Nanyang Technological University, Singapore

> \*Correspondence: Tony Lefebvre tony.lefebvre@univ-lille1.fr

#### Specialty section:

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

Received: 02 December 2015 Accepted: 06 May 2016 Published: 25 May 2016

#### Citation:

Steenackers A, Olivier-Van Stichelen S, Baldini SF, Dehennaut V, Toillon R-A, Le Bourhis X, El Yazidi-Belkoura I and Lefebvre T (2016) Silencing the Nucleocytoplasmic O-GlcNAc Transferase Reduces Proliferation, Adhesion, and Migration of Cancer and Fetal Human Colon Cell Lines. Front. Endocrinol. 7:46. doi: 10.3389/fendo.2016.00046 The post-translational modification of proteins by O-linked  $\beta$ -N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) is regulated by a unique couple of enzymes. O-GlcNAc transferase (OGT) transfers the GlcNAc residue from UDP-GlcNAc, the final product of the hexosamine biosynthetic pathway (HBP), whereas O-GlcNAcase (OGA) removes it. This study and others show that OGT and O-GlcNAcylation levels are increased in cancer cell lines. In that context, we studied the effect of OGT silencing in the colon cancer cell lines HT29 and HCT116 and the primary colon cell line CCD841CoN. Herein, we report that OGT silencing diminished proliferation, in vitro cell survival and adhesion of primary and cancer cell lines. SiOGT dramatically decreased HT29 and CCD841CoN migration, CCD841CoN harboring high capabilities of migration in Boyden chamber system when compared to HT29 and HCT116. The expression levels of actin and tubulin were unaffected by OGT knockdown but siOGT seemed to disorganize microfilament, microtubule, and vinculin networks in CCD841CoN. While cancer cell lines harbor higher levels of OGT and O-GlcNAcylation to fulfill their proliferative and migratory properties, in agreement with their higher consumption of HBP main substrates glucose and glutamine, our data demonstrate that OGT expression is not only necessary for the biological properties of cancer cell lines but also for normal cells.

Keywords: O-GIcNAcylation, O-linked N-acetylglucosamine transferase, colon cell lines, colorectal cancer, siRNA

## INTRODUCTION

O-linked  $\beta$ -N-acetylglucosaminylation (O-GlcNAcylation) is the modification by a single residue of N-acetylglucosamine (GlcNAc) of nucleocytoplasmic and mitochondrial proteins. This modification is highly dynamic and is regulated by two enzymes: the O-GlcNAc transferase (OGT), which adds the residue and the O-GlcNAcase (OGA), which removes it (**Figure 1A**). O-GlcNAcylation

Abbreviations: GFAT, Glutamine:Fructose-6-phosphate amidotransferase; NAGK, N-acetylglucosamine kinase; OGA, O-GlcNAcase (O-linked N-acetylglucosaminidase); OGT, O-GlcNAc transferase (O-linked N-acetylglucosaminyl transferase).



cycling is involved in many fundamental functions, including translation (1), transcription (2), cell signaling (3), and protein trafficking (4). Deregulation of O-GlcNAcylation dynamics actively participates in tumorigenesis and in the etiology of cancer (5). A synergy between unhealthy diet and cancer development is proposed because of the status of OGT's natural substrate, UDP-GlcNAc, which is positioned at the crossroad of metabolic pathways (6–8). Moreover, glucose transport and consumption is upregulated in cancer cells. This alteration of metabolism is called the "Warburg effect," Otto Warburg having devoted a large part of his research activities to "the origin of cancer cells" (9).

The initial observation made by Cori and Cori (10) concluded that a hen's wing having Rous sarcoma produced more lactic acid than the normal wing. Therefore, it was suggested that a deficiency in glucose metabolism was responsible for carcinogenesis even if it is now accepted that it is rather a consequence. Interestingly, cancer cells not only increase glucose

OGT Knockdown Reduces Colon Cells Properties

consumption but also use more glutamine (11). Glutamine is necessary for both non-essential amino-acids and for purine/ pyrimidine base synthesis in highly proliferative cells (11). In cancer cells, glucose is also used for production of amino-acids and lipids. A large part of the increased-glucose flux is diverted toward the pentose phosphate pathway (PPP) to generate deoxyribose needed for the synthesis of DNA. Interestingly, both glutamine and glucose are limiting substrates of the hexosamine biosynthetic pathway (HBP) (12). HBP results in UDP-GlcNAc synthesis subsequently used by OGT to modify proteins (6). Consequently, through O-GlcNAcylation, HBP activation is involved in cellular structure construction as well as regulation of metabolic flux, signaling pathways, cell homeostasis processes, and tumorigenesis. Increased O-GlcNAcylation levels have been reported in diverse kind of cancers: breast (5, 13, 14), lung (15), liver (16), prostate (17), chronic lymphocytic leukemia (18), colon (15, 19-21), and colitis-associated cancer patients (22). Regarding these recent observations, we wondered whether silencing OGT expression affects biological properties of colon cancer-derived cell lines (HT29 and HCT116) in comparison to a normal colon cell line (CCD841CoN, derived from a fetus). Although O-GlcNAcylation and its cycling enzymes are more elevated in cancer cell lines, we found that both normal and cancer cell lines are impacted by siOGT. While the fetal colon cells are highly mobile, we demonstrate that OGT knockdown slows down their migration property in addition to a disturbance of the cytoskeleton. Together, these data show that OGT is crucial for the biological properties of cancer and non-cancer cell lines. However, we suggest that cancer cell lines are highly sensitive to metabolic deprivation and OGT knockdown, accordingly to their high-demand in nutrients, in particular glucose and glutamine.

## MATERIALS AND METHODS

## Cell Culture and Transfection of siRNA

HT29 and HCT116 cells were maintained in a Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and CCD841CoN cells were maintained in an Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) (Lonza) (**Table 1**). The three cell lines were maintained in a medium supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum, 2 mM

TABLE 1   Characteristics of the cell lines used in the study.					
Cell line	Gender, age, disease, MSI status	Characterized deletions, mutations, and comments			
CCD841CoN	Female, 21-week gestation (fetus), normal colon	According to ATCC, the definitive evidence of epithelial origin is lacking			
HT29	Female, 44 years, colorectal adenocarcinoma, MSS	Deletion in APC (del1555_2843) Mutation in p53 (codon 273: R273H) Mutation in BRAF (codon 600: V600E) Mutation in PI3KCA (P449T)			
HCT116	Male, 48 years, colorectal carcinoma (proximal), HNPCC, MSI	Mutation in Ras (codon 13: G13D) Mutation in PI3KCA (codon 1047: H1047R) Deletion in $\beta$ -catenin (del45)			

L-glutamine, 5 IU/mL penicillin, and 50  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> streptomycin at 37°C in a 5% (v/v) CO<sub>2</sub>-enriched humidified atmosphere. Cells were reverse-transfected with Lipofectamine RNAiMax (Life Technologies) according to manufacturer's instructions using 5 nM small interfering RNA targeting OGT (21) or a control siRNA (MISSION siRNA universal negative control #1, SIGMA).

# SDS-PAGE, Western Blotting, and Antibody Staining

Equal amounts of protein (determined by the BCA method) were resolved on 10% SDS-PAGE under reducing conditions and proteins were electroblotted on nitrocellulose (GE Healthcare). Efficiency of the transfer and equal loading were verified using Ponceau red staining. Membranes were first saturated for 45 min with 5% (m/v) non-fatty acid milk in Tris-buffered saline (TBS)-Tween buffer [15 mM Tris/HCl, 140 mM NaCl, and 0.05% Tween20 (v/v), pH 8.0]. Mouse monoclonal anti-O-GlcNAc (RL2, Ozyme) was used at a dilution of 1:4,000. Chicken anti-OGA (345, generously provided by Hart, the Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, MD, USA) was used at a dilution of 1:2,000. Mouse monoclonal anti-tubulin (Santa Cruz Biotechnology) and mouse polyclonal anti-GAPDH (Santa Cruz Biotechnology) were used at a dilution of 1:3,000; rabbit polyclonal anti-OGT (TI14, Sigma-Aldrich) was used at a dilution of 1:4,000; anti-GFAT (Abcam). Membranes were incubated with the different antibodies overnight at 4°C, then washed three times with TBS-Tween for 10 min, and incubated with either an anti-rabbit or an antimouse horseradish peroxidase-labeled secondary antibody at a dilution of 1:10,000 for 1 h. Finally, three washes of 10 min each were performed with TBS-Tween and the detection was carried out by chemiluminescence imaging (Fusion Solo system, Vilber Lourmat).

## **Cell Adhesion Assay**

Cells (1 × 10<sup>4</sup>) were seeded 48 h after transfection with siRNA targeting OGT or a control siRNA in 96-well plates (Thermo Fisher Scientific) in DMEM for HCT116 and HT29, and EMEM for CCD841 CoN, containing 10% (v/v) fetal calf serum. At the indicated time periods, medium containing not attached cells was removed and replaced with fresh medium. Viability of adherent cells was analyzed using the MTS method (Promega) according to the manufacturer's instructions. Cell adhesion was measured in three independent experiments (n = 8).

## **Proliferation Assays**

HCT116 and HT29 cells  $(2 \times 10^3)$  and CCD841 CoN  $(1 \times 10^3)$  cells were seeded in 96-well plates (Thermo Fisher Scientific) and grown in DMEM (for HCT116 and HT29) or EMEM (for CCD841CoN) medium containing 10% (v/v) fetal calf serum. Cells were transfected two times with siRNA targeting OGT or a control siRNA. Cell growth was analyzed for the indicated time periods using the MTS reagent (Promega) according to the manufacturer's instructions. Cell proliferation was evaluated in three independent experiments (n = 8).

### In Vitro Cell Survival Assays

Cells  $(2 \times 10^3)$  were seeded in 100-mm Petri dishes. After attachment, cells were transfected four times with siRNA targeting OGT or a control siRNA. Two weeks later, cells were fixed in 4% (m/v) paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) for 20 min at room temperature and stained with crystal violet (0.1% w/v, 30 min, at room temperature) for 30 min at room temperature. Colonies were then washed several times with water and left to dry at room temperature. *In vitro* cell survival assays were performed in two independent experiments (n = 4).

## Cell Migration Analysis

#### Wound Healing Assays

Wound healing assays were performed using culture-insertµDish (Ibidi) composed of two chambers (growth area per well 0.22 cm<sup>2</sup>) separated by a wall (width of 500 µm). Cultureinserts were put in 12-well plates.  $1 \times 10^4$  CCD841CoN and  $4 \times 10^4$  HCT116 and HT29 cells were seeded into the chambers 48 h after transfection. After cell attachment overnight at 37°C in 10% (v/v) fetal calf serum-containing medium (DMEM for HCT116 and HT29 and EMEM for CCD841CoN) cultureinserts were gently removed to form the cell-free gap. For each cell line, pictures were taken 24 h later to monitor the healing of the cell-free gap on a Nikon Eclipse Ti-U microscope. Wound healing assays were performed in three independent experiments (n = 6).

#### Transwell System

Forty-eight hours after transfection cells ( $5 \times 10^4$ ) were seeded in the upper surface of a Transwell 12-well (size of the pores, 8 µm) (BD Biosciences) and cultured for 24 h in a 0.2% (v/v) fetal calf serum-containing medium (DMEM for HCT116 and HT29 and EMEM for CCD841 CoN). After incubation, cells were fixed in 4% (m/v) paraformaldehyde for 20 min at room temperature and stained with Hoechst 33258 for 15 min in the dark at room temperature. Then, cells in the upper chamber of the well's porous membrane were removed by scraping with a cotton swab and washed several times with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2). The membrane was mounted on slide with Glycergel mounting medium (Dako). The migrated cells were counted under ×20 magnification and the mean number of cells was evaluated in three independent experiments (n = 6).

## **Confocal Microscopy**

Cells were cultured on glass coverslips in DMEM (for HCT116 and HT29) and EMEM (for CCD841CoN) medium containing 10% (v/v) fetal calf serum. Cells were washed twice in PBS and fixed in 4% (m/v) paraformaldehyde for 20 min at room temperature. After washing with PBS, cells were blocked and permeabilized in PBS containing 0.2% (m/v) BSA and 0.1% (m/v) saponin for 1 h. Cells were incubated for 4 h at room temperature with polyclonal anti-tubulin (1:200) (Santa Cruz Biotechnology) or monoclonal anti-vinculin (1:200) (Abcam), diluted in PBS-BSA-saponin. Cells were washed three times in PBS-BSA-saponin and incubated with Alexa Fluor® 488 and Alexa Fluor® 568 (Life Technologies) or CytoPainter PhalloidiniFluor 488 Reagent (1:1000) (Abcam) in PBS-BSA-saponin for 1 h at room temperature. Following washings, cells were stained with Hoechst during 15 min in the dark at room temperature. After washings with PBS and deionized water, cells were mounted with Glycergel mounting medium. Data were finally collected using the ZEN2012 software.

### **Statistical Analysis**

Student's *t*-test (Excel) was used for statistical analysis (unpaired/ two-tailed); *p*-values were calculated and reported accordingly (\*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001).

## RESULTS

#### HT29 and HCT116 Cells Exhibit Higher Levels of O-GlcNAcylation Cycling Enzymes Compared to CCD841CoN

Two colon cancer cell lines, HT29 and HCT116, respectively, derived from an adenocarcinoma and from a carcinoma (Table 1) and the fetal colon cell line CCD841CoN were analyzed by Western blot to determine to the levels of O-GlcNAcylation, OGT, OGA, and Glutamine:Fructose-6-P amidotransferase (GFAT), the rate-limiting enzyme of the HBP (Figures 1A,B). As shown by western blotting results, O-GlcNAcylated proteins levels, as well as OGA, OGT, and GFAT protein expression were much more elevated in cancer cell lines compared to the fetal cell line (Figure 1B), in accordance with our previous study (23). We next checked whether the three cell lines' O-GlcNAcylation levels were dependent upon glucose and glutamine, the two pivotal substrates of the HBP (Figure 1A). Thus, overnight depletion of either glucose or glutamine reduced O-GlcNAcylation processes, more particularly in HT29 and HCT116 cells (Figure 1C), which are high consumers of these two nutrients like most cancer cell lines (7-11). Moreover, we noticed that CCD841CoN were particularly sensitive to glucose starvation, leading to a high mortality rate.

Therefore, we next assessed the impact of OGT knockdown on the biological properties of these cell lines.

## OGT Knockdown Decreases Cell Proliferation, Reduces *In Vitro* Cell Survival, and Impairs Cell Adhesion

The efficiency of siOGT was checked for the three cell lines. As expected, transfection of HCT116, HT29, and CCD841CoN with siOGT decreased the expression of the glycosyltransferase and drastically reduced *O*-GlcNAcylation levels (**Figure 2**).

We previously observed that the inhibitor of OGA, NButGT (24), accelerated the proliferation rate of MCF7 cells (23), whereas the potent OGT inhibitor, Ac-5SGlcNAc (25), slightly delayed cell proliferation (26). In the present study, we tested the impact of siOGT on the proliferation rate of CCD841CoN,



FIGURE 2 | OGT knockdown decreases O-GlcNAcylation contents in colon cells. Forty-eight hours after transfection, the efficiency of siOGT vs. siCtrl was tested in the three cell lines used in the study. OGT and O-GlcNAcylation levels were measured by Western blot. The arrowhead indicates an unspecific band.

HT29, and HCT116 cells (**Figures 3A–C**, respectively). As expected and in agreement with our previous observations (26), OGT silencing decelerated the proliferation rate of the three cell lines, with an average 20% decrease for CCD841CoN and HT29, and 45% decrease for HCT116 (**Figure 3D**). To go further, we tested the ability of colon cells to grow into a colony (*in vitro* cell survival assay) in response to siOGT (**Figure 4A**). Both for HT29 and HCT116 cells, the reduction of OGT expression dramatically decreased *in vitro* survival compared with siCtrl-transfected cells (**Figure 4B**). The ability of a single cell to grow into a colony is characteristic of cancer cells. Accordingly, we were unable to assess the formation of colonies for the primary cell line CCD841CoN. These experiments showed that OGT and, consequently, *O*-GlcNAcylation are needed for colon cells growth.

We next performed cell adhesion assays for the indicated time periods (**Figure 5**). While siOGT decreased the adhesion of the three cell lines, we observed a higher impact of OGT silencing on the adhesion of HT29 and CCD841CoN cells. OGT is, therefore, necessary for adhesion of colon cells.







quantified (mean values  $\pm$  SD). (Student's *t*-test: \*P < 0.05).

### OGT Knockdown Reduces Migration of Colon Cells

We wondered whether OGT is involved in the migration of colon cells. For this matter, we used two distinct approaches: the wound healing assay using culture-inserts µDish and the Transwell system assay, a more quantitative method. Wound healing was assessed 24 h after the culture-inserts were removed (Figure 6). While CCD841CoN were able to fill in the cell-free gap in 24 h, the gap separating the two edges of the migratory HT29 cells was tight at t = 24 h. However, HCT116 only slowly recovered the wound after 24 h. OGT knockdown impaired the closure of the wound for CCD841CoN and HT29 cells as no significant migration was measured after siOGT treatment in comparison to siControl. Nevertheless, even if the migration of the HCT116 cells was slow, siOGT also delayed significantly this process (Figure 6B). Furthermore, these first observations were corroborated by the more quantitative Transwell assay (Figure 7A). HCT116 cells did not display any significant migration across the filter pores even in the siControl conditions.



FIGURE 5 | OGT silencing reduces cell adhesion. Cell adhesion wasmonitored for the different cell lines 48 h after siOGT or siCtrl treatment from15 min to 4 h after seeding as detailed in the experimental proceduressection. Mean values ( $\pm$ SD) were reported. (A) CCD841CoN; (B) HT29; (C)HCT116. (Student's *t*-test: \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*\*P < 0.001).

Regarding HT29, while these cells harbored a weak migration in Boyden chambers, a significant decrease was measured when OGT was silenced. Surprisingly, despite their size, CCD841CoN cells exhibited a high capacity of migration compared to HT29



*t*-test: \**P* < 0.05, \*\*\**P* < 0.001).

and HCT116 in Boyden chambers. OGT silencing dramatically reduced their migratory capabilities, in accordance with wound healing assays.

We hypothesized that a larger cytoskeleton network could confer the high-migratory properties of CCD841CoN cells of which the epithelial origin has not been clearly established (**Table 1**). First, we showed that actin, the major component of the microfilament network, was more heavily expressed in CCD841CoN cells compared to HT29 and HCT116 cells (**Figure 7B**). Interestingly, siOGT did not impact the expression of both actin and tubulin, another major component of the cytoskeleton network. Analysis of the cytoskeleton by confocal microscopy (**Figures 7C–E**) indicated that the cytoskeletal networks are more elaborated in CCD841CoN, which reinforces the doubt about the epithelial origin of this cell line according to ATCC. Surprisingly, OGT silencing did not impact the expression of actin, tubulin, and vinculin, a cytoskeletal protein associated with cell-cell and cell-matrix junctions. On the other hand, siOGT greatly affected



the cytoskeletal networks and cell morphology in CCD841CoN cells. The cell shape appeared stocky and stunted, whereas the microfilament network, responsible for cell migration, was less extended.

## DISCUSSION

O-GlcNAcylation is fundamental for cell viability as demonstrated by the non-viability of OGT-depleted ES cells (27).

Whereas three isoforms were described for OGT (nucleocytoplasmic, short, and mitochondrial isoforms), this enzyme is encoded by a single gene and downregulating its expression or inhibiting its catalytic activity affects major fundamental biological functions (3, 26, 27). Moreover, a deregulation in the O-GlcNAcylation cycling is involved in the etiology of diverse pathologies, such as type-2 diabetes, Alzheimer's, and cancers (6). Intriguingly, due to the correlation between UDP-GlcNAc, O-GlcNAcylation, and nutrients availability, diseases associated with unhealthy diet and metabolic disorders may be tightly linked to O-GlcNAcylation imbalance (28). It is, therefore, crucial to better understand through which metabolic mechanisms lifestyles negatively impact human health. Particularly, some cancers, among which colorectal cancers, are synergistically favored by metabolic problems and unhealthy lifestyles (29, 30). Elevated-O-GlcNAcylation level was described in many cancers, even if the reasons and impacts of this increased level remain obscure. For example, breast cancer cells have increased-O-GlcNAcylation and OGT levels, and a reduction of OGT expression correlated to tumor growth decrease (5). High levels of OGT and its product, O-GlcNAcylation, were also reported in colon cancers and cancer cell lines (15, 19-21) and colitisassociated cancer patients (22) but very few initiatives to measure the effect of OGT knockdown were conducted. Among those few studies, OGA inhibition or shOGT exhibited no significant effect on HT29 cell invasion but enhanced and reduced, respectively, their anchorage-independent growth (15). Furthermore, OGT knockdown inhibited anchorage-independent growth (14), but contradictory results were also reported (19). This last study indicated that OGA silencing changed the anchorage-independent growth and the morphology of the primary colorectal cancer cell SW480 and of its metastatic clone SW620 (19). Whereas one previous study showed altered gene expression related to actin reorganization and cell migration in siOGA-transfected cells (19), we found that OGT silencing also modifies cell shape features of the fetal human colon cell line CCD841CoN. In our hands, siOGT did not modify the expression of actin but we suspected that actin-binding proteins are up- or downregulated when OGT is silenced. In that sense, OGT promotes breast cancer cells invasion in a cofilin-dependent manner. O-GlcNAcylation of cofilin at Ser108 localizes this actin-interacting protein to invadopodia (31). Also, under conditions of low OGT expression, actin may be itself affected by defective O-GlcNAcylation. In a previous work, we mapped a major O-GlcNAcylation site within the 318–324 region of  $\beta$ -actin expressed in Xenopus laevis oocytes (32) and later, one O-GlcNAcylation site was localized in the domain four of rat actin (33). Nevertheless, the function of actin O-GlcNAcylation remains to be established. In parallel, O-GlcNAcylation was also widely studied on tubulin, another major component of the cytoskeleton network. O-GlcNAcylation of  $\alpha$ -tubulin reduces heterodimerization of  $\alpha/\beta$ -tubulins and O-GlcNAcylated forms of tubulins are unable to polymerize into microtubule (34). Moreover,  $\alpha$ -tubulin is heavily O-GlcNAcylated in primary colorectal cancer (20). These two independent studies tend to support our observations of a disorganization of microtubules in the primary colon cell line, while no significant effect of siOGT was found in the two colon cancer lines.

Beyond the effect of *O*-GlcNAcylation on structural proteins in a pathologic context, downregulation of OGT must interfere with the expression and/or the activity of regulatory proteins. A comparison between primary breast malignant tumors and benign tumors revealed the *O*-GlcNAcylation of crucial components of the "Warburg effect" only in cancer (14). One of the characteristics of cancer cells is the shift from an oxidative to a non-oxidative consumption of glucose. Oncogenic signaling pathways controlling the transcription factor hypoxia-inducible factor-1 (HIF1) alpha are responsible for this metabolic shift.

HIF1 $\alpha$  stability is dependent upon *O*-GlcNAcylation level (35). GLUT1 expression, one of the HIF1 $\alpha$ 's target genes, is more heavily expressed when OGT is activated. Consequently, glucose transport into the cell is increased. Most of the glycolytic enzymes are modified by *O*-GlcNAcylation (32, 36, 37). Among those, the enzyme phosphofructokinase-1 (PFK1) (38) controls the entry of glucose into glycolysis. *O*-GlcNAcylation of PFK1 at Ser509 prevents the binding of the activator Fru-2,6-bis-phosphate. Consequently, this modification diverts the use of glucose to the PPP to produce pentoses and NADPH<sub>2</sub>, respectively, used for nucleic acids and lipids biosynthesis. This confers an advantage for cancer cell to increase their proliferation rate.

*O*-GlcNAc transferase is critical for normal cells and cancer cell homeostasis and adaptation to environment. Due to the plethora of OGT's targets, it is difficult to assign precisely the impact of OGT silencing. In light of the different elements exposed above, we suggest that a default of *O*-GlcNAcylation impacts on cell architecture as attested by the alteration of morphology observed in CCD841CoN cells and of metabolic routes. Moreover, knocking-down OGT also results in inactivation of mitogen signaling pathways as previously established (3, 26, 39, 40).

Our observations indicate that OGT is crucial for the biological properties of normal colon-derived cells and colon cancer cell lines. However, colon cancer cells express higher amounts of OGT and O-GlcNAcylation than normal cells. Due to the addiction of cancer cells for glutamine and glucose (7-10), the main substrates of HBP, it could be suspected that cancer cells were much more sensitive to changes in O-GlcNAcylation levels than normal cells while we found that both colon cancer and primary cell lines were affected by OGT silencing. OGT also interferes with cell migration, especially for the fetal cell line CCD841CoN, by reducing the size of the actin network, which participates in the alteration of the cell morphology. Along this study, we demonstrated that OGT impacts proliferation and migration of normal as well as cancer colon cells. This work highlights how O-GlcNAcylation, through the modulation of basic biological features, controls the properties of primary cells and also might initiate nutrientresponsive cancers, such as colorectal cancer.

## **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

AS designed, performed, and analyzed the experiments, and wrote the experimental procedures. SS and VD initiated the project, conceived, and performed experiments. SS edited the manuscript. SB and R-AT performed and analyzed the experiments. XB analyzed the experiments and managed the study at INSERM U908. IY-B designed, performed, and analyzed the experiments. TL initiated the project, conceived, and coordinated the study, and wrote the paper. All authors reviewed the results and approved the final version of the manuscript.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the "Ligue Contre le Cancer/Comité du Nord," the "Fondation ARC (Association pour la Recherche sur le Cancer)," the Région Nord-Pas de Calais (Cancer Regional

### REFERENCES

- Zhu Y, Liu TW, Cecioni S, Eskandari R, Zandberg WF, Vocadlo DJ. O-GlcNAc occurs cotranslationally to stabilize nascent polypeptide chains. *Nat Chem Biol* (2015) 11:319–25. doi:10.1038/nchembio.1774
- Hardivillé S, Hoedt E, Mariller C, Benaïssa M, Pierce A. O-GlcNAcylation/phosphorylation cycling at Ser10 controls both transcriptional activity and stability of delta-lactoferrin. J Biol Chem (2010) 285:19205–18. doi:10.1074/jbc.M109.080572
- Perez-Cervera Y, Dehennaut V, Aquino Gil M, Guedri K, Solórzano Mata CJ, Olivier-Van Stichelen S, et al. Insulin signaling controls the expression of O-GlcNAc transferase and its interaction with lipid microdomains. *FASEB J* (2013) 27:3478–86. doi:10.1096/fj.12-217984
- Chun YS, Park Y, Oh HG, Kim TW, Yang HO, Park MK, et al. O-GlcNAcylation promotes non-amyloidogenic processing of amyloid-β protein precursor via inhibition of endocytosis from the plasma membrane. J Alzheimers Dis (2015) 44:261–75. doi:10.3233/JAD-140096
- Caldwell SA, Jackson SR, Shahriari KS, Lynch TP, Sethi G, Walker S, et al. Nutrient sensor O-GlcNAc transferase regulates breast cancer tumorigenesis through targeting of the oncogenic transcription factor FoxM1. Oncogene (2010) 29:2831–42. doi:10.1038/onc.2010.41
- Lefebvre T, Dehennaut V, Guinez C, Olivier S, Drougat L, Mir AM, et al. Dysregulation of the nutrient/stress sensor O-GlcNAcylation is involved in the etiology of cardiovascular disorders, type-2 diabetes and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* (2010) 1800:67–79. doi:10.1016/j.bbagen.2009.08.008
- Fardini Y, Dehennaut V, Lefebvre T, Issad T. O-GlcNAcylation: a new cancer hallmark? *Front Endocrinol* (2013) 4:99. doi:10.3389/fendo.2013.00099
- Jóźwiak P, Forma E, Bryś M, Krześlak A. O-GlcNAcylation and metabolic reprograming in cancer. *Front Endocrinol* (2014) 5:145. doi:10.3389/ fendo.2014.00145
- Warburg O. On the origin of cancer cells. Science (1956) 123:309–14. doi:10.1126/science.123.3191.309
- Cori CF, Cori GT. The carbohydrate metabolismof tumors: I, the free sugar, lactic acid, and glycogen content of malignant tumors. *J Biol Chem* (1925) 64:11–22.
- Wise DR, Thompson CB. Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. Trends Biochem Sci (2010) 35:427–33. doi:10.1016/j.tibs.2010.05.003
- Marshall S, Bacote V, Traxinger RR. Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. *J Biol Chem* (1991) 266:4706–12.
- Gu Y, Mi W, Ge Y, Liu H, Fan Q, Han C, et al. GlcNAcylation plays an essential role in breast cancer metastasis. *Cancer Res* (2010) 70:6344–51. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1887
- Champattanachai V, Netsirisawan P, Chaiyawat P, Phueaouan T, Charoenwattanasatien R, Chokchaichamnankit D, et al. Proteomic analysis and abrogated expression of O-GlcNAcylated proteins associated with primary breast cancer. *Proteomics* (2013) 13:2088–99. doi:10.1002/pmic.201200126
- Mi W, Gu Y, Han C, Liu H, Fan Q, Zhang X, et al. O-GlcNAcylation is a novel regulator of lung and colon cancer malignancy. *Biochim Biophys Acta* (2011) 1812:514–9. doi:10.1016/j.bbadis.2011.01.009
- Zhu Q, Zhou L, Yang Z, Lai M, Xie H, Wu L, et al. O-GlcNAcylation plays a role in tumor recurrence of hepatocellular carcinoma following liver transplantation. *Med Oncol* (2012) 29:985–93. doi:10.1007/s12032-011-9912-1
- Lynch TP, Ferrer CM, Jackson SR, Shahriari KS, Vosseller K, Reginato MJ. Critical role of O-Linked β-N-acetylglucosamine transferase

Program), the University of Lille and the "Centre National de la Recherche Scientifique," the "Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale" for their financial support. The authors are also grateful to the "SIte de Recherche Intégré sur le Cancer" (SIRIC) ONCOLille. The authors also appreciated the help of Dr. Christian Slomianny and Mrs. Elodie Richard of the CCMIC platform (BICeL Campus Lille 1). We thank Dr. Sophie Groux-Degroote (University Lille 1, UGSF), a fluent English speaker, for the final reading of our manuscript.

in prostate cancer invasion, angiogenesis, and metastasis. *J Biol Chem* (2012) **287**:11070–81. doi:10.1074/jbc.M111.302547

- Shi Y, Tomic J, Wen F, Shaha S, Bahlo A, Harrison R, et al. Aberrant O-GlcNAcylation characterizes chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* (2010) 24:1588–98. doi:10.1038/leu.2010.152
- Yehezkel G, Cohen L, Kliger A, Manor E, Khalaila I. O-linked β-N-acetylglucosaminylation (O-GlcNAcylation) in primary and metastatic colorectal cancer clones and effect of N-acetyl-β-D-glucosaminidase silencing on cell phenotype and transcriptome. *J Biol Chem* (2012) 287:28755–69. doi:10.1074/ jbc.M112.345546
- Phueaouan T, Chaiyawat P, Netsirisawan P, Chokchaichamnankit D, Punyarit P, Srisomsap C, et al. Aberrant O-GlcNAc-modified proteins expressed in primary colorectal cancer. Oncol Rep (2013) 30:2929–36. doi:10.3892/or.2013.2794
- Olivier-Van Stichelen S, Dehennaut V, Buzy A, Zachayus JL, Guinez C, Mir AM, et al. O-GlcNAcylation stabilizes β-catenin through direct competition with phosphorylation at threonine 41. FASEB J (2014) 28:3325–38. doi:10.1096/fj.13-243535
- Yang YR, Kim DH, Seo YK, Park D, Jang HJ, Choi SY, et al. Elevated O-GlcNAcylation promotes colonic inflammation and tumorigenesis by modulating NF-κB signaling. *Oncotarget* (2015) 6:12529–42. doi:10.18632/ oncotarget.3725
- Olivier-Van Stichelen S, Guinez C, Mir AM, Perez-Cervera Y, Liu C, Michalski JC, et al. The hexosamine biosynthetic pathway and O-GlcNAcylation drive the expression of β-catenin and cell proliferation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* (2012) 302:E417–24. doi:10.1152/ajpendo.00390.2011
- 24. Yuzwa SA, Macauley MS, Heinonen JE, Shan X, Dennis RJ, He Y, et al. A potent mechanism-inspired O-GlcNAcase inhibitor that blocks phosphorylation of tau in vivo. *Nat Chem Biol* (2008) **4**:483–90. doi:10.1038/nchembio.96
- GlosterTM,ZandbergWF,HeinonenJE,ShenDL,DengL,VocadloDJ. Hijacking a biosynthetic pathway yields a glycosyltransferase inhibitor within cells. *Nat Chem Biol* (2011) 7:174–81. doi:10.1038/nchembio.520
- Olivier-Van Stichelen S, Drougat L, Dehennaut V, El Yazidi-Belkoura I, Guinez C, Mir AM, et al. Serum-stimulated cell cycle entry promotes ncOGT synthesis required for cyclin D expression. *Oncogenesis* (2012) 1:e36. doi:10.1038/ oncsis.2012.36
- Shafi R, Iyer SP, Ellies LG, O'Donnell N, Marek KW, Chui D, et al. The O-GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2000) 97:735–9. doi:10.1073/pnas.100471497
- Olivier-Van Stichelen S, Hanover JA. You are what you eat: O-linked N-acetylglucosamine in disease, development and epigenetics. Curr Opin Clin Nutr Metab Care (2015) 18:339–45. doi:10.1097/MCO.0000000000000188
- Pais R, Silaghi H, Silaghi AC, Rusu ML, Dumitrascu DL. Metabolic syndrome and risk of subsequent colorectal cancer. World J Gastroenterol (2009) 15:5141–8. doi:10.3748/wjg.15.5141
- Renehan A, Smith U, Kirkman MS. Linking diabetes and cancer: a consensus on complexity. *Lancet* (2010) 375:2201–2. doi:10.1016/S0140-6736(10)60706-4
- Huang X, Pan Q, Sun D, Chen W, Shen A, Huang M, et al. O-GlcNAcylation of cofilin promotes breast cancer cell invasion. J Biol Chem (2013) 288:36418–25. doi:10.1074/jbc.M113.495713
- Dehennaut V, Slomianny MC, Page A, Vercoutter-Edouart AS, Jessus C, Michalski JC, et al. Identification of structural and functional O-linked N-acetylglucosamine-bearing proteins in *Xenopus laevis* oocyte. *Mol Cell Proteomics* (2008) 7:2229–45. doi:10.1074/mcp.M700494-MCP200

- Hédou J, Bastide B, Page A, Michalski JC, Morelle W. Mapping of O-linked beta-N-acetylglucosamine modification sites in key contractile proteins of rat skeletal muscle. *Proteomics* (2009) 9:2139–48. doi:10.1002/pmic.200800617
- Ji S, Kang JG, Park SY, Lee J, Oh YJ, Cho JW. O-GlcNAcylation of tubulin inhibits its polymerization. *Amino Acids* (2011) 40:809–18. doi:10.1007/ s00726-010-0698-9
- Ferrer CM, Lynch TP, Sodi VL, Falcone JN, Schwab LP, Peacock DL, et al. O-GlcNAcylation regulates cancer metabolism and survival stress signaling via regulation of the HIF-1 pathway. *Mol Cell* (2014) 54:820–31. doi:10.1016/j. molcel.2014.04.026
- Wells L, Vosseller K, Cole RN, Cronshaw JM, Matunis MJ, Hart GW. Mapping sites of O-GlcNAc modification using affinity tags for serine and threonine post-translational modifications. *Mol Cell Proteomics* (2002) 1:791–804. doi:10.1074/mcp.M200048-MCP200
- Cieniewski-Bernard C, Bastide B, Lefebvre T, Lemoine J, Mounier Y, Michalski JC. Identification of O-linked N-acetylglucosamine proteins in rat skeletal muscle using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* (2004) 3:577–85. doi:10.1074/mcp.M400024-MCP200
- Yi W, Clark PM, Mason DE, Keenan MC, Hill C, Goddard WA III, et al. Phosphofructokinase 1 glycosylation regulates cell growth and metabolism. *Science* (2012) 337:975–80. doi:10.1126/science.1222278

- Sekine O, Love DC, Rubenstein DS, Hanover JA. Blocking O-linked GlcNAc cycling in Drosophila insulin-producing cells perturbs glucose-insulin homeostasis. J Biol Chem (2010) 285:38684–91. doi:10.1074/jbc.M110. 155192
- Zhang N, Chen X. Potential role of O-GlcNAcylation and involvement of PI3K/Akt1 pathway in the expression of oncogenic phenotypes of gastric cancer cells in vitro. *Biotechnol Appl Biochem* (2015). doi:10.1002/bab. 1441

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

Copyright © 2016 Steenackers, Olivier-Van Stichelen, Baldini, Dehennaut, Toillon, Le Bourhis, El Yazidi-Belkoura and Lefebvre. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.