

**Université de Lille - Sciences et Technologies**

Ecole Doctorale Biologie-Santé (ED 446)

Thèse de doctorat d'Université

Présentée et soutenue publiquement le 29 Mai 2018 par

**Maité LETURCQ**

En vue de l'obtention du grade de

**Docteur de l'Université de Lille, Sciences et Technologies**

Spécialité : Biochimie et Biologie Moléculaire

***Etude du rôle de la dynamique de O-GlcNAcylation sur les  
protéines du complexe Minichromosome Maintenance  
MCM2-7 dans les cellules somatiques humaines***

**Membres du jury :**

**Rapporteurs :** Dr Tarik Issad

Dr Malik Lutzmann

**Examineurs :** Dr Anne Harduin-Lepers

Pr Jean-François Bodart

Dr Chad Slawson

**Directrice de thèse :** Dr Anne-Sophie Vercoutter-Edouart

Thèse préparée au sein de l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle

(UMR CNRS 8576)





**Université de Lille - Sciences et Technologies**

Ecole Doctorale Biologie-Santé (ED 446)

Thèse de doctorat d'Université

Présentée et soutenue publiquement le 29 Mai 2018 par

**Maité LETURCQ**

En vue de l'obtention du grade de

**Docteur de l'Université de Lille, Sciences et Technologies**

Spécialité : Biochimie et Biologie Moléculaire

***Etude du rôle de la dynamique de O-GlcNAcylation sur les  
protéines du complexe Minichromosome Maintenance  
MCM2-7 dans les cellules somatiques humaines***

**Membres du jury :**

**Rapporteurs :** Dr Tarik Issad

Dr Malik Lutzmann

**Examineurs :** Dr Anne Harduin-Lepers

Pr Jean-François Bodart

Dr Chad Slawson

**Directrice de thèse :** Dr Anne-Sophie Vercoutter-Edouart

Thèse préparée au sein de l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle

(UMR CNRS 8576)



« Entre ce que je pense, ce que je veux dire, ce que je crois dire, ce que je dis,  
ce que vous avez envie d'entendre, ce que vous entendez, ce que vous comprenez...

il y a dix possibilités qu'on ait des difficultés à communiquer.

Mais essayons quand même... »

*Encyclopédie du savoir relatif et absolu, Bernard Werber*

*Cette thèse est dédiée à mes parents,*

*A Lulu, Ange et Lila,*



# Remerciements

Mon tout premier grand « Merci » est destiné au **Dr Anne-Sophie Vercoutter-Edouart** qui m'a prise sous son aile et m'a accompagnée pendant plus de 4 ans. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir apporté ton soutien en fin de M2 pour le passage du concours et pendant tout le reste de ma thèse. Tu m'as fait découvrir, et aimer la recherche et ces MCMs qui ont changé ma vie. Je te remercie aussi de m'avoir permis de participer à différents congrès, tous plus intéressants les uns que les autres. Un immense Merci pour tout ! (Ainsi qu'un grand « désolée » pour tous les tracas que j'ai pu te causer, en espérant qu'ils ne soient pas trop nombreux).

Je remercie le **Pr Christophe D'Hulst** pour son accueil au sein de l'UGSF.

Un grand merci au **Pr Tony Lefebvre** de m'avoir guidée auprès d'Anne-Sophie pour mon stage de M2 et de m'avoir si bien accueillie au sein l'équipe. Merci pour toutes nos discussions, scientifiques ou non, autour du café du matin, ou de la bière du jeudi. Et je m'excuse pour le vouvoiement, mais malheureusement je pense que ça restera.

Je souhaite remercier l'ensemble de mon jury de thèse et en premier lieu le **Dr Tarik Issad** et le **Dr Malik Lutzmann** d'avoir accepté d'être mes rapporteurs. Je remercie également le **Dr Anne Harduin-Lepers**, le **Pr Jean-François Bodart** et le **Dr Chad Slawson** d'avoir accepté d'examiner mon travail de thèse. J'adresse un Merci tout particulier au Dr Malik Lutzmann et au Pr Jean-François Bodart pour avoir suivi l'évolution de mes travaux de thèse au cours des différents CST, vos conseils m'ont été d'une aide précieuse.

Un immense Merci à **Marlène**. Merci pour ton sourire quotidien et ton soutien sans faille pendant toute la durée de mon séjour au laboratoire. J'étais heureuse de pouvoir compter sur toi, que ce soit pour les manipulations ou pour m'offrir une oreille attentive chaque fois que j'avais des déboires à te raconter. J'espère ne pas t'avoir trop ennuyé avec toutes mes histoires. En tout cas, ça a été un réel plaisir de travailler en ta compagnie, au rythme de ta sonnerie de téléphone qui va beaucoup me manquer d'ailleurs.

Je souhaite remercier tous les membres de l'équipe grâce à qui je me suis rapidement sentie intégrée à mon arrivée en Master et avec qui j'ai pu travailler dans une ambiance chaleureuse. Merci **Ikram** et **Annick** pour nos discussions autour de la table café et d'avoir pris de votre temps pour assister aux répétitions de mes différentes présentations. **Céline**, merci pour ton aide

précieuse et pour tout ce temps passé en microscopie. Merci à mes voisins de bureau, **Stephan, Ninon, Moyira** et **Sadia** sans qui l'atmosphère n'y serait pas aussi agréable. **Stephan**, qui supporte sans broncher toutes nos discussions un peu trop féminines. Merci pour toute l'aide que tu m'as apportée pendant ma dernière année. **Sadia**, je te souhaite beaucoup de courage et de réussite pour la fin de ton Master 2. Les copines **Ninon** et **Moyira**, un grand merci pour tous ces moments passés en votre compagnie. J'ai apprécié chacun d'entre eux et j'espère en vivre beaucoup d'autres. **Ninon**, je vous souhaite beaucoup de bonheur à toi, Bryan et la petite Olivia et beaucoup de courage pour la suite de ta thèse. **Moyira**, garde ta bonne humeur, t'entendre rire et dire « coulure » chaque jour était un vrai bonheur. Je te souhaite aussi beaucoup de courage pour ta rédaction qui approche et j'espère pouvoir un jour visiter le Mexique avec toi. Peut-être au moment de ta soutenance, qui sait ?

Merci aux doctorants de l'unité pour tous ces moments que nous avons partagé et qui m'ont permis de souffler pendant ces quatre années : **James, Charles, Maxence, Anne-Sophie S., Maxime, Pierre, Anne-Sophie, Pierre-André, Clément, Alexandre...**

Je souhaite aussi remercier tous les stagiaires qui ont participé à l'avancée de mon projet de thèse : **Louis, Riad, Nicolas, Lucie, Emeline, Antoine.**

Un grand merci au **Dr Olivier Vidal** pour toute son aide apportée au cours de ma thèse. Merci d'avoir eu la patience de m'apprendre les bases de la microbiologie et pour toutes tes idées et conseils qui nous ont permis d'avancer sur le projet.

Merci à tous les enseignants avec qui j'ai eu le plaisir de travailler au cours des différents TP et projets : **Marie-Ange, Cécile, Jérôme, Belinda, Frédéric, Christophe, Sophie, Isabelle...**

Je tiens à remercier **Martine, Laurence** et **Nadège** de m'avoir aidée dans toutes mes démarches administratives et pour votre bonne humeur et votre sourire à chaque fois que je passais la porte de votre bureau.

Un immense merci à tous mes amis qui sont restés présents et m'ont soutenu pendant toute la durée de ma thèse **Steffi, Jeanne, Alexandra, Josette, Julie, Manu...** **Steffi**, merci pour tous ces moments passés ensembles. Toutes nos soirées, dont je ne me souviens pas de la totalité, mais j'ai toujours pu compter sur toi pour me les rappeler. Tu as apporté ce petit grain de folie, qui je pense est typiquement Baldinien, et qui m'a aidé à souffler quand c'était nécessaire. Ne change rien et profite de ta nouvelle petite famille. A nos prochaines (nombreuses) soirées ! **Josette**, qui me supporte depuis le master. Merci beaucoup de ne pas m'avoir abandonnée

malgré le peu de nouvelles que je te donne. Merci pour ton soutien et pour tes remontrances aussi qui m'ont fait réagir et me relever quand ça n'allait pas fort. Merci à tous les copains de la musique que j'ai eu le plaisir de retrouver quasiment tous les week-ends : **Maïté, Elodie et Elodie, William, Valentin, Romuald, Romain et Alexandre.**

J'ai d'ailleurs une pensée toute particulière pour tous les membres de **l'Harmonie Municipale de Houdain** avec qui je partage mes samedis depuis que j'ai 8 ans. Merci de m'avoir fait confiance et m'avoir laissé vous diriger pendant toutes ces années. Les répétitions sont la bouffée d'oxygène qui m'a empêché d'étouffer pendant mes années de thèse. J'ai apprécié chacune d'entre elles, même si j'ai l'air de m'énerver parfois, et je suis très fière de constater les énormes progrès que nous avons fait tous ensemble. Merci à **Bruno** pour toute son aide et ses conseils de direction, et je souhaite bon courage aux deux nouveaux chefs **Thierry et Romain**. Et enfin merci à tous les musiciens pour votre bonne humeur et l'ambiance familiale que vous créez chaque semaine.

Merci à la société **Echo** de m'avoir intégrée dans vos rangs. Même s'il est parfois difficile de se lever un dimanche matin c'est toujours un plaisir de jouer en votre compagnie.

Je souhaite remercier ma **Tata Catherine** pour tout le temps passé sur la correction de mon manuscrit. Merci de t'être accrochée malgré la difficulté du *challenge*.

Mes derniers remerciements, et non des moindres, sont destinés à l'ensemble de ma famille. Tout d'abord **mes parents** qui ont toujours été derrière moi et m'ont poussé à faire de mon mieux. Merci pour tout ce que vous m'avez apporté, tout ce que vous m'avez appris et merci d'être toujours présents pour moi. Vous êtes les meilleurs parents du Monde, je ne pouvais pas espérer mieux. Merci aussi à l'ensemble de ma fratrie, **Lucille, Ange et Lila** sans qui ma vie aurait été bien ennuyeuse et pour qui j'ai toujours envie de donner le meilleur de moi-même. Merci à l'ensemble des familles **Leturcq et Leturgie**, pour votre soutien et votre bonne humeur et de m'avoir permis de grandir dans un environnement aussi agréable et de me créer de merveilleux souvenirs.





*Avant-propos*



Cette thèse de doctorat a été menée au sein de l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UGSF – UMR CNRS 8576) à Villeneuve d'Ascq dans l'équipe « O-GlcNAcylation, signalisation cellulaire et cycle cellulaire » dirigée par le **Pr Tony Lefebvre**, sous la direction du **Dr Anne-Sophie Vercoutter-Edouart**. Cette thèse a été financée par l'Université Lille 1 et a fait l'objet de publications ainsi que de communications orales et par affiche lors de congrès :

## **Publications :**

**Leturcq M.**, Mortuaire M., Hardivillé S., Schulz C., Lefebvre T., Vercoutter-Edouart AS. (2018) O-GlcNAc transferase associates with the MCM2-7 complex and its silencing destabilizes MCM-MCM interactions. *Cell. Mol. Life Sci.* doi:10.1007/s00018-018-2874-0.

**Leturcq M.**, Lefebvre T, Vercoutter-Edouart AS. (2017) O-GlcNAcylation and chromatin remodeling in Mammals : An up-to date overview. *Biochem. Soc Trans.* :45(2): 323-38

Vercoutter-Edouart AS, Yazidi-Belkoura IE, Guinez C, Baldini S, **Leturcq M**, Mortuaire M, Mir AM, Steenackers A, Dehennaut V, Pierce A, Lefebvre T (2015) Detection and identification of O-GlcNAcylated proteins by proteomic approaches. *Proteomics.* ;15(5-6):1039-50

## **Congrès et journées scientifiques suivies**

- 14<sup>ème</sup> Journée André Verbert (JAV), 11 septembre 2014. Lille, France.
- 11<sup>ème</sup> Colloque des « 3R » Persqu'île de Giens, mai 2015
- 14th International Congress on Amino Acids, peptides and proteins. Vienne, Août 2015.
- 15<sup>ème</sup> Journée André Verbert (JAV), 14 septembre 2015. Lille, France.
- Cancer, individu et société le 13 mai 2016, Lille, France.
- GFG2016, Aussois, mai 2016.
- Protein O-GlcNAcylation in Health and Disease. Londres, Juillet 2016.
- 16<sup>ème</sup> Journée André Verbert (JAV), 5 septembre 2016. Lille, France.
- Congrès « Chromatin, Replication and chromosomal stability 2016 » à Copenhague du 19 au 21 octobre 2016.



## Communications orales :

- **Maïté LETURCQ** « O-GlcNAc Transférase : un nouveau régulateur de la réplication » Séminaire de l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle de Lille, 29 mai 2015.

- **Maïté LETURCQ**, Marlène MORTUAIRE, Tony LEFEBVRE and Anne-Sophie VERCOUTTER-EDOUART « O-GlcNAcylation: A new regulatory mechanism of the pre-replicative complex » 14th International Congress on Amino Acids, peptides and proteins. Vienne, Autriche, du 3 au 7 Août 2015.

## Communications par poster :

- **Maïté LETURCQ**, Marlène Mortuaire, Tony Lefebvre et Anne-Sophie Vercoutter-Edouart « La O-GlcNAcylation : une nouvelle modification post-traductionnelle régulant le complexe MCM2-7 ? » 11<sup>ème</sup> Colloque des « 3R » Persqu'île de Giens, France, du 4 au 7 mai 2015

- **Maïté LETURCQ**, Marlène Mortuaire, Tony Lefebvre et Anne-Sophie Vercoutter-Edouart « The MCM2-7 helicase complex is glycosylated by O-GlcNAc Transferase. Towards a new role in the regulation of DNA replication » GFG2016, du 23 au 27 mai 2016 à Aussois.

- Vercoutter-Edouart AS, Massinon O, Mortuaire M, **Leturcq M**, Lefebvre T, Vincent S. Synthesis of glycosides restrained in a 1,4B boat conformation. Impact on the *in vitro* activity of the beta-N-acetylhexosaminidase C (O-GlcNAcase) and the intracellular O-GlcNAcylation levels in human cell lines. *Groupe Français des Glycosciences*, Mai 2016, Aussois, France

- **Maïté LETURCQ**, Marlène Mortuaire, Tony Lefebvre et Anne-Sophie Vercoutter-Edouart "The MCM2-7 helicase complex is glycosylated by O-GlcNAc Transferase. Towards a new role of OGT in the regulation of DNA replication." Protein O-GlcNAcylation in Health and Disease, le 8 juillet 2016 à Londres.

- **Maïté LETURCQ**, Marlène Mortuaire, Tony Lefebvre et Anne-Sophie Vercoutter-Edouart « The MCM2-7 helicase complex is glycosylated by O-GlcNAc Transferase. Towards a new role in the regulation of DNA replication » 16ème Journée André Verbert, 5 septembre 2016, Lille, France.

- **Maïté LETURCQ**, Marlène Mortuaire, Tony Lefebvre et Anne-Sophie Vercoutter-Edouart « The human MCM2-7 helicase complex is modified by O-GlcNAc highlighting a potential role of O-GlcNAcylation in the initiation of DNA replication ». Congrès « Chromatin, Replication and chromosomal stability 2016 » à Copenhague du 19 au 21 octobre 2016



# *Résumé/Abstract*





La réplication de l'ADN est un processus extrêmement régulé permettant à une cellule de dupliquer fidèlement son matériel génétique au cours de la phase S du cycle cellulaire. Un des acteurs essentiels de l'initiation de la réplication de l'ADN est le complexe Minichromosome Maintenance MCM2-7. Ce complexe est composé de 6 protéines MCM distinctes (MCM2 à MCM7) organisées de manière précise en hétérohexamères qui sont recrutés aux origines de réplication dès le début de la phase G1. Le complexe MCM2-7 possède une activité hélicase responsable de l'ouverture de la double hélice d'ADN, permettant ainsi la formation des fourches de réplication et le recrutement des ADN polymérases qui vont pouvoir alors initier la duplication du génome en phase S. Afin d'assurer une réplication unique de l'ADN par cycle cellulaire, l'arrimage à la chromatine et l'activité du complexe MCM2-7 doivent être finement contrôlés. Cette régulation est assurée notamment par des interactions avec différents partenaires protéiques qui vont moduler la localisation subcellulaire et l'activité de l'hélicase en fonction de la progression dans le cycle cellulaire, et par un ensemble de modifications post-traductionnelles dont la phosphorylation et l'ubiquitination. Des travaux de l'équipe ont identifié la *O*-GlcNAcylation comme une nouvelle modification post-traductionnelle sur quatre des six sous-unités du complexe MCM2-7. La *O*-GlcNAcylation est une glycosylation dynamique et réversible des protéines nucléocytoplasmiques et mitochondriales, gouvernée par deux enzymes uniques : la *O*-GlcNAc transférase (OGT) et la *O*-GlcNAcase (OGA). Lors de mes travaux de thèse j'ai cherché à comprendre le rôle de la *O*-GlcNAcylation sur le complexe MCM2-7 dans des lignées cellulaires humaines synchronisées dans le cycle cellulaire. J'ai démontré que les six protéines MCM sont *O*-GlcNAcylées et que cette modification n'intervient que sur la fraction des MCM liées à la chromatine. De plus, mes travaux montrent l'existence d'une interaction stable entre l'OGT et certaines sous-unités du complexe MCM2-7. Bien que la dérégulation de la dynamique de *O*-GlcNAcylation ne perturbe pas le niveau protéique global des MCM, l'extinction de l'expression de l'OGT par siRNA dans les cellules MCF7 diminue la fixation à la chromatine des MCM2, MCM6 et MCM7. Enfin, la perturbation de la dynamique *O*-GlcNAc induite par l'extinction de l'OGT ou de l'OGA déstabilise les interactions entre les sous-unités MCM2/6, MCM4/7 et MCM4/6. L'ensemble de mes travaux de thèse montre donc que l'OGT est un nouveau partenaire du complexe MCM2-7 dans les cellules somatiques humaines, et suggère que l'homéostasie de *O*-GlcNAcylation pourrait réguler le maintien et la stabilisation du complexe MCM2-7 à la chromatine au cours de la réplication de l'ADN.



DNA replication is a highly regulated process to ensure the faithful duplication of the entire genome of the cell during the S phase of the cell cycle. The Minichromosome Maintenance MCM2-7 complex is one of the major players for regulating the initiation step of DNA replication. MCM2-7 contains six distinct and evolutionarily conserved subunits (MCM2 to MCM7) which bind together in a defined order to form a heterohexameric complex. The MCM2-7 complex is progressively loaded onto chromatin to licence origins of replication during G1 phase, and forms the core of the replicative helicase necessary to fuel the unwinding of double-stranded DNA at the replication fork, allowing the loading of the DNA polymerases and ultimately, the initiation of DNA synthesis. The MCM2-7 helicase must be tightly regulated to ensure that DNA is replicated once and only once per cell cycle. This occurs mainly through interactions with specific protein partners which timely regulate the subcellular localization and activity of MCM2-7, and also by post-translational modifications including phosphorylation and ubiquitination. In our team, *O*-GlcNAcylation has previously been identified as a new post-translational modification of several MCM2-7 subunits. *O*-GlcNAcylation is a dynamic and reversible glycosylation of nucleocytoplasmic and mitochondrial proteins, and is governed by two unique enzymes, *O*-GlcNAc transferase (OGT) and *O*-GlcNAcase (OGA). The aim of my thesis was to decipher the role of *O*-GlcNAcylation on the MCM2-7 complex in human cells. First, I show that each MCM subunit is *O*-GlcNAcylated mainly in the chromatin-bound protein fraction of synchronized MCF7 cells. Moreover, my results show that OGT stably interacts with several MCM proteins. Although deregulation in *O*-GlcNAc dynamics has no effect on the steady-state levels of MCM proteins, OGT down-regulation induces a decrease in the chromatin loading of MCM2, MCM6 and MCM7 subunits. Finally, I show that perturbation of *O*-GlcNAc cycling by OGT- or OGA- targeted siRNA delivery in MCF7 cells destabilizes interactions between MCM2/6, MCM4/7 and MCM4/6 subunits. To conclude, my results show that OGT is a new partner of the MCM2-7 replicative helicase complex in human cells, and suggest that *O*-GlcNAc homeostasis might be essential to ensure the maintenance of the MCM2-7 complex onto chromatin during DNA replication.



# *Abréviations*



# Liste des abréviations

5hmC : 5-hydroxyméthylcytosine

5mC : 5-méthylcytosine

## A

AAA+ : ATPases associées à diverses activités cellulaires

AAL-2 : Agrocysteine aegerita lectin 2

Acétyl-5S-GlcNAc : (Ac)<sub>4</sub>-5S-GlcNAc ; 2-acétamido-1, 3, 4, 6-tetra-O-acétyl-2-déoxy-5-thio- $\alpha$ -D-glucopyranose

AMPK : AMP-activated protein kinase

ARNpol II : ARN polymérase II

ARS : Autonomously replicating sequence

AURKA/B : kinase Aurora A/B

Azasérine : O-(2-diazoacétyl)-L-sérine

## B

BEMAD :  $\beta$ -elimination Michael addition with dithiothreitol

## C

CABIN1 : Calcineurin-binding protein 1

CAD : Collision activated dissociation

CAK : CDK Activating Kinase

CCR : Cancer colorectal

Cdc6 : Cell division control

Cdt1 : Cdc10-dependent transcript 1

CENPA : protéine du centromère A

CDI/II : Catalytic Domain I/II

CDK : Cyclin Dependent Kinase

Chk1 : Checkpoint kinase 1

CID : Collision Induced Dissociation

CKI : Cyclin Dependent Kinase Inhibitor

CMG : Cdc45-MCM2-7-GINS

CRL : Cullin-RING ubiquitine ligases

CRM1 : Chromosome region maintenance 1

CTD : COOH-terminal domain

## D

DAPI : 4'6'-diamidino-2-phenylindole

Dbf4 : Dumbbell former 4

D-box : Destruction box

DDK : Dbf4 dependent kinase

DNMT : ADN méthyltransférase

dNTP : déoxynucléotides triphosphates

DON : 6-diazo-5-oxonorleucine

DTT : Dithiothreitol

## E

ECD : Electron Capture Dissociation

EGF: Epidermal growth factor-like

EOGT: EGF domain specific OGT

ETD : Electron Transfert Dissociation

EZH2 : enhancer of zeste 2

## F

F-6-P : Fructose-6-P

FACS : Fluorescence activating cell sorting

FBP : fructose 1,6-bisphosphate

FEN1 : Flap endonuclease 1

## **G**

G-6-P : Glucose-6-Phosphate

GalT :  $\beta$ -1,4-galactosyltransférase

GCK : Glucokinase ou hexokinase IV

GFAT : Glutamine fructose-6-phosphate amidotransférase

GIP : Glucose-6-phosphate isomérase

GK : Glucokinase

Glc : Glucose

GlcN-6-P : Glucosamine-6-phosphate

GlcNAc : N-Acétylglucosamine

GlcNAc-6-P : N-Acétyl-Glucosamine-6-Phosphate

GNK : GlcNAc kinase

GNPNAT : GlcNH<sub>2</sub>-6-phosphate N-acétyltransférase

Goblin : OGT bisubstrate-linked inhibitor

GSK3 $\beta$  : Glycogen synthase kinase 3 $\beta$

## **H**

HBP : Hexosamine Biosynthesis Pathway

HCD : Higher energy c-trap dissociation

HCF-1 : Host Cell Factor 1

HDAC : Histone-désacétylase

HIF : Hypoxia-induced factor

HIRA : Histone cell cycle regulator

HMT : Histoneméthyltransférase

HU : Hydroxyurée

## **I**

INCENP : Inner centromere protein

Int-D : Intervening domain

IP: Iodure de Propidium

## **K**

KAP : Kinase-activated phosphatases

KPC: Kip1 ubiquitination-promoting complex

## **L**

L-OGA: Long OGA

## **M**

MAPK : Mitogen-activated protein kinase

MCM : Minichromosome Maintenance protein

MCM-BP: MCM-binding protein

MEC : Matrice extracellulaire

MEFs : Mouse embryonic fibroblasts

MGEA5 : Meningioma expressed antigen 5

MLL5 : Mixed lineage leukemia 5

MMP : Matrix metalloproteinase

mOGT : Mitochondrial OGT

MTS : Mitochondrial Targeting Sequence

MYPT1 : Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A

Myt1: membrane associated tyrosine and threonine-specific cdc2 inhibitory kinase

## **N**

NatB : N-terminale acétyltransférase B

ncOGT : nucleocytoplasmic OGT

NEBD : Nuclear enveloppe breakdown

NES : Nuclear export sequence

NF-H : Neurofilament H



NLS : Nuclear Localization Sequence

NPC : Nuclear pore complex

Nup62 : Nuclear pore protein 62

## **O**

OGA : O-GlcNAc hydrolase

OGT : O-GlcNAc transférase

ORC : Origin Recognition Complex

Ori : Origine de réplication

## **P**

PcG : Polycomb group

PEG : Polyéthylène glycol

PEP : Phosphoénolpyruvate

PFK : Phosphofructokinase

PI<sub>3</sub>K : Phosphatidylinositol-3-OH kinase

PIP<sub>2</sub> : Phosphatidylinositol 4,5 biphosphate

PIP<sub>3</sub> : Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate

PK : pyruvate kinase

Plk1 : Polo-like kinase 1

PMA1 : Plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase

Pnc1 : Pyrimidine nucleotide carrier 1

PNGase F : Peptide N-glycosidase F

PP1 : protéine phosphatase 1

PPO : PIP Binding activity

PPP1C : Complexe phosphatase 1C

PRC : Polycomb repressive complex

pré-RC : Complexe de pré-réplication

PUGNAc : O-(2-acetamido-2-deoxy-glucopyranosylidène)-amino-N-phenylcarbamate

PVL : Psathyrella Velutina lectin

## **R**

RB : protéine du rétinoblastome

RCPG : Récepteur couplé aux protéines G

RPA : Replication Protein A

RTK : Récepteur à tyrosine kinase

## **S**

SAC : spindle assembly checkpoint

SAM : S-Adénosylméthionine

SEC : Secret agent

SNP : Single nucleotide polymorphism

S-OGA: Short OGA

sOGT : short OGT

Sp : specificity protein

SPY: Spindly

SRE : Serum response element

SRF : Serum response factor

STZ : streptozotocine

## **T**

TET : Ten eleven translocation

TFIIH : Facteur d'initiation de la transcription IIH

TPR : Tetratricopeptide repeat

## **U**

UAP : UDP-GlcNAc pyrophosphorylase

UBN1 : Ubinuclein 1

UDP-GlcNAc : Uridine-5'diphospho-N-Acétyleglucosamine

## **W**

Wee1 : Wee1-like protein kinase

WGA : Wheat germ agglutinin

*Tables des figures et  
tableaux*



<b>Figure 1: La O-GlcNAcylation est une modification post-traductionnelle dynamique et réversible gouvernée par deux enzymes uniques .....</b>	<b>2</b>
<b>Figure 2: Le dialogue O-GlcNAcylation/phosphorylation.....</b>	<b>8</b>
<b>Figure 3: La O-GlcNAcylation est une modification post-traductionnelle dynamique dépendante de la voie de biosynthèse des hexosamines .....</b>	<b>10</b>
<b>Figure 4: Du gène à la protéine. Représentation schématique des trois isoformes et des modifications post-traductionnelles de l'OGT .....</b>	<b>12</b>
<b>Figure 5: Mécanisme catalytique de l'OGT pour le transfert de la N-Acetylglucosamine sur les protéines à partir de l'UDP-GlcNAc .....</b>	<b>24</b>
<b>Figure 6: Le clivage protéolytique de HCF-1 par l'OGT .....</b>	<b>28</b>
<b>Figure 7: Régulation de l'activité de l'OGT par tyrosine phosphorylation induite par l'insuline .....</b>	<b>34</b>
<b>Figure 8: La O-GlcNAcylation de l'OGT régule son import nucléaire.....</b>	<b>38</b>
<b>Figure 9: Schéma de la voie de dégradation protéasomale dépendante de l'ubiquitine..</b>	<b>42</b>
<b>Figure 10: L'OGA : Du gène à la protéine. Représentation schématique des deux isoformes de l'OGA.....</b>	<b>48</b>
<b>Figure 11: Schéma du mécanisme d'hydrolyse du résidu O-GlcNAcylé par l'OGA.....</b>	<b>52</b>
<b>Figure 12: Quelques analogues de la glutamine modulant la voie de biosynthèse des hexosamines .....</b>	<b>56</b>
<b>Figure 13: Représentation de quelques inhibiteurs de l'OGT .....</b>	<b>58</b>
<b>Figure 14: Quelques inhibiteurs de l'OGA.....</b>	<b>60</b>
<b>Figure 15: La régulation directe de l'activité du protéasome par la O-GlcNAcylation ..</b>	<b>84</b>
<b>Figure 16: Quelques exemples de régulation de la dégradation protéasomale par compétition entre phosphorylation et O-GlcNAcylation .....</b>	<b>92</b>

<b>Figure 17: La O-GlcNAcylation co-traductionnelle .....</b>	<b>98</b>
<b>Figure 18: Régulation de l'ARN polymérase II par un dialogue phosphorylation/O-GlcNAcylation sur son domaine CTD .....</b>	<b>100</b>
<b>Figure 19: Représentation schématique de la régulation de la localisation subcellulaire de la <math>\beta</math>-caténine par O-GlcNAcylation.....</b>	<b>102</b>
<b>Figure 20: Le cycle cellulaire et ses différents points de contrôle.....</b>	<b>120</b>
<b>Figure 21: Quelques exemples de méthodes de synchronisation cellulaire.....</b>	<b>124</b>
<b>Figure 22: Représentation schématique des variations des niveaux de O-GlcNAcylation au cours du cycle cellulaire.....</b>	<b>124</b>
<b>Figure 23: Représentation schématique de la famille des cyclines et de leur accumulation pendant le cycle cellulaire chez les mammifères .....</b>	<b>136</b>
<b>Figure 24: Les différents complexes cycline/CDK au cours du cycle cellulaire et leurs inhibiteurs .....</b>	<b>140</b>
<b>Figure 25: Les cycles de phosphorylation régulant les CDKs .....</b>	<b>142</b>
<b>Figure 26: Schéma des voies de signalisation régulant la phase G1 .....</b>	<b>146</b>
<b>Figure 27: Modulation de l'interaction pRB/E2F1 par les complexes cycline/CDK et la O-GlcNAcylation lors de la phase G1 .....</b>	<b>150</b>
<b>Figure 28: Représentation simplifiée des 5 sous-phases de la mitose .....</b>	<b>154</b>
<b>Figure 29: Métabolisme du glucose par les voies de la glycolyse et de biosynthèse des hexosamines .....</b>	<b>168</b>
<b>Figure 30: Une hyper-O-GlcNAcylation est retrouvée dans différents types de cancer</b>	<b>172</b>
<b>Figure 31: Implication de l'hyper-O-GlcNAcylation dans des voies métaboliques soutenant la croissance des cellules cancéreuses .....</b>	<b>178</b>
<b>Figure 32: Implications de l'hyper-O-GlcNAcylation dans les cellules cancéreuses. ....</b>	<b>178</b>

<b>Figure 33: La formation du complexe de pré-réplication au niveau des origines</b> .....	198
<b>Figure 34: Alignement des protéines MCM2 à MCM7 humaines</b> .....	204
<b>Figure 35: L'assemblage du complexe MCM2-7 son ouverture</b> .....	208
<b>Figure 36: Modèle proposé de recrutement du double hexamère MCM2-7 avec un seul ORC</b> .....	224
<b>Figure 37: Formation du complexe CMG, d'après des études chez la levure</b> .....	230
<b>Figure 38: Ouverture de la double hélice d'ADN pour former les fourches de réplication</b> .....	232
<b>Figure 39: Chaque sous-unité du complexe MCM2-7 est O-GlcNAcylée.</b> .....	264
<b>Figure 40: Les MCM O-GlcNAcylées sont localisées sur la chromatine dans les cellules MCF7</b> .....	268
<b>Figure 41: Les MCM O-GlcNAcylées sont localisées sur la chromatine dans les cellules MDA-MB-231</b> .....	270
<b>Figure 42: Les six protéines MCM sont O-GlcNAcylées dans les cellules MCF7</b> .....	272
<b>Figure 43: Evaluation de la stœchiométrie de O-GlcNAcylation des MCM</b> .....	274
<b>Figure 44: L'OGT interagit préférentiellement avec certaines sous-unités MCM dans les cellules HEK293T transfectées avec l'OGT-HA</b> .....	276
<b>Figure 45: Mise au point de la visualisation in cellulo des interactions OGT-MCM</b> .....	278
<b>Figure 46: Visualisation in cellulo des interactions OGT-MCM</b> .....	282
<b>Figure 47: Expression et purification des différentes protéines recombinantes GST-OGT</b> .....	284
<b>Figure 48: Etude des interactions OGT-MCM par GST-Pull down</b> .....	286
<b>Figure 49: Etude de l'expression des MCM avec la dérégulation de la dynamique de O-GlcNAcylation</b> .....	288

<b>Figure 50: Etude de la localisation des MCM avec la dérégulation de la dynamique de O-GlcNAcylation.....</b>	<b>290</b>
<b>Figure 51: L’extinction de l’OGT par siRNA entraîne une déstabilisation des interactions MCM-MCM dans les cellules MCF7 synchronisées en phase S.....</b>	<b>294</b>
<b>Figure 52: L’extinction de l’OGT par siRNA entraîne une déstabilisation des interactions MCM-MCM dans les cellules MCF7 synchronisées en phase S.....</b>	<b>297</b>
<b>Figure 53: L’extinction de l’OGA par siRNA entraîne une déstabilisation des interactions MCM-MCM dans les cellules MCF7 synchronisées en phase S.....</b>	<b>299</b>
<b>Figure 54: L’inhibition de l’OGT ne modifie significativement les interactions MCM-MCM. ....</b>	<b>301</b>
<b>Figure 55: Visualisation des interactions MCM-MCM par PLA après traitements des cellules par les inhibiteurs de la dynamique de O-GlcNAcylation.....</b>	<b>302</b>
<b>Figure 56: Test de synchronisation en phase S par différentes méthodes chimiques. ...</b>	<b>304</b>
<b>Figure 57: L’inhibition des enzymes de la O-GlcNAc n’affecte pas la synthèse de l’ADN des cellules MCF7.....</b>	<b>309</b>
<b>Figure 58: Les siOGT et siOGA n’affectent pas la synthèse de l’ADN des cellules MCF7.....</b>	<b>311</b>
<b>Figure 59: Effet de la dérégulation de la dynamique O-GlcNAc sur la croissance des cellules MCF7.....</b>	<b>312</b>
<b>Figure 60: Le siOGT augmente la quantité de cellules MCF7 en phase S à 18h.....</b>	<b>313</b>
<b>Figure 61: L’inhibition des enzymes de la O-GlcNAc n’affecte pas la synthèse de l’ADN des cellules MDA-MB-231.....</b>	<b>315</b>
<b>Figure 62: Les siOGT affectent la synthèse de l’ADN des cellules MDA-MB-231.....</b>	<b>317</b>
<b>Figure 63: L’extinction de l’OGT par ARN interférence diminue la synthèse de l’ADN des cellules MDA-MB-231.....</b>	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>



<b>Figure 64: Effet de la dérégulation de la dynamique O-GlcNAc sur la croissance des cellules MDA-MB-231 .....</b>	<b>318</b>
<b>Figure 65: Mises au point de l'approche de Click-EdU sur les cellules non cancéreuses MCF10A.....</b>	<b>320</b>
<b>Figure 66: La dérégulation de la dynamique O-GlcNAc n'affecte pas la synthèse d'ADN des cellules non-cancéreuses MCF10A.....</b>	<b>322</b>
<b>Figure 67: L'utilisation du Thiamet G perturbe le profil de migration isoélectrophorétique de certaines MCM.....</b>	<b>326</b>
<b>Figure 68: Effet du thiamet G sur le profil de migration isoélectrophorétique des MCM dans des cellules MCF7 synchronisées à la thymidine.....</b>	<b>328</b>
<b>Figure 69: Effet des siRNA (OGT/OGA) sur le profil de migration isoélectrophorétique des MCM dans les cellules MCF7 asynchrones.....</b>	<b>329</b>
<b>Figure 70: Test à la <math>\gamma</math>-phosphatase.....</b>	<b>330</b>
<b>Figure 71: Etude de 3 phosphosites de MCM2 dans les cellules MCF10A synchronisées .....</b>	<b>332</b>
<b>Figure 72: Etude de phosphosites de MCM2 dans les cellules MCF7 synchronisées ....</b>	<b>334</b>
<b>Figure 73: Etude de phosphosites de MCM2 dans les cellules MDA-MB-231 synchronisées .....</b>	<b>335</b>
<b>Tableau 1: Dilution des anticorps pour les différentes manipulations .....</b>	<b>259</b>



# *Table des matières*



# Table des matières

Remerciements

Avant-propos

Résumé/Abstract

Abréviations

Tables des figures et tableaux

Introduction .....	1
Partie 1 : La <i>O</i> -GlcNAcylation .....	1
I/ Rappel historique et généralités .....	1
II/ La <i>O</i> -GlcNAc transférase ou OGT .....	9
1°) Les trois isoformes de l'OGT.....	11
2°) La voie de biosynthèse des hexosamines, un carrefour métabolique .....	19
3°) L'OGT, un senseur nutritionnel.....	21
4°) L'activité catalytique de l'OGT .....	25
a- Le mécanisme catalytique .....	25
b- L'activité protéolytique de l'OGT.....	27
5°) La régulation de l'activité de l'OGT.....	29
a- Régulation par des interactions OGT-protéine.....	29
b- L'OGT est la cible de modifications post-traductionnelles.....	35
III/ La <i>O</i> -GlcNAc hydrolase ou OGA .....	45
1°) Les deux isoformes de l'OGA .....	49
2°) L'activité catalytique de l'OGA.....	53
IV/ Les outils d'étude de la <i>O</i> -GlcNAcylation.....	55
1°) Les inhibiteurs chimiques .....	55
a- Inhibition de la voie HBP .....	55
b- Inhibition de l'OGT .....	57
c- Inhibition de l'OGA.....	61
d- Impact des inhibiteurs sur l'expression des enzymes.....	65
2°) Détection et enrichissement des protéines <i>O</i> -GlcNAcylées .....	67
a- Reconnaissance des motifs <i>O</i> -GlcNAc par des lectines .....	67
b- Les anticorps anti- <i>O</i> -GlcNAc.....	69

c-	Les méthodes basées sur le marquage enzymatique.....	71
3°)	La spectrométrie de masse .....	75
V/	Les processus cellulaires régulés par la O-GlcNAcylation .....	79
1°)	Le développement embryonnaire.....	79
2°)	La dégradation protéasomale .....	83
a-	Implications de la O-GlcNAcylation dans la régulation du protéasome .....	83
b-	Généralités sur le dialogue phosphorylation/O-GlcNAcylation.....	87
c-	La régulation de la polyubiquitination.....	91
d-	La O-GlcNAcylation co-translationnelle .....	95
3°)	La transcription .....	99
a-	Implication de la O-GlcNAcylation dans la régulation de l'ARN polymérase II .....	99
b-	Quelques facteurs de transcription régulés par la O-GlcNAcylation .....	101
4°)	La régulation épigénétique.....	105
a-	La O-GlcNAcylation et le code histone .....	105
b-	La O-GlcNAcylation de la chaperone HIRA .....	111
d-	Interaction de l'OGT avec les protéines du groupe Polycomb.....	115
<b>Partie 2 : Les implications de la O-GlcNAcylation dans le cycle cellulaire .....</b>		<b>119</b>
I/	Généralités sur le cycle cellulaire .....	119
II/	Les variations de la O-GlcNAcylation au cours du cycle cellulaire.....	123
1°)	Quelques exemples de méthodes de synchronisation .....	123
2°)	Evolution de la O-GlcNAcylation en fonction du cycle cellulaire .....	129
3°)	La dérégulation de la dynamique de O-GlcNAcylation affecte la progression du cycle cellulaire.....	131
III/	Le dialogue entre la dynamique O-GlcNAc et les complexes cycline/CDK.....	137
1°)	Les complexes cycline/CDK régulent la progression du cycle.....	137
2°)	Implications de la O-GlcNAcylation dans la régulation des complexes cycline/CDK .....	145
IV/	La O-GlcNAcylation et la régulation de la transition G1/S .....	149
1°)	La transcription dépendante de la voie RB/E2F .....	149
2°)	La régulation de pRB par la O-GlcNAcylation .....	151
V/	La O-GlcNAcylation et la mitose.....	155

1°) Le déroulement de la mitose .....	155
2°) Impact de la dynamique de O-GlcNAcylation au cours de la mitose .....	157
a- La régulation de la kinase Aurora A par la O-GlcNAcylation .....	159
b- Formation d'un complexe entre l'OGT et la kinase Aurora B .....	161
c- Implication de la O-GlcNAcylation dans la condensation des chromosomes en mitose .....	163
<b>Partie 3: Dérégulation de la dynamique de O-GlcNAcylation et cancer .....</b>	<b>169</b>
I/ Quelques généralités sur le cancer .....	169
II/ La O-GlcNAcylation aberrante des cellules cancéreuses .....	171
III/ La O-GlcNAcylation et le shift métabolique .....	175
1°) La régulation des transporteurs de glucose GLUT .....	175
2°) Régulation du flux de la voie de la glycolyse par O-GlcNAcylation .....	177
IV/ L'hyper-O-GlcNAcylation favorise la prolifération et la survie cellulaire. ....	183
1°) Activation de proto-oncogènes. ....	183
2°) Inactivation de suppresseurs de tumeurs .....	187
V/ Régulation de l'invasion et de la métastase <i>via</i> FoxM1 .....	191
<b>Partie 4 : La réplication de l'ADN eucaryote .....</b>	<b>195</b>
A/ L'initiation de la Réplication.....	197
I/ La reconnaissance des origines de réplication .....	197
II/ La famille des protéines <i>Minichromosome Maintenance</i> .....	203
1°) Description des MCM eucaryotes .....	203
2°) L'assemblage du complexe MCM2-7 .....	207
3°) Régulation des MCM par les modifications post-traductionnelles .....	213
a- Régulation de l'activité par des kinases .....	213
b- L'acétylation des MCMs .....	217
c- L'ubiquitination de MCM7 .....	219
d- La sumoylation des protéines MCM .....	221
III/ Le recrutement de l'hélicase pour former le pré-RC .....	223
IV/ L'activation de l'hélicase.....	229
1°) La formation du pré-IC .....	229
2°) La formation des fourches de réplication.....	231

B/ L'élongation de la réplication.....	233
C/ La terminaison de la réplication.....	237
D/ La surexpression des MCM dans le cancer .....	239
<b>Contexte scientifique des travaux de thèse.....</b>	<b>245</b>
<b>Matériels et méthodes.....</b>	<b>249</b>
<b>I/ Culture cellulaire.....</b>	<b>249</b>
1°) Entretien des lignées .....	249
2°) Synchronisation cellulaire.....	249
3°) Traitement avec les inhibiteurs et transfection .....	250
<b>II/ Lyse cellulaire.....</b>	<b>251</b>
1°) Fraction totale .....	251
2°) Fractionnement subcellulaire .....	251
3°) Dosage protéique.....	251
<b>III/ Western-Blot et Immunoprécipitation .....</b>	<b>252</b>
1°) Western-blot.....	252
2°) (Co)-Immunoprécipitation .....	252
<b>IV/ Enrichissement en protéines O-GlcNAcylées .....</b>	<b>253</b>
1°) La chromatographie d'affinité sur billes de sWGA .....	253
2°) La chimie-click .....	253
<b>V/ Visualisation des protéines O-GlcNAcylées.....</b>	<b>254</b>
1°) Marquage métabolique avec la [ <sup>3</sup> H]-Glucosamine ([ <sup>3</sup> H]-GlcNH <sub>2</sub> ) .....	254
2°) <i>PEG mass-Tag</i> .....	254
<b>VI/ Cytométrie en flux.....</b>	<b>255</b>
1°) Analyse du cycle cellulaire .....	255
2°) Analyse de la synthèse d'ADN .....	255
<b>VII/ GST-Pull-Down .....</b>	<b>256</b>
1°) Expression des protéines recombinantes.....	256
2°) GST-Pull down .....	256
<b>VIII/ Immunofluorescence et PLA (Proximity Ligation Assay)...</b>	<b>257</b>
<b>IX/ Electrophorèse bidimensionnelle (2D).....</b>	<b>258</b>



<b>Résultats</b> .....	265
<b>A/ Les protéines MCM sont O-GlcNAcylées</b> .....	265
I/ Etude de la O-GlcNAcylation des protéines du complexe MCM2-7 .....	265
1°) Identification de la O-GlcNAcylation par immunoprécipitation .....	265
2°) Marquage métabolique des protéines O-GlcNAcylées avec de la glucosamine tritiée .....	267
II/ Etude de la localisation subcellulaire des MCM O-GlcNAcylées .....	267
1°) Chromatographie d'affinité avec la lectine sWGA.....	269
2°) Enrichissement en protéines O-GlcNAcylées par chimie-click.....	271
III/ Détermination de la stœchiométrie de O-GlcNAcylation.....	275
<b>B/ L'OGT interagit spécifiquement avec certaines sous-unités du complexe MCM2-7</b> .....	277
I/ Etude des interactions OGT-MCM par co-Immunoprécipitation (co-IP)	277
II/ Visualisation des interactions <i>in cellulo</i> OGT-MCM par PLA ( <i>Proximity ligation assay</i> ) .....	279
III/ Identification des partenaires MCM de l'OGT par <i>GST-Pull down</i> .....	283
<b>C/ La dérégulation de la dynamique de O-GlcNAcylation impacte les MCM à différents niveaux</b> .....	287
I/ Etude de l'expression des protéines MCM.....	289
II/ Etude de la localisation subcellulaire des MCM .....	291
III/ Etude de l'impact de la dérégulation de la O-GlcNAcylation sur la formation du complexe MCM2-7 .....	293
IV/ Etude de l'impact des variations de O-GlcNAcylation sur la synthèse d'ADN.....	303
1°) Tests de différentes méthodes de synchronisation.....	305
2°) Analyse de la synthèse d'ADN sur des cellules synchronisées par sevrage.....	307
<b>D/ Etude du dialogue Phosphorylation/O-GlcNAcylation sur les protéines MCM</b> .....	325
<b>Conclusions et discussion</b> .....	339
<b>Bibliographie</b> .....	359



# *Introduction*



# Introduction

## Partie 1 : La O-GlcNAcylation

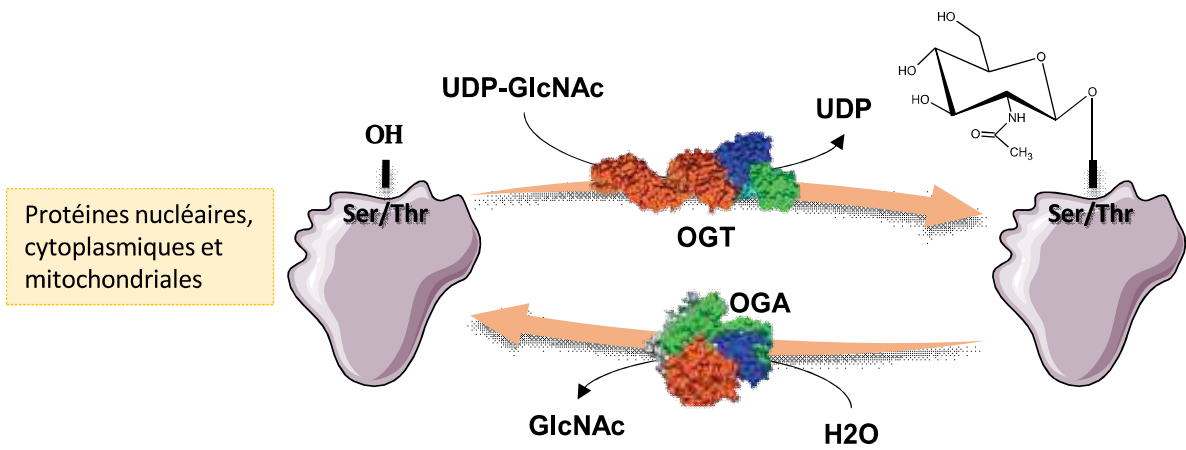
### I/ Rappel historique et généralités

La O-Linked- $\beta$ -N-acétylglucosaminylation, ou O-GlcNAcylation, est une modification post-traductionnelle (PTM ; Post-Translational Modification) particulière découverte en 1984 par Carmen-Rosa Torres et Gerald Hart alors qu'ils étudiaient la distribution des résidus N-acétylglucosamine terminaux de glycanes situés à la surface de lymphocytes murins (Torres et Hart 1984). Durant les années qui suivirent, différentes études ont conduit à la mise en évidence des caractéristiques qui font de la O-GlcNAcylation une glycosylation originale des protéines, à distinguer de la N- et la O-glycosylation.

En effet, des protéines O-GlcNAcylées ont été localisées dans le cytoplasme, le noyau et les mitochondries des cellules, contrairement aux glycoprotéines connues jusqu'alors retrouvées au niveau de la membrane plasmique ou sécrétées dans le milieu extracellulaire (Hirschberg et Snider 1987). La O-GlcNAcylation a notamment été identifiée sur des protéines de l'enveloppe nucléaire chez le rat (Holt et Hart 1986; Holt, Snow, et al. 1987; J. A. Hanover et al. 1987), sur la chromatine chez la drosophile (Kelly et Hart 1989), dans le cytoplasme des érythrocytes chez l'homme (Holt, Haltiwanger, et al. 1987) et plus récemment au niveau de la chaîne respiratoire de la mitochondrie chez le rat (Hu et al. 2009).

De plus, la O-GlcNAcylation est une modification post-traductionnelle réversible dont la dynamique est gouvernée par deux enzymes uniques identifiées dans les années 1990s (Starr et Hanover 1990). D'un côté, la O-GlcNAc transférase (OGT) catalyse le transfert d'un résidu de N-Acétylglucosamine (GlcNAc) à partir du nucléotide-sucre donneur UDP-GlcNAc sur le groupement hydroxyle des sérines et thréonines des protéines-cibles et de l'autre, la O-GlcNAc

**Figure 1: La O-GlcNAcylation est une modification post-traductionnelle dynamique et réversible gouvernée par deux enzymes uniques**



hydrolase (*O*-GlcNAcase, OGA) hydrolyse le résidu de GlcNAc (Haltiwanger, Holt, et Hart 1990; Dong et Hart 1994). Enfin, la *O*-GlcNAcylation consiste en l'ajout d'un unique monosaccharide sur les protéines-cibles par l'OGT, contrairement aux élongations et ramifications qui peuvent intervenir dans les autres types de glycosylation (Figure 1).

Récemment, des études se sont penchées sur un autre type de *O*-GlcNAcylation faisant intervenir une nouvelle OGT. Il s'agit de la *O*-GlcNAcylation extracellulaire observée dans une étude menée chez la drosophile et catalysée par la EOGT (EGF domain specific OGT) qui, comme l'OGT, est dépendante du flux de la voie de biosynthèse des hexosamines (Matsuura et al. 2008; Sakaidani et al. 2012). L'EOGT appartient à la famille des glycosyltransférases GT61 selon la classification CAZy et est localisée dans la lumière du réticulum endoplasmique. Le gène de l'EOGT qui est conservé au cours de l'évolution est situé sur le chromosome 3 (3p14.1) et l'enzyme ne présente pas d'homologie particulière avec l'OGT. L'EOGT modifie des protéines présentant un domaine EGF-like (Epidermal growth factor-like) de façon indépendante de l'OGT et qui seront par la suite sécrétées dans le milieu extracellulaire (Sakaidani, Furukawa, et Okajima 2010). Ainsi, via la *O*-GlcNAcylation de ces protéines, l'EOGT est impliquée dans les mécanismes d'interaction cellule-cellule ou cellule-matrice extracellulaire (Sakaidani et al. 2011; Müller, Jenny, et Stanley 2013). Ne faisant pas l'objet de mes travaux de thèse, la *O*-GlcNAcylation extracellulaire ne sera pas traitée dans ce manuscrit.

La *O*-GlcNAcylation intracellulaire est une modification très conservée chez les eucaryotes. En effet, elle a pu être identifiée chez de nombreux organismes dont le nématode *C. elegans* (John A. Hanover et al. 2005), quelques protistes (S. Banerjee, Robbins, et Samuelson 2009; Acosta et al. 2011), l'apicomplexe *Toxoplasma gondii* (Perez-Cervera et al. 2011), la drosophile (Kelly et Hart 1989), le xénope (Chad Slawson et al. 2002), le rat (Hu et al. 2009), les plantes (Hartweck, Scott, et Olszewski 2002) et l'homme (Holt, Haltiwanger, et al. 1987).





Chez les plantes, des protéines du complexe du pore nucléaire (NPC ; *Nuclear pore complex*) ont été identifiées comme étant *O*-GlcNAcylées. Cependant, cette modification est sensiblement différente de celle observée dans le règne animal puisqu'elle semble être constituée de l'assemblage de plusieurs résidus de N-Acétyleglucosamine (Heese-Peck et al. 1995; Heese-Peck et Raikhel 1998). Par la suite, d'autres protéines ont été identifiées comme étant *O*-GlcNAcylées chez la plante dont des facteurs de transcription et des protéines liées à l'ARN (Xiao et al. 2014; Zentella et al. 2016). De plus, l'OGT telle que nous la connaissons dans le règne animal n'est pas retrouvée chez les plantes, mais deux homologues, les protéines SEC (*Secret agent*) et SPY (*Spindly*) ont été identifiés (Hartweck, Scott, et Olszewski 2002). Ces deux protéines possèdent des fonctions différentes, intervenant dans des processus distincts au cours de la vie de la plante (Hartweck et al. 2006). SEC serait la seule à avoir une activité *O*-GlcNAc transférase. Une étude de 2017 démontre en effet que SPY est une *O*-fucosyltransférase responsable de l'attachement d'un fucose unique sur les résidus de sérine ou de thréonine de ses protéines-cibles. L'étude met aussi en évidence la possibilité d'un dialogue compétitif entre ces deux enzymes, SEC et SPY pour la régulation de leurs protéines-cibles (Zentella et al. 2017). Enfin, le caractère dynamique de la *O*-GlcNAcylation retrouvé dans le règne animal n'est pas confirmé chez la plante puisqu'aucun homologue de l'OGA n'a pu être identifié à ce jour. La *O*-GlcNAcylation chez les plantes ne faisant pas l'objet de mes travaux de thèse, je ne la détaillerai pas plus ici.

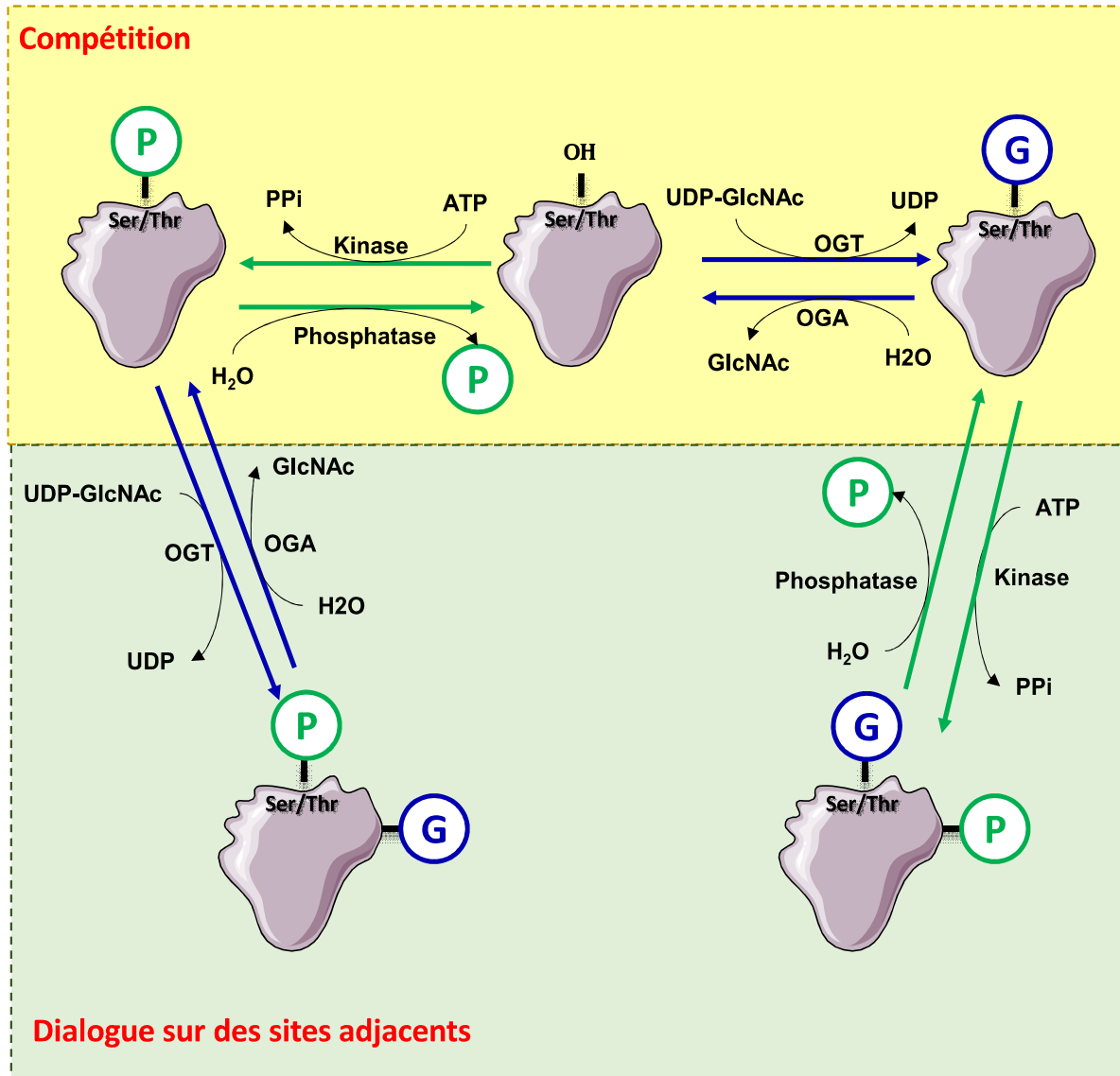
Il est intéressant de noter que la *O*-GlcNAcylation est aussi retrouvée sur des protéines virales (Benko et al. 1988; Pérez et al. 2013) et chez certaines bactéries (Schirm et al. 2004; A. Shen et al. 2006; W.-W. Shi et al. 2014; Ostrowski et al. 2015). Par contre, la levure *Saccharomyces cerevisiae* ne présente pas de protéine *O*-GlcNAcylée, ni les enzymes nécessaires pour cette modification (Kreppel, Blomberg, et Hart 1997). Une autre modification post-traductionnelle des protéines a toutefois été mise en évidence chez la levure en 2015: La



O-Mannosylation (O-Man) nucléocytoplasmique. Tout comme lors de la découverte de la O-GlcNAcylation, Halim et collaborateurs cherchaient initialement à établir le glycoprotéome O-Man de la levure en pensant ne détecter que des protéines de la voie de sécrétion. De manière inattendue, un ensemble de protéines nucléaires, cytoplasmiques et mitochondriales ont également été identifiées comme étant O-Mannosylées. Ainsi il semblerait que la O-Man chez la levure soit l'équivalent de la O-GlcNAcylation chez les eucaryotes supérieurs. Cette hypothèse est renforcée par l'identification d'un site de O-Mannosylation sur la protéine PMA1 (Plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase) au niveau de la thréonine 558 qui est un résidu conservé dans la région de liaison à l'ATP et qui est retrouvé O-GlcNAcylé chez les mammifères (Trinidad et al. 2012). A ce jour, la O-mannosylation nucléocytoplasmique est une MPT spécifique de la levure qui pourrait participer à la régulation de ses protéines-cibles d'une manière similaire à la O-GlcNAcylation (Halim et al. 2015).

Jusqu'à présent, environ 4 000 protéines ont été identifiées comme étant O-GlcNAcylées, et ce nombre ne cesse de croître grâce à l'apparition de méthodes d'enrichissement et de détection de plus en plus spécifiques et sensibles (Alfaro et al. 2012; B. Shen et al. 2017). La O-GlcNAcylation peut moduler plusieurs caractéristiques des protéines-cibles dont la conformation, la stabilité, la localisation cellulaire, l'activité catalytique et les interactions protéine-protéine. Elle peut ainsi réguler une grande variété de processus cellulaires dont la transcription (Sodi et al. 2017), la traduction (Zeidan et al. 2010), le rythme circadien (M.-D. Li et al. 2013), la dégradation protéasomale (C. N. Keembiyehetty et al. 2011a) et le cycle cellulaire (Lanza et al. 2016). Par conséquent, la perte de l'homéostasie de O-GlcNAcylation est associée à différentes pathologies dont les maladies cardiovasculaires (Ramirez-Correa et al. 2015) et neurodégénératives (Yuzwa et al. 2012; Hastings et al. 2017), le diabète (Akimoto et al. 2000) et de nombreux types de cancers (Y. Shi et al. 2010; Yuchao Gu et al. 2014).

Figure 2: Le dialogue O-GlcNAcylation/phosphorylation



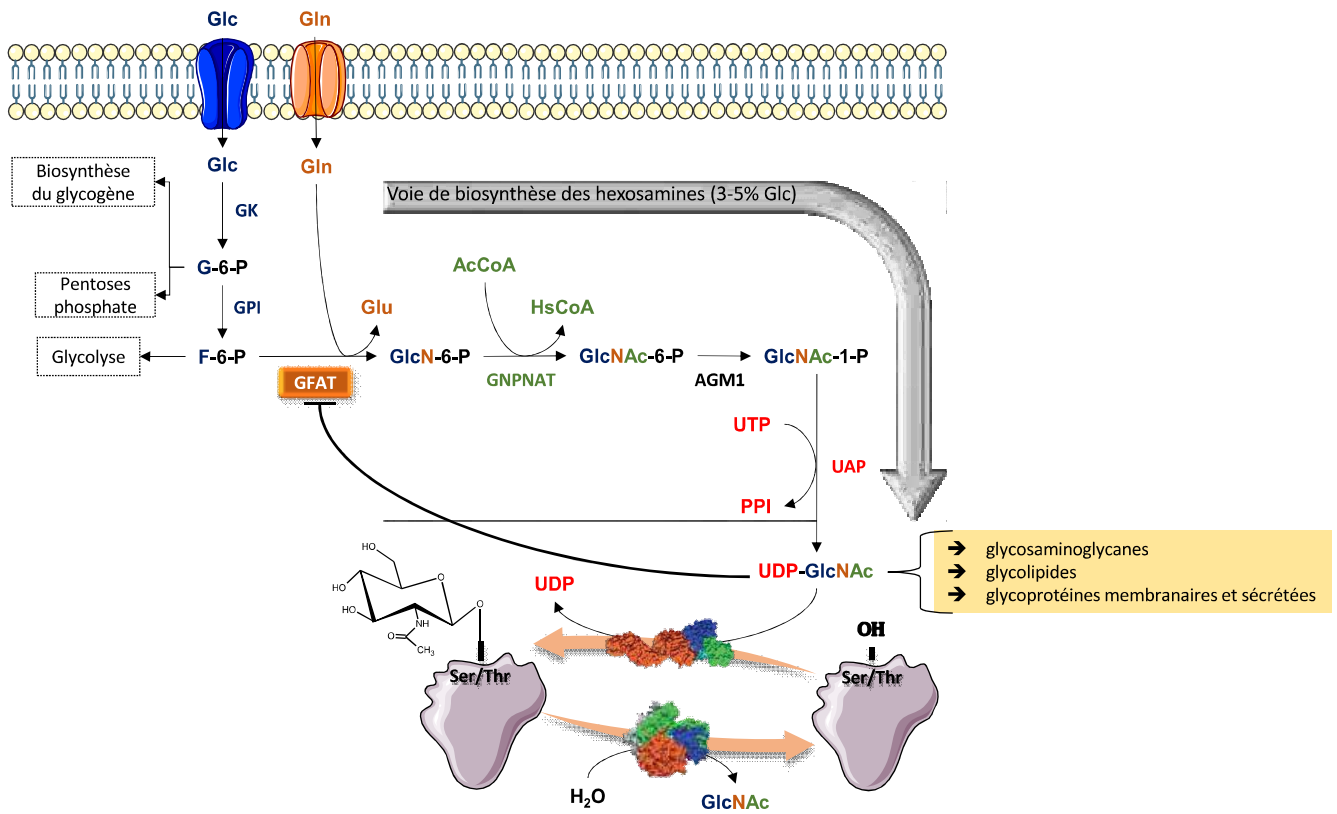
La O-GlcNAcylation et la phosphorylation sont toutes deux des modifications post-traductionnelles dynamiques intervenant sur les mêmes résidus de protéines nucléocytoplasmiques. De par leurs similitudes, ces deux modifications peuvent dialoguer pour réguler certaines protéines par des mécanismes de compétition ou de coopération sur un même site, ou sur des sites adjacents (J. Shi et al. 2017) (Figure 2). Mais, au-delà de ce dialogue avec la phosphorylation, la O-GlcNAcylation peut interagir avec d'autres modifications comme la méthylation, l'acétylation ou l'ubiquitination afin de réguler finement l'activité de certaines protéines (C.-S. Chu et al. 2014). Tous ces points seront détaillés dans les paragraphes suivants.

## II/ La O-GlcNAc transférase ou OGT

La O-linked  $\beta$ -N-acétyl-D-glucosaminyltransférase ou OGT, appartenant à la classe GT41 selon la classification CAZy, est l'un des deux acteurs de la dynamique de O-GlcNAcylation ([www.cazy.org/GT41](http://www.cazy.org/GT41)). C'est une glycosyltransférase de type Leloir qui utilise comme substrat un nucléotide-sucré donneur, l'uridine-5'-diphospho-N-Acétylglucosamine (UDP-GlcNAc), le produit final de la voie de biosynthèse des hexosamines (HBP ; Hexosamine Biosynthesis Pathway). Ainsi l'OGT catalyse la formation d'une liaison  $\beta$  entre un résidu de N-Acétylglucosamine et la fonction hydroxyle des sérines et thréonines des protéines-cibles avec le départ de l'UDP (Figure 3). Contrairement à la plupart des glycosyltransférases, la présence d'ions métalliques divalents n'est pas nécessaire au bon fonctionnement de l'OGT (Haltiwanger, Holt, et Hart 1990).

Initialement purifiée à partir de foie de rat, l'OGT est une protéine très conservée chez tous les eucaryotes à l'exception de la levure (Haltiwanger, Blomberg, et Hart 1992; Nakanishi et al. 2017). L'OGT humaine partage environ 63% d'identité avec l'OGT de *C. elegans* et presque 95% avec son homologue chez le xénope. Chez les mammifères, l'OGT est codée par un gène unique localisé sur le chromosome X (Xq13.1 chez l'homme) et trois isoformes sont

**Figure 3: La O-GlcNAcylation est une modification post-traductionnelle dynamique dépendante de la voie de biosynthèse des hexosamines**



généérées par épissage alternatif (Kreppel, Blomberg, et Hart 1997; John A. Hanover et al. 2003). En terme de répartition, l'OGT est retrouvée dans le cytoplasme, le noyau et les mitochondries de tous les tissus, avec des niveaux plus élevés dans le pancréas, notamment dans les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans qui sécrètent l'insuline et au niveau du cerveau (Lubas et al. 1997; Roos et al. 1998; J. A. Hanover et al. 1999; Okuyama et Marshall 2003).

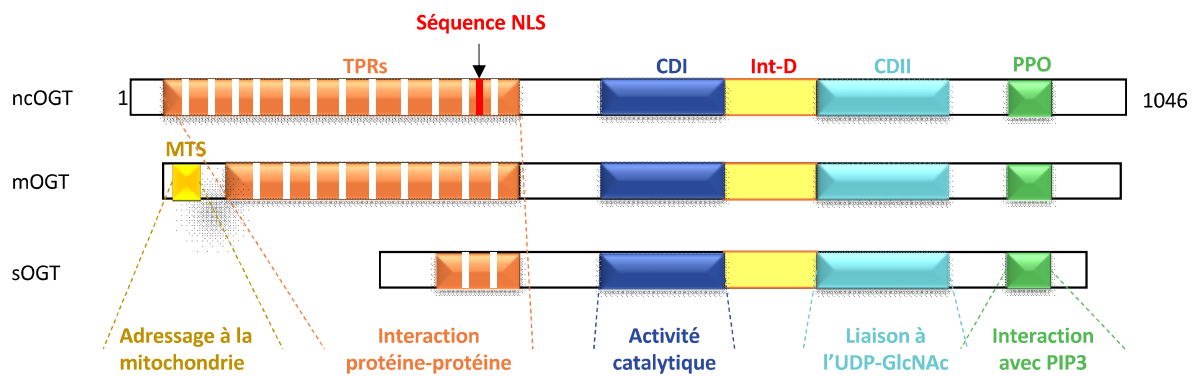
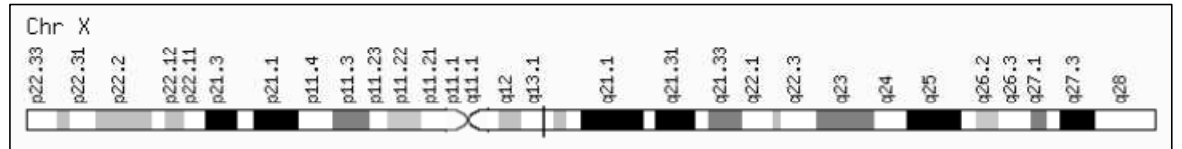
## 1°) Les trois isoformes de l'OGT

A partir du gène de l'OGT, composé de 23 exons et 21 introns, trois isoformes sont générées par épissage alternatif et exprimées dans les cellules : Deux isoformes nucléocytoplasmiques, une courte (*short OGT*, sOGT) de 75 KDa codée par les exons 10 à 23 et une longue (*nucleocytoplasmic OGT*, ncOGT) de 116 KDa codée par les 23 exons. De plus, il existe une isoforme mitochondriale (*mitochondrial OGT*, mOGT) de 103 KDa codée par les exons 5 à 23 (Shafi et al. 2000; John A. Hanover, Krause, et Love 2010). Les isoformes diffèrent essentiellement par leur extrémité N-terminale et notamment par leur nombre de motifs TPR (*Tetratricopeptide repeat*), soit 13 pour la ncOGT, 9 pour la mOGT et 2.5 pour la sOGT (Lubas et al. 1997; John A. Hanover et al. 2003; John A. Hanover, Krause, et Love 2010). Cette dernière isoforme est très peu étudiée et rarement détectée et son activité glycosyltransférase n'est toujours pas clairement établie (B. D. Lazarus, Love, et Hanover 2006; Ortiz-Meoz et al. 2014). Je ferai donc par la suite principalement référence à la ncOGT (OGT) ou la mOGT.

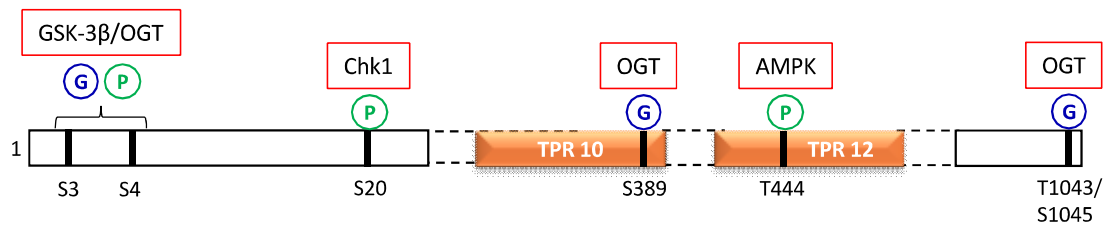
Les motifs TPR consistent en la répétition de 34 acides aminés, dont 8 sont fortement conservés, formant une structure de super-hélice mise en évidence par la cristallisation du domaine TPR de l'OGT en 2004 (Figure 4) (Sikorski et al. 1990; Jínek et al. 2004). Ce domaine contribue à la capacité de reconnaissance des protéines-cibles par l'OGT principalement au niveau de zones non structurées. Les TPRs participent aussi à l'interaction de l'OGT avec des protéines partenaires capables de moduler son activité glycosyltransférase (Kreppel et Hart 1999; Roos et Hanover 2000). Les motifs TPR semblent indispensables à l'activité catalytique

**Figure 4: Du gène à la protéine. Représentation schématique des trois isoformes et des modifications post-traductionnelles de l'OGT**

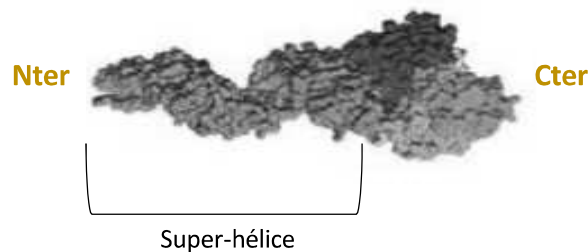
Localisation du gène de l'OGT chez l'Homme (genecards.org)



Les modifications post-traductionnelles de la ncOGT pour lesquelles l'enzyme et/ou le rôle sont connus



Modèle 3D de ncOGT



Modèle tiré de *Vocadlo, Curr Opin Chem Biol, 2012*



de l'OGT et la délétion de six de ces motifs entraîne une inhibition de sa capacité de transfert du résidu de GlcNAc sur les protéines-cibles testées. Toutefois, cette délétion n'empêche pas la glycosylation de peptides courts, ceci indiquant que le domaine TPR permet l'interaction de l'OGT avec les protéines-cibles complètes et rapproche le résidu à modifier du site catalytique de l'enzyme (Lubas et Hanover 2000; S. P. N. Iyer et Hart 2003).

Cinq résidus asparagine situés au niveau du domaine TPR sont impliqués dans la fonction de reconnaissance des protéines-cibles (Asn322, 325, 356, 390 et 424). Cette reconnaissance se fait *via* des liaisons hydrogène établies entre la chaîne latérale des résidus asparagine de l'OGT et la protéine-cible permettant ainsi l'insertion de cette dernière dans la lumière de l'hélice formée par le domaine TPR. La mutation de ces cinq résidus asparagine en alanine (5N5A) ne modifie pas l'activité catalytique de l'OGT vis-à-vis d'un peptide qui n'interagit pas avec le domaine TPR de l'OGT. Cependant, un peptide qui interagit avec la lumière du TPR et qui est normalement modifié par l'OGT sauvage ne sera pas *O*-GlcNAcylé par la forme mutée 5N5A. Ces résultats très récents obtenus *in vitro* suggèrent que ces cinq résidus asparagine sont essentiels pour la reconnaissance de son substrat-accepteur par l'OGT (Rafie et al. 2017; Levine et al. 2018).

Il est intéressant de noter que trois mutations ont été identifiées sur le gène de l'OGT lors de l'étude de pathologies neurodégénératives. Ces trois mutations faux sens interviennent au niveau de résidus situés dans le domaine TPR de l'enzyme. La première, 759G>T conduit à la substitution de la leucine en position 254 par une phénylalanine. Dans ce cas l'OGT reste active mais instable. Ceci pourrait conduire à une diminution des niveaux de *O*-GlcNAcylation mais il a été montré *in vivo* que les niveaux d'OGA sont en fait réduits pour compenser la baisse de la *O*-GlcNAc (Vaidyanathan et al. 2017). La seconde mutation 851 G>C se traduit par une substitution de l'arginine en position 284 par une proline. Ce site est situé au centre du TPR 7 et il semble que sa mutation en proline entraîne des défauts dans la structure secondaire du



motif TPR, ce qui pourrait le déstabiliser (Willems et al. 2017). La dernière mutation (955G>A) entraîne une substitution de l'alanine 319 en thréonine mais l'impact de cette mutation sur l'activité de l'OGT n'est pas connu (Bouazzi et al. 2015). Les trois mutations touchent le domaine TPR de l'OGT et pourraient perturber sa structure hélicoïdale ainsi que sa stabilité (Gundogdu et al. 2018). Cependant, ces 3 mutations ne semblent pas affecter l'homéostasie de O-GlcNAcylation, ce qui pourrait s'expliquer par un mécanisme de compensation de la cellule qui diminue les niveaux d'OGA afin de limiter la diminution de la O-GlcNAcylation induite par l'instabilité de l'OGT (Vaidyanathan et al. 2017). Des études sont encore nécessaires pour comprendre le lien entre ces mutations et les pathologies neurodégénératives dans lesquelles elles sont retrouvées.

Récemment, une séquence de trois acides aminés (451 à 453) a été identifiée comme étant un signal de localisation nucléaire (NLS) dans la région N-terminale de la ncOGT humaine, au niveau du 12<sup>ème</sup> motif TPR. Cette séquence composée de l'aspartate, la phénylalanine et la proline (DFP) est reconnue et interagit avec l'importine  $\alpha 5$ , une chaperonne qui permet à l'OGT de traverser les pores nucléaires et d'entrer dans le noyau (Seo et al. 2016) (Figure 4).

L'isoforme mitochondriale se distingue des deux autres par la présence dans sa séquence d'acides aminés d'un motif d'adressage à la mitochondrie (MTS, *mitochondrial targeting sequence*), en N-terminal, en amont du domaine TPR (Figure 4) (Harwood et Hanover 2014). Le MTS permet à la mOGT d'être recrutée au niveau de la membrane interne de la mitochondrie d'où elle peut modifier différentes protéines mitochondriales grâce à l'entrée de l'UDP-GlcNAc *via* le transporteur pnc1 (*Pyrimidine nucleotide carrier 1*) (Love et al. 2003; Hu et al. 2009; Yuanyuan Gu, Ande, et Mishra 2011; P. S. Banerjee, Ma, et Hart 2015).

Compte-tenu des différences de structure et de localisation subcellulaire des isoformes de l'OGT, il est possible d'observer une certaine spécificité au niveau des protéines ciblées par



chacune des isoformes. Par exemple, l'OGA, qui interagit avec les six premiers TPR de la ncOGT, et la protéine Tau sont exclusivement modifiées par la ncOGT alors que la tyrosine kinase YES est un substrat de la mOGT (B. D. Lazarus, Love, et Hanover 2006; Whisenhunt et al. 2006). Cependant, les niveaux de mOGT sont relativement faibles et une étude récente montre que la surexpression de la ncOGT chez les mammifères permet d'augmenter les niveaux de O-GlcNAcylation des protéines mitochondriales (Trapannone et al. 2016). Ceci suggère que l'isoforme nucléocytoplasmique peut modifier les protéines mitochondriales et que la mOGT ne serait pas indispensable à ce processus. Bien que le rôle spécifique de cette isoforme soit encore peu compris, il semblerait qu'elle régule le processus apoptotique. En effet, la surexpression de la mOGT conduit à la mort cellulaire par apoptose de manière dépendante de sa région N-terminale, notamment du motif MTS, et de son activité (S.-H. Shin, Love, et Hanover 2011). Une étude plus récente montre que la mOGT est aussi impliquée dans la régulation de l'activité et de la morphologie de la mitochondrie. L'extinction spécifique de son expression conduit à la fragmentation de la mitochondrie, à la perte de son contenu et à une altération significative du potentiel transmembranaire et ce, même en présence de la ncOGT (Sacoman et al. 2017). Tous ces résultats indiquent que même si la ncOGT est capable de modifier des protéines mitochondriales, la mOGT possède un rôle spécifique dans la régulation de la mitochondrie.

Malgré ces différences, les trois isoformes partagent le même domaine C-terminal portant l'activité glycosyltransférase de la protéine (Kreppel, Blomberg, et Hart 1997) (Figure 4). La structure de ce domaine a été particulièrement étudiée en 2011 en utilisant une OGT humaine cristallisée contenant 4,5 TPRs et le domaine catalytique. La région C-terminale comporte trois domaines principaux : Le domaine catalytique I (CDI ; domaine N-terminal, N-Cat) portant l'activité catalytique de l'OGT et le domaine catalytique II (CDII ; domaine C-terminal, C-Cat) qui forme une poche pour l'intégration de l'UDP-GlcNAc. Un domaine



intermédiaire (*Intervening domain*, Int-D) sépare les deux domaines catalytiques et ne possède pas de fonction connue à ce jour (M. B. Lazarus et al. 2011).

Un autre domaine a pu être mis en évidence en C-terminal grâce à l'étude de l'OGT cristallisée : Le domaine de liaison au phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP<sub>3</sub>) nommé PPO (*PIP Binding activity*). Selon une seule étude de 2008, ce domaine permettrait à l'OGT d'interagir temporairement avec la membrane plasmique, riche en PIP<sub>3</sub>, et de se rapprocher de substrats potentiels notamment lors des mécanismes de réponse à l'insuline (X. Yang et al. 2008) (Figure 4).

Grâce aux domaines catalytiques présents en C-terminal, l'OGT est capable de transférer le résidu de GlcNAc sur ses protéines-cibles et cette réaction débute avec la prise en charge du nucléotide-sucré donneur UDP-GlcNAc, lui-même produit par la voie de biosynthèse des hexosamines.

## **2°) La voie de biosynthèse des hexosamines, un carrefour métabolique**

La voie HBP est une voie métabolique dépendante de l'entrée du glucose dans la cellule par le transporteur membranaire GLUT. Suite à son entrée, le glucose (Glc) est phosphorylé par la glucokinase (GK) pour donner le glucose-6-phosphate (G-6-P) qui peut intégrer la voie de biosynthèse du glycogène, la voie des pentoses phosphate ou être converti en Fructose-6-phosphate (F-6-P) par une isomérase (GIP ; Glucose-6-phosphate isomérase). Le F-6-P peut soit intégrer la voie de la glycolyse, ce qu'il fera en grande majorité, soit la voie HBP. Dans ce cas, le F-6-P est pris en charge par la glutamine fructose-6-phosphate amidotransférase (GFAT), la toute première enzyme de la voie HBP, pour donner la glucosamine-6-phosphate (GlcN-6-P) selon une réaction irréversible (McKnight et al. 1992). Seulement 3 à 5% du glucose entrant dans la cellule intègrent la voie HBP pour donner l'UDP-GlcNAc et alimenter la dynamique de O-GlcNAcylation. La GFAT est l'enzyme limitante de la voie HBP car, en plus de catalyser





une réaction irréversible, l'UDP-GlcNAc lui applique un rétro-contrôle négatif en l'inhibant ce qui évite ainsi l'augmentation trop importante de sa concentration dans la cellule (Traxinger et Marshall 1991) (Figure 3).

La voie HBP se situe au carrefour de plusieurs voies métaboliques, en commençant par le métabolisme du glucose puis le métabolisme des acides aminés impliqué par la prise en charge de la glutamine par la GFAT pour transférer son groupement amine sur le G-6-P, en libérant le glutamate. Par la suite, l'enzyme GlcNH<sub>2</sub>-6-phosphate N-Acetyltransférase (GNPNAT) utilise l'Acétyl-Coenzyme A (Acétyl-CoA) provenant du métabolisme des acides gras pour produire la N-Acetylglucosamine-6-Phosphate (GlcNAc-6-P). Enfin, le métabolisme des acides nucléiques fournit l'Uridine-5'-triphosphate (UTP) pris en charge par l'UDP-GlcNAc pyrophosphorylase (UAP) indispensable à la formation de l'UDP-GlcNAc (Marsh, Dell'Italia, et Chatham 2011) (Figure 3).

Ainsi, l'apport nutritionnel peut moduler le flux de la voie HBP *via* les différents métabolismes cités ci-dessus et impacter la quantité d'UDP-GlcNAc produite. L'activité de l'OGT, dépendante de la disponibilité en nucléotide-sucres donneur, est donc en partie régulée par l'apport alimentaire. De ce fait, la O-GlcNAcylation est considérée comme un senseur nutritionnel dont l'homéostasie reflète l'état nutritif de la cellule.

### **3°) L'OGT, un senseur nutritionnel**

La spécificité de l'OGT pour certaines protéines-cibles peut être modulée par des variations de concentration en UDP-GlcNAc dans la cellule. La O-GlcNAcylation n'est pas la seule modification consommatrice d'UDP-GlcNAc. En effet deux résidus de GlcNAc participent à la formation de l'oligosaccharide précurseur Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> utilisé pour la N-glycosylation dans le réticulum endoplasmique et certaines glycosyltransférases golgiennes utilisent

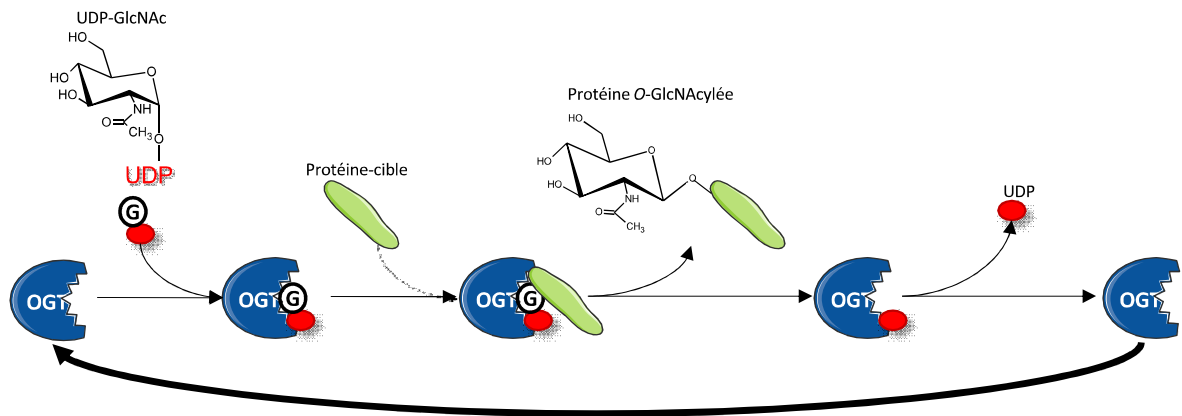


l'UDP-GlcNAc comme substrat lors des étapes de maturation des N- et O-Glycanes. Enfin l'UDP-GlcNAc est aussi utilisé pour la production des glycosaminoglycanes et des glycolipides.

Une étude menée en 2000 sur des souris dont le gène de l'enzyme GNPAT est inactivé montre que l'activité de l'OGT et la O-GlcNAcylation sont beaucoup plus dépendantes des niveaux d'UDP-GlcNAc que les autres types de glycosylation. Ces souris présentent de très faibles niveaux d'UDP-GlcNAc, environ 5% de la quantité produite dans des souris *wild type* et, alors que les niveaux de N- et O-Glycosylation ne sont pas modifiés, les niveaux de protéines O-GlcNAcylées sont fortement diminués (Boehmelt et al. 2000).

Une première étude *in vitro* détermine un  $K_M$  apparent ( $K_{M,App}$ ) de l'OGT purifiée à partir de foie de rat pour l'UDP-GlcNAc de 545 nM, ce qui permet à l'OGT de rester active même en cas de très faibles concentrations en substrat-donneur et d'être suffisamment compétitive vis-à-vis des transporteurs de nucléotide-sucres au niveau du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi dont le  $K_{M,App}$  est d'environ 3 à 4  $\mu$ M (Perez et Hirschberg 1987; Haltiwanger, Blomberg, et Hart 1992). Cependant le  $K_{M,App}$  pour l'UDP-GlcNAc semble varier *in vitro* en fonction de la protéine-cible fixée dans le domaine catalytique de l'OGT avec des valeurs pouvant aller de 1.3  $\mu$ M pour la protéine du pore nucléaire Nup62 à plus de 20  $\mu$ M pour la kinase CaMKIV (D. L. Shen et al. 2012). Ces valeurs de  $K_M$  restent tout de même plus faibles que celles des GlcNAc transférases impliquées dans d'autres types de glycosylation. Par exemple les MGATs, des GlcNAc transférases intervenant dans la synthèse des N-glycanes ont des  $K_{M,App}$  pour l'UDP-GlcNAc compris entre 40  $\mu$ M pour MGAT1 et 11 mM pour MGAT5 (Grigorian et al. 2007). L'affinité de l'OGT pour l'UDP-GlcNAc est donc assez importante pour être compétitive vis-à-vis des autres glycosyltransférases.

**Figure 5: Mécanisme catalytique de l'OGT pour le transfert de la N-Acétylglucosamine sur les protéines à partir de l'UDP-GlcNAc**



[Lazarus et al, 2012]

D'un autre côté, le  $K_M$  apparent de l'OGT pour ses protéines-cibles varie en fonction de la concentration en UDP-GlcNAc dans la cellule (de l'ordre du nM à 50 mM) (Kreppel et Hart 1999; C. Slawson, Copeland, et Hart 2010; D. L. Shen et al. 2012). Cette concentration peut varier en fonction de plusieurs paramètres dont les signaux extracellulaires, l'état nutritif de la cellule, le développement et le type cellulaire régulant ainsi l'activité catalytique de l'OGT et faisant de cette enzyme un senseur de l'état de la cellule (Zachara et Hart 2004).

#### **4°) L'activité catalytique de l'OGT**

##### **a- Le mécanisme catalytique**

Afin de catalyser le transfert du résidu de GlcNAc sur ses protéines-cibles, l'OGT utilise un mécanisme bi-bi séquentiel qui fait intervenir sa région C-terminale et qui a été mis en évidence par la cristallisation de l'enzyme en complexe avec des substrats donneurs et accepteurs. Dans un premier temps, l'OGT reconnaît et fixe l'UDP-GlcNAc *via* le domaine catalytique CDII puis elle prend en charge la protéine acceptrice pour former un complexe ternaire.

Dans un second temps, le résidu de N-Acetylglucosamine est transféré sur la protéine-cible avec une inversion de la configuration du centre anomérique qui passe d'une configuration  $\alpha$  à une configuration  $\beta$  et enfin, l'UDP quitte le domaine catalytique de l'OGT qui devient disponible pour une nouvelle réaction (M. B. Lazarus et al. 2012) (Figure 5). Au sein de la région C-terminale, le résidu lysine 842 a été identifié comme essentiel à l'activité catalytique de l'enzyme. La mutation de ce site en méthionine rend l'OGT inactive sans pour autant inhiber sa capacité d'interaction avec ses protéines-cibles (Schimpl, Zheng, et al. 2012).

A ce jour, et contrairement à la phosphorylation, aucune séquence consensus reconnue par l'OGT n'a pu être clairement identifiée, les sites de O-GlcNAcylation ne peuvent donc pas être prédits avec certitude. Une certaine préférence de l'OGT pour des résidus de sérine/thréonine flanqués d'une proline a tout de même été observée (Pathak et al. 2015).



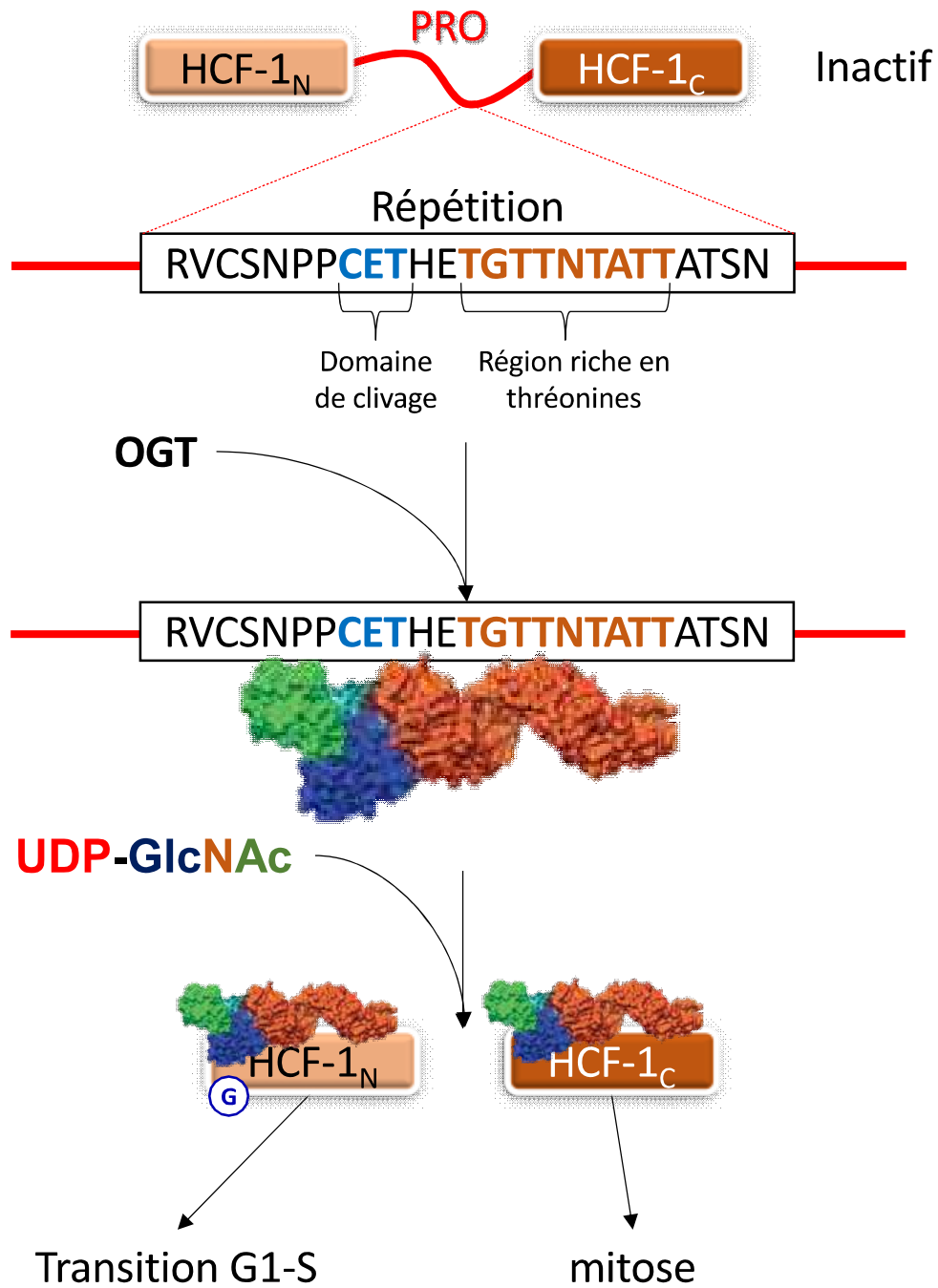
Une étude récente basée sur la spectrométrie de masse a mis en évidence un motif spécifique pour le dialogue phosphorylation/*O*-GlcNAcylation : (pS/pT)P(V/A/T)(gS/gT) au sein duquel la phosphorylation inhibe la *O*-GlcNAcylation (Leney et al. 2017). Ainsi la connaissance de ce motif permet de prédire la position de sites potentiellement ciblés par l'OGT à partir d'études phosphoprotéomiques.

### **b- L'activité protéolytique de l'OGT**

Il a récemment été montré que l'OGT, en plus de son activité de glycosyltransférase, est capable de catalyser le clivage protéolytique de HCF-1 (*Host cell factor 1*) chez les vertébrés. Ce co-régulateur transcriptionnel est d'abord synthétisé sous forme d'un complexe hétérodimérique de 2035 acides aminés qui subit ensuite des étapes de maturation dont son clivage conduisant à la génération de deux sous-unités toujours liées entre-elles mais de façon non covalente et impliquées dans la régulation de différentes étapes du cycle cellulaire. Tout d'abord, la sous-unité N-terminale de HCF-1 (HCF-1<sub>N</sub>) permet la transition entre la phase G1 (Gap1) et la phase de réplication de l'ADN (S) puis la sous-unité C-terminale (HCF-1<sub>C</sub>) participe à la régulation de la mitose (Julien et Herr 2003). Chez les vertébrés, les deux sous-unités sont séparées par une région nommée HCF-1<sub>PRO</sub> (pour protéolyse) constituée de 6 répétitions d'une séquence de 26 acides aminés très conservée avec deux domaines importants pour le clivage, reconnus par des protéases. Un domaine riche en thréonines et une séquence CET (Cys-Glu-Thr) dont le résidu glutamate marque le site de clivage (Wilson, Peterson, et Herr 1995; John A. Hanover 2011).

Plusieurs études ont montré que l'OGT est responsable à la fois de la *O*-GlcNAcylation de HCF-1 et de son clivage protéolytique chez les vertébrés (Daou et al. 2011). Ce sont bel et bien deux activités de l'OGT, indépendantes l'une de l'autre. En effet, l'OGT interagit stablement avec la région de HCF-1<sub>PRO</sub> riche en Thr en formant un ensemble de liaisons hydrogène *via* les cinq asparagines de son domaine TPR citées plus haut, alors que la séquence

Figure 6: Le clivage protéolytique de HCF-1 par l'OGT





CET se comporte comme un substrat de l'OGT et interagit avec son site catalytique amenant le résidu glutamate à proximité de l'UDP-GlcNAc. Ceci mène au clivage de HCF-1<sub>PRO</sub> de manière dépendante de la présence de l'UDP-GlcNAc entre la cystéine et le glutamate avec formation d'un pyroglutamate (Daou et al. 2011; Capotosti et al. 2011; M. B. Lazarus et al. 2013; Bhuiyan et al. 2015; Kötzler et Withers 2016) (Figure 6). Malgré l'implication de l'OGT dans le clivage de HCF-1, aucun lien n'a pu être établi à ce jour entre ce clivage et la régulation du cycle cellulaire, même s'il est connu que l'OGT modifie HCF-1<sub>N</sub> et maintient son interaction avec les sous-unités de HCF-1 après le clivage, le tout suggérant un rôle de l'enzyme dans la régulation de leur activité (Wysocka et al. 2003; Zihao Wang et al. 2010; Bhuiyan et al. 2015).

Ainsi, l'OGT est la seule enzyme présentant deux activités catalytiques distinctes mais effectuées *via* le même site catalytique : une activité de glycosyltransférase et une activité protéolytique qui pour l'instant n'a été décrite que vis-à-vis de HCF-1.

## **5°) La régulation de l'activité de l'OGT**

### **a- Régulation par des interactions OGT-protéine**

Tout d'abord, l'activité de l'OGT est modulée par son interaction avec ses protéines-cibles. Cette régulation passe essentiellement par la région TPR de l'OGT, responsable de l'interaction de l'OGT avec ses substrats (Roos et Hanover 2000; S. P. N. Iyer et Hart 2003). De plus, l'OGT est un partenaire d'interaction de nombreuses protéines et forme différents complexes dont certains seront décrits dans les paragraphes suivants.

Le mécanisme et le rôle de ces interactions ne sont pas toujours connus mais certaines protéines sont impliquées dans le recrutement de l'OGT auprès des protéines-cible à modifier, régulant ainsi indirectement son activité (C. Slawson, Copeland, et Hart 2010). C'est le cas des protéines TET (*Ten eleven translocation*) qui sont des dioxygénases participant à la déméthylation active de l'ADN en catalysant la conversion de la 5-méthylcytosine (5mC) en



5-hydroxyméthylcytosine (5hmC). La méthylation de l'ADN est une modification épigénétique importante notamment dans la régulation de la transcription. *Via* leur interaction avec l'OGT, TET2 et TET3 régulent positivement son activité catalytique permettant la modification de plusieurs cibles dont HCF-1 et les histones. TET2 et TET3 participent au recrutement de l'OGT au niveau de la chromatine, à proximité des sites de transcription de gènes, pour faciliter la O-GlcNAcylation des histones (Deplus et al. 2013; Q. Chen et al. 2013).

En condition de stress induit par une privation de glucose dans le cerveau, les niveaux d'UDP-GlcNAc cellulaires diminuent mais de manière assez paradoxale les niveaux de O-GlcNAcylation augmentent, ce qui a pour effet de favoriser la survie cellulaire. L'augmentation de la O-GlcNAcylation est causée par une augmentation des niveaux d'OGT et une diminution de l'expression de l'OGA (Taylor et al. 2008). De plus, dans ces conditions de stress, des protéines interagissant avec l'OGT permettent d'améliorer son activité, participant ainsi à l'augmentation de la O-GlcNAcylation. Par exemple, l'une des voies de réponse au stress implique la régulation de l'activité de l'OGT par la voie p38MAPK. La région C-terminale de l'OGT (979-1036) interagit directement avec la kinase p38, activée en réponse à la privation de glucose et permettant le recrutement de l'enzyme au niveau de protéines-cibles et l'activation de son activité glycosyltransférase. Parmi les protéines ciblées par le complexe OGT-p38, nous pouvons citer le neurofilament H (NF-H) qui est l'un des composants structurels majeurs des axones. Sa O-GlcNAcylation entraîne sa dépolymérisation et l'augmentation de sa solubilité, ce qui a des conséquences négatives sur la structure des axones (W. D. Cheung et Hart 2008).

D'autres protéines interagissent avec l'OGT afin d'amener ses substrats au niveau du site catalytique. De cette façon, ces protéines participent à la modulation de la spécificité de substrat de l'OGT. Parmi elles nous pouvons citer la sous-unité du complexe phosphatase 1C (PPP1C), MYPT1 (*Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A*) et l'histone méthyltransférase CARM1. Ces deux protéines interagissent avec et sont modifiées par l'OGT. Leur interaction

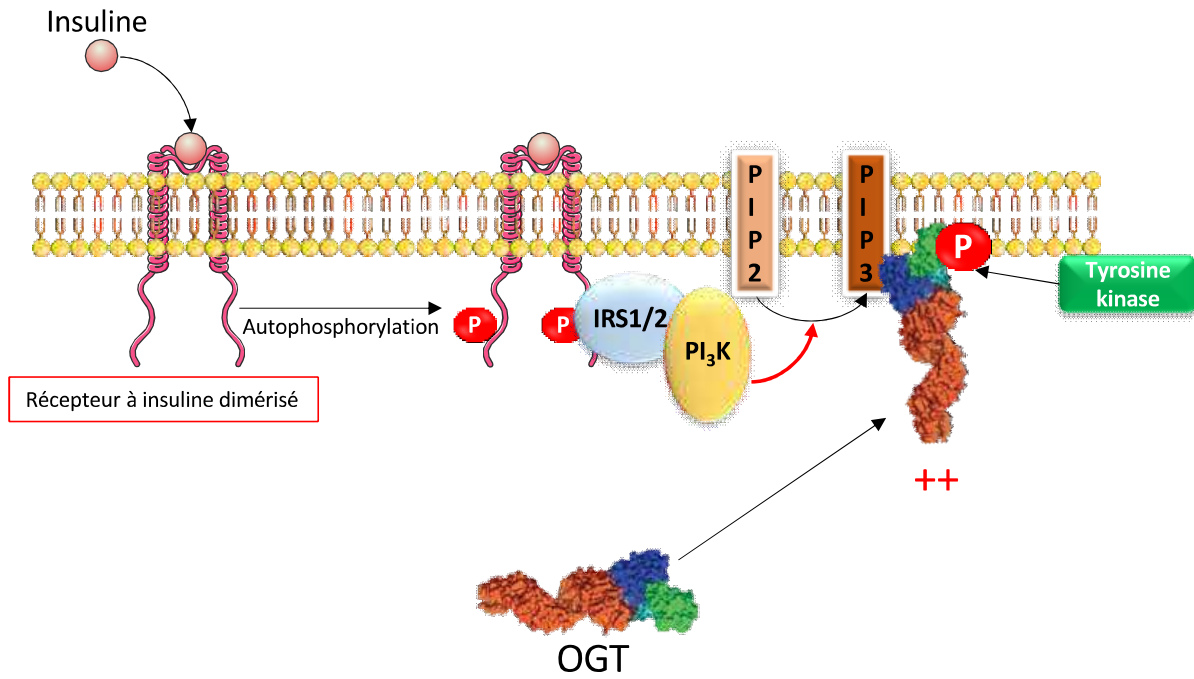


avec l'OGT affecte sa spécificité de substrat *in vitro* et ceci a été confirmé *in vivo* chez la souris pour MYPT1 (W. D. Cheung et al. 2008). L'impact de CARM1 sur la spécificité de substrat de l'OGT n'a pas encore été démontré *in vivo* mais à l'inverse, une étude de 2015 montre que l'activité de l'OGT régule la spécificité de substrat de CARM1 (Charoensuksai et al. 2015).

Enfin, l'interaction de l'OGT avec certaines protéines permet d'augmenter sa stabilité, favorisant ainsi son activité. L'OGT est une protéine relativement stable dont la demi-vie est d'environ 12h dans les cellules HeLa (Stephen Marshall, Okuyama, et Rumberger 2005). Sa dégradation est réalisée par le protéasome suite à la polyubiquitination de l'enzyme, modification dont je reparlerai dans le paragraphe suivant. L'étude de Daou et collaborateurs montre que HCF-1, dont le clivage protéolytique est induit par l'OGT, régule positivement la stabilité de cette dernière. Bien que HCF-1 ne soit pas retrouvé au niveau du promoteur du gène de l'OGT, l'extinction de l'expression de HCF-1 entraîne une diminution des niveaux protéiques d'OGT, sans modifier significativement les niveaux d'ARNm. Ces données suggèrent que la régulation de la stabilité de l'OGT par HCF-1 passe par un mécanisme post-transcriptionnel et notamment l'inhibition de la dégradation protéasomale grâce à l'interaction entre l'OGT et HCF-1 (Daou et al. 2011).

Ainsi, l'interaction de l'OGT avec ses partenaires est importante pour la régulation de son activité en condition normale mais aussi en cas de réponse aux stress pouvant intervenir tout au long de la vie de la cellule. L'activité de l'OGT peut également être modulée par différents types de modifications post-traductionnelles.

**Figure 7: Régulation de l'activité de l'OGT par tyrosine phosphorylation induite par l'insuline**



## **b- L'OGT est la cible de modifications post-traductionnelles**

L'OGT est modifiée par des tyrosine-kinases dans sa région C-terminale notamment suite à la stimulation des cellules par l'insuline, comme montré dans les adipocytes de souris, et cette modification a pour effet d'augmenter l'activité de l'OGT (Kreppel, Blomberg, et Hart 1997; Whelan, Lane, et Hart 2008). Toutefois, nous ne savons pas encore avec précision comment intervient cette modification et selon quel mécanisme elle modulerait l'activité de l'OGT. L'étude de Yang et collaborateurs suggère que suite à la stimulation des cellules par l'insuline, une cascade de phosphorylations conduit à la formation de PIP<sub>3</sub> à la membrane plasmique recrutant ainsi une partie de l'OGT *via* son domaine PPO (Xiaoyong Yang et al. 2008). En effet, l'insuline se fixe au niveau de récepteurs transmembranaires à tyrosine kinase (RTK) dimérisés pour induire l'autophosphorylation de leur région C-terminale. La kinase PI<sub>3</sub>K (Phosphatidylinositol-3-OH kinase) est alors recrutée aux RTKs *via* les IRS1 et 2 (*Insulin Receptor Substrate*) phosphorylés puis activée pour convertir les PIP<sub>2</sub> (Phosphatidylinositol 4,5 biphosphate) membranaires en PIP<sub>3</sub>. Il semblerait que l'OGT, *via* son domaine PPO, reconnaisse ce signal et interagisse avec la membrane plasmique, à proximité des récepteurs à insuline. L'OGT serait ensuite phosphorylée, avec pour effet de favoriser son activité glycosyltransférase envers différentes protéines de la voie de signalisation de l'insuline, dont la kinase AKT (Xiaoyong Yang et al. 2008; Whelan, Lane, et Hart 2008; C. Slawson, Copeland, et Hart 2010) (Figure 7).

L'OGT peut aussi être phosphorylée sur des résidus sérine ou thréonine afin de réguler son activité et sa stabilité. Ainsi l'OGT est la cible de Chk1 (*Checkpoint kinase 1*), une kinase essentielle pour le maintien de l'intégrité du génome puisque cette kinase régule à la fois l'étape de réplication de l'ADN, les points de contrôle de dommage à l'ADN et d'assemblage des fuseaux mitotiques, et la cytokinèse. L'OGT interagit avec Chk1 qui la phosphoryle sur la sérine 20 pendant la cytokinèse dans les cellules HeLa (Figure 4). Cette phosphorylation participe à





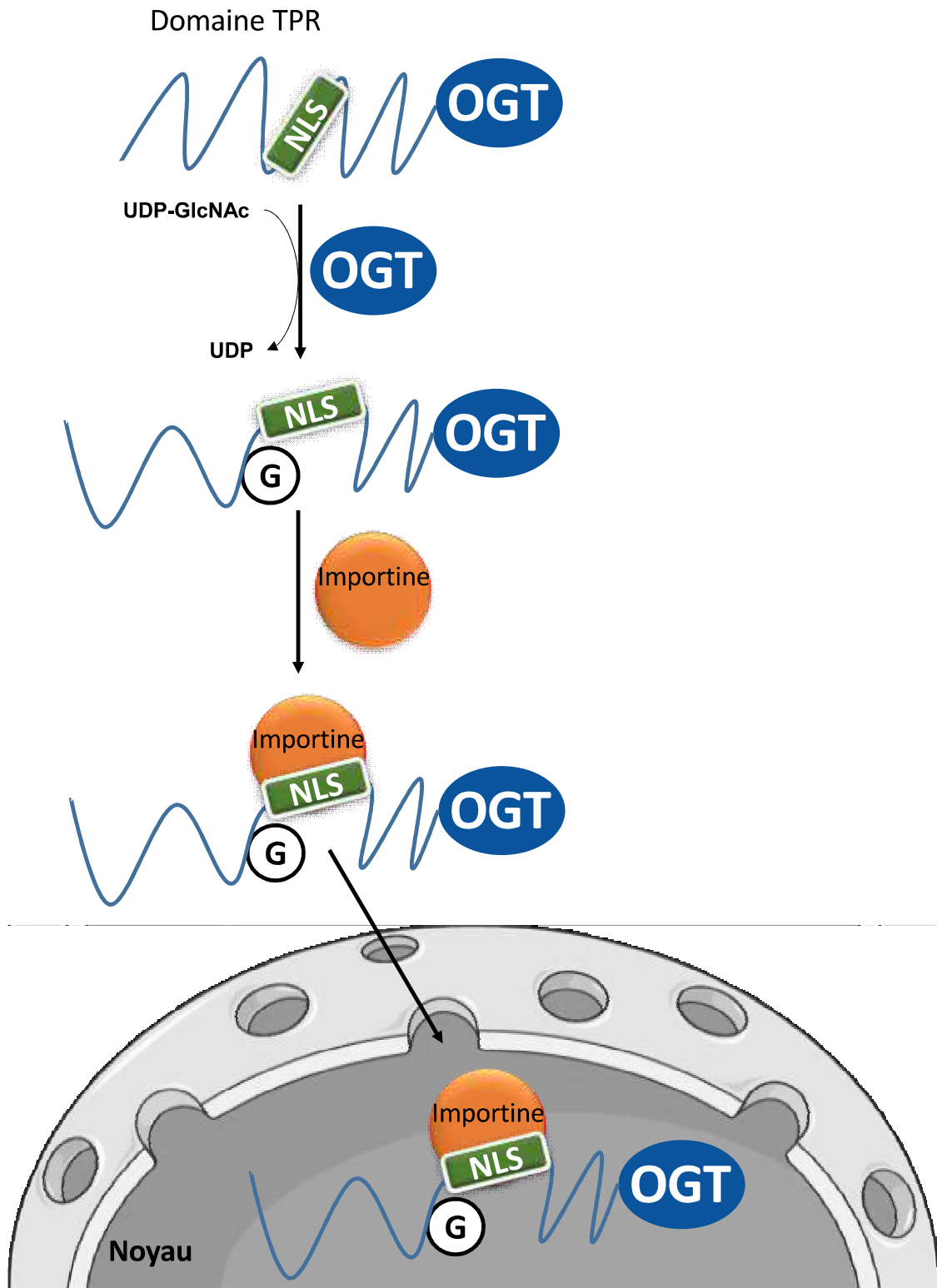
la stabilité de l'OGT, nécessaire pour la O-GlcNAcylation d'autres cibles, elles aussi impliquées dans la régulation de la mitose (Z. Li et al. 2017).

De plus, la kinase GSK3 $\beta$  (*Glycogen synthase kinase 3 $\beta$* ) impliquée dans différents processus dont le rythme circadien, la transcription et le cycle cellulaire, phosphoryle l'OGT en N-terminal afin de réguler son activité catalytique (Figure 4). La phosphorylation de l'OGT par GSK-3 $\beta$  a été démontrée *in vitro* à partir de protéines murines et les données expérimentales obtenues par spectrométrie de masse ne permettent pas de déterminer précisément quel site est modifié (Ser3 ou Ser4). De plus, l'analyse *in vitro* de l'activité de l'OGT en présence d'UDP-[<sup>3</sup>H]GlcNAc montre que l'activité glycosyltransférase vis-à-vis d'un peptide CKII est augmentée en présence de GSK-3 $\beta$  par rapport à une condition sans kinase. La mutation des sites S3 et S4 en alanine diminue significativement l'activité de l'OGT, en présence ou non de GSK-3 $\beta$ , par rapport à la condition associant l'OGT *wild type* (WT) et la kinase (Kaasik et al. 2013). De manière intéressante, la mutation des sites S3 et S4 en acide aspartique dans le but de mimer la phosphorylation induit, en absence de GSK-3 $\beta$ , une légère augmentation d'activité par rapport à la condition OGT-WT sans kinase, mais l'ajout de GSK-3 $\beta$  dans le milieu réactionnel suffit pour obtenir une activité similaire à la condition OGT-WT en présence de kinase. Ces résultats suggèrent que la phosphorylation des sites S3 et S4 est effectivement impliquée dans l'activation de l'OGT mais aussi que la kinase GSK-3 $\beta$  modifie d'autres sites eux aussi impliqués dans cette activation (Kaasik et al. 2013). D'autres sites de phosphorylation de l'OGT ont pu être mis en évidence par des études phosphoprotéomiques mais les kinases impliquées et l'impact de la modification sur l'activité de l'OGT ne sont pas connus (Olsen et al. 2010). Nous ne savons donc pas à ce jour quels sont les autres sites modifiés par GSK-3 $\beta$ .

L'étude de Kaasik et collaborateurs montre également que les sites Ser3 et Ser4 sont O-GlcNAcylés *in vitro*, ceci suggérant fortement la présence d'un dialogue entre phosphorylation

**Figure 8: La O-GlcNAcylation de l'OGT régule son import nucléaire**

(Tiré de Seo et al, *Sci Rep*, 2016)



et *O*-GlcNAcylation en N-terminal pour la régulation de l'activité de l'OGT (Kaasik et al. 2013). L'OGT est aussi *O*-GlcNAcyllée au niveau de sa sérine 389 dans le 10<sup>ème</sup> motif TPR, à proximité d'un des cinq résidus asparagine impliqués dans l'interaction des protéines-cibles avec le domaine TPR (Asp390) et de la séquence NLS située entre les résidus 451 et 453 (Levine et al. 2018). La mutation de la sérine 389 en alanine inhibe presque totalement l'import nucléaire de l'OGT sans modifier son activité catalytique, suggérant fortement que la *O*-GlcNAcylation de l'OGT sur la sérine 389 est essentielle pour l'entrée de l'enzyme dans le noyau. Seo et collaborateurs proposent que cette modification entraîne des changements conformationnels permettant l'exposition de la séquence NLS de l'OGT et l'interaction avec des importines pour favoriser son entrée dans le noyau (Seo et al. 2016) (Figure 8).

De manière intéressante, une phosphorylation sur la thréonine 444 de l'OGT catalysée par la kinase AMPK (*AMP-activated protein kinase*) est aussi importante pour l'entrée de l'enzyme dans le noyau (Xu et al. 2014). Ceci pourrait expliquer pourquoi une faible quantité de S389A-OGT est toujours capable d'entrer dans le noyau dans l'étude de Seo et collaborateurs. De plus, la phosphorylation sur la Thr444 semble réguler la spécificité de substrat de l'OGT. En effet, le profil de *O*-GlcNAcylation d'extraits de cellules HEK293T transfectées avec de l'OGT WT est sensiblement différent de celui obtenu avec la forme phosphomimétique T444E-OGT. Ceci indique que la nature des protéines-cibles reconnues et modifiées par l'OGT dépendrait de la présence ou l'absence de la phosphorylation sur le site Thr444 (Bullen et al. 2014). La localisation de ce résidu au niveau du 12<sup>ème</sup> TPR pourrait expliquer la différence de spécificité de substrat de l'OGT, la phosphorylation induisant peut-être des mouvements dans la structure du domaine TPR.

Une étude par Kreppel et Hart suggère qu'au moins un site de *O*-GlcNAcylation se situe au niveau de la région C-terminale de l'OGT (Kreppel et Hart 1999). Ceci fut confirmé en 2004 avec l'identification d'un site de *O*-GlcNAcylation entre les résidus 1037 et 1046, puis en 2012

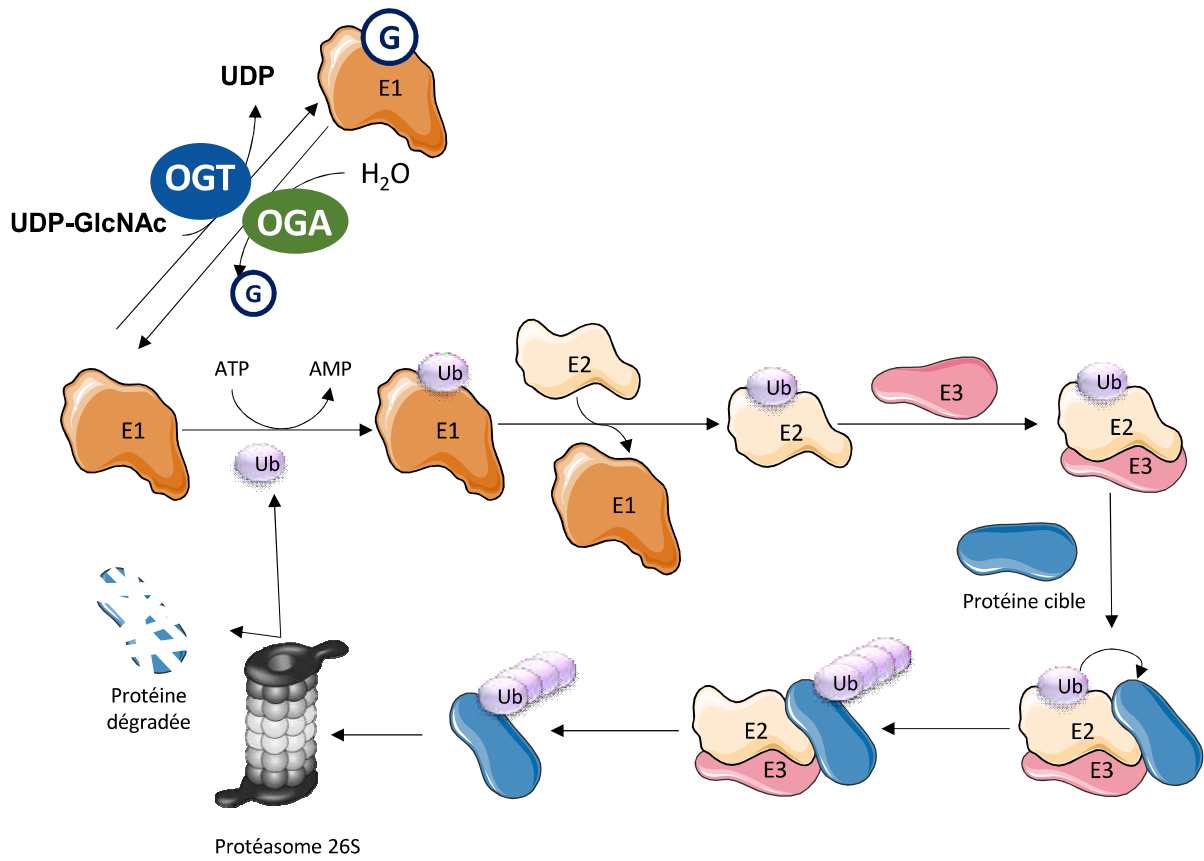


avec la localisation par spectrométrie de masse du site de *O*-GlcNAcylation sur le résidu Thr1043 ou Ser1045 (Tai et al. 2004; Trinidad et al. 2012). La position de ce site au niveau du domaine C-terminal de l'OGT suggère un rôle de la *O*-GlcNAcylation dans la régulation de l'activité catalytique de l'enzyme, mais cela reste à confirmer.

En 2010, une étude menée dans des cellules HeLa a mis en évidence que les niveaux globaux de *O*-GlcNAcylation de l'OGT dépendent de la progression du cycle cellulaire avec une diminution pendant la mitose suivie d'une augmentation quand les cellules débutent le cycle suivant (Sakabe et Hart 2010). De plus, l'expression de l'OGT diminue pendant la mitose suggérant une implication de la *O*-GlcNAcylation dans la régulation de l'expression ou de la stabilité de la protéine de façon dépendante de la progression du cycle cellulaire (Whitfield et al. 2002) Ceci sera discuté plus en détails dans le chapitre « *O*-GlcNAcylation et cycle cellulaire ». Il faut noter qu'une faible proportion d'OGT est *O*-GlcNAcylée, avec une stoechiométrie de *O*-GlcNAcylation d'environ 3%. De plus, l'OGT est principalement mono-*O*-GlcNAcylée et ce malgré l'existence de plusieurs sites sur la séquence de la protéine (Rexach et al. 2010). Ceci suggère que la modification n'intervient sur l'OGT que dans des circonstances précises, au cours d'une phase spécifique du cycle cellulaire par exemple, et sur un site donné afin de réguler finement l'activité de l'OGT selon les besoins de la cellule. Si la *O*-GlcNAcylation intervient au niveau du domaine TPR elle pourrait réguler l'interaction de l'OGT avec ses partenaires, si c'est en C-ter elle pourrait moduler la fixation de ses substrats au niveau du site catalytique. Le résidu de GlcNAc est ensuite rapidement hydrolysé par l'OGA.

Enfin, plusieurs sites d'ubiquitination ont pu être identifiés sur l'OGT. L'ubiquitine est une petite protéine conservée (8 KDa) qui est liée de manière covalente sur les protéines afin de les cibler pour la dégradation par le protéasome 26S qui est un complexe de 3 sous-unités : la sous-unité catalytique 20S et les deux sous-unités régulatrices 11S et 19S. L'ubiquitination est une

**Figure 9: Schéma de la voie de dégradation protéasomale dépendante de l'ubiquitine**



modification post-traductionnelle qui s'effectue selon une cascade de réactions enzymatiques. Tout d'abord l'enzyme E1 (*Ubiquitin-activating*) prend en charge l'ubiquitine de façon dépendante de l'ATP, ce qui a pour conséquence de l'activer. L'ubiquitine est ensuite transférée sur l'enzyme E2 (*ubiquitin-conjugating*) et pour être enfin liée sur une lysine de la protéine-cible par l'enzyme E3 (*Ubiquitin ligase*) (Figure 9).

Les sites d'ubiquitination de l'OGT ont pu être identifiés par spectrométrie de masse (W. Kim et al. 2011; Wagner et al. 2011). Cependant, l'ubiquitine ligase impliquée et le rôle précis de cette modification ne sont pas encore connus. L'étude de l'interaction de l'OGT avec HCF-1 a toutefois permis de montrer une corrélation entre l'ubiquitination de l'OGT et sa dégradation protéasomale. En effet, l'extinction de HCF-1 est associée à une augmentation de l'ubiquitination de l'OGT et de sa dégradation, suggérant un rôle de cette modification dans la régulation de la stabilité de l'OGT (Daou et al. 2011).

Des ubiquitines ligases ciblant l'OGT pour la dégradation protéasomale ont été identifiées mais les sites ciblés par ces enzymes ne sont pas connus. Tout d'abord, l'ubiquitine ligase  $\beta$ -TrCP1 est responsable de la polyubiquitination de l'OGT, entraînant sa dégradation par le protéasome 26S en réponse à un stress hypoxique (H. Liu et al. 2014). Chez des souris soumises à un stress hypoxique, l'extinction de l'expression de  $\beta$ -TrCP1 induit l'augmentation des niveaux d'OGT par rapport aux souris contrôle, et à l'inverse, la surexpression de l'ubiquitine ligase entraîne la diminution des niveaux d'OGT de façon dépendante du protéasome (H. Liu et al. 2014).

La polyubiquitination de l'OGT est aussi assurée par une protéine initialement décrite comme une histone déméthylase, LSD2. Il a été démontré *in vitro* et *in vivo* que LSD2 possède également une activité ubiquitine ligase vis-à-vis de l'OGT dans des cellules cancéreuses : L'extinction de l'expression de LSD2 entraîne une diminution significative de l'ubiquitination





de l'OGT tandis que sa surexpression conduit à la diminution des niveaux protéiques de l'OGT (Y. Yang et al. 2015).

Donc selon le contexte cellulaire chez les mammifères, la dégradation de l'OGT par le protéasome est régulée par différentes ubiquitine ligases et d'autres seront certainement découvertes au cours de futures études. Il serait aussi intéressant de faire le lien entre les sites d'ubiquitination identifiés et la ligase impliquée afin d'étudier le rôle de cette modification dans la régulation de l'OGT.

Ainsi, en plus de la régulation de son activité par les niveaux du nucléotide-sucré donneur UDP-GlcNAc disponibles dans la cellule, l'OGT peut être régulée par des modifications post-traductionnelles. Celles-ci modulent l'activité de l'OGT, soit de manière directe, soit de manière indirecte *via* la régulation de sa stabilité ou de sa localisation subcellulaire.

### **III/ La O-GlcNAc hydrolase ou OGA**

La  $\beta$ -N-Acétyleglucosaminidase (O-GlcNAcase ou OGA) est la deuxième enzyme indispensable au cycle de O-GlcNAcylation qui a pour rôle d'hydrolyser le résidu de GlcNAc ajouté par l'OGT afin de déglycosyler les protéines-cibles (Figure 1) (Gao et al. 2001; Lance Wells et al. 2002). L'OGA appartient à la famille des glycosides hydrolases 84 (GH84) selon la classification CAZy ([www.cazy.org/GH84](http://www.cazy.org/GH84)). C'est une enzyme nucléocytoplasmique produite à partir d'un gène unique, MGEA5 (*meningioma expressed antigen 5*), localisé sur le chromosome 10q24.

Ce gène a été étudié en 2005 en tant que gène candidat pour le diabète de type II (Lehman et al. 2005). L'OGA est particulièrement importante pour la fonction des cellules  $\beta$  du pancréas. L'inhibition de son activité est toxique pour ces cellules et augmente la probabilité de développer du diabète (R. J. Konrad, Janowski, et Kudlow 2000; K. Liu et al. 2000). De plus, la région chromosomique 10q a été associée au diabète de type II au cours d'une étude

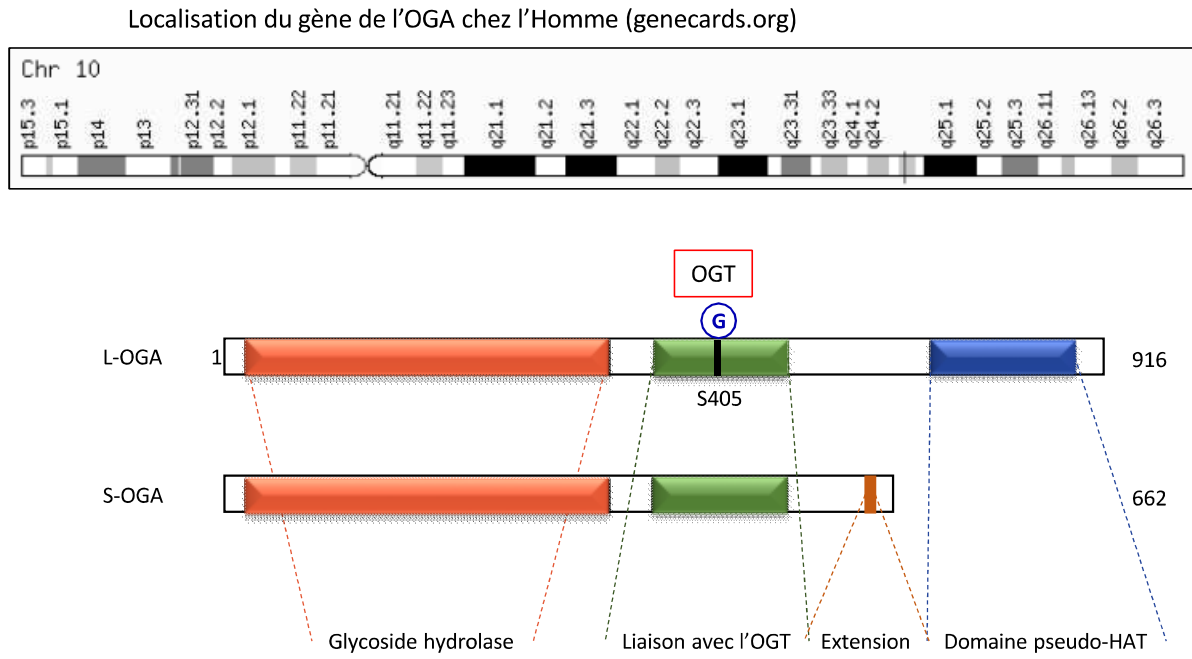


précédente sur une population particulière de patients diabétiques (SAFADS ; San Antonio family diabetes study) (Duggirala et al. 1999). En 2005, Lehman et collaborateurs ont identifié un variant d'un seul nucléotide (SNP ; *Single nucleotide polymorphism*) localisé au niveau de l'intron 10 et relié à l'induction du diabète de type II dans cette même population (Lehman et al. 2005). Cet intron contient un codon stop alternatif, le variant pourrait donc diminuer l'expression de l'OGA fonctionnellement active et reproduire le phénotype obtenu lors de son inhibition. Des études fonctionnelles sont encore nécessaires pour valider cette hypothèse.

Un ensemble de protéines mitochondriales sont O-GlcNAcylées mais bien que l'OGT présente une isoforme mitochondriale, une telle isoforme ne semble pas exister pour l'OGA. Toutefois, la surexpression de l'OGA dans différents types cellulaires de mammifères diminue significativement la O-GlcNAcylation mitochondriale suggérant la présence de l'enzyme dans la mitochondrie (Hu et al. 2009; Tan et al. 2014). De plus, une étude *in vitro* utilisant des mitochondries purifiées à partir de cœurs de souris démontre la présence d'une activité O-GlcNAcase mitochondriale, confirmant l'observation précédente (Hu et al. 2009). Enfin, une étude parue en 2015 sur la localisation de l'OGA par immunofluorescence chez le rat montre pour la première fois la présence de l'enzyme dans les mitochondries *in vivo*. L'ensemble de ces études confirment que la dynamique de O-GlcNAcylation existe bel et bien dans ce compartiment (P. S. Banerjee, Ma, et Hart 2015).

L'OGA est très conservée parmi les eucaryotes avec 25% d'identité entre l'OGA humaine et celle de *C. elegans*, 33% avec celle de la drosophile et 80% avec l'OGA du xénope (Gao et al. 2001). Par contre, comme pour l'OGT, le gène de l'OGA n'est pas retrouvé dans le génome de la levure (Nakanishi et al. 2017). L'OGA est exprimée dans tous les tissus avec des niveaux plus élevés dans les tissus cérébral, placentaire et pancréatique. A l'inverse, les poumons et le foie présentent les plus faibles niveaux d'expression de l'OGA. Elle se distingue des autres hexosaminidases fonctionnant à pH acide par une activité optimale à pH neutre, de

**Figure 10: L'OGA : Du gène à la protéine. Représentation schématique des deux isoformes de l'OGA**



Modèle 3D de L-OGA



Modèle tiré de *Vocadlo, Curr Opin Chem Biol, 2012*

5.7 à 7 (Gao et al. 2001). Contrairement à l'OGT dont l'activité dépend à la fois de l'UDP-GlcNAc et de la protéine-cible, l'activité de l'OGA ne dépend que de la présence du résidu de GlcNAc sur la protéine-cible qu'elle peut hydrolyser indépendamment de la nature de la séquence peptidique (D. L. Shen et al. 2012; Schimpl, Borodkin, et al. 2012). Toutefois, à l'image de l'OGT, l'OGA est exprimée sous forme de deux isoformes distinctes issues de l'épissage alternatif du gène unique de l'OGA.

### **1°) Les deux isoformes de l'OGA**

Suite à l'épissage alternatif du gène de l'OGA humaine, MGEA5, deux isoformes sont exprimées dans les cellules : une isoforme longue, L-OGA de 916 acides aminés (130 KDa) et une isoforme courte, S-OGA de 662 acides aminés (75 KDa) (Figure 10). Les deux isoformes partagent la même région N-terminale qui porte l'activité catalytique de l'enzyme. Trois résidus d'acide aspartique contenus dans cette région ont été identifiés comme étant nécessaires à l'activité hydrolase de l'OGA chez la souris, les résidus 174, 175 et 177. De plus, les résidus D175 et D177 appartiennent à un motif D-Ψ-D/E (où Ψ représente un acide aminé hydrophobe, l'isoleucine dans le cas de l'OGA chez la souris et l'Homme) retrouvé dans la séquence de l'OGA de tous les organismes étudiés jusqu'à aujourd'hui. Leur mutation en alanine entraîne une inhibition significative de l'activité de l'OGA, inhibition plus mesurée avec la mutation du résidu D-174, lui aussi conservé au cours de l'évolution. Ceci suggère que les résidus D175 et D177 sont importants pour l'activité de l'enzyme tout comme le résidu D174 mais dans une moindre mesure (Toleman, Paterson, et Kudlow 2006).

Les deux isoformes se distinguent l'une de l'autre par leur région C-terminale. Alors que les deux OGA possèdent un domaine d'interaction avec l'OGT entre les résidus 404 et 548, la L-OGA présente un domaine apparenté aux histone acétyltransférases (HATs) qui, selon une étude de 2004 posséderait une activité catalytique *in vitro*. Ces résultats n'ont cependant pas pu être confirmés *in vivo* (Schultz et Pils 2002; Toleman et al. 2004). De plus, aucune interaction



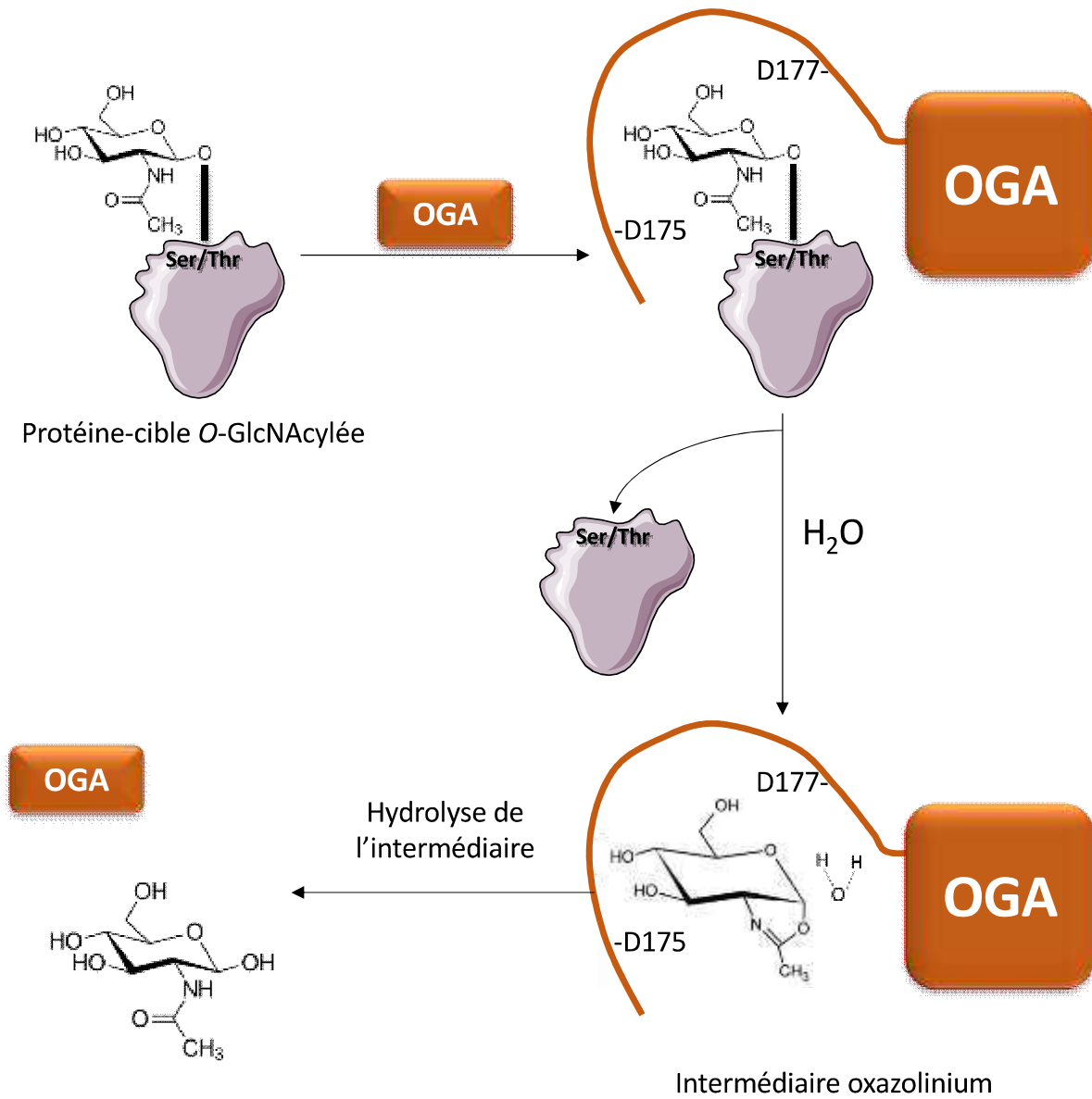
entre l'acétyl-CoA et ce domaine « pseudo-HAT » n'a pu être détectée, suggérant fortement qu'il ne possède pas d'activité catalytique de type acétyltransférase (Rao et al. 2013). Alors que la S-OGA ne présente pas de domaine pseudo-HAT, elle possède une extension de 15 acides aminés lui permettant d'interagir avec la membrane des vésicules lipidiques impliqués dans le stockage de lipides neutres pour y réguler l'activité du protéasome responsable du réarrangement de la surface des gouttelettes (Figure 10) (Comtesse, Maldener, et Meese 2001; C. N. Keembiyehetty et al. 2011a).

Les régions N- et C-terminales sont séparées par une séquence nécessaire à l'interaction des deux isoformes de l'OGA avec l'OGT et dans laquelle on retrouve un site de clivage protéolytique par la Caspase-3 (B. D. Lazarus, Love, et Hanover 2006). En effet, suite à l'induction de l'apoptose, l'OGA est rapidement clivée par la caspase-3 et, même si le rôle de ce phénomène est encore inconnu, cela ne semble pas modifier l'activité catalytique de l'enzyme, dans la mesure où les deux fragments peuvent se réassocier (Lance Wells et al. 2002; Butkinaree et al. 2008).

La L-OGA est l'isoforme nucléaire et cytoplasmique majoritairement exprimée et active car elle prend en charge environ 2/3 de toute l'activité d'hydrolyse de la O-GlcNAcylation de la cellule (Comtesse, Maldener, et Meese 2001; Lance Wells et al. 2002; C. N. Keembiyehetty et al. 2011a). C'est l'activité et la régulation de cette isoforme (notée OGA) que j'évoquerai dans les paragraphes suivants. Malgré la présence de la même région catalytique N-terminale que dans l'OGA pleine taille, l'isoforme courte possède une activité catalytique globalement plus faible. Ceci suggère que la région C-terminale pourrait être importante pour la régulation de l'activité de l'enzyme puisqu'elle est tronquée dans la S-OGA. Cependant, le rôle exact de cette région dans la régulation de l'activité de l'OGA doit encore être déterminé (Eun Ju Kim et al. 2006; Macauley et Vocadlo 2009).

**Figure 11: Schéma du mécanisme d'hydrolyse du résidu *O*-GlcNAcylé par l'OGA**

*(selon Toleman et al, 2006)*





## 2°) L'activité catalytique de l'OGA

Plusieurs travaux ont étudié des homologues de l'OGA humaine afin de déterminer les mécanismes de reconnaissance du substrat *O*-GlcNAcylé à la base de l'activité catalytique de l'enzyme. Notamment, une structure cristallisée d'une GH84 de *Clostridium perfringens*, présentant une homologie de séquence importante avec la région N-terminale de l'OGA humaine (34% d'identité et 51% d'homologie de séquence) montre la présence d'une poche pour la prise en charge d'un unique résidu de GlcNAc. Ce modèle révèle que l'OGA reconnaît le résidu de GlcNAc à hydrolyser, indépendamment de la séquence d'acides aminés de la protéine-cible, et l'intègre dans sa poche en N-terminal *via* un ensemble de liaisons hydrogène (Rao et al. 2006; Schimpl et al. 2010; Gloster et Vocadlo 2010; D. L. Shen et al. 2012; Schimpl, Borodkin, et al. 2012).

Suite à la fixation du résidu de GlcNAc dans la poche catalytique de l'OGA, un mécanisme similaire à celui mis en jeu par les hexosaminidases et faisant intervenir le duo d'acides aspartiques D175 et D177 est initié. L'OGA utilise un mécanisme de catalyse assistée par le substrat avec la formation d'un état de transition avec un intermédiaire bicyclique oxazolinium qui est ensuite hydrolysé par une molécule d'eau afin de libérer l'OGA et la GlcNAc avec rétention de la configuration du centre anomérique (Macauley et al. 2005; Cetinbaş et al. 2006; Toleman, Paterson, et Kudlow 2006) (Figure 11). Comme nous le verrons par la suite, la découverte de cet état de transition fut très importante pour la conception d'inhibiteurs pharmacologiques de l'OGA. Une étude cinétique utilisant un pseudo-substrat, le *p*-nitrophenyl-GlcNAc (pNP-GlcNAc), a permis de déterminer un  $K_M$  de l'OGA pour le pNP-GlcNAc d'environ 1,1 mM (Lance Wells et al. 2002; Vocadlo 2012).

Les mécanismes régulant l'activité de l'OGA sont encore peu connus. Ainsi, l'OGA est la cible de modifications post-traductionnelles dont la phosphorylation et l'ubiquitination (Wagner et al. 2011; W. Kim et al. 2011; Povlsen et al. 2012; Mertins et al. 2016). Cependant,



à ce jour ces modifications n'ont pas de rôle connu dans la régulation de l'activité de l'OGA. L'OGA est aussi O-GlcNAcylée, avec une stoechiométrie d'environ 10%, et un site de O-GlcNAcylation a été identifié sur le résidu sérine 405, au niveau de la zone d'interaction avec l'OGT mais le rôle de cette modification n'a pas encore été étudié (B. D. Lazarus, Love, et Hanover 2006; Khidekel et al. 2007; Rexach et al. 2010) (Figure 10).

## IV/ Les outils d'étude de la O-GlcNAcylation

Afin de mieux comprendre la dynamique de O-GlcNAcylation, différents outils sont utilisés et régulièrement mis au point afin de moduler les niveaux de O-GlcNAcylation et d'étudier l'impact de cette modulation sur la cellule ou un organisme entier. Ces outils sont nombreux et vont des molécules inhibitrices des enzymes de la O-GlcNAcylation aux différentes techniques d'enrichissement et de détection de la modification. Je vais décrire quelques-uns de ces outils, dont ceux que j'ai utilisés lors de mes travaux de thèse, et un aperçu plus exhaustif des autres outils est donné dans les revues suivantes : (Zachara 2009; Macauley et Vocadlo 2010; Eun J. Kim et al. 2014; Vercoutter-Edouart et al. 2015; Trapannone, Rafie, et van Aalten 2016; Eun Ju Kim 2017; Worth, Li, et Jiang 2017).

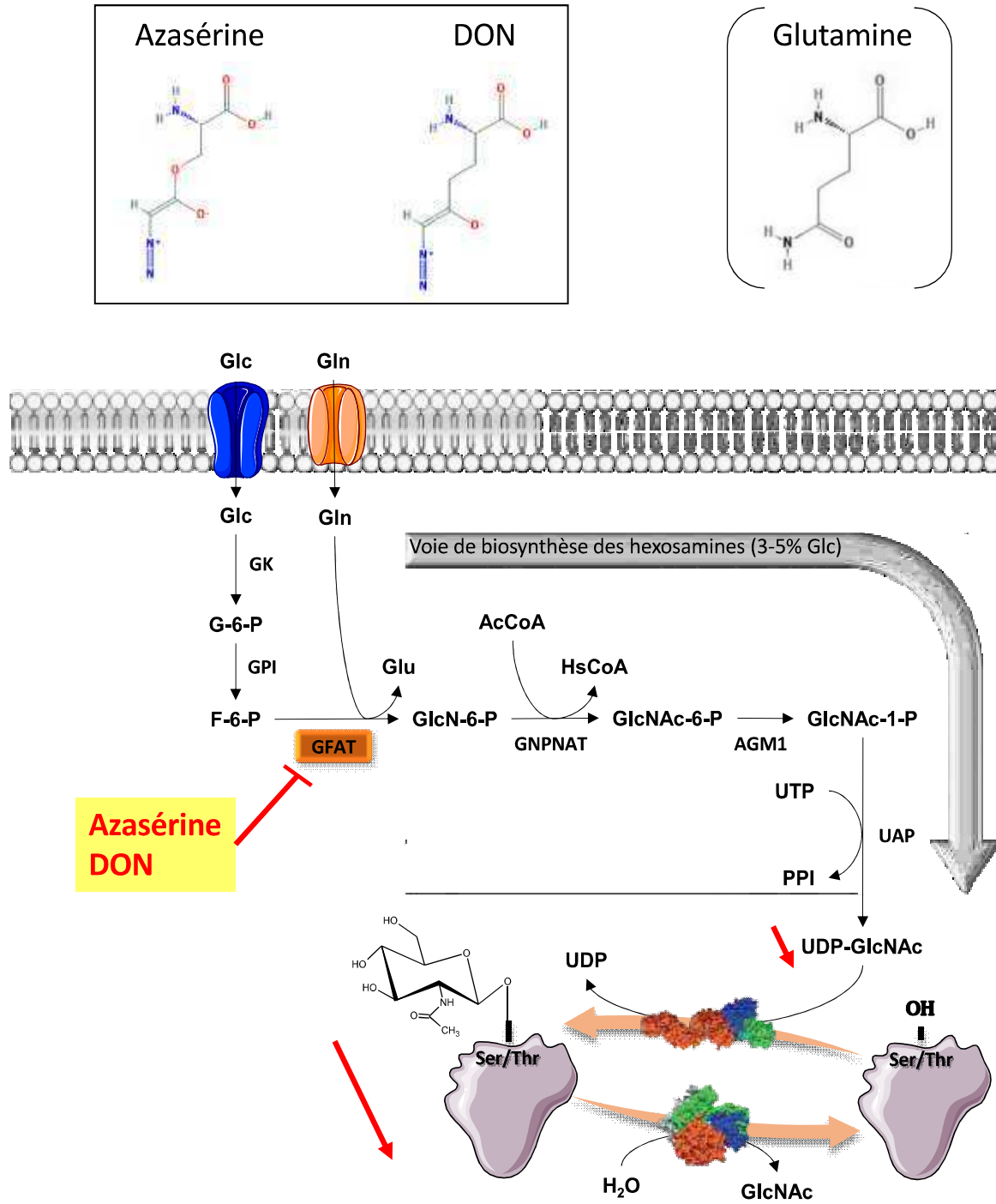
### 1°) Les inhibiteurs chimiques

#### a- Inhibition de la voie HBP

Comme je l'ai expliqué précédemment, l'activité catalytique de l'OGT est dépendante de la concentration en UDP-GlcNAc disponible dans la cellule. La modulation des niveaux de ce nucléotide-sucré, *via* l'inhibition de la voie de biosynthèse des hexosamines, est donc un moyen efficace de diminuer l'activité de l'OGT et les niveaux de O-GlcNAcylation.

L'enzyme principalement ciblée ici est l'enzyme limitante de la voie, la GFAT (McKnight et al. 1992). Il est possible de l'inhiber en utilisant des analogues de la glutamine dont l'**azasérine** (O-(2-diazoacétyl)-L-sérine) et **DON** (6-diazo-5-oxonorleucine) qui

Figure 12: Quelques analogues de la glutamine modulant la voie de biosynthèse des hexosamines



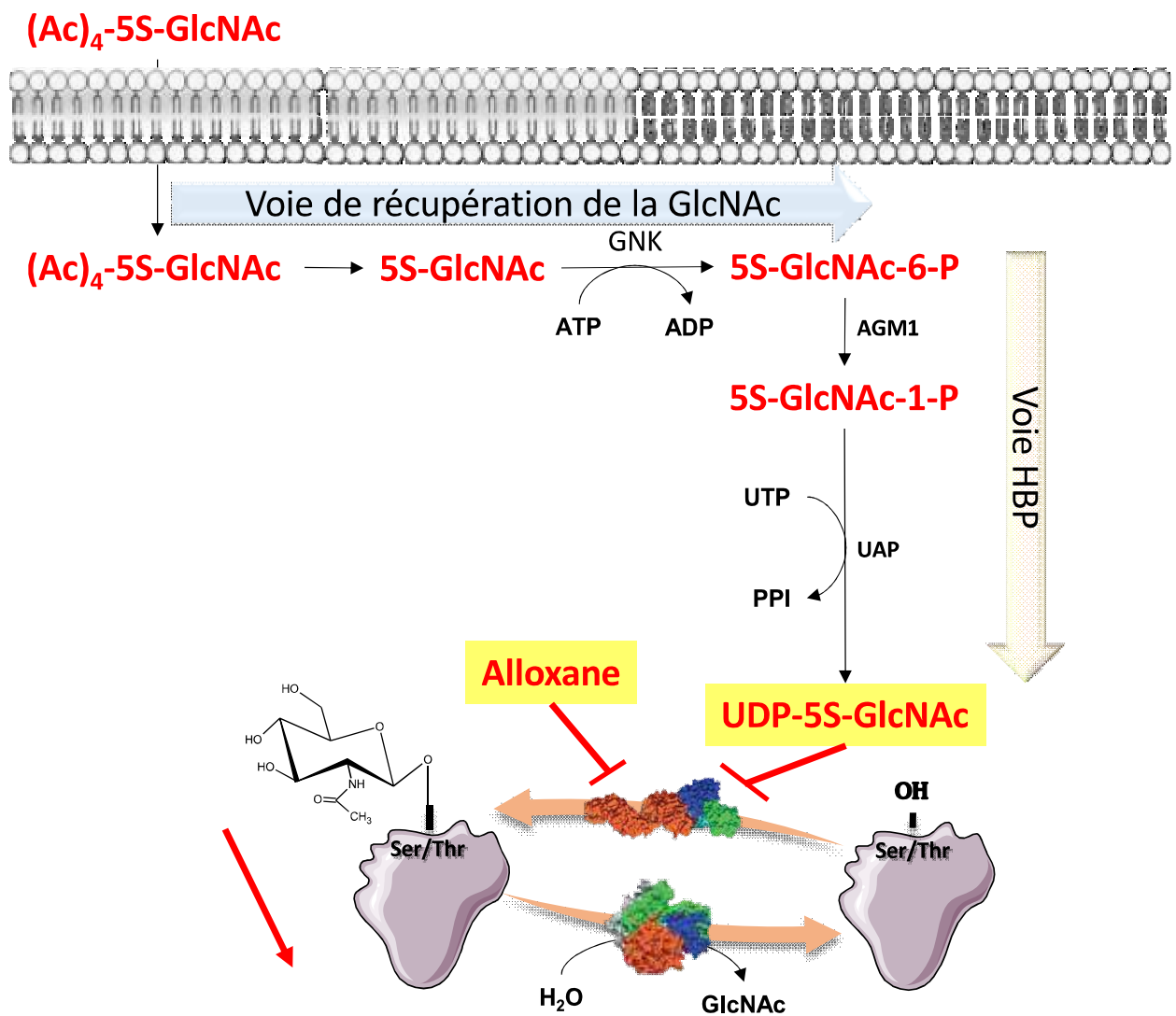
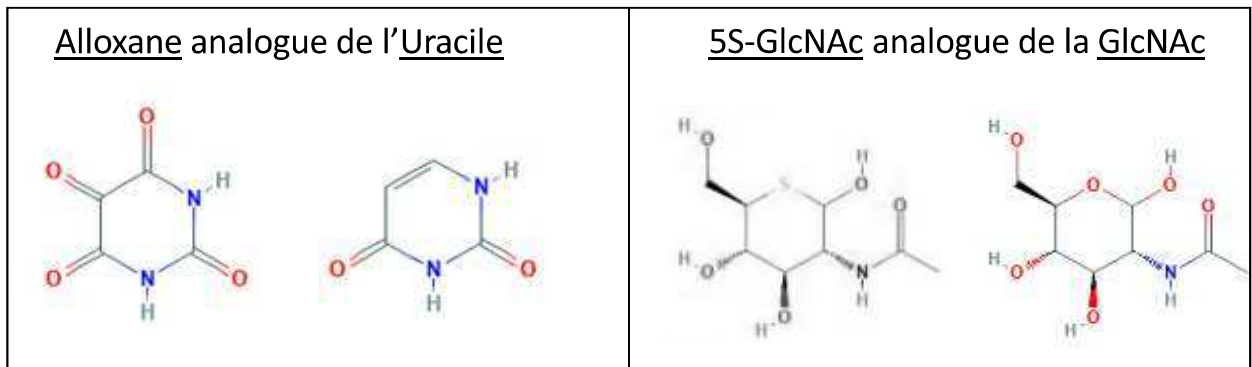
diminuent de façon efficace les niveaux de *O*-GlcNAcylation (Kisner, Catane, et Muggia 1980; S. Marshall, Bacote, et Traxinger 1991; Rajapakse et al. 2009; Herzog et al. 2014) (Figure 12).

Ce sont des inhibiteurs compétitifs prenant la place de la glutamine au niveau du domaine d'interaction avec le substrat au sein de la GFAT. Le problème majeur de ces composés est leur manque de spécificité puisque toutes les amidotransférases seront touchées par l'inhibition. Ainsi les voies de biosynthèse des acides nucléiques et des acides aminés sont aussi affectées par l'azasérine et DON (Miller-Patrick et al. 1993; Hiramoto, Fujino, et Kikugawa 1996). Ces composés ne sont donc pas spécifiques pour la modulation des niveaux de *O*-GlcNAcylation dans la cellule. Des inhibiteurs de l'OGT ont ainsi été mis au point afin de diminuer significativement les niveaux de *O*-GlcNAcylation cellulaire de la manière la plus spécifique possible.

#### **b- Inhibition de l'OGT**

L'**alloxane** (ou mésoxalylurée) est un composé découvert en 1828 et dont l'activité inhibitrice de la dynamique de *O*-GlcNAcylation fut mise en évidence bien plus tard. C'est la toute première molécule décrite comme un inhibiteur de l'activité de l'OGT (Robert J. Konrad et al. 2002). L'alloxane est un analogue de l'uracile, base pyrimidique retrouvée dans l'UDP-GlcNAc, initialement utilisé comme toxine diabétogénique puis comme inhibiteur de l'OGT (Figure 13). Pour se faire, il entre en compétition avec l'UDP-GlcNAc au niveau du CDII de l'OGT mais la brièveté de sa demi-vie (1,5 min à 37°C et pH 7.4) et son manque de spécificité en font un inhibiteur peu efficace et donc peu utilisé aujourd'hui pour l'étude de la *O*-GlcNAcylation (Lenzen et Munday 1991). En effet, l'alloxane inhibe aussi l'activité de l'OGA, toutefois, la concentration requise pour inhiber l'OGA est plus importante que la concentration suffisante pour inhiber efficacement l'OGT (T. N. Lee et al. 2006b).

Figure 13: Représentation de quelques inhibiteurs de l'OGT

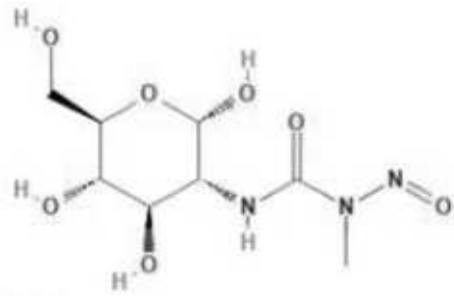


Ainsi cet inhibiteur, malgré sa capacité à diminuer les niveaux de *O*-GlcNAcylation avec un IC<sub>50</sub> de 18 μM (Dorfmueller et al. 2011) (contre 100 μM selon Konrad et al en 2002), n'est pas le plus adapté pour l'étude de la *O*-GlcNAcylation. Plusieurs équipes ont alors cherché à synthétiser des molécules analogues de l'UDP-GlcNAc qui pourraient inhiber plus efficacement l'OGT *via* un mécanisme de compétition avec son substrat-donneur. L'**UDP-S-GlcNAc** fait partie de ces molécules et inhibe l'OGT *in vitro* avec un IC<sub>50</sub> de 93 ± 15 μM (Dorfmueller et al. 2011). Cependant, *in vivo*, ce composé n'induit qu'une diminution limitée de la *O*-GlcNAcylation, sûrement due à des difficultés dans le passage du milieu extracellulaire vers le cytoplasme.

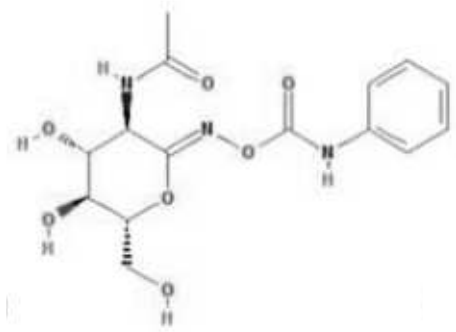
L'**Acétyl-5S-GlcNAc** ((Ac)<sub>4</sub>-5S-GlcNAc ; 2-acétamido-1, 3, 4, 6-tetra-O-acétyl-2-déoxy-5-thio- $\alpha$ -D-glucopyranose) a été mis au point dans l'optique de pouvoir traverser la membrane plasmique et être pris en charge par les enzymes d'une voie associée à la voie HBP qui est la voie de récupération de la GlcNAc pour être converti en UDP-5S-GlcNAc. Après son entrée dans la cellule, l'inhibiteur est déacétylé puis phosphorylé en position 6 par la GlcNAc kinase (GNK) pour intégrer la voie HBP et donner l'UDP-5S-GlcNAc (Figure 13). Il mime ainsi le substrat donneur de l'OGT, l'UDP-GlcNAc avec lequel il entre en compétition. L'UDP-5S-GlcNAc est un donneur de substrat très peu efficace et l'OGT, après l'avoir pris en charge mettra beaucoup plus de temps à transférer le résidu de GlcNAc sur une protéine-cible. Pendant ce laps de temps, le site catalytique de l'OGT restera inaccessible à l'UDP-GlcNAc, diminuant drastiquement les niveaux de *O*-GlcNAcylation (Gloster et al. 2011). Une concentration de 50 μM d'(Ac)<sub>4</sub>-5S-GlcNAc dans le milieu de culture des cellules est suffisante pour éliminer la majorité de la *O*-GlcNAcylation (Andres et al. 2017).

Figure 14: Quelques inhibiteurs de l'OGA

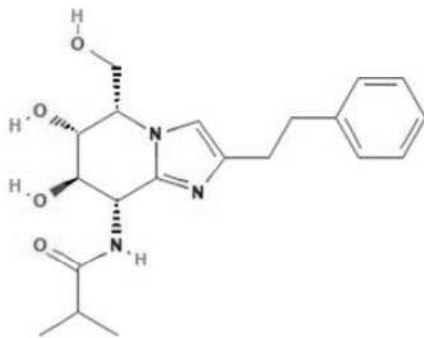
Streptozotocine



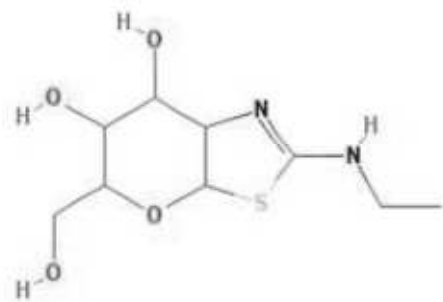
PUGNAc



GlcNAcstatine



Thiamet G





Plusieurs autres composés inhibent efficacement l'OGT dans des études menées *in vitro* cependant ils n'ont pas été testés, ou ne sont ni assez efficaces ni assez spécifiques pour être utilisés *in vivo*, je n'en citerai ici que quelques exemples (Trapannone, Rafie, et van Aalten 2016; Worth, Li, et Jiang 2017). L'**UDP** est lui-même un inhibiteur efficace de l'OGT avec un  $IC_{50}$  de 1,8  $\mu$ M *in vitro* mais, étant utilisé par plusieurs autres enzymes cellulaires, il n'est pas assez spécifique pour une utilisation *in vivo* (Dorfmueller et al. 2011; Schimpl, Zheng, et al. 2012). Les inhibiteurs **goblin1** et **2** (*OGT bisubstrate-linked inhibitor 1/2*), formés par l'association de l'UDP et d'un peptide *via* un *linker* remplaçant le résidu de GlcNAc, inhibent l'OGT avec un  $IC_{50}$  de 18  $\mu$ M et 40  $\mu$ M respectivement *in vitro*. Aucune inhibition de l'OGT n'a pourtant pu être observée *in vivo* avec ces deux inhibiteurs (Borodkin et al. 2014). Enfin, l'inhibiteur **OSMI-1** inhibe l'OGT *in vitro* avec un  $IC_{50}$  de 2.7  $\mu$ M mais il perd en efficacité *in vivo* car il traverse difficilement la membrane plasmique (Ortiz-Meoz et al. 2015).

### c- Inhibition de l'OGA

Il est important de noter que parmi les différentes molécules mises au point pour augmenter les niveaux de O-GlcNAcylation, certaines sont plus spécifiques de la L-OGA et d'autres de la S-OGA.

Tout d'abord la **streptozotocine** (STZ), utilisée initialement pour induire expérimentalement un diabète de type I est un modeste inhibiteur de l'OGA avec un  $K_i$  de 1,5 mM (R. J. Konrad et al. 2001; Macauley et al. 2005) (Figure 14). En effet, son utilisation chez le rat entraîne l'augmentation dose-dépendante de la O-GlcNAcylation dans les cellules  $\beta$  du pancréas (Roos et al. 1998). C'est un analogue de la N-Acétyleglucosamine qui cible le site catalytique de l'OGA et s'y loge de manière plus stable que son substrat naturel.

Par la suite, la STZ forme un analogue du composé intermédiaire oxazolinium dans le site catalytique de l'enzyme avant d'être libéré. Toutefois le passage de l'état OGA-STZ à



l'OGA libre est beaucoup plus lent qu'avec la GlcNAc ce qui limite l'activité de l'enzyme (Toleman et al. 2006; T. N. Lee et al. 2006a). Cependant, la STZ induit des dommages à l'ADN et un effet cytotoxique important, notamment sur les cellules  $\beta$  du pancréas, d'où l'induction de diabète (Roos et al. 1998; J. A. Hanover et al. 1999).

Un second composé, le **PUGNAc** (O-(2-acetamido-2-deoxy-glucopyranosylidène)-amino-N-phenylcarbamate) induit efficacement l'augmentation de la O-GlcNAcylation, à la fois *in vitro* et *in vivo* (Haltiwanger, Grove, et Philipsberg 1998; Rao et al. 2006) (Figure 14). Le PUGNAc inhibe l'OGA avec un  $K_i$  proche de 50 nM mais présente un problème de manque de spécificité *in vivo* puisqu'il inhibe aussi la  $\beta$ -hexosaminidase lysosomale (avec un  $K_i$  d'environ 35 mM) entraînant l'accumulation d'oligosaccharides libres dans les cellules (Mehdy et al. 2012). De plus, il ne traverse pas la barrière hématoencéphalique et ne peut donc pas atteindre les tissus présentant la plus forte concentration en OGA lors de son utilisation chez l'animal (Macauley et al. 2005). Enfin, le PUGNAc est efficace pour l'inhibition de la L-OGA mais pas ou peu efficace sur la S-OGA. Il semble que cette différence d'activité soit due à l'absence de la région C-terminale sur l'isoforme courte (Eun J. Kim et al. 2007).

L'inhibiteur suivant, la **GlcNAcstatine**, a été synthétisé à partir des informations obtenues par l'étude du complexe OGA-PUGNAc (Figure 14). C'est un inhibiteur compétitif qui interagit avec le site actif de l'OGA pour être converti en un composé mimant l'état de transition. Il permet l'augmentation significative des niveaux de O-GlcNAcylation et, bien qu'il inhibe faiblement les hexosaminidases A et B, il présente une sélectivité beaucoup plus importante pour l'OGA (Dorfmueller et al. 2006).

Enfin le **Thiamet G** est un inhibiteur puissant de l'OGA mis au point en 2008 et est couramment utilisé en laboratoire. Contrairement au PUGNAc, le Thiamet G est capable de traverser la barrière hématoencéphalique, ce qui le rend beaucoup plus efficace pour l'inhibition de l'OGA chez l'animal. Sa structure mime le composé intermédiaire bicyclique formé après



la prise en charge de son substrat par l'OGA et bloque ainsi le site actif de l'enzyme (Figure 14). Avec une sélectivité environ 37 000 fois plus importante pour l'OGA que pour les hexosaminidases lysosomales, le thiamet G inhibe très efficacement l'OGA et est très stable en milieu aqueux ce qui le rend aussi facile d'utilisation en laboratoire (Yuzwa et al. 2008).

#### **d- Impact des inhibiteurs sur l'expression des enzymes.**

Il est important de noter que l'utilisation des différents inhibiteurs listés ci-dessus s'accompagne souvent d'une modification des niveaux d'expression de l'OGT ou de l'OGA. Cette donnée est donc à prendre en compte lors de l'utilisation des inhibiteurs pour l'étude de la *O*-GlcNAcylation. Ainsi l'utilisation de l'Ac-5S-GlcNAc entraîne, en plus de la diminution des niveaux de *O*-GlcNAcylation, une diminution significative de l'expression de l'OGA (Gloster et al. 2011; Ortiz-Meoz et al. 2015; Andres et al. 2017). A l'inverse, l'utilisation des inhibiteurs de l'OGA comme le PUGNAc ou le thiamet G entraîne une diminution significative des niveaux d'OGT associée à une augmentation des niveaux de l'OGA (Chad Slawson et al. 2005).

Ceci suggère qu'un mécanisme de régulation se met en place lors de l'inhibition de des enzymes afin de limiter la dérégulation de la dynamique de *O*-GlcNAcylation dans les cellules. Le mécanisme régulant l'expression des enzymes de la *O*-GlcNAcylation en réponse à l'utilisation des inhibiteurs est encore peu compris. Cependant, une étude utilisant le thiamet G montre que l'augmentation des niveaux de *O*-GlcNAcylation entraîne une augmentation des niveaux d'ARNm de l'OGA sans pour autant perturber les niveaux d'OGT (Z. Zhang et al. 2014). Comme nous le verrons plus loin, l'ARN polymérase II ainsi que de nombreux facteurs de transcription sont *O*-GlcNAcylés afin de réguler leur activité. L'inhibition des enzymes de *O*-GlcNAcylation pourrait donc moduler les niveaux de glycosylation de la machinerie transcriptionnelle ainsi que l'activation de la transcription du gène de l'OGT ou de l'OGA. De



cette manière, la cellule pourrait partiellement limiter la perte de l'homéostasie de O-GlcNAcylation induite par les molécules inhibitrices.

## 2°) Détection et enrichissement des protéines O-GlcNAcylées

### a- Reconnaissance des motifs O-GlcNAc par des lectines

Historiquement, l'utilisation des lectines est la première méthode utilisée pour localiser les protéines O-GlcNAcylées avec l'association de la WGA (*Wheat germ agglutinin*) couplée à une molécule fluorescente, le FITC (Holt et Hart 1986). Les lectines sont des protéines essentiellement d'origine végétale connues pour reconnaître et se lier à un motif sucré, avec une spécificité plus ou moins importante selon la lectine considérée.

La **WGA** est une lectine capable de reconnaître à la fois les résidus de GlcNAc, uniques ou en bout de chaîne glycanique, et les acides sialiques (Finlay et al. 1987). Toutefois, la modification chimique de la WGA en succinyl-WGA (sWGA) permet de réduire le domaine de reconnaissance de cette lectine uniquement aux résidus de GlcNAc (Moullier et al. 1986). Ainsi en utilisant des colonnes contenant des billes d'agarose couplées à la sWGA, il est possible d'enrichir des extraits en protéines O-GlcNAcylées par chromatographie d'affinité (Arnold et al. 1996; Zachara, Vosseller, et Hart 2011; P. S. Banerjee, Hart, et Cho 2013). Les protéines O-GlcNAcylées retenues sur les billes sont ensuite éluées par compétition avec de la GlcNAc libre. Afin d'optimiser la spécificité de cette manipulation il est souvent nécessaire d'effectuer un pré-traitement de l'extrait à analyser avec la PNGase F (Peptide N-glycosidase F) pour limiter l'interaction de la lectine avec les résidus de GlcNAc contenus dans les N-Glycanes. La sWGA peut aussi être couplée à la peroxydase afin de détecter directement par western-blot les protéines O-GlcNAcylées, à la manière d'un anticorps.

Une nouvelle lectine pouvant se lier aux résidus de GlcNAc a été récemment identifiée et isolée à partir du champignon *Agrocybe aegerita*. Nommée **AAL-2** (*Agrocybe aegerita* lectin





2) ou **AANL**, cette lectine présente une spécificité pour les résidus de GlcNAc terminaux non réducteurs, qu'ils soient liés en  $\alpha$  ou en  $\beta$ . Ainsi le même pré-traitement des extraits par la PNGase F est requis avant utilisation de cette lectine. Elle semble cependant avoir une affinité plus importante pour la GlcNAc que la WGA et est un outil efficace pour la détection et l'enrichissement des protéines O-GlcNAcylées (Jiang et al. 2012; X. Ren et al. 2013; W. Liu et al. 2018).

Une autre lectine fongique, **PVL** (*Psathyrella Velutina lectin*) présente six sites de liaison à des résidus de GlcNAc terminaux mais, tout comme la WGA, peut aussi reconnaître les acides sialiques (Cioci et al. 2006). Les travaux de l'équipe d'Anne Imberty, en collaboration avec la nôtre, ont menés à la mise au point d'une lectine recombinante, rPVL produite chez *E. coli* qui reconnaît de manière plus spécifique les résidus de GlcNAc par rapport aux acides sialiques, faisant de cette lectine un outil efficace pour l'enrichissement et la détection de la O-GlcNAcylation à partir de lysats cellulaires (Machon et al. 2017). Enfin, une lectine synthétique polycyclique a récemment été produite pour la détection des motifs O-GlcNAcylés avec une affinité 25 fois supérieure à celle de la WGA (Rios et al. 2016).

#### **b- Les anticorps anti-O-GlcNAc**

Les anticorps spécifiques du motif O-GlcNAc sont utilisés dans un grand nombre de manipulations et permettent par exemple d'enrichir un extrait en protéines O-GlcNAcylées par immunoprécipitation et de détecter les protéines modifiées par western-blot ou directement *in cellulo* par immunofluorescence (Drougat et al. 2012; Lefebvre et al. 2013). Les anticorps RL2 et CTD110.6 sont les plus couramment utilisés en laboratoire (Zachara, Vosseller, et Hart 2011).

Le **CTD110.6** est un anticorps monoclonal efficace pour la détection de la O-GlcNAcylation mais il présente des problèmes de spécificité (Comer et al. 2001). En effet, cet anticorps reconnaît aussi l'épitope N-*linked* GlcNAc<sub>2</sub> dont la présence est induite par des



conditions de privation de glucose (Isono 2011). Le CTD110.6 possède également une affinité pour le N-N,N-diacétylchitobiose qui peut être problématique quand l'anticorps est utilisé pour de l'immunoprécipitation (Reeves et al. 2014). Enfin, le CTD110.6 reconnaît les motifs GlcNAc terminaux des N-Glycanes situés à la surface des cellules rendant le pré-traitement à la PNGase F nécessaire avant l'utilisation de l'anticorps (Tashima et Stanley 2014).

Le **RL2** est un anticorps monoclonal produit initialement pour la reconnaissance de protéines situées au niveau du complexe du pore nucléaire chez le rat (Snow, Senior, et Gerace 1987). Ces protéines étant fortement *O*-GlcNAcylées, il a été montré que l'épitope reconnu par l'anticorps n'est pas la protéine du pore nucléaire en elle-même mais bien le motif *O*-GlcNAc qu'elle porte (Holt, Snow, et al. 1987). Le RL2 présente beaucoup moins de problème de spécificité que le CTD110.6 et reste aujourd'hui l'anticorps le plus utilisé pour l'étude de la *O*-GlcNAcylation (Dehennaut, Slomianny, et al. 2008). Il est toutefois connu que cet anticorps détecte faiblement les protéines *O*-GlcNAcylées de taille inférieure à 50 KDa dans un extrait total (Reeves et al. 2014).

Les lectines et les anticorps anti-*O*-GlcNAc sont donc des outils très utilisés en laboratoire et doivent être accompagnés des contrôles adéquats. D'autres techniques de détection et d'enrichissement en protéines *O*-GlcNAcylées sont quant à elles basées sur une réaction enzymatique sélective permettant de modifier le motif *O*-GlcNAc avec un élément connu qui sera facilement détectable par la suite.

### **c- Les méthodes basées sur le marquage enzymatique**

L'enzyme initialement utilisée pour ce marquage est la  $\beta$ -1,4-galactosyltransférase (GalT) qui transfère un résidu de galactose sur les résidus de GlcNAc terminaux à partir de l'UDP-Galactose. Elle a permis notamment d'utiliser la **radioactivité** pour détecter les protéines *O*-GlcNAcylées à partir de l'UDP-[<sup>3</sup>H]-Galactose (Torres et Hart 1984; Holt et Hart 1986).



La méthode de **click-chemistry** (ou chimie-click) repose sur l'utilisation d'une galactosyltransférase mutée (Y289L) capable de prendre en charge un galactose modifié, portant un groupement qui n'existe pas naturellement, le groupement azido (GalNAz). Par la suite, différentes molécules comportant un groupement alcyne peuvent être fixées sur le GalNAz, comme une biotine ou une molécule fluorescente, *via* la réaction chimique sélective entre le groupement azido du GalNAz et l'alcyne porté par ces molécules (Clark et al. 2008; Vercoutter-Edouart et al. 2015; Thompson, Griffin, et Hsieh-Wilson 2018). L'ensemble de la méthode de *click chemistry* est souvent employé directement sur les extraits, après la lyse cellulaire. Il est aussi possible d'effectuer un marquage métabolique des protéines O-GlcNAcylées en incluant directement dans le milieu de culture des cellules une GlcNAz peracétylée (N-azidoacétylglucosamine). Après son entrée dans la cellule et sa désacétylation la GlcNAz peut intégrer la voie HBP *via* la voie de récupération de la GlcNAc pour donner l'UDP-GlcNAz et enfin être prise en charge par l'OGT (Vocadlo et al. 2003; Hahne et al. 2013). Cette méthode a été utilisée au sein de l'équipe et a permis l'identification de 32 protéines O-GlcNAcylées dans les cellules MCF7 (Gurcel et al. 2008). Il semble cependant que l'utilisation d'une GalNAz peracétylée, prise en charge par la voie de récupération de la GalNAc, induise un meilleur rendement de marquage des protéines O-GlcNAcylées que la GlcNAz. Ceci dépend de l'efficacité des différentes voie de récupération dans la prise en charge du sucre modifié et sa conversion en UDP-sucre (Boyce et al. 2011; Hart et al. 2011; Thompson, Griffin, et Hsieh-Wilson 2018).

Ainsi la *click-chemistry* est une méthode très sélective et efficace permettant l'enrichissement et/ou la détection des protéines O-GlcNAcylées. L'utilisation de la biotine-alcyne permet à la fois l'enrichissement par chromatographie d'affinité et la détection directe par western-blot via sa reconnaissance par la streptavidine (couplée à des billes d'agarose ou à une peroxydase respectivement) et l'utilisation de molécules fluorescentes permet la détection



et la localisation *in cellulo* des protéines *O*-GlcNAcylées (Dehennaut, Slomianny, et al. 2008; Hahne et al. 2013; Kupferschmid et al. 2017).

Enfin, le marquage enzymatique permet la mise en place d'une plateforme pour la fixation de molécules de **polyéthylène glycol** (PEG). Ces molécules solubles de masse moléculaire connues (de l'ordre du KDa) sont chimiquement inertes et induisent une augmentation de la masse de la protéine *O*-GlcNAcylée sur laquelle elles se fixent, augmentation visible par un shift de masse en western-blot. A raison d'un PEG par résidu de GlcNAc, et connaissant la masse initiale de la molécule, il est possible d'avoir une idée du nombre de sites *O*-GlcNAcylés sur une protéine donnée et de la stœchiométrie de chaque forme modifiée (Rexach et al. 2010; Clark, Rexach, et Hsieh-Wilson 2013).

### **3°) La spectrométrie de masse**

Les différentes manipulations d'enrichissement citées précédemment ainsi qu'une première étape de chromatographie liquide sont souvent nécessaires pour enrichir les protéines *O*-GlcNAcylées avant le passage en spectrométrie de masse en raison de la faible abondance des protéines modifiées par la *O*-GlcNAc (Chalkley et Burlingame 2003; Hahne et Kuster 2011; B. Shen et al. 2017). La spectrométrie de masse permet, en plus de détecter la *O*-GlcNAcylation sur les protéines, d'identifier le ou les sites *O*-GlcNAcylés. La connaissance de ces sites offre alors la possibilité de construire des mutants de sites de *O*-GlcNAcylation dont l'étude peut révéler l'importance de la modification sur la fonction biologique de la protéine et son impact sur les processus cellulaires (X. Cheng et Hart 2000; Hardivillé et al. 2010; Stéphanie Olivier-Van Stichelen et al. 2014).

La *O*-GlcNAcylation est hautement labile et ne modifie pas de manière significative la charge et la masse moléculaire de la protéine. Elle perturbe donc rarement le profil de migration des protéines en électrophorèse et est facilement perdue dans la plupart des analyses par





spectrométrie qui utilisent des techniques d'ionisation trop agressives comme la CID (*Collision Induced Dissociation*) ou la CAD (*Collision activated dissociation*). L'utilisation d'autres méthodes d'ionisation plus douces comme l'ECD (*Electron Capture Dissociation*) ou l'ETD (*Electron Transfert Dissociation*) permet de conserver la modification sur le résidu après fragmentation du squelette peptidique (Chalkley et al. 2009; Vercoutter-Edouart et al. 2015; J. Ma et Hart 2017).

Ainsi l'ETD est particulièrement utile pour la détection directe des sites de O-GlcNAcylation mais souffre de plusieurs inconvénients et notamment de sa faible efficacité de fragmentation limitant le nombre de sites identifiés. L'utilisation de spectromètres de masse CID/HCD (*Higher energy c-trap dissociation*) est plus répandue en laboratoire. Malgré la perte du résidu de GlcNAc, cette méthode peut être utilisée pour détecter la O-GlcNAcylation sur les protéines. Dans la plupart des cas, l'utilisation de la CID/HCD permet de s'affranchir des étapes d'enrichissement. Cependant, si la stœchiométrie de O-GlcNAcylation d'une protéine est trop faible, les peptides modifiés ne seront pas détectés par rapport aux peptides non-modifiés. Afin d'améliorer cette méthode, une approche chimique est utilisée afin de convertir la liaison O-glycosidique labile en une liaison plus stable qui sera conservée au cours de l'ionisation. Cette méthode appelée BEMAD ( *$\beta$ -elimination Michael addition with dithiothreitol*) conduit à la formation d'un substitut-dithiothreitol (DTT) qui peut être enrichi par chromatographie d'affinité avant l'analyse en spectrométrie de masse (Chalkley et al. 2009; J. Ma et al. 2015; J. Ma et Hart 2017). Enfin, la combinaison des deux techniques complémentaires HCD et ETD peut aussi être utilisée pour améliorer la détection des sites de O-GlcNAcylation (P. Zhao et al. 2011).

Il est nécessaire de garder à l'esprit que même si la spectrométrie de masse est un outil puissant pour la détection et l'identification des sites de O-GlcNAcylation, elle ne fait pas la distinction entre un résidu de GlcNAc et un résidu de GalNAc. Ainsi, afin de pouvoir identifier



un site de *O*-GlcNAcylation sans ambiguïté, la spectrométrie de masse doit être associée aux contrôles adéquats et à d'autres méthodes d'identification de la *O*-GlcNAcylation, dont celles que j'ai évoqué plus haut.

L'ensemble de ces techniques, ainsi que de nombreuses autres non présentées ici, ont été utilisées au cours de différentes études pour déterminer le rôle de la *O*-GlcNAcylation dans différents processus biologiques. Ces études révèlent que la *O*-GlcNAcylation remplit de nombreux rôles et, bien qu'ils ne soient pas encore totalement compris, il paraît évident que la dynamique de *O*-GlcNAcylation est essentielle pour le fonctionnement normal des cellules. Quelques rôles importants de la *O*-GlcNAcylation seront présentés dans les paragraphes suivants, en commençant par son implication au cours du développement embryonnaire.

## **V/ Les processus cellulaires régulés par la *O*-GlcNAcylation**

### **1°) Le développement embryonnaire**

De nombreuses études se sont penchées sur l'impact de la *O*-GlcNAcylation dans le développement embryonnaire de différents organismes dont la drosophile, le poisson-zèbre, le xénope, le rat et la souris. Ces études montrent que chaque étape du développement embryonnaire, et de l'ovogenèse chez le xénope, sont associées à un profil de *O*-GlcNAcylation particulier (Dehennaut et al. 2009; Ying Liu et al. 2012; Mariappa, Zheng, et al. 2015). Ainsi, une étude se concentrant sur les niveaux de *O*-GlcNAcylation dans des cerveaux de rat allant du 15<sup>ème</sup> jour de développement embryonnaire (E15d) à 2 ans après la naissance (P2y) montre des niveaux assez élevés à E15d. La *O*-GlcNAcylation diminue ensuite progressivement jusqu'à 3 mois après la naissance pour garder un niveau stable après ce point. Ceci suggérant l'importance de la *O*-GlcNAcylation pour les premières étapes du développement embryonnaire, et notamment pour le développement cérébral dans lequel l'OGT est naturellement fortement



exprimée (Ying Liu et al. 2012). Les deux enzymes de la dynamique de *O*-GlcNAcylation doivent donc présenter un rôle majeur au cours de ce processus.

L'activité catalytique de l'OGT est indispensable au développement embryonnaire à la fois chez la drosophile et la souris et une délétion du gène de l'OGT conduit à la mort des cellules embryonnaires (Shafi et al. 2000; Mariappa, Selvan, et al. 2015; Mariappa, Zheng, et al. 2015). Dans un modèle de souris KO pour l'OGT spécifiquement dans le tissu neuronal, les jeunes présentent des défauts sévères de locomotion et meurent dans les dix jours qui suivent la naissance (N. O'Donnell et al. 2004). Chez le poisson-zèbre, la diminution de la *O*-GlcNAcylation induite par l'extinction de l'OGT, ou à l'inverse par la surexpression de l'OGA, conduit à la formation d'embryons de taille réduite par rapport aux animaux sauvages. De plus, le cerveau de ces embryons est significativement plus petit que les sauvages confirmant l'importance de l'homéostasie de *O*-GlcNAcylation dans le développement du tissu cérébral dans ce modèle animal (Webster et al. 2009).

De son côté, l'OGA qui est fortement exprimée au niveau du placenta est tout autant indispensable au développement des mammifères. Ainsi des souris KO pour l'OGA présentent des défauts placentaires importants et une survie maximale de trois semaines après la naissance (Y. R. Yang, Jang, et al. 2015). La mort périnatale de ces souris s'explique par plusieurs points. D'un côté, le développement embryonnaire semble retardé chez les souris KO pour l'OGA et, à la naissance, elles ne possèdent pas de poumons totalement développés et fonctionnels. D'un autre côté, la dérégulation de la *O*-GlcNAcylation induite par le KO de l'OGA réduit de manière significative l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la régulation de l'homéostasie du glucose. Ainsi les souris KO présentent une hypoglycémie par rapport aux souris sauvages qui entraîne la mort périnatale (C. Keembiyehetty et al. 2015). Chez le poisson-zèbre, l'augmentation de la *O*-GlcNAcylation induite par une surexpression de l'OGT entraîne des



défauts de gastrulation conduisant à une morphologie aberrante du mésoblaste, le feuillet intermédiaire de l'embryon (Webster et al. 2009).

Tous ces résultats s'accordent sur le fait que la dynamique de *O*-GlcNAcylation doit être parfaitement régulée pour assurer un développement embryonnaire normal chez ces organismes. La dérégulation de la dynamique de *O*-GlcNAcylation entraîne des défauts de différents processus cellulaires essentiels pour la survie de l'embryon.

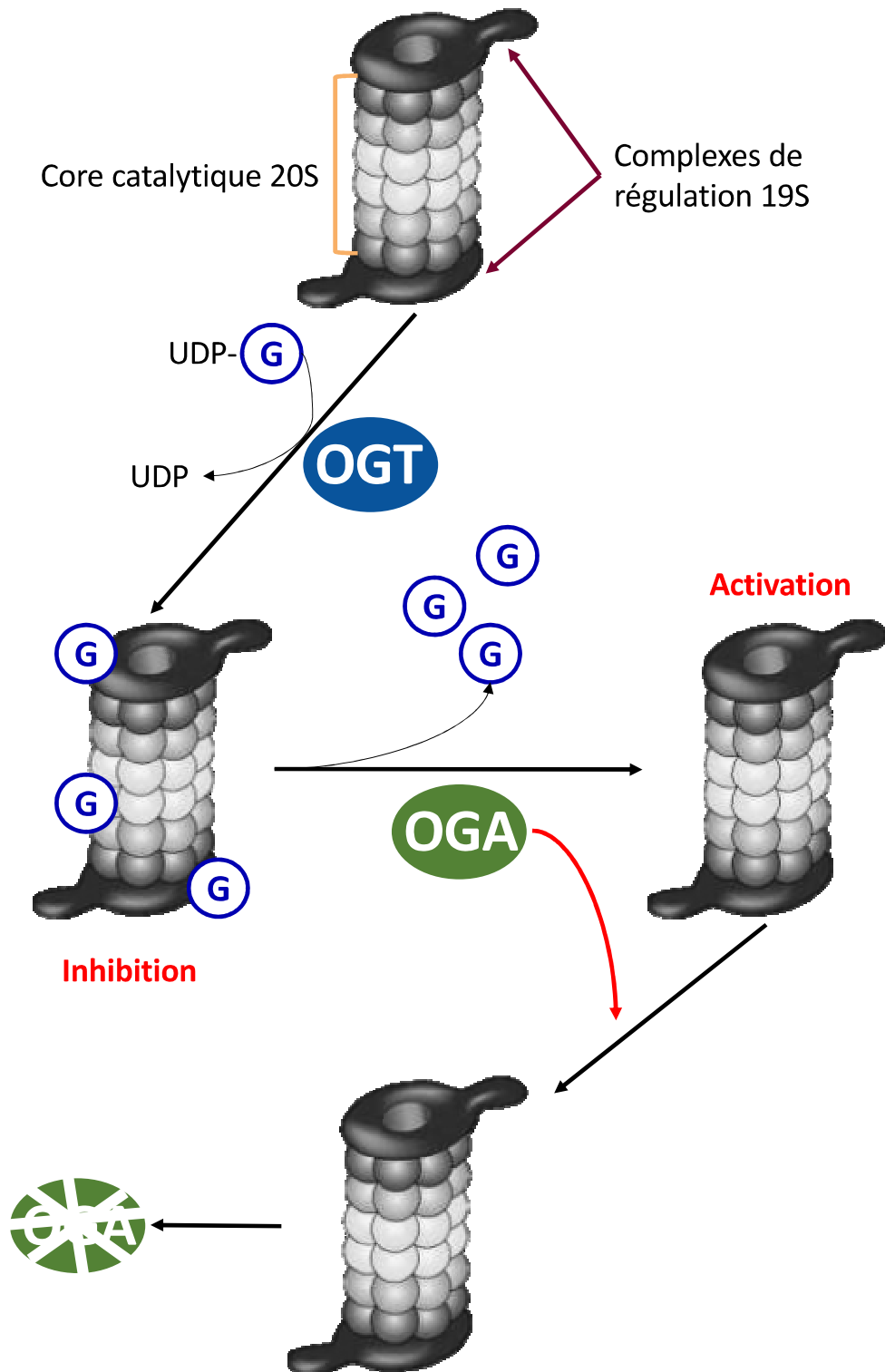
## **2°) La dégradation protéasomale**

Plusieurs études font état de l'importance de la *O*-GlcNAcylation dans la régulation de la dégradation protéasomale et donc dans la stabilité des protéines qui pourrait être compromise en cas de dérégulation de la dynamique de *O*-GlcNAcylation. La dégradation protéasomale est un processus nécessaire au maintien de l'homéostasie protéique (ou protéostasie). Cette dégradation procède selon deux grandes étapes : Tout d'abord la polyubiquitination des protéines-cibles puis leur reconnaissance et leur protéolyse par le protéasome. Comme nous le verrons dans les paragraphes suivants, il semble que la *O*-GlcNAcylation soit impliquée dans ce processus en intervenant au niveau de ces deux étapes. En effet, plusieurs études montrent que les deux enzymes de la *O*-GlcNAcylation régulent directement l'activité du protéasome. De plus, un dialogue impliquant trois modifications (la phosphorylation, l'ubiquitination et la *O*-GlcNAcylation) intervenant sur certaines protéines-cibles permet de réguler leur stabilité. Enfin, des études récentes montrent que la *O*-GlcNAcylation peut intervenir de façon co-translationnelle afin de protéger les protéines en cours de synthèse d'une dégradation prématurée.

### **a- Implications de la *O*-GlcNAcylation dans la régulation du protéasome**

Le protéasome 26S est responsable de la dégradation dépendante de l'ATP des protéines marquées par polyubiquitination dans le noyau et le cytoplasme des cellules. Il est composé

Figure 15: La régulation directe de l'activité du protéasome par la O-GlcNAcylation





d'une unité catalytique centrale cylindrique (core catalytique), le protéasome 20S, et de deux complexes de régulation 19S à chaque extrémité du cylindre. Les complexes régulateurs sont chacun composés de 20 sous-unités et sont responsables de la reconnaissance des substrats polyubiquitinylés régulant ainsi leur entrée dans la cavité du core catalytique (Navon et Goldberg 2001) (Figure 15).

L'activité du protéasome peut être régulée par des MPTs au niveau de certaines des 28 sous-unités du core catalytique ou des sous-unités des complexes 19S et parmi elles on retrouve la phosphorylation, l'acétylation et la *O*-GlcNAcylation (Sümegei et al. 2003; Overath et al. 2012). Par exemple, la sous-unité ATPasique Rpt2 du protéasome est une cible directe de l'OGT, cependant le rôle précis de la *O*-GlcNAcylation sur l'activité de la protéine reste inconnu (Fengxue Zhang et al. 2003). Il semble cependant que cette modification inhibe l'activité du protéasome car l'induction de l'augmentation de la *O*-GlcNAcylation, par des inhibiteurs de l'OGA ou *via* l'extinction de son expression, entraîne une inhibition de l'activité protéolytique du protéasome. Ceci peut conduire à l'accumulation de certaines protéines et parmi elles des protéines pro-apoptotiques et donc à l'initiation de l'apoptose comme cela a été observé dans des cerveaux de souris auxquelles la STZ a été injectée (Kan Liu et al. 2004). Mais l'augmentation de *O*-GlcNAcylation pourrait entraîner l'accumulation d'autres types de protéines conduisant à tout un panel de pathologies, comme par exemple avec l'accumulation de facteurs oncogéniques.

L'activité de l'OGA semble aussi directement impliquée dans la régulation du protéasome, et ce de manière différentielle selon l'isoforme considérée. Ici, à l'inverse de l'OGT, l'OGA participe à l'activation du protéasome (Fengxue Zhang et al. 2003). Comme évoqué plus haut, l'isoforme courte de l'OGA est recrutée à la surface des vésicules lipidiques (Walther et Farese 2009). Elle peut ainsi interagir et modifier le statut de *O*-GlcNAcylation du protéasome chargé du remodelage de la surface des vésicules pour réguler son activité. De cette



façon, la S-OGA lève l'inhibition appliquée par l'OGT et active le protéasome (Figure 15). L'extinction de l'expression de l'une ou l'autre des isoformes de l'OGA conduit à une diminution significative de l'activité du protéasome et à une accumulation des protéines polyubiquitinylées dans la cellule (C. N. Keembiyehetty et al. 2011b). Il est intéressant de noter que même si la S-OGA est responsable d'une faible proportion de l'activité *O*-GlcNAc hydrolase de la cellule, son extinction entraîne une diminution de l'activité protéasomale similaire à celle induite par l'extinction de la L-OGA. Ces données confirmant l'importance de l'OGA dans la régulation du protéasome et suggérant que ce dernier est la cible préférentielle de la S-OGA. Il est aussi intéressant de noter qu'il semble exister une réciprocity entre la régulation de l'activité du protéasome et de l'homéostasie de l'OGA puisque cette dernière, en activant le protéasome, participe à sa propre dégradation (C. N. Keembiyehetty et al. 2011b) (Figure 15). Ceci pourrait expliquer en partie pourquoi l'inhibition de l'activité de l'OGT par l'Acétyl-5S-GlcNAc est associée à une diminution de l'expression de l'OGA.

L'ensemble de ces données indiquent que l'homéostasie de la dynamique de *O*-GlcNAcylation est essentielle pour la régulation de l'activité protéasomale. Les deux enzymes participent ainsi directement à la régulation de la protéostasie et au bon fonctionnement d'un grand nombre de processus cellulaires. Des dérégulations de la dynamique de *O*-GlcNAcylation peuvent entraîner un déséquilibre dans la protéostasie et, comme nous le verrons plus tard, être à l'origine d'un ensemble de pathologies. La *O*-GlcNAcylation est aussi impliquée de manière plus indirecte dans la régulation de la stabilité des protéines via la modulation de leur ubiquitination et, dans beaucoup de cas, un dialogue phosphorylation/*O*-GlcNAcylation est au cœur de cette régulation.

## **b- Généralités sur le dialogue phosphorylation/*O*-GlcNAcylation**

Tout comme la *O*-GlcNAcylation, la phosphorylation peut intervenir sur des résidus de sérine ou de thréonine des protéines nucléocytoplasmiques et ce de manière dynamique. Par



contre, contrairement à la *O*-GlcNAcylation, une pléthore de kinases et de phosphatases régule la dynamique de phosphorylation. Les deux modifications ciblant parfois les mêmes résidus sur une protéine-cible, l'existence d'un dialogue a rapidement été envisagée. En accord avec cette idée, plusieurs études montrent que la dérégulation de la dynamique de *O*-GlcNAcylation modifie les niveaux globaux de phosphorylation, et inversement. Par exemple, une étude menée par notre laboratoire a enregistré une diminution de la *O*-GlcNAcylation globale dans une lignée cellulaire neuronale en réponse à un inhibiteur de phosphatase à large spectre, l'acide okadaïque alors que l'inhibition de l'OGA dans des cellules murines induit une diminution de la phosphorylation sur les résidus thréonine (T. Lefebvre et al. 1999; Zihao Wang, Gucek, et Hart 2008). Le dialogue entre ces deux modifications ne se limite pas à une simple compétition sur les protéines-cibles et peut intervenir à différents niveaux :

- **Directement sur les protéines-cibles.**

La stabilité, l'activité et la localisation subcellulaire de nombreuses protéines sont régulées *via* ce type de dialogue. Il peut intervenir sur le même site, les deux modifications devenant mutuellement exclusives. Dans ce cas de figure les rôles de la *O*-GlcNAcylation et de la phosphorylation sont généralement opposés, jouant le rôle d'un « bouton on/off » dans la régulation de la protéine. Le dialogue peut aussi intervenir sur des sites voisins entraînant différents scénarios. D'un côté, comme dans le cas du dialogue sur le même site, les deux modifications peuvent être mutuellement exclusives, l'encombrement stérique imposé par l'une empêche l'autre d'intervenir. C'est souvent le cas quand les deux sites modifiés sont séparés par un maximum de 10 résidus. Comme je l'ai déjà évoqué dans le paragraphe concernant l'activité catalytique de l'OGT, Leney et collaborateurs ont récemment identifié un motif spécifique pour un dialogue compétitif entre phosphorylation et *O*-GlcNAcylation : (pS/pT)P(V/A/T)(gS/gT) (Leney et al. 2017). D'un autre côté, un système de coopération peut se mettre en place avec l'une des modifications favorisant l'intervention de l'autre. Dans ce cas



de figure, la *O*-GlcNAcylation et la phosphorylation co-existent sur la protéine-cible (Figure 2) (Zeidan et Hart 2010; Zihao Wang et al. 2010; Butkinaree, Park, et Hart 2010).

#### - **Régulation mutuelle des enzymes effectrices.**

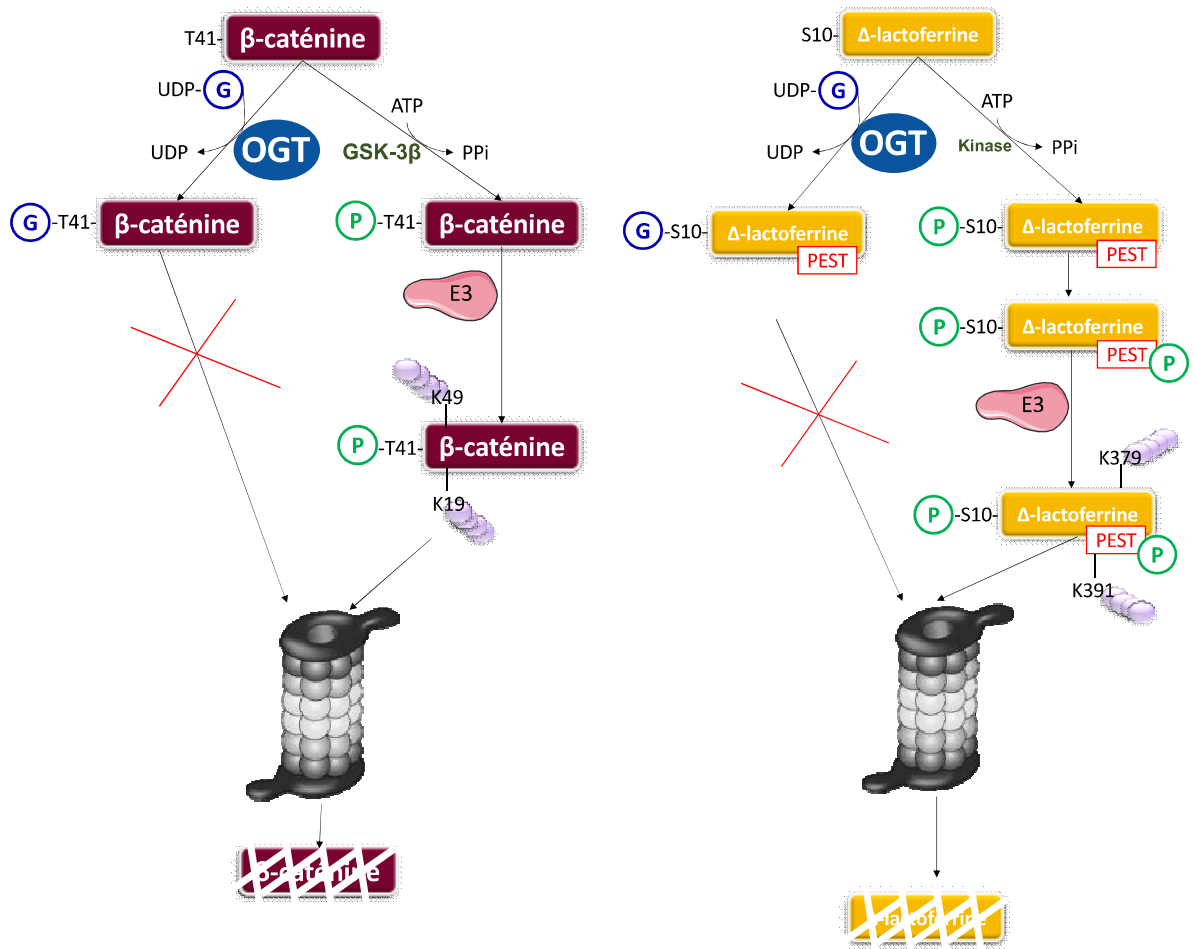
L'OGT et l'OGA sont phosphorylées et de nombreuses kinases et phosphatases sont modifiées par les enzymes de la *O*-GlcNAcylation (C. Slawson, Copeland, et Hart 2010; Dias, Cheung, et Hart 2012; Z. Li et al. 2017). De cette manière, il est possible que les deux dynamiques régulent mutuellement la stabilité et l'activité de leurs enzymes. De plus, des complexes comprenant l'OGT et/ou l'OGA associées à une kinase et/ou une phosphatase existent dans la cellule, ce qui favorise la relocalisation des enzymes à proximité de leurs protéines-cibles (C. Slawson et al. 2008).

La régulation de nombreux processus cellulaires repose sur ce dialogue entre phosphorylation et *O*-GlcNAcylation dont la transcription, le cycle cellulaire et la dégradation protéasomale. Des exemples de chaque type de dialogue seront présentés dans les paragraphes suivants. Dans le cas de la dégradation protéasomale, en plus de réguler directement le protéasome, la *O*-GlcNAcylation peut dialoguer avec la phosphorylation pour réguler une troisième modification importante dans ce processus, la polyubiquitination. Il faut noter qu'une étude de notre équipe suggère une régulation de la machinerie d'ubiquitination *via* la *O*-GlcNAcylation de l'enzyme activatrice E1, donc en amont du protéasome (Guinez et al. 2008) (Figure 9).

#### **c- La régulation de la polyubiquitination**

Une étude menée au sein de l'équipe a permis d'établir un lien entre la *O*-GlcNAcylation de la  **$\beta$ -caténine** et la régulation de sa stabilité. La  $\beta$ -caténine est un facteur de transcription et un membre clé de la voie de signalisation Wnt elle-même impliquée dans divers processus biologiques dont la progression du cycle cellulaire (Clevers 2006). La stabilité de la  $\beta$ -caténine

Figure 16: Quelques exemples de régulation de la dégradation protéasomale par compétition entre phosphorylation et O-GlcNAcylation





est régulée par un système combinant la phosphorylation de la protéine au niveau de la D box (*Destruction box*) en N-terminal et la polyubiquitination sur deux lysines (K19 et K49) (C. Liu et al. 2002). Cette dernière modification conduit à la dégradation protéasomale de la protéine. La  $\beta$ -caténine est aussi une protéine *O*-GlcNAcyllée et l'augmentation de la *O*-GlcNAcylation la protège de la dégradation (S. Olivier-Van Stichelen et al. 2012). Le site Thr-41, inclus dans la D-box, est le point central de la régulation de la stabilité de la  $\beta$ -caténine. Ce résidu est à la fois une cible de la *O*-GlcNAcylation et de la phosphorylation créant un dialogue entre les deux modifications, mutuellement exclusives dans ce cas. En effet, la phosphorylation de T41 par la kinase GSK-3 $\beta$  constitue un signal pour l'ubiquitination conduisant à la dégradation alors qu'à l'inverse, la *O*-GlcNAcylation de T41 inhibe l'ubiquitination de la protéine et la stabilise (van Noort, van de Wetering, et Clevers 2002; S. Olivier-Van Stichelen et al. 2014) (Figure 16).

Le facteur de transcription  **$\delta$ -lactoferrine** est aussi la cible d'un dialogue entre la phosphorylation et la *O*-GlcNAcylation afin de réguler sa stabilité. La  $\delta$ -lactoferrine est un suppresseur de tumeur dont l'expression entraîne un arrêt du cycle cellulaire en phase de réplication (Breton et al. 2004). La régulation de son expression et de sa stabilité est donc cruciale pour la croissance cellulaire. La sérine 10 semble être le résidu au centre de cette régulation. En effet, sa modification par l'OGT a pour conséquence d'inhiber la phosphorylation du motif PEST (Pro-Glu-Ser-Thr) qui est un signal de dégradation. Ceci empêche la polyubiquitination des sites K391 et K379 ainsi que la dégradation protéasomale de la protéine. A l'inverse la phosphorylation sur la sérine 10 favorise la phosphorylation de la séquence PEST et la polyubiquitination de la  $\delta$ -lactoferrine (Hardivillé et al. 2010) (Figure 16). Ainsi, la sérine 10 de la  $\delta$ -lactoferrine est aussi la cible d'un dialogue mutuellement exclusif entre *O*-GlcNAcylation et phosphorylation agissant comme un bouton on/off pour la dégradation de la protéine.



Le dernier exemple de cette partie concerne **p53**, un suppresseur de tumeur impliqué dans l'arrêt de la croissance cellulaire et l'apoptose en réponse à différents types de stress. En condition non pathologique les niveaux de p53 sont maintenus assez faibles pour permettre la croissance cellulaire normale et ce *via* une dégradation protéasomale rapide et continue de la protéine. La dégradation de p53 dépend de son interaction avec l'oncogène Mdm2, une E3 ubiquitine ligase. Cette interaction est favorisée par la phosphorylation sur le site T155 par des kinases associées au COP9 signalosome (CSN). A l'inverse, en condition de stress cellulaire, p53 peut être *O*-GlcNAcylé sur le site S149, au voisinage du site de phosphorylation ce qui a pour effet de diminuer l'interaction p53-Mdm2 et d'entraîner l'accumulation de p53 dans la cellule, le tout suggérant une diminution de sa dégradation. Ainsi nous avons ici une compétition entre phosphorylation et *O*-GlcNAcylation sur deux sites voisins régulant l'ubiquitination de p53 par son partenaire Mdm2 (W. H. Yang et al. 2006).

#### **d- La *O*-GlcNAcylation co-traductionnelle**

La dégradation protéasomale peut aussi toucher des protéines naissantes, en cours de traduction. Des études récentes font état de la *O*-GlcNAcylation comme régulateur de cette dégradation démontrant par la même occasion que cette modification peut aussi intervenir co-traductionnellement.

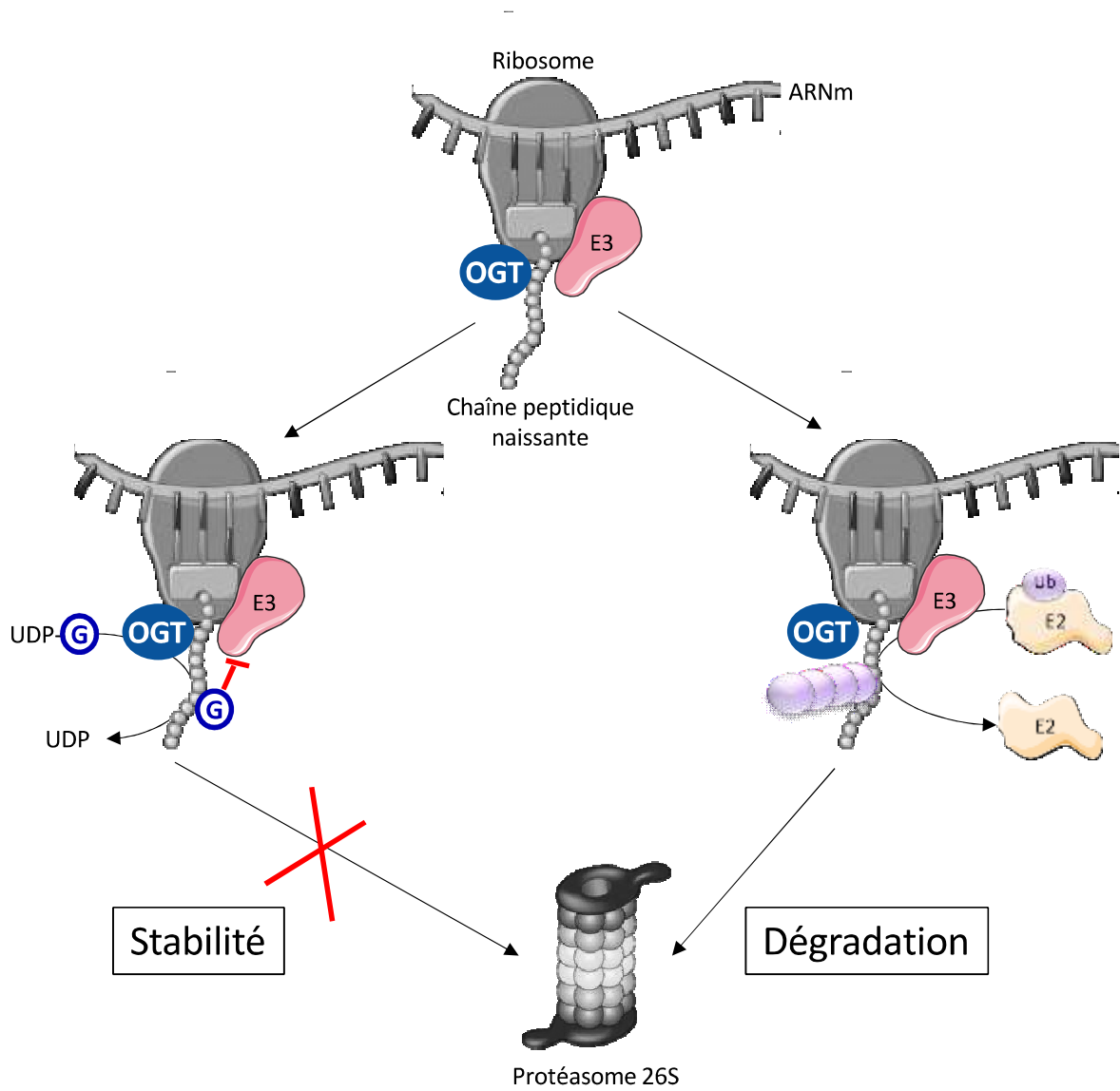
La machinerie traductionnelle a pour fonction de décoder la séquence d'ARN messager (ARNm) et de la « traduire » en séquence peptidique *via* l'activité des ribosomes. Chez les eucaryotes, ces derniers sont constitués d'une grande sous-unité (60S) et d'une petite sous-unité (40S), elles-mêmes composées d'un assemblage d'ARN ribosomal (ARNr) et de protéines (Acker et Lorsch 2008). L'activité des ribosomes est finement régulée, notamment par un ensemble de modifications post-traductionnelles dont la phosphorylation, l'acétylation et la méthylation (Odintsova et al. 2003; Y. Yu et al. 2005). A cela s'ajoute la *O*-GlcNAcylation puisqu'une étude de 2010 montre que l'OGT interagit stablement avec la machinerie de



traduction et modifie les ribosomes (Zeidan et al. 2010), ce qui suggère un rôle de l'OGT dans le processus de traduction. En effet, il a été montré récemment que l'OGT à la surface des ribosomes est capable de modifier de façon co-traductionnelle certaines protéines en cours de synthèse. Ainsi, leur aspect non-structuré à la sortie du ribosome pourrait faciliter leur entrée dans l'hélice du domaine TPR de l'OGT et la proximité du résidu à modifier avec le site catalytique. Ceci explique comment l'OGT peut modifier des sites qui semblent inaccessibles à l'enzyme dans des protéines conformées (Pathak et al. 2015)

Une étude menée sur des protéines dont la O-GlcNAcylation a été largement étudiée, le facteur de transcription Sp1 (*specificity protein 1*) et la protéine du pore nucléaire p62 (Nup62) a permis de mettre en évidence leur modification co-traductionnelle à la fois *in vitro* et *in vivo* dans une lignée cellulaire humaine. La O-GlcNAcylation de sp1 était initialement connue pour moduler ses niveaux intracellulaires *via* la régulation de sa dégradation protéasomale. La O-GlcNAcylation post-traductionnelle tend à stabiliser la protéine mature (I. Han et Kudlow 1997). Une étude menée par Zhu et collaborateurs révèle que la O-GlcNAcylation au niveau de la chaîne polypeptidique naissante de Sp1 la protège aussi de la dégradation protéasomale. De plus, il semble que la chaîne peptidique naissante soit plus fortement O-GlcNAcylée que la protéine mature suggérant que le rôle de la O-GlcNAcylation co-traductionnelle est cantonné à l'étape de la traduction de la protéine. Plusieurs résidus de GlcNAc seront retirés par la suite, après les étapes de maturation (Yanping Zhu et al. 2015). De son côté, la protéine Nup62 est modifiée par l'OGT sur au moins dix résidus et sa O-GlcNAcylation co-traductionnelle a aussi été démontrée en 2015 (L. I. Davis et Blobel 1987; D'Onofrio et al. 1988; Cordes, Waizenegger, et Krohne 1991; Yanping Zhu et al. 2015).

Figure 17: La O-GlcNAcylation co-traductionnelle



Dans le cas des deux protéines présentées ici, la *O*-GlcNAcylation co-traductionnelle a pour rôle de protéger les chaînes polypeptidiques en cours de synthèse contre l'ubiquitinylation co-traductionnelle et leur dégradation protéasomale prématurée (S. Sato, Ward, et Kopito 1998; Y. Zhu et al. 2015) (Figure 17). Le mécanisme favorisant l'ubiquitination ou la *O*-GlcNAcylation, et donc respectivement la dégradation ou la stabilité des protéines naissantes est encore inconnu. Toujours est-il que les deux modifications semblent être mutuellement exclusives, créant un dialogue régulant la stabilité des protéines en cours de traduction.

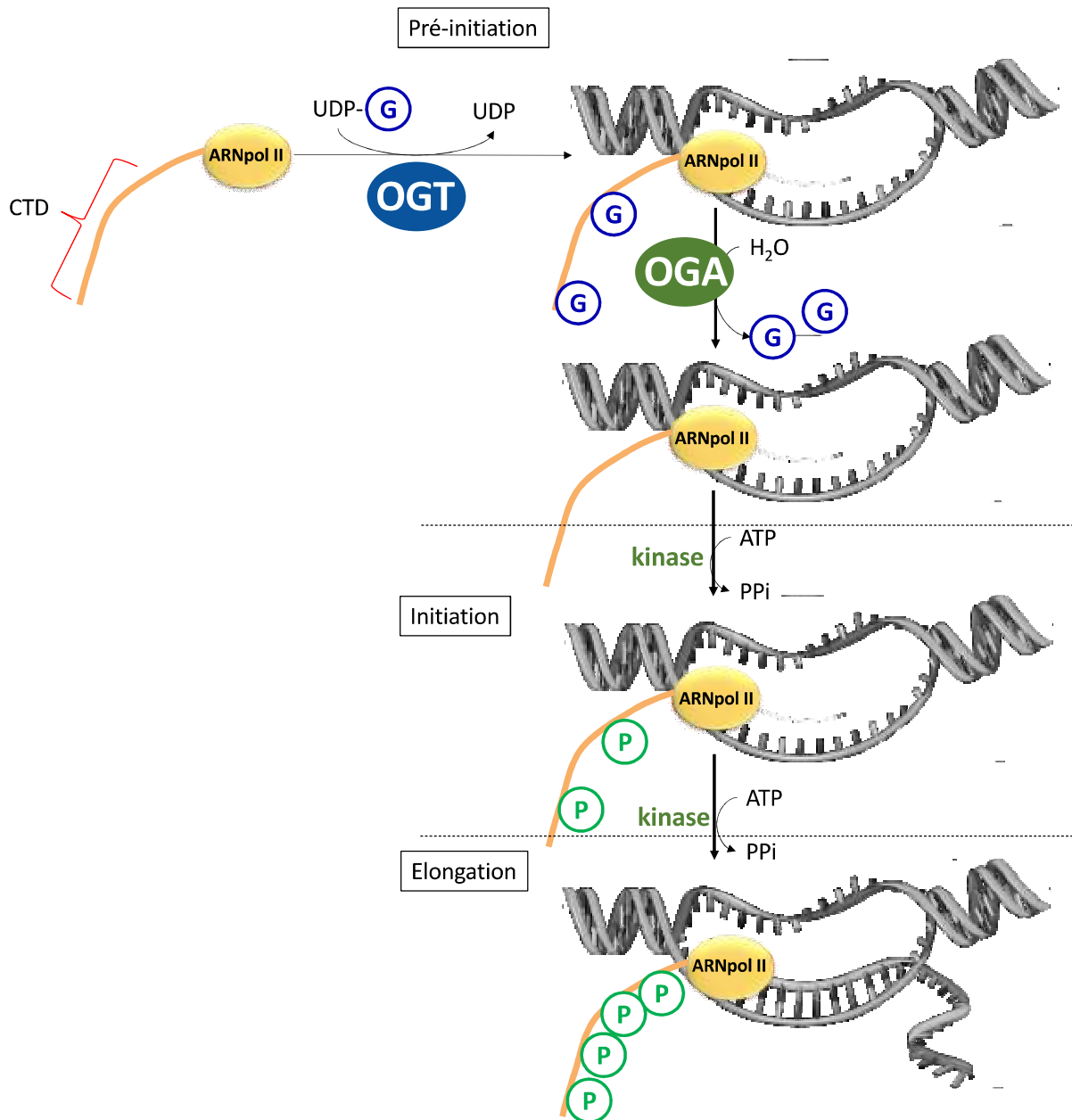
Ainsi, l'ensemble des mécanismes par lesquels la *O*-GlcNAcylation régule la stabilité des protéines font de cette modification un élément majeur de la régulation de la protéostasie cellulaire. Comme je l'ai présenté au travers de plusieurs exemples, la *O*-GlcNAcylation est (ici indirectement) impliquée dans le processus de transcription *via* la régulation de la stabilité de divers facteurs de transcription.

### **3°) La transcription**

#### **a- Implication de la *O*-GlcNAcylation dans la régulation de l'ARN polymérase II**

L'ARN polymérase II (ARNpol II) est un complexe composé d'au moins 10 sous-unités. La sous-unité la plus large présente un domaine CTD (*COOH-terminal domain*) essentiel pour la viabilité et constitué de 52 répétitions d'une séquence Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser chez les mammifères. Des phosphorylations au niveau de ce domaine, sur les résidus Ser2, 5 et 7, sont connues pour réguler l'activité de la polymérase (Egloff et Murphy 2008). De plus, le CTD est modifié par l'OGT, à la fois *in vitro* et *in vivo*, sur les sites Ser 2 et Ser 5 (Kelly, Dahmus, et Hart 1993; Ranuncolo et al. 2012; Lewis, Burlingame, et Myers 2016). Les deux modifications sont mutuellement exclusives et sont impliquées dans la régulation de différentes étapes de la transcription. La phosphorylation assure la transition entre l'initiation et l'élongation alors que la *O*-GlcNAcylation est essentielle pour la formation du complexe de pré-initiation et la

**Figure 18: Régulation de l'ARN polymérase II par un dialogue phosphorylation/O-GlcNAcylation sur son domaine CTD**





régulation de l'initiation de la transcription (Comer et Hart 2001; Ranuncolo et al. 2012) (Figure 18).

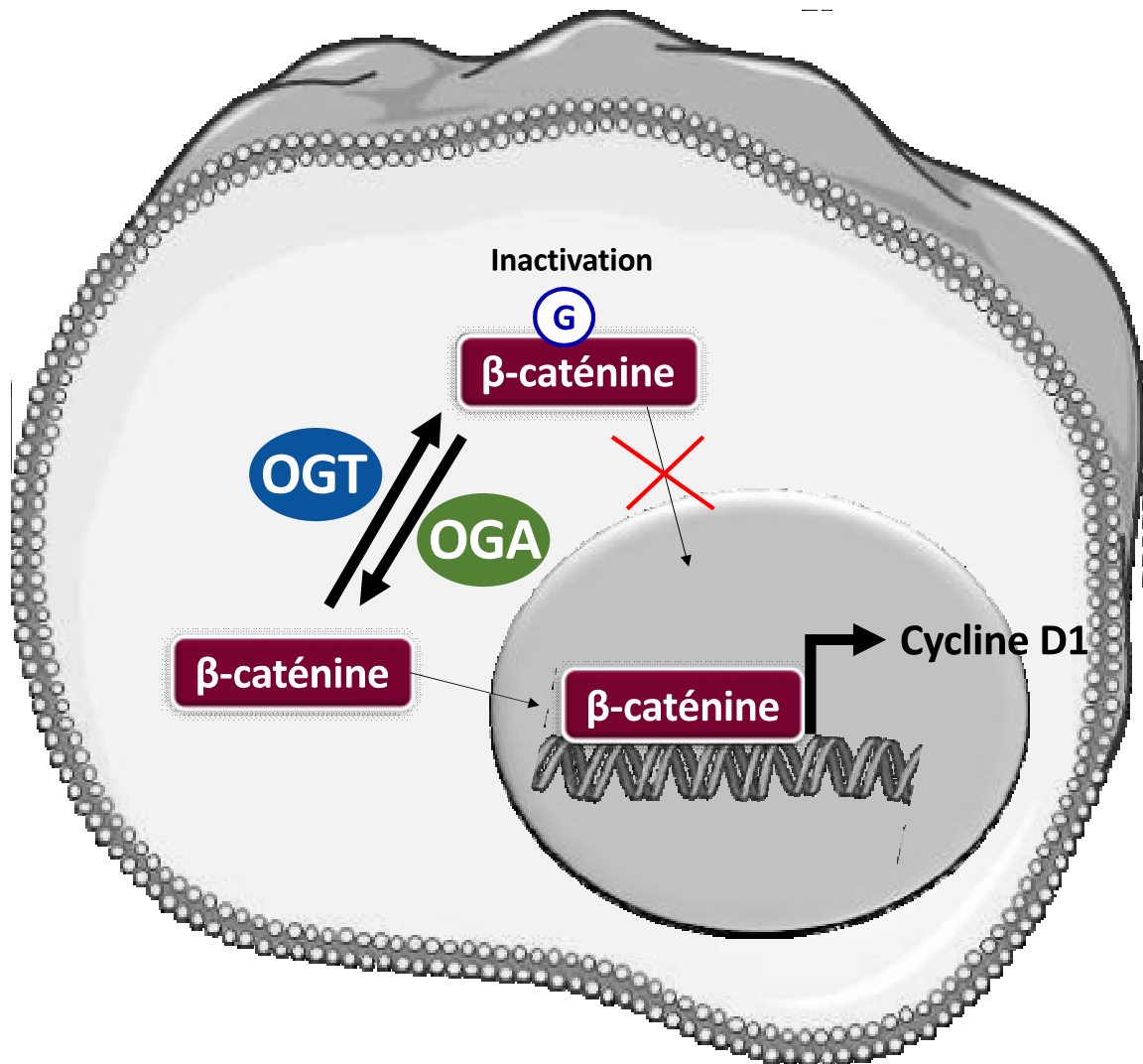
L'OGT semble aussi nécessaire au recrutement de la pol II au niveau des promoteurs puisque qu'une extinction de l'enzyme entraîne une diminution significative de l'occupation des promoteurs par la polymérase (Lewis, Burlingame, et Myers 2016) (Figure 18). Une étude récente menée *in vitro* montre que l'OGA est également impliquée dans les étapes d'initiation et d'élongation *via* la déglycosylation du CTD, libérant ainsi des résidus hydroxylés qui peuvent être phosphorylés pour activer la polymérase (Resto et al. 2016).

### **b- Quelques facteurs de transcription régulés par la O-GlcNAcylation**

De nombreux facteurs de transcription associés à l'ARN polymérase II sont aussi régulés, positivement ou négativement, par la O-GlcNAcylation. La modification peut moduler directement l'activité transcriptionnelle du facteur ou sa localisation subcellulaire, régulant ainsi son accès à la chromatine. J'ai aussi déjà évoqué précédemment quelques exemples de facteurs de transcription dont la stabilité est régulée par l'OGT.

Le facteur **Sp1** contient deux domaines d'activation riches en glutamine en N-terminal. Chaque domaine est associé à une région riche en sérines et en thréonines. Sp1 est O-GlcNAcylé au niveau de la région Cter du second domaine d'activation, le site principal étant la sérine 491 chez l'homme (Jackson et Tjian 1988). Ce domaine en particulier est nécessaire à l'homomultimérisation du facteur et à son interaction avec le facteur de transcription général TFIID. Sa O-GlcNAcylation inhibe la capacité de Sp1 à activer la transcription, probablement *via* une inhibition des interactions avec ses partenaires (X. Yang et al. 2001). Deux autres facteurs de transcription de la famille Sp, **Sp3** et **Sp4**, sont eux aussi O-GlcNAcylés au niveau de leur domaine d'activation, avec le même effet inhibiteur de la modification (C. Ha et Lim 2015). A l'inverse, la O-GlcNAcylation de Sp1 en C-terminal, au niveau du domaine de liaison

Figure 19: Représentation schématique de la régulation de la localisation subcellulaire de la  $\beta$ -caténine par O-GlcNAcylation



à l'ADN, induit une augmentation de son activité transcriptionnelle (X. Yang et al. 2001; C. Ha et Lim 2015).

La O-GlcNAcylation de la  **$\beta$ -caténine**, en plus de réguler la stabilité de la protéine, est impliquée dans la régulation de sa localisation nucléaire. En effet, la  $\beta$ -caténine oscille continuellement entre le compartiment cytoplasmique et nucléaire selon les besoins de la cellule (Clevers 2006). Il semble que la O-GlcNAcylation de la  $\beta$ -caténine sur la Ser23 dans le cytoplasme inhibe son import dans le noyau, inhibant par la même occasion son activité transcriptionnelle (Figure 19) (Sayat et al. 2008; J. R. Ha et al. 2014). La modification de la protéine est ainsi associée à une diminution significative des niveaux de l'ARNm de la cycline D1, l'une de ses cibles, qui est un régulateur essentiel de la progression du cycle cellulaire (S. Olivier-Van Stichelen et al. 2012). De manière intéressante, la modification ne semble pas inhiber l'export nucléaire de la  $\beta$ -caténine O-GlcNAcylée. Ceci indique que la O-GlcNAcylation impacte spécifiquement l'import nucléaire, peut-être en inhibant l'interaction de la  $\beta$ -caténine avec les protéines du pore nucléaire. En effet, le facteur de transcription est connu pour entrer dans le noyau *via* son interaction directe avec les protéines du complexe du pore nucléaire et ce, de manière indépendante d'une séquence NLS ou d'un quelconque transporteur (Fagotto, Glück, et Gumbiner 1998; Koike et al. 2004). D'un autre côté, la O-GlcNAcylation pourrait renforcer l'interaction de la  $\beta$ -caténine avec certains partenaires cytoplasmiques, entraînant sa séquestration dans le cytoplasme (Barth et al. 1997, 1). Cependant, ces hypothèses nécessitent encore d'être confirmées.

Enfin, le facteur de transcription **SRF** (*Serum response factor*) est connu pour se fixer au niveau des SRE (*Serum response element*) des promoteurs inductibles après stimulation des cellules par des facteurs de croissance. Ceci induit l'expression de nombreux gènes dont ceux impliqués dans l'entrée dans le cycle cellulaire et la prolifération. SRF est une protéine de 508 acides aminés qui se lie à l'ADN après sa dimérisation, *via* un domaine de liaison situé entre



les résidus 133 et 222. La région C-terminale de SRF présente quant à elle un domaine d'activation dans lequel on retrouve quatre résidus sérine O-GlcNAcylés (Reason et al. 1992).

#### **4°) La régulation épigénétique**

Le dernier point que j'évoquerai pour cette partie concerne l'implication de la O-GlcNAcylation dans la régulation épigénétique. Ce sujet a fait l'objet d'une revue parue en 2017 (Leturcq, Lefebvre, et Vercoutter-Edouart 2017). L'épigénome regroupe toutes les modifications post-traductionnelles pouvant intervenir sur les histones ainsi que la méthylation de l'ADN. L'ensemble de ces modifications module la structure de la chromatine et régule l'expression des gènes. En effet, l'état de compaction de la chromatine est un élément essentiel dans la régulation de la transcription facilitant ou non l'accès de la machinerie de transcription aux promoteurs. La compaction de la chromatine est aussi modulée au cours du cycle cellulaire pour permettre le passage des ADN polymérase pendant la phase de réplication de l'ADN et la condensation des chromosomes pendant la mitose (Y. Ma, Kanakousaki, et Buttitta 2015).

##### **a- La O-GlcNAcylation et le code histone**

Dans le noyau des cellules eucaryotes, la molécule d'ADN est organisée sous forme de chromatine, plus ou moins condensée selon les besoins de la cellule, et constituée d'un assemblage de nucléosomes. Ces derniers se composent de 146 paires de base d'ADN enroulées autour d'un octamère d'histones appelé « *core histone* ». Ce complexe octamérique contient deux copies de chacun des histones suivants : H2A, H2B, H3 et H4 (Luger et al. 1997). Comme je l'ai évoqué précédemment, la compaction de la chromatine est un événement dynamique qui est finement régulé lors des processus de transcription, de réplication et de réparation de l'ADN, notamment *via* les MPTs des histones. En effet, les histones sont la cibles de nombreuses modifications post-traductionnelles dont la phosphorylation, l'ubiquitination, l'acétylation et la méthylation formant ainsi le « code histone » régulant l'interaction des histones avec l'ADN et



avec leurs partenaires protéiques (Sims et Reinberg 2008; Tessarz et Kouzarides 2014; Singh et al. 2015). Récemment, la *O*-GlcNAcylation s'est ajoutée aux MPTs du code histone qu'elle peut moduler à la fois directement et indirectement.

La *O*-GlcNAcylation des histones, bien que controversée, a été démontrée par plusieurs techniques dont la détection par les anticorps spécifiques de la *O*-GlcNAcylation CTD110.6 et RL2 à partir de lysats cellulaires totaux ou d'histones immunoprécipitées, l'enrichissement grâce à la lectine WGA ou par *click chemistry* et la détection par spectrométrie de masse. Plusieurs sites de *O*-GlcNAcylation ont ainsi été identifiés sur les histones dont Thr-101 de H2A, Ser-36 de H2B, Ser-10/Thr-32 de H3 et Ser47 de H4 (Sakabe, Wang, et Hart 2010; S. Zhang et al. 2011; Fong et al. 2012; Gagnon et al. 2015). Une partie de la *O*-GlcNAcylation des histones est impliquée dans la régulation de la condensation des chromosomes pendant la mitose, j'en parlerai donc dans la partie suivante dédiée aux implications de la *O*-GlcNAcylation au cours du cycle cellulaire.

Un dialogue existe entre la *O*-GlcNAcylation et la monoubiquitination sur l'histone H2B régulant l'activation de la transcription. L'histone H2B est *O*-GlcNAcyllée sur la sérine 112 à la fois *in vitro* et *in vivo* dans des cellules HeLa, à proximité d'un site connu de monoubiquitination, la lysine 120. De manière intéressante, l'augmentation de la *O*-GlcNAcylation sur le site S112 induite par une incubation des cellules avec du glucose est suivie de la monoubiquitination de K120. A l'inverse, l'extinction de l'OGT abolit ce dialogue entre les deux modifications. Ceci suggère que la *O*-GlcNAcylation facilite l'ubiquitination de K120 peut-être en participant au recrutement de l'ubiquitine ligase responsable de cette modification, RNF20/40. La monoubiquitination de K120 est associée à une transcription active de certains gènes impliqués dans le cycle cellulaire, notamment en réponse à un stress génotoxique (F. Zhang et Yu 2011). De plus, l'histone H2B *O*-GlcNAcyllée sur la S112 est principalement retrouvée au niveau de l'euchromatine, la chromatine décondensée favorisant





la transcription, et beaucoup moins sur l'hétérochromatine (ou chromatine inactive, condensée) (Fujiki et al. 2011). Ainsi l'OGT participerait à l'activation de la transcription en facilitant la monoubiquitination de l'histone H2B.

Cependant, des travaux menés en 2015 font état de la non-détection de la O-GlcNAcylation des histones chez les mammifères, ce qui entre en contradiction avec les éléments présentés plus tôt. En effet, quelque soient le type cellulaire et la phase du cycle considérée, les auteurs ne détectent pas de O-GlcNAcylation significative des histones (Gagnon et al. 2015). Ils suggèrent donc que la modification des histones doit s'effectuer à des niveaux trop faibles pour être détectable par les méthodes actuelles. D'après eux, la détection de la O-GlcNAcylation des histones reportée par d'autres groupes s'explique par la présence de faux positifs, dans le cas d'une analyse d'un grand nombre de protéines en même temps, ou par le fait que les histones soient retrouvées en grand nombre dans la cellule, ce qui pourrait compenser le faible niveau de O-GlcNAcylation sur chaque protéine et permettre ainsi la détection de leur glycosylation (Gagnon et al. 2015).

La O-GlcNAcylation peut aussi moduler de manière indirecte le code histone en régulant l'activité de certaines enzymes catalysant différentes MPTs des histones. Par exemple, l'OGT interagit stablement avec la protéine de la famille des méthyltransférases, **MLL5** (*Mixed lineage leukemia 5*) qui catalyse la triméthylation de l'histone H3 sur sa lysine 4 (H3K4me3) (H. Wu et Zhang 2014). Cette modification active la transcription de certains gènes, notamment des gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire (P. Zhou et al. 2013). La stabilité de MLL5 est régulée par la formation d'un complexe principalement nucléaire avec l'OGT et la déubiquitinase USP7. Cette dernière protège MLL5 de la dégradation protéasomale en diminuant son ubiquitination, augmentant ainsi sa stabilité et favorisant la méthylation de H3. De manière intéressante, l'extinction de l'expression de l'OGT entraîne la dégradation



protéasomale de MLL5 indiquant que l'OGT pourrait coopérer avec USP7 afin de protéger MLL5 de l'ubiquitination et donc de la dégradation (Ding et al. 2015).

### **b- La O-GlcNAcylation de la chaperone HIRA**

L'état de compaction de la chromatine dépend fortement de la voie d'assemblage des nucléosomes dans laquelle les histones chaperones jouent un rôle majeur (Ransom, Dennehey, et Tyler 2010, 20). *In vitro*, les histones chargées positivement s'associent de manière aléatoire avec l'ADN chargé négativement. Les histones chaperones permettent donc *in vivo* de réguler cette association pour assurer la formation de nucléosomes bien définis (Venkatesh et Workman 2015). Les modifications post-traductionnelles des histones peuvent moduler les interactions entre l'histone et la chaperone qui la prend en charge. La O-GlcNAcylation, et particulièrement l'OGT, semble être un élément important dans la régulation de l'activité de ces chaperones.

Le complexe **HIRA** (*Histone cell cycle regulator*) régule, en association avec la protéine ASF1a, l'incorporation du variant histone H3.3 dans les nucléosomes. Ceci a pour effet de les déstabiliser et de favoriser l'activation de la transcription. Le complexe HIRA est composé de HIRA, UBN1 (*Ubinuclein 1*) et CABIN1 (*Calcineurin-binding protein 1*) et peut interagir avec différentes protéines pour réguler sa distribution sur la chromatine (Pchelintsev et al. 2013). Une étude de 2016 montre que l'OGT interagit avec le complexe HIRA *via* une interaction directe avec la sous-unité UBN1. HIRA est O-GlcNAcylée et il semble que cette modification soit nécessaire pour la formation du complexe HIRA-H3.3. En effet, la mutation du site de O-GlcNAcylation de HIRA en alanine (S231A) entraîne une diminution de l'incorporation de l'histone H3.3 à la chromatine, suggérant un défaut dans la prise en charge de l'histone par HIRA (J.-S. Lee et Zhang 2016).



### c- Implication de la O-GlcNAcylation dans la méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN en position 5 des cytosines (5mC) est une modification épigénétique dynamique des îlots CpG chez les mammifères catalysée par une ADN méthyltransférase (DNMT ; DNA Methyltransferase) qui utilise le donneur S-Adénosylméthionine (SAM). La méthylation de l'ADN est un répresseur de la transcription puisqu'elle inhibe les interactions entre l'ADN et la machinerie transcriptionnelle, et elle est reconnue par des protéines qui facilitent le recrutement des histone-désacétylases (HDACs) et des histoneméthyltransférases (HMTs). La modification de code histone a pour effet de condenser la chromatine, empêchant ainsi la fixation des protéines impliquées dans la transcription.

A l'inverse, la déméthylation de l'ADN entraîne la décompaction de la chromatine et active la transcription. Elle peut s'effectuer selon un mécanisme passif dépendant de la réplication de l'ADN ou selon un mécanisme actif faisant intervenir différentes enzymes dont les dioxygénases de la famille TET (*ten-eleven translocation*) (H. Wu et Zhang 2014). Les trois membres de cette famille, TET1, 2 et 3, catalysent la conversion des 5-méthylcytosines en 5-hydroxyméthylcytosines (5hmC) (Tahiliani et al. 2009; Pastor, Aravind, et Rao 2013).

Chacune des protéines TET peut former un complexe avec l'OGT dans le noyau. Certaines études suggèrent que la formation de ce complexe facilite le recrutement de l'OGT au niveau de la chromatine afin d'augmenter la O-GlcNAcylation des histones (Vella et al. 2013; Ito et al. 2014). C'est le cas des protéines TET2 et TET3 qui interagissent avec l'OGT afin de la recruter à la chromatine pour réguler la transcription *via* la O-GlcNAcylation des histones (Q. Chen et al. 2013; Deplus et al. 2013). L'étude de Deplus et collaborateurs montre aussi que l'interaction des protéines TET2 et TET3 avec l'OGT induit la O-GlcNAcylation de plusieurs protéines dont HCF-1 que j'ai déjà évoqué plus haut, et participe à la méthylation de l'histone H3 (H3K4me3) *via* le recrutement d'autres facteurs à la



chromatine (Deplus et al. 2013). Ce dernier évènement contribue à l'activation de la transcription. TET1 semble aussi nécessaire pour le recrutement de l'OGT à la chromatine, notamment au niveau des promoteurs de gènes, puisque l'absence de TET1 entraîne une diminution de l'OGT à la chromatine (Vella et al. 2013).

D'autres études indiquent plutôt que l'OGT modifie les protéines TET afin de réguler leur stabilité et leur localisation subcellulaire. Ainsi, Zhang et collaborateurs montrent que l'OGT interagit avec et modifie la protéine TET3 ce qui induit son export nucléaire, diminuant ainsi son activité de déméthylation de l'ADN. D'après cette même étude, la O-GlcNAcylation de TET1 ou TET2 ne modifie ni leur activité enzymatique, ni leur localisation subcellulaire suggérant une régulation différentielle des protéines TET par l'OGT (Q. Zhang et al. 2014). Toutefois une étude de 2013 montre que chez la souris, l'OGT régule positivement les niveaux d'expression de TET1 et augmente par ce biais la répression de la transcription (F.-T. Shi et al. 2013). L'ensemble de ces études suggère fortement une implication de la dynamique de O-GlcNAcylation dans la régulation de la méthylation et donc de la compaction de l'ADN.

#### **d- Interaction de l'OGT avec les protéines du groupe Polycomb**

Les protéines du groupe Polycomb (PcG) s'assemblent selon différents complexes dont les plus connus sont PRC1 et PRC2 (*Polycomb repressive complex*) et qui jouent un rôle important dans différents processus dont le développement embryonnaire (J. A. Simon et Kingston 2009; Aloia, Di Stefano, et Di Croce 2013). PRC1 participe à la monoubiquitination de H2A ce qui inhibe l'élongation de la transcription. PRC2 est impliqué dans la di- et triméthylation de H3K27 qui réprime la transcription.

La sous-unité catalytique de PRC1, **RING1B** est O-GlcNAcylée sur plusieurs sites : Thr250/Ser251 et Ser278. La O-GlcNAcylation de RING1B semble moduler son interaction avec l'ADN et serait donc impliquée dans la régulation de l'activité de PRC1. De manière





intéressante, RING1B est différentiellement O-GlcNAcylée au cours de la différenciation de cellules embryonnaires et les différentes formes glycosylées n'ont pas la même distribution sur le génome. Alors que la forme hypo-O-GlcNAcylée de RING1B est plutôt retrouvée à proximité de gènes impliqués dans le cycle cellulaire, la forme O-GlcNAcylée est localisée au niveau des gènes impliqués dans le développement neuronal. Ainsi la dynamique de O-GlcNAcylation peut réguler le ciblage des gènes par PRC1 et participe ainsi à la différenciation des cellules souches embryonnaires (Maury et al. 2015).

D'un autre côté, l'OGT interagit avec la sous-unité catalytique **EZH2** (*enhancer of zeste 2*) et la modifie sur sa sérine 75 pour augmenter sa stabilité et favoriser la répression des gènes. En effet, selon une étude de Chu et collaborateurs, l'extinction de l'expression de l'OGT entraîne une diminution significative de H3K27me3, sans pour autant modifier d'autres sites de méthylation sur l'histone H3, ainsi qu'une déstabilisation de EZH2. Il semblerait donc que l'OGT régule spécifiquement la méthylation H3K27me3 au travers de la stabilisation de EZH2 (C.-S. Chu et al. 2014).

L'ensemble de ces données indiquent que la dynamique de O-GlcNAcylation est impliquée dans la régulation épigénétique de manière directe, ou indirecte. Cette régulation est très complexe, fait intervenir de nombreux facteurs et peut aboutir à la fois à l'inhibition ou à l'activation de la transcription.



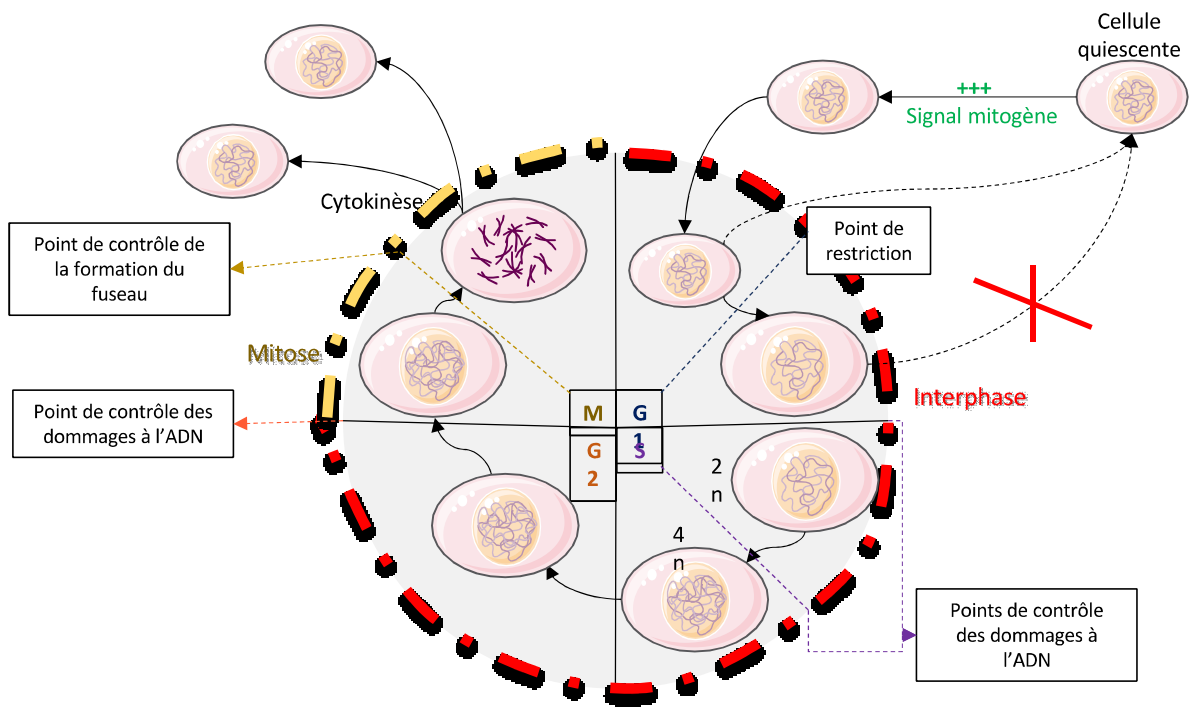
## **Partie 2 : Les implications de la O-GlcNAcylation dans le cycle cellulaire**

### **I/ Généralités sur le cycle cellulaire**

Le cycle cellulaire, ou division cellulaire, est un processus extrêmement régulé dont la fonction est de produire, à partir d'une cellule-mère unique, deux cellules-filles génétiquement identiques. Ce processus est essentiel dans toute la vie d'un individu, du stade embryonnaire à l'âge adulte. Par exemple chez l'homme, la division cellulaire permet de passer du zygote, l'ovocyte fécondé, à un être humain adulte composé d'environ  $3.10^{13}$  (30 000 milliards) de cellules (Sender, Fuchs, et Milo 2016). De plus, le cycle cellulaire permet de remplacer les cellules qui disparaissent au cours de la vie de l'individu suite, entre autres, au mécanisme de mort programmée, l'apoptose. Le cycle cellulaire est un processus assez conservé chez les eucaryotes avec tout de même des spécificités chez certains organismes notamment au niveau de la régulation du cycle (Harashima, Dissmeyer, et Schnittger 2013; L. Cao et al. 2014).

Dans l'organisme, toutes les cellules ne se divisent pas constamment et la plupart reste dans un état non prolifératif, la phase de quiescence (G0), pendant laquelle leur taille et leur métabolisme sont réduits. Ainsi le cycle cellulaire est un processus qui doit être déclenché, selon les besoins de l'individu, par des signaux appelés mitogènes, regroupant un ensemble de facteurs de croissance et d'hormones. Suite à cette stimulation, les cellules quiescentes intègrent le cycle cellulaire jusqu'à atteindre un point de non-retour que l'on nomme point de restriction (Zetterberg et Larsson 1985; Zetterberg, Larsson, et Wiman 1995). Au-delà de ce point, les cellules poursuivront le cycle cellulaire jusqu'à la production des deux cellules-filles indépendamment de tout stimulus extérieur.

Figure 20: Le cycle cellulaire et ses différents points de contrôle



Le cycle cellulaire est composé de 4 phases, dont les trois premières constituent l'interphase pendant laquelle l'ADN est répliqué. Le cycle se termine par la phase de mitose qui consiste en la répartition des chromosomes dans chaque cellule-fille, génétiquement et morphologiquement identiques entre elles et à la cellule-mère.

La première phase, la phase G1 (*Gap 1* ; *Gap* signifiant « intervalle »), est une étape de préparation durant laquelle la cellule induit la transcription des gènes, et la synthèse des protéines nécessaires à la prochaine phase. C'est aussi la phase la plus variable de tout le cycle cellulaire car sa durée dépend du type cellulaire et des conditions environnementales dans lesquelles se trouvent les cellules. Ainsi la taille de la cellule augmente avant le passage à la phase de réplication, ou synthèse, de l'ADN (phase S). C'est au cours de cette phase que la cellule duplique son ADN, en passant de  $2n$  à  $4n$  chromosomes, afin d'assurer le transfert de son matériel génétique à chaque cellule-fille. Plusieurs mécanismes de régulation, que je décrirai dans une partie dédiée à la réplication, sont mis en jeu ici pour assurer la réplication la plus fidèle possible de l'ADN parental et empêcher un second cycle de synthèse au cours du même cycle cellulaire. Ainsi, si la phase de réplication s'est déroulée sans erreur, la cellule-mère peut entrer en phase G2 (*Gap 2*). A l'issue de la phase G1, cette étape est une phase de préparation et de croissance de la cellule avant d'entrer en mitose (phase M). Au cours de cette dernière phase, l'enveloppe nucléaire disparaît, la chromatine se condense et les deux jeux de chromosomes se séparent dans les cellules filles, physiquement dissociées lors de la dernière étape de la mitose, la cytokinèse (Figure 20). Les cellules-filles peuvent alors entamer un autre cycle cellulaire ou entrer en phase de quiescence.

Le cycle cellulaire est un processus finement régulé pendant lequel les phases se succèdent dans un ordre précis et une phase ne peut pas commencer tant que la précédente n'est pas terminée. Ainsi, plusieurs points de contrôle (*Checkpoints*) sont mis en place à des moments clés du cycle cellulaire afin de vérifier que chaque phase se déroule sans erreur.



Les deux principaux sont les points de contrôle de la structure de l'ADN et le contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique. La structure de l'ADN est contrôlée à trois niveaux : A la transition G1/S, pendant la phase S et à la transition G2/M (Sancar et al. 2004). Le point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique s'effectue quant à lui entre la métaphase et l'anaphase de la mitose (E. A. Nigg 2001) (Figure 20). Dans le cas où une anomalie est identifiée, le cycle cellulaire est bloqué et différents mécanismes sont mis en place pour réparer au mieux l'erreur. Malgré tous ces contrôles, il se peut que certaines anomalies soient tout de même transmises aux cellules-filles conduisant à différentes pathologies dont les cancers, comme nous le verrons plus tard.

La régulation de la progression du cycle est assurée par différents processus dont les modifications post-traductionnelles dépendantes du cycle, la principale étant la phosphorylation assurée par les complexes cycline/CDK. De nombreuses études ont aussi mis en évidence une implication de la O-GlcNAcylation dans la régulation du cycle cellulaire. En effet, cette modification évolue de façon dépendante du cycle cellulaire et, comme nous le verrons plus loin, l'extinction, ou l'inhibition, de l'OGT et/ou de l'OGA impacte le cycle cellulaire de différentes manières, même si tous les mécanismes moléculaires impactés sont loin d'être tous connus.

## **II/ Les variations de la O-GlcNAcylation au cours du cycle cellulaire**

### **1°) Quelques exemples de méthodes de synchronisation**

Afin de pouvoir évaluer les niveaux de O-GlcNAcylation en fonction de la progression du cycle cellulaire, la mise en place de méthodes de synchronisation cellulaire efficaces est nécessaire. Plusieurs méthodes peuvent être utilisées et parmi elles nous pouvons distinguer la

Figure 21: Quelques exemples de méthodes de synchronisation cellulaire

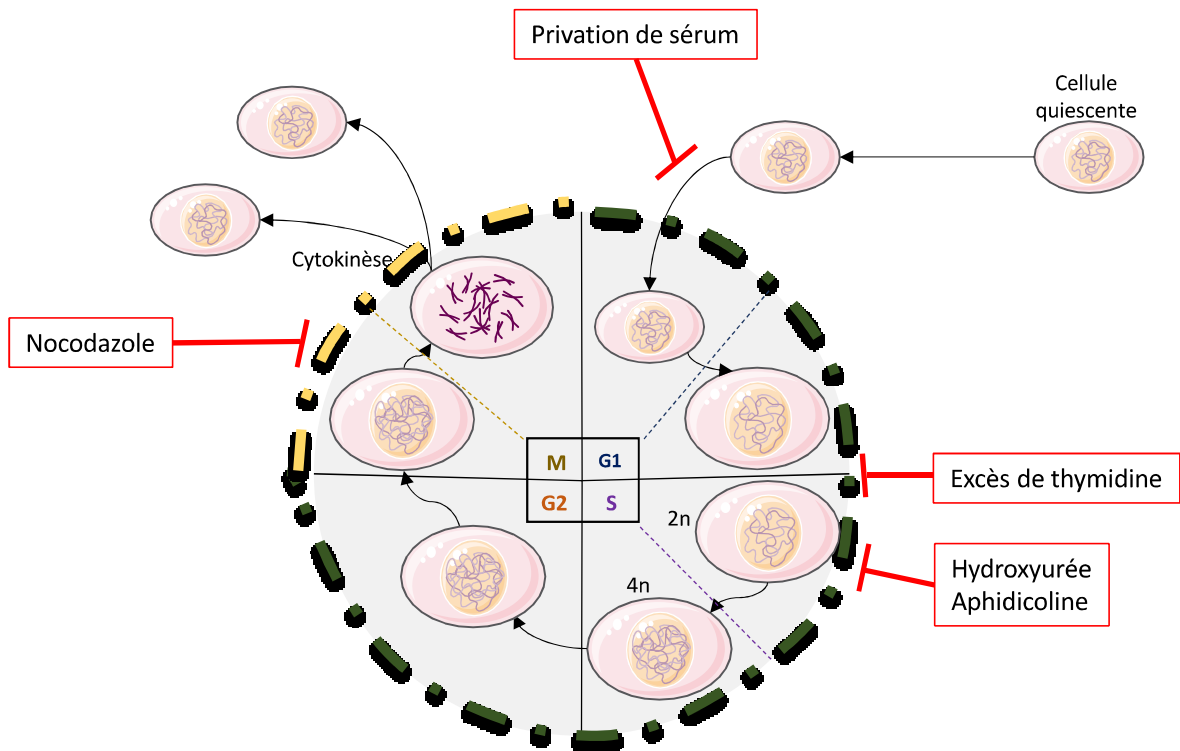
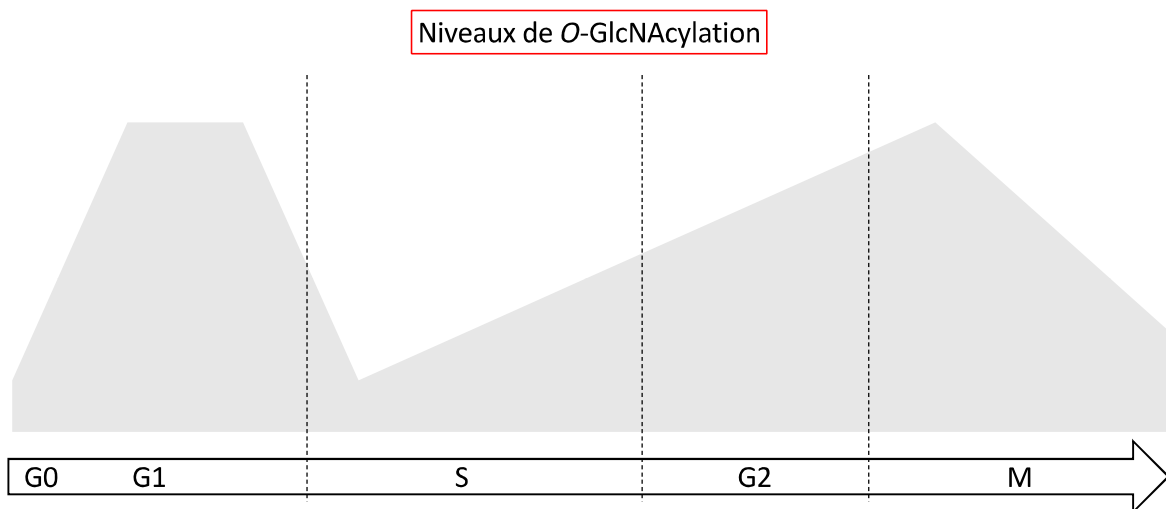


Figure 22: Représentation schématique des variations des niveaux de O-GlcNAcylation au cours du cycle cellulaire





synchronisation chimique des méthodes de synchronisation plus douces dont la privation de sérum (Figure 21) (Merrill 1998; P. K. Davis, Ho, et Dowdy 2001; J. Jackman et O'Connor 2001).

La synchronisation par **privation de sérum** nécessite de cultiver les cellules dans un milieu en absence, ou avec des niveaux très faibles, de sérum ou de facteurs de croissance afin de forcer l'entrée des cellules en phase de quiescence. Après un temps d'incubation dépendant du type cellulaire dans ce milieu, l'ajout de facteurs de croissance contenus dans le sérum permet de relancer le cycle cellulaire. Les cellules sont enfin récoltées à des temps précis pour obtenir des populations synchronisées dans différentes phases (Langan et Chou 2011; M. Chen et al. 2012). La privation de sérum a par exemple été utilisée par notre équipe sur des cellules MCF7 afin d'étudier les variations de la dynamique de O-GlcNAcylation au cours des premières phases du cycle cellulaire (Drougat et al. 2012; S. Olivier-Van Stichelen et al. 2012). L'efficacité de cette méthode de synchronisation dépend fortement du type cellulaire utilisé.

Les synchronisations chimiques permettent de synchroniser les cellules dans une phase précise sans avoir besoin de passer par la phase de quiescence. Ces méthodes, bien que très efficaces, sont parfois assez agressives et peuvent entraîner des dommages à l'ADN et avoir un effet cytotoxique (Darzynkiewicz et al. 2011). Il existe de nombreux types de synchronisation chimique selon la phase ciblée et le type cellulaire concerné. Je n'en citerai ici que quelques-uns, dont les méthodes utilisées au cours de mes travaux de thèse.

L'**hydroxyurée** (HU) et l'**aphidicoline** sont des inhibiteurs de la synthèse de l'ADN permettant de synchroniser les cellules en phase S (Krek et DeCaprio 1995). L'hydroxyurée diminue la quantité de ribonucléotides disponibles pour la synthèse de l'ADN en intervenant sur les ribonucléotide réductases. Cet inhibiteur a aussi été utilisé par l'équipe pour l'étude des variations de la O-GlcNAcylation en fonction du cycle cellulaire (Drougat et al. 2012). L'aphidicoline inhibe la fixation des dNTP (déoxynucléotides triphosphates) sur l'ADN



polymérase  $\alpha$  (Pedrali-Noy et al. 1980; Spadari, Sala, et Pedrali-Noy 1982). De cette manière, elle bloque la synthèse d'ADN et provoque un arrêt du cycle en début de phase S (Figure 21).

La **thymidine** est également un inhibiteur de la synthèse d'ADN utilisé pour induire un arrêt en phase G1/S (Harper 2005). Le protocole le plus souvent décrit est le double blocage à la thymidine (C. Slawson et al. 2008; Sakabe et Hart 2010). Il consiste à incuber les cellules avec un premier excès de thymidine (2 mM) qui entraîne un arrêt en G1/S (Figure 21). Les cellules sont ensuite incubées quelques heures dans un milieu sans inhibiteur avant d'être réincubées avec un excès de thymidine pour un temps équivalent à un cycle cellulaire complet. La thymidine peut être associée à un autre inhibiteur chimique qui est utilisé lors du second blocage afin d'améliorer le rendement de la synchronisation (Krek et DeCaprio 1995; Whitfield et al. 2002). L'incubation avec l'excès de thymidine peut aussi être précédé d'une étape de privation de sérum pour favoriser la synchronisation en tout début de phase S (Darzynkiewicz et al. 2011).

L'enrichissement de cellules en phase de mitose est permis par une propriété particulière des cellules adhérentes. En effet, les cellules adhérentes entrant en mitose prennent une forme arrondie et se détachent des parois des boîtes de culture. Elles peuvent donc être facilement prélevées après une légère agitation de la boîte et une aspiration du milieu de culture pour récupérer les cellules en suspension. Cependant, une faible proportion de cellules se situe en phase de mitose dans une population de cellules asynchrones. Le **nocodazole** est un poison du fuseau mitotique qui induit un arrêt en phase de mitose, augmentant ainsi la proportion de cellules en mitose dans les cultures. Cet agent est très efficace pour l'obtention de cellules en phase M avec 40 à 80% de cellules synchronisées en métaphase selon le type cellulaire (Krek et DeCaprio 1995; A. Tomokazu et al. 2001) (Figure 21). Toutefois, en tant que poison du fuseau, ce composé induit des défauts dans la ségrégation des chromosomes, dans la croissance



cellulaire et est cytotoxique et doit donc être utilisé en parallèle des contrôles adéquats (Darzynkiewicz et al. 2011).

La synchronisation des cellules peut être facilement vérifiée par cytométrie en flux (FACS ; *Fluorescence activating cell sorting*) après marquage fluorescent de l'ADN. Parmi les molécules utilisées pour ce marquage nous pouvons citer l'iodure de propidium (IP) ou le DAPI (4'6'-diamidino-2-phenylindole) (Drougat et al. 2012). La quantité d'ADN présente dans chaque cellule permet de distinguer les cellules en phase G0/G1, les cellules en phase S et les cellules en G2/M (Darzynkiewicz, Bedner, et Smolewski 2001).

## **2°) Evolution de la O-GlcNAcylation en fonction du cycle cellulaire**

Au sein de l'équipe nous avons montré que dans des cellules MCF7 synchronisées par privation de sérum ou chimiquement par l'hydroxyurée, les niveaux de protéines O-GlcNAcylées apparaissent élevés en phase G1 puis diminuent de manière significative dès l'entrée en phase S. De manière intéressante ces variations sont associées à une augmentation des niveaux d'OGT dès l'entrée en phase G1 et de l'activité de l'OGA lors de l'entrée en phase S (Drougat et al. 2012; S. Olivier-Van Stichelen et al. 2012). Une autre étude de 2012 menée dans des cellules MEFs et HEK293 synchronisées par privation de sérum suivie d'une stimulation toutes les 4h montre des niveaux élevés d'OGT et de O-GlcNAcylation en fin de phase S suggérant une augmentation de la O-GlcNAcylation pendant la phase S. Ces niveaux continuent d'augmenter jusqu'à atteindre un maximum en début de mitose (Y. R. Yang et al. 2012). Plusieurs études rapportent qu'au cours de la mitose, les niveaux de O-GlcNAcylation et d'OGT diminuent (Whitfield et al. 2002; Sakabe et Hart 2010) (Figure 22). De plus, une variation des niveaux de O-GlcNAcylation de l'OGT a été montrée par immunoprécipitation de l'enzyme suivie d'un western-blot avec un anticorps anti-O-GlcNAc. Ainsi la O-GlcNAcylation de l'OGT est très faible pendant la mitose puis augmente dès l'entrée en phase



G1 suivant donc les variations de O-GlcNAcylation globale décrite dans les études évoquées plus haut (Sakabe et Hart 2010).

Enfin, la localisation subcellulaire des enzymes de la O-GlcNAcylation dépend également de la progression du cycle. En effet, pendant toute la durée de l'interphase l'OGT est principalement nucléaire et péri-nucléaire mais au cours de la mitose elle se concentre au niveau du fuseau mitotique et du corps central (ou *midbody*) séparant les deux cellules-filles au moment de la cytokinèse (C. Slawson et al. 2005). L'OGA est quant à elle principalement cytoplasmique pendant la transition G1/S puis est répartie dans toute la cellule pendant la mitose. Enfin elle est exclue de la nouvelle enveloppe nucléaire qui se forme en fin de mitose (C. Slawson et al. 2005).

Ainsi, la dynamique de O-GlcNAcylation est régulée dans la progression du cycle cellulaire. D'autres résultats ont mis en évidence l'implication de cette glycosylation dans la régulation de ce processus.

### **3°) La dérégulation de la dynamique de O-GlcNAcylation affecte la progression du cycle cellulaire**

Afin d'évaluer l'importance de la dynamique de O-GlcNAcylation dans la progression du cycle cellulaire différentes stratégies de dérégulation de l'homéostasie de O-GlcNAcylation ont été utilisées sur des cellules synchronisées.

Tout d'abord, l'augmentation des niveaux de O-GlcNAcylation par l'inhibition de l'OGA affecte la croissance des cellules de souris 3T3-L1 qui affichent une diminution significative du taux de croissance par rapport aux cellules contrôle (C. Slawson et al. 2005). L'extinction de l'OGA entraîne aussi des défauts dans le passage de la transition G2/M et des anomalies au niveau du fuseau mitotique, notamment la formation de fuseaux multipolaires





entraînant une mauvaise ségrégation des chromosomes en fin de mitose (Y. R. Yang et al. 2012; Lanza et al. 2016).

A l'inverse, la diminution des niveaux de *O*-GlcNAcylation par inhibition de la GFAT entraîne une accélération de la progression du cycle, effet qui peut être annulé en ajoutant de la glutamine dans le milieu. Par contre, des cellules initialement synchronisées en phase M ou fin de G1 et traitées avec l'inhibiteur de la GFAT sont bloquées en phase G1 et ne parviennent pas à entrer en phase S. De manière intéressante, si le même inhibiteur est ajouté quand les cellules sont synchronisées au début de la phase S, le cycle cellulaire n'est pas perturbé (C. Slawson et al. 2005). Ceci suggérant que la *O*-GlcNAcylation est essentielle pour le passage de la transition G1/S et qu'une fois ce point passé, la diminution des niveaux d'UDP-GlcNAc ne perturbe pas outre mesure la suite de la progression du cycle. Enfin, l'extinction de l'OGT dans des cellules MCF7 en quiescence ralentit fortement leur entrée en phase G1 en réponse à une stimulation par le sérum (S. Olivier-Van Stichelen et al. 2012).

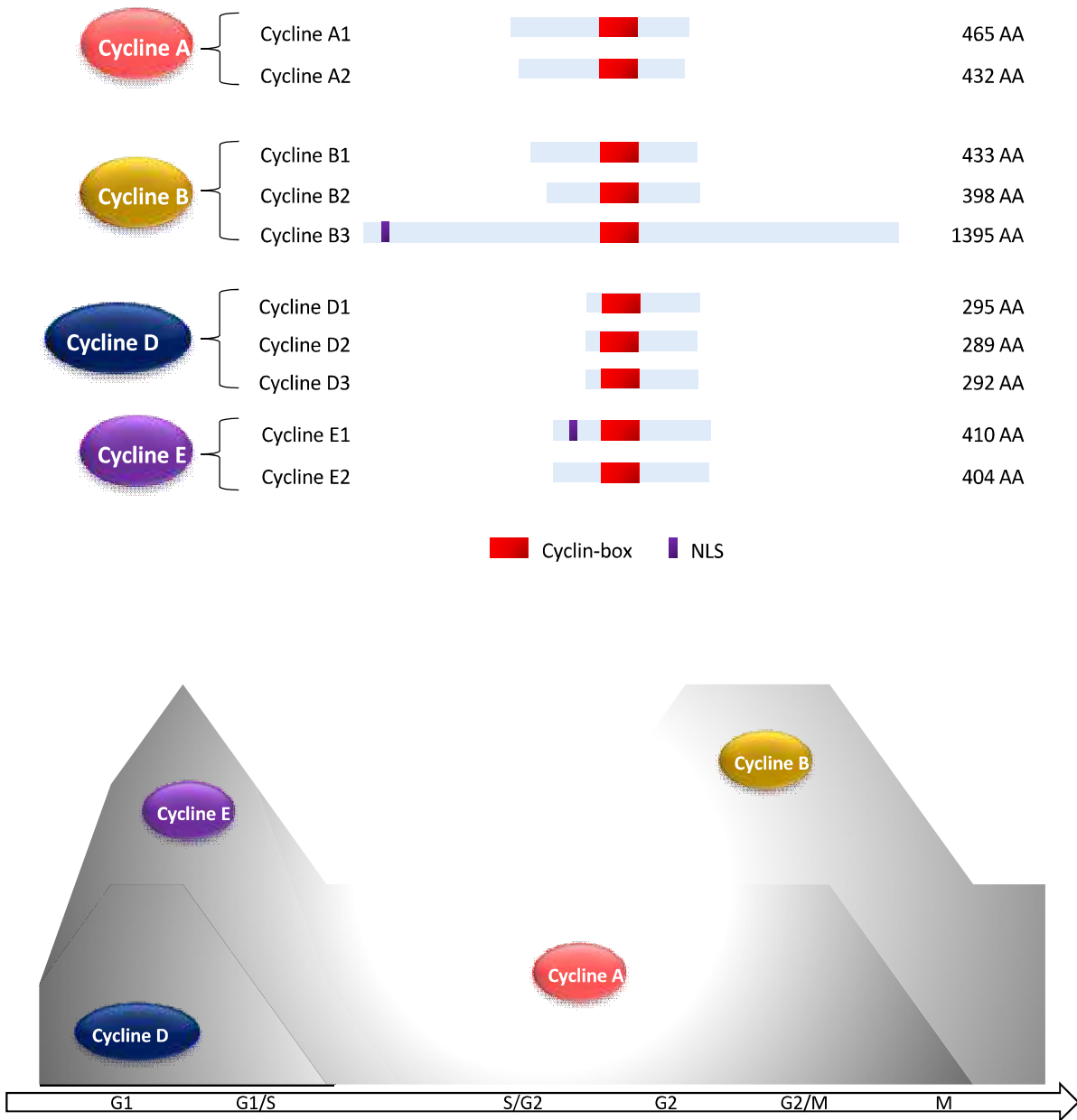
D'autres études utilisant des ovocytes de xénope comme modèle d'étude de la transition G2/M complètent les données précédentes. L'entrée en méiose des ovocytes de xénope est similaire à la transition G2/M et peut être induite par une stimulation hormonale (Schorderet-Slatkine 1972). Une première étude de 2002 montre que la stimulation des ovocytes par la progestérone est accompagnée d'une diminution des niveaux de *O*-GlcNAcylation, ce qui est en accord avec d'autres études déjà citées plus haut montrant une diminution de la *O*-GlcNAcylation avec l'entrée en mitose (Whitfield et al. 2002; C. Slawson et al. 2002) Ceci confirmant que l'ovocyte de xénope est un bon modèle d'étude de la *O*-GlcNAcylation à la transition G2/M. Au cours de cette même étude, Slawson et collaborateurs ont constaté un ralentissement de la maturation des ovocytes dont la *O*-GlcNAcylation est augmentée par des traitements à la glucosamine ou au PUGNAc. A l'inverse, une légère accélération de la maturation est observée après traitement des ovocytes avec l'inhibiteur de la GFAT DON, qui



induit une diminution des niveaux de *O*-GlcNAcylation (C. Slawson et al. 2002). L'ensemble de ces données suggérant fortement que la diminution des niveaux de *O*-GlcNAcylation est un évènement essentiel à la progression des cellules en mitose. En accord avec ces données, une étude de 2007 montre que l'inhibition de l'OGT par l'alloxane empêche le passage de la phase G2 à la mitose induit par la progestérone et à l'inverse, une accélération de l'entrée en mitose est observée quand la *O*-GlcNAcylation est augmentée après inhibition de l'OGA (Dehennaut et al. 2007). De manière concordante, l'injection d'une OGT recombinante dans des ovocytes immatures induit également une accélération de l'entrée en phase M après stimulation par la progestérone par rapport aux cellules non injectées. L'accélération de l'entrée en mitose peut être inhibée en neutralisant l'OGT avec des anticorps anti-OGT confirmant l'impact de l'enzyme sur la maturation ovocytaire, analogue à la transition G2/M (Dehennaut, Hanouille, et al. 2008).

L'ensemble de ces données montrent que l'OGT est nécessaire à des moments clés du cycle cellulaire, notamment pour l'entrée des cellules dans le cycle, à la transition G1/S et à la transition G2/M. Cependant, des niveaux aberrants de *O*-GlcNAcylation peuvent perturber la succession des différentes phases indiquant que le maintien de l'homéostasie de *O*-GlcNAcylation est essentiel pour une progression normale du cycle cellulaire. Comme nous le verrons dans les paragraphes suivants, la *O*-GlcNAcylation participe à la régulation des différentes phases du cycle cellulaire, principalement au travers de dialogues avec d'autres MPTs.

**Figure 23: Représentation schématique de la famille des cyclines et de leur accumulation pendant le cycle cellulaire chez les mammifères**



### III/ Le dialogue entre la dynamique O-GlcNAc et les complexes cycline/CDK

#### 1°) Les complexes cycline/CDK régulent la progression du cycle

La progression du cycle cellulaire doit être parfaitement orchestrée et sa régulation passe en grande partie par les phosphorylations catalysées par les différents complexes cycline/CDK s'associant et intervenant à des instants précis du cycle. Dans ces complexes, la cycline constitue la sous-unité régulatrice dont l'expression et la dégradation sont dépendantes de la progression du cycle cellulaire, et la CDK (*Cyclin Dependent Kinase*) est la sous-unité catalytique.

Les protéines de la famille des **cyclines** ont été identifiées pour la première fois dans des œufs d'oursin en 1983. Ces protéines sont caractérisées par une très faible expression dans les ovocytes non fécondés, une accumulation rapide dès la fécondation et enfin une dégradation à des instants précis du cycle cellulaire, ce qui leur a valu le nom de « cyclines » (Evans et al. 1983). Je me concentrerai ici sur quatre cyclines en particulier qui sont particulièrement importantes pour la progression du cycle cellulaire : les cyclines D, E, A et B.

Les cyclines sont toutes caractérisées par la présence d'un motif d'environ 100 acides aminés s'agencant en cinq hélices  $\alpha$  appelé *cyclin-box* (Figure 23). C'est au travers de ce domaine que les cyclines interagissent avec leurs partenaires catalytiques, les CDKs. Les niveaux protéiques des cyclines dépendent de la progression du cycle cellulaire. Ainsi, chaque cycline est exprimée puis dégradée à un moment précis et spécifique du cycle selon la cycline considérée. Les cyclines D (D1, D2 et D3) et E (E1 et E2) sont exprimées pendant la phase G1 et rapidement dégradées en début de phase S (Baldin et al. 1993; Ohtsubo et al. 1995).

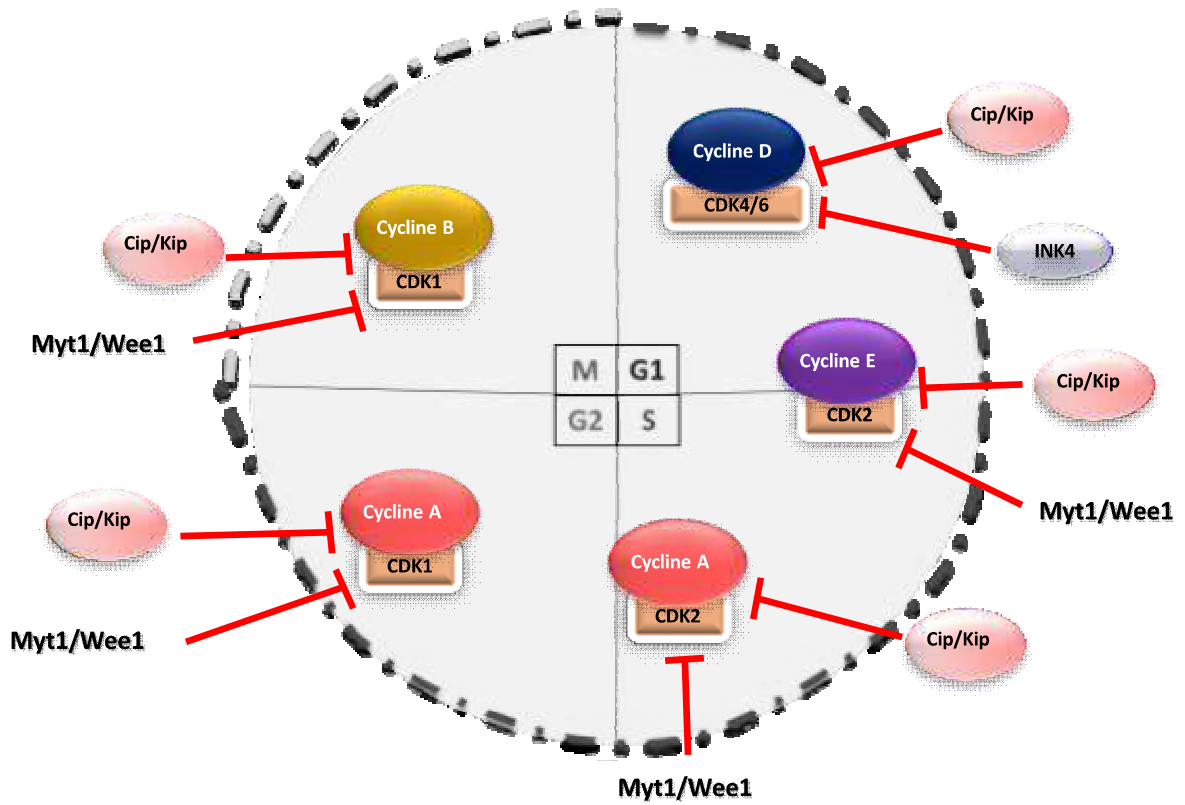


Les cyclines A (A1 et A2) interviennent en phase S jusqu'au début de mitose et enfin les cyclines B (B1, B2 et B3) sont exprimées de la phase G2 à la fin de la mitose (Figure 23) (Pines et Hunter 1989; Pagano et al. 1992; Furuno, den Elzen, et Pines 1999; M. Jackman et al. 2003). La localisation subcellulaire des cyclines est aussi finement régulée afin de moduler leur interaction avec les CDKs et avec leur protéines-cibles, ainsi que leur dégradation protéasomale (Pines et Hunter 1991; Hagting et al. 1999; M. Jackman et al. 2002). En effet, une fois leur rôle accompli, les cyclines sont ubiquitinyllées en réponse à une phosphorylation spécifique puis dégradées par le protéasome (Koepp et al. 2001, 2001).

Chaque cycline a pour fonction de s'associer avec une, ou plusieurs, sérine/thréonine kinases de la famille des **CDKs** afin de les activer (Pines 1993a, 1993b; Malumbres 2014). Ces protéines, qui catalysent le transfert d'un groupement phosphate sur les sérines et thréonines des protéines-cibles, sont exprimées de façon constante tout au long du cycle cellulaire. L'activité des CDKs est régulée selon deux grands axes : Par une interaction directe avec des activateurs ou des inhibiteurs spécifiques et/ou par des phosphorylations sur des sites spécifiques.

C'est au travers de l'interaction avec leur cycline partenaire que les CDKs sont activées à un moment précis du cycle. Parmi les 21 CDKs identifiées chez l'homme (CDK1 à CDK20), je n'évoquerai ici que les partenaires des cyclines D, E, A et B : CDK4/6, CDK2 et CDK1 (Meyerson et al. 1992; Malumbres et al. 2009; Lim et Kaldis 2013; L. Cao et al. 2014). Ainsi CDK4 et CDK6 interagissent avec la cycline D pendant la phase G1 puis la cycline E prend en charge CDK2 pour réguler le début de la phase S (Kato et al. 1993; Meyerson et Harlow 1994). Le complexe cycline A/CDK2 intervient en fin de phase S, suivi par le complexe cycline A/CDK1 en phase G2, et enfin le complexe cycline B/CDK1 régule la phase de mitose (Pines et Hunter 1989; Koff et al. 1992; Pagano et al. 1992) (Figure 24).

Figure 24: Les différents complexes cycline/CDK au cours du cycle cellulaire et leurs inhibiteurs

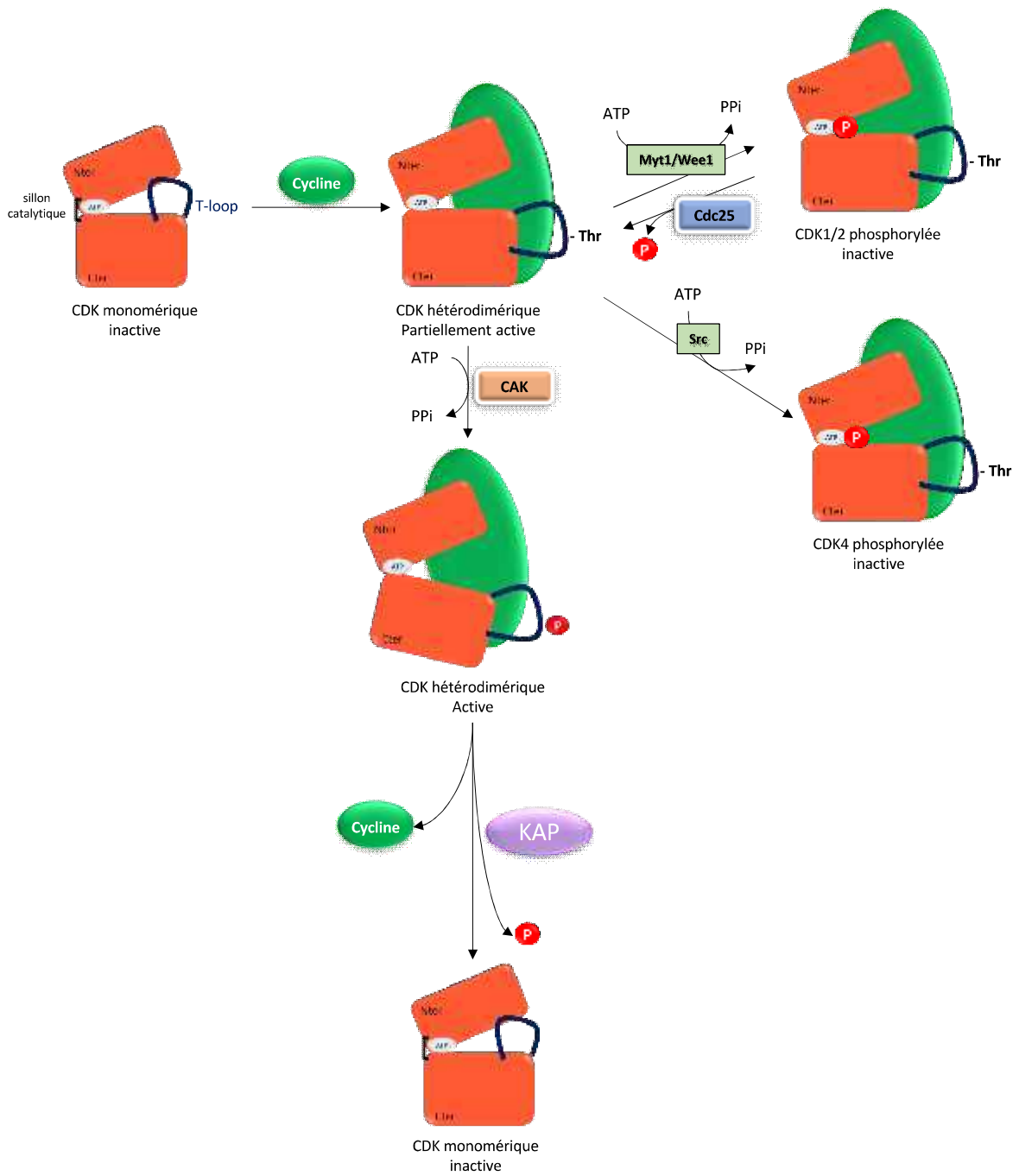




Cependant, l'interaction des CDKs avec les cyclines n'induit qu'une activation partielle du complexe et l'activité d'une kinase spécifique est nécessaire pour l'activation complète. Dans le règne animal, une seule kinase est responsable de la phosphorylation activatrice des CDKs, le complexe CAK (*CDK Activating Kinase*) (Fisher et Morgan 1994). L'interaction de la cycline avec sa CDK partenaire induit l'exposition d'un site de phosphorylation au niveau de la CDK qui est ensuite modifiée par CAK. Le résidu modifié est une thréonine située au niveau d'une boucle de régulation (ou *T-loop*) préalablement exposée par l'interaction avec la cycline : T161 pour CDK1, T160 pour CDK2, T172 pour CDK4 et T177 pour CDK6 (Desai, Gu, et Morgan 1992). A l'inverse, la famille des phosphatases KAP (*Kinase-activated phosphatases*, ou Cdi1, Cip2), identifiée en 1994, est capable d'interagir avec les CDKs, liées ou non aux cyclines, afin de déphosphoryler le site activateur au niveau de la boucle de régulation après séparation des deux sous-unités (Hannon, Casso, et Beach 1994; Poon et Hunter 1995; A. Cheng et al. 1999) (Figure 25).

D'un autre côté, les CDKs sont inhibées de façon dépendante de la progression du cycle cellulaire par différentes protéines afin de réguler la succession des phases du cycle (Toyoshima et Hunter 1994) (Figure 24). En cas d'anomalies détectées par les différents points de contrôle du cycle, l'inhibition des CDKs participe aussi à l'arrêt du cycle cellulaire permettant la mise en place de mécanismes de réparation (Poon et al. 1996). Les CKIs (*Cyclin-dependent kinase inhibitors*) peuvent être regroupés en deux classes principales : La première comprend les protéines de la famille des INK4 (p16, p15, p18 et p19) qui sont des inhibiteurs spécifiques de CDK4 et CDK6. Les INK4 régulent principalement la progression en G1 en interagissant avec CDK4 et CDK6 uniquement afin d'inhiber leur interaction avec le complexe CAK ainsi que la phosphorylation activatrice qui en découle (Aprelikova, Xiong, et Liu 1995).

Figure 25: Les cycles de phosphorylation régulant les CDKs



La seconde classe d'inhibiteurs, la famille Cip/Kip, regroupe p21 (Waf1, Cip1), p27 (Kip1) et p57 (Kip2). Elle présente une spécificité plus large que les INK4 et possède une plus grande affinité pour les complexes Cycline/CDK que pour les CDKs seules (Poon, Toyoshima, et Hunter 1995). Des premiers travaux ont montré que l'interaction avec l'inhibiteur Cip/Kip empêche le recrutement du complexe kinase CAK et inhibe la phosphorylation activatrice au niveau de la boucle de régulation (Polyak et al. 1994). Cependant, des études structurales ont montré que l'inhibition est également due à un blocage mécanique du sillon catalytique (Hashimoto et al. 1998). Il faut aussi noter qu'une étude de 1994 démontre que p21 peut former avec les cyclines et les CDKs un complexe dont l'activité kinase est toujours présente (H. Zhang, Hannon, et Beach 1994) : p21 interagit avec les complexes cycline D/CDK4 et cycline A/CDK2 mais n'inhibe pas leur activité *in vitro* et *in vivo* dans la mesure où il n'est pas présent à une concentration saturante. Donc ces complexes existent sous deux formes, une active contenant une seule sous-unité p21 et une inactive avec plusieurs sous-unités p21 inhibant l'activité kinase (H. Zhang, Hannon, et Beach 1994). L'activité inhibitrice de p21 sur les CDK est donc dépendante de son niveau d'expression, et non pas uniquement de sa présence ou non dans la cellule.

Enfin, des phosphorylations spécifiques peuvent intervenir pour inhiber les CDKs. Wee1 (*Wee1-like protein kinase*) et Myt1 (*membrane associated tyrosine and threonine-specific cdc2 inhibitory kinase*) sont les kinases responsables des phosphorylations inhibitrices au niveau du site catalytique de CDK1 et CDK2 (Parker, Atherton-Fessler, et Piwnica-Worms 1992; Mueller et al. 1995; Parker et al. 1995). Ces phosphorylations peuvent être annulées par la phosphatase Cdc25 qui déphosphoryle les CDKs pour rendre le domaine catalytique accessible à l'ATP (Parker et Piwnica-Worms 1992; Blomberg et Hoffmann 1999) (Figure 25). CDK4 n'est pas un substrat de Wee1 et de Cdc25, sauf dans certaines conditions, notamment en réponse à des dommages à l'ADN, où Wee1 active alors la phosphorylation inhibitrice de



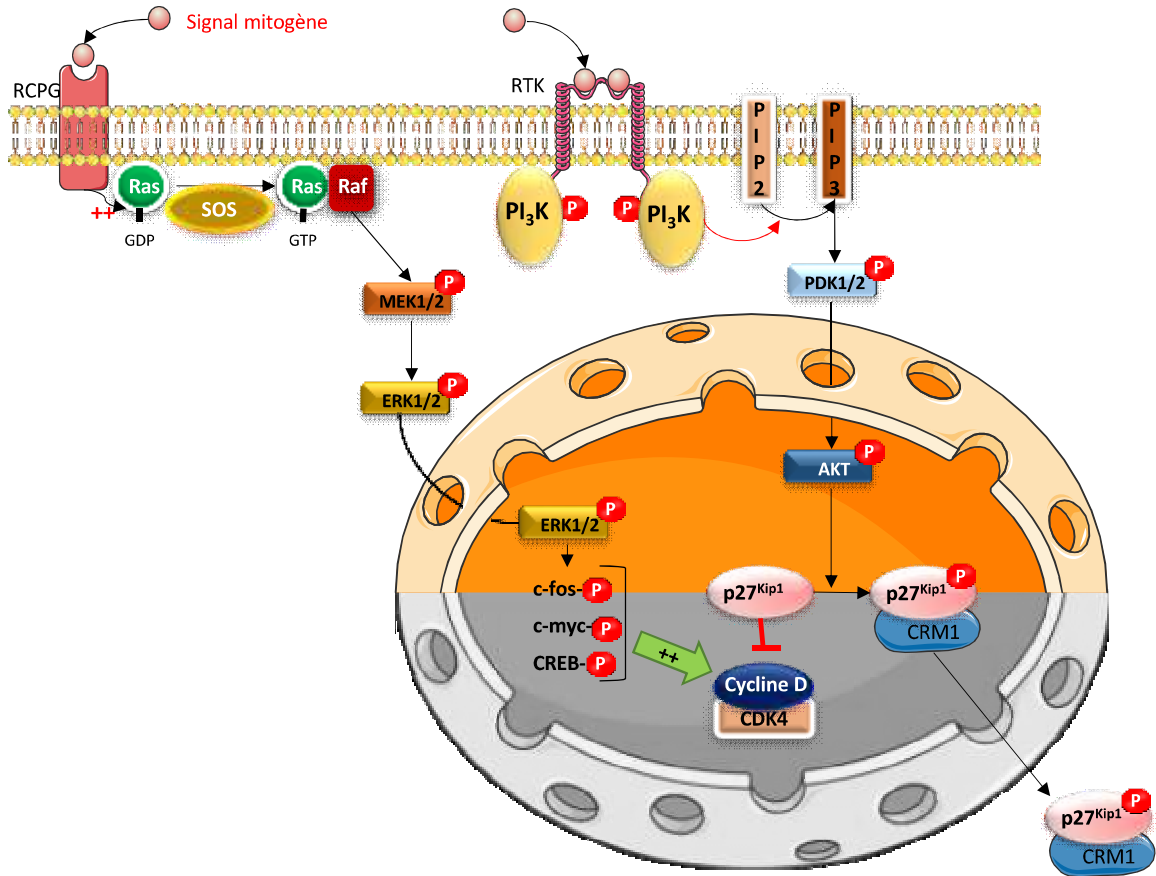
CDK4 sur la tyrosine-17 (Poon et al. 1996; Chow et Poon 2013). Par ailleurs, une étude de 2008 a identifié les kinases de la famille Src comme étant responsables de la phosphorylation de la Tyr-17 de CDK4 à la fois *in vitro* et *in vivo* (Martin et al. 2008) (Figure 25).

## **2°) Implications de la O-GlcNAcylation dans la régulation des complexes cycline/CDK**

Des travaux ont démontré la présence d'un dialogue entre la dynamique de O-GlcNAcylation et les complexes cycline/CDK. Tout d'abord, l'homéostasie de O-GlcNAcylation est impliquée dans la régulation des niveaux d'expression des cyclines D et E. En effet, la surexpression de l'OGT ou de l'OGA induit une diminution significative de l'expression des cyclines D1 et E (C. Slawson et al. 2005). De plus, l'expression de l'inhibiteur p27<sup>Kip1</sup> est aussi altérée quand la O-GlcNAcylation est diminuée par une mutation du gene Ogt dans des fibroblastes de souris. Les niveaux protéiques de l'inhibiteur sont augmentés de façon significative avec la diminution de la O-GlcNAcylation (N. O'Donnell et al. 2004). Ces données indiquent que la dynamique de O-GlcNAcylation est impliquée dans le contrôle de l'activité des complexes cycline/CDK en modulant directement l'expression des cyclines et l'activité des kinases ou indirectement *via* la régulation de l'expression de l'inhibiteur p27<sup>Kip1</sup>. Ces études expliquent en partie pourquoi une dérégulation de l'homéostasie de O-GlcNAc entraîne des défauts dans la progression du cycle cellulaire. En accord avec les études précédentes, nous avons observé que l'extinction de l'OGT dans des cellules humaines quiescentes inhibe l'expression de la cycline D1 nécessaire à la progression de la phase G1 lors de la reprise du cycle induite par l'ajout de sérum dans le milieu de culture (S. Olivier-Van Stichelen et al. 2012).

Une des possibilités concernant les mécanismes moléculaires impliqués dans le lien entre l'activité de l'OGT et l'expression des cyclines est l'activation des voies de signalisation

Figure 26: Schéma des voies de signalisation régulant la phase G1



qui sont, elles-aussi, en partie régulées par l'OGT (L. Wells, Vosseller, et Hart 2001) . La fixation des facteurs mitogènes sur leurs récepteurs transmembranaires, de type RTK (récepteurs tyrosine-kinase) ou couplés aux protéines G (RCPG), entraîne l'activation de cascades de signalisation dont les voies MAPK (Mitogen-activated protein kinase) et PI3K/Akt. Ceci permet l'activation de différents facteurs de transcription, dont CREB, c-Fos et c-Myc, aboutissant entre-autres à l'expression de la cycline D, et à l'entrée en phase G1 (Force et al. 1994; Albanese et al. 1995; J. J. Liu et al. 1995) (Figure 26). De plus, l'entrée en phase G1 est accompagnée d'une phosphorylation de p27<sup>Kip1</sup> par AKT elle-même activée par la voie de signalisation PI<sub>3</sub>K/AKT (Carpenter et al. 1993). La phosphorylation de p27<sup>Kip1</sup> induit son export nucléaire et sa dégradation protéasomale dans le cytoplasme, ceci permettant au complexe cycline D/CDK4 d'être pleinement actif pendant la phase G1 (N. Fujita et al. 2002; Ishida et al. 2002; Kamura et al. 2004; I. Shin et al. 2005; Susaki, Nakayama, et Nakayama 2007).

Or, l'extinction de l'OGT dans des cellules humaines MCF7 induit une diminution significative de l'activation d'AKT et MAPK ce qui peut contribuer à la baisse de l'expression de la cycline D1 observée lors de l'entrée des cellules siOGT dans le cycle cellulaire (S. Olivier-Van Stichelen et al. 2012). De même, on peut supposer que l'augmentation du niveau de p27 observée dans les fibroblastes déficients en OGT serait due à un défaut d'activation d'AKT, menant à une inhibition de son export nucléaire et de sa dégradation (N. O'Donnell et al. 2004).

Ensuite, les enzymes de la O-GlcNAcylation modulent les phosphorylations régulatrices intervenant sur les CDKs. Ainsi, il a été observé qu'une surexpression de l'OGT dans des cellules HeLa entraîne l'inhibition de la déphosphorylation par Cdc25 des résidus T14 et Y15 de la kinase CDK1, la maintenant dans un état inactif (Tan et al. 2013). De plus, la surexpression de l'OGT induit une diminution des niveaux d'expression de la kinase Plk1 (*Polo-like kinase*





1) elle-même responsable d'une phosphorylation inhibitrice de Myt1 sur la thréonine 495. Dans des conditions d'hyper-O-GlcNAcylation induites par la surexpression de l'OGT, Myt1 est maintenue active et participe à l'augmentation de la phosphorylation inhibitrice de CDK1 (Zihao Wang et al. 2010). Ces résultats ont été confirmés par une extinction de l'expression de l'OGA qui entraîne une augmentation de la phosphorylation inhibitrice de CDK1 sur le site Y15 par rapport aux cellules contrôles (Lanza et al. 2016).

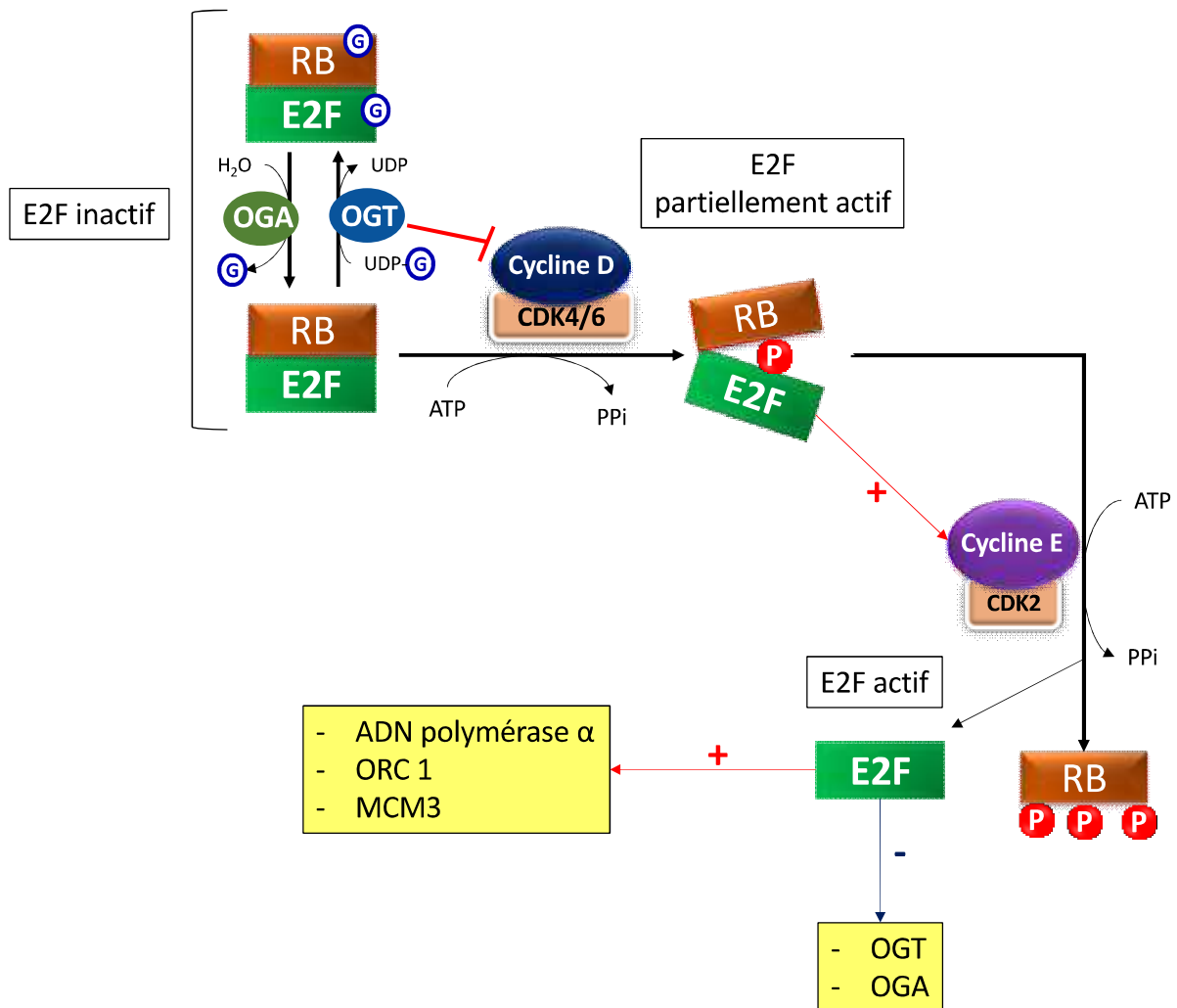
L'ensemble de ces données montre que la dynamique de O-GlcNAcylation est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire *via* un dialogue avec les complexes cycline/CDK et leurs régulateurs. Cependant, les mécanismes précis intervenant entre les deux modifications ne sont vraisemblablement pas encore totalement connus.

## **IV/ La O-GlcNAcylation et la régulation de la transition G1/S**

### **1°) La transcription dépendante de la voie RB/E2F**

Le passage de la phase G1 à la phase S est permis grâce à l'expression d'un ensemble de gènes nécessaires à la réplication de l'ADN, en grande partie régulée par les complexes RB/E2F (Nevins et al. 1997). Les protéines du rétinoblastome (RB) sont des co-répresseurs transcriptionnels qui inhibent la transcription d'un certain nombre de gènes en séquestrant les facteurs de transcription de la famille E2F (Hurford et al. 1997). Les membres de cette famille sont regroupés dans deux grandes classes : **E2F1 à E2F3A** sont des activateurs transcriptionnels, E2F1 étant le plus étudié et le plus connu pour la transition G1/S (Ohtani, DeGregori, et Nevins 1995; Leone et al. 1998). **E2F3B à E2F8** sont des répresseurs transcriptionnels qui interagissent avec les promoteurs pendant la phase de quiescence et en tout début de G1 (Cartwright et al. 1998). Quand les cellules progressent en phase G1, les répresseurs se dissocient des promoteurs qui deviennent accessibles aux activateurs E2F1, 2 et

**Figure 27: Modulation de l'interaction pRB/E2F1 par les complexes cycline/CDK et la O-GlcNAcylation lors de la phase G1**



3 lors de la transition G1/S et qui étaient jusqu'alors séquestrés et inactivés par les protéines RB (DeGregori et al. 1997; Y. Takahashi, Rayman, et Dynlacht 2000; Mitxelena et al. 2016).

L'inactivation des facteurs E2F dépend de l'état de phosphorylation des protéines RB (pRB, p107 et p130). Dès l'entrée en phase G1, un complexe se forme entre pRB, E2F1, la cycline D et CDK4/6 (L. Zhu et al. 1993; Ewen et al. 1993; Zarkowska et Mittnacht 1997; T.-S. Chu et al. 2007). Sous sa forme hypophosphorylée pRB est active et réprime l'activité transcriptionnelle de E2F, empêchant ainsi que certaines protéines soient exprimées prématurément et dérèglent la progression du cycle (Figure 27) (Rubin et al. 2005). A l'inverse, les phosphorylations de pRB affaiblissent progressivement l'interaction entre la protéine et le facteur de transcription sans pour autant les dissocier totalement (Burke et al. 2010). Après avoir modifié pRB, libérant partiellement E2F1, le complexe cycline D/CDK4-6 se dissocie de la protéine (Kato et al. 1993). L'activation partielle de E2F1 est tout de même suffisante pour induire l'activation de quelques gènes dont celui de la cycline E (Ohtani, DeGregori, et Nevins 1995).

En fin de G1, l'expression de la cycline E et l'abondance du complexe cycline E/CDK2 est maximale et permet de poursuivre la phosphorylation de pRB pour libérer totalement E2F1 (Koff et al. 1992) (Figure 27). Ce dernier peut ainsi interagir avec et activer les promoteurs de gènes nécessaires à l'entrée en phase S, notamment des protéines de la machinerie réplivative telles que l'ADN polymérase  $\alpha$ , la sous-unité Orc1 du complexe de reconnaissance des origines de réplification et la sous-unité MCM3 du complexe à activité hélicase MCM2-7 et ce, *via* le recrutement d'autres facteurs, dont HCF-1.

## **2°) La régulation de pRB par la O-GlcNAcylation**

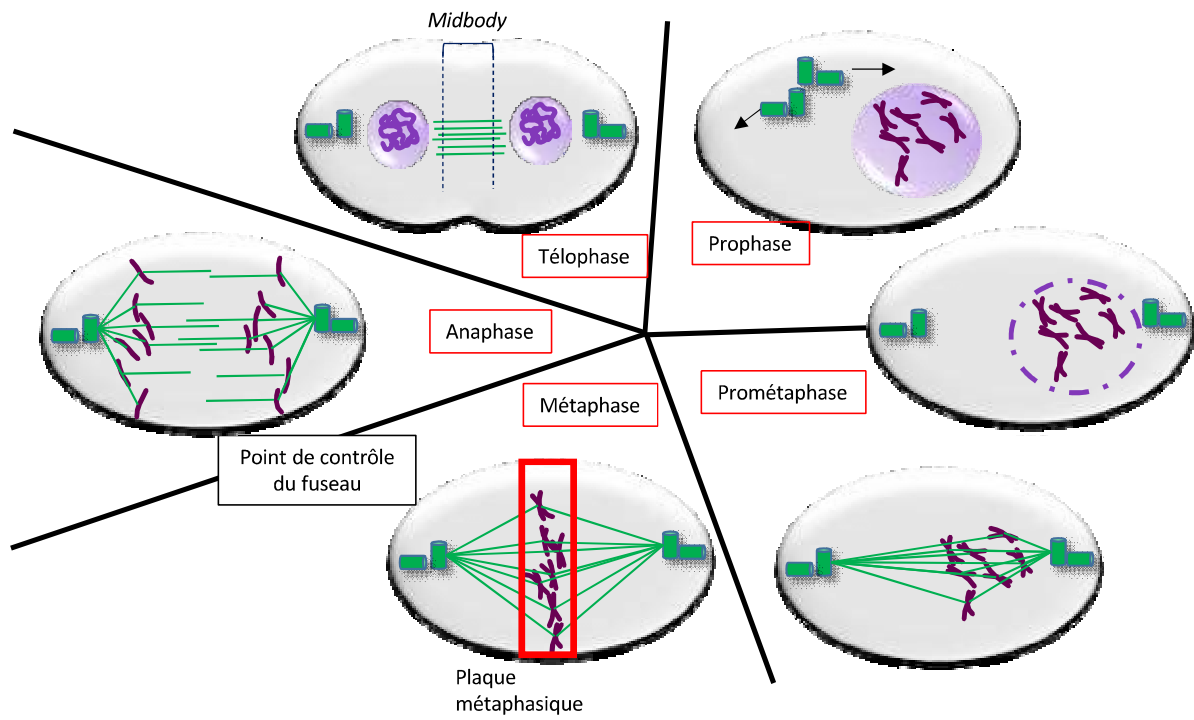
La protéine du rétinoblastome pRB est O-GlcNAcylée à la fois *in vitro* et *in vivo* dans des cellules HeLa asynchrones. L'activité de pRB étant fortement dépendante du cycle



cellulaire, sa O-GlcNAcylation a été étudiée dans des cellules synchronisées en phase G1 durant laquelle pRB est hypophosphorylée et inhibe efficacement l'activité transcriptionnelle de E2F-1. Les résultats de cette étude montrent que pRB est majoritairement O-GlcNAcylée pendant la phase G1 (L. Wells, Slawson, et Hart 2011), suggérant que la O-GlcNAcylation pourrait entrer en compétition avec la phosphorylation de pRB afin de réguler les événements transcriptionnels intervenant en fin de G1. Cependant, nous avons aussi vu précédemment que la dynamique de O-GlcNAcylation a un impact sur l'expression et l'activité des cyclines et notamment de la cycline D (C. Slawson et al. 2005; S. Olivier-Van Stichelen et al. 2012), suggérant l'existence d'une régulation indirecte de pRB par la O-GlcNAcylation (Figure 27). De manière intéressante, pRB est capable de réguler négativement l'expression de l'OGT et de l'OGA. En effet, leurs niveaux d'ARNm et de protéines sont considérablement augmentés dans des MEFs (*mouse embryonic fibroblasts*)  $Rb1^{-/-}$  (x2 à x3 par rapport aux cellules *wild-type*) (Muthusamy et al. 2015).

Une relation étroite a aussi été mise en évidence entre la O-GlcNAcylation et le facteur de transcription E2F chez la souris et l'homme. Dans les deux espèces, plusieurs sites de liaison pour le facteur de transcription E2F1 ont été identifiés sur le promoteur des gènes de l'OGT (-350 à +238 pb pour l'homme) et de l'OGA (-300 à +443 pb pour l'homme) (Muthusamy et al. 2015). E2F1 agit comme un répresseur des gènes de l'OGT et de l'OGA, sa surexpression induisant une diminution de l'expression des deux enzymes, sans toutefois modifier le niveau global de O-GlcNAcylation dans les cellules transfectées. A l'inverse, la délétion de E2F1 induit une augmentation de l'expression de l'OGT et de l'OGA (Muthusamy et al. 2015). De plus, la régulation négative de la transcription de l'OGT et l'OGA *via* E2F1 est dépendante de pRB puisque la répression transcriptionnelle des gènes *Ogt* et *Mgea5* induite par la surexpression de E2F1 est inhibée dans les MEFs  $Rb1^{-/-}$  (Muthusamy et al. 2015). Par ailleurs, E2F est lui-même O-GlcNAcylé lorsqu'il interagit avec pRB hypophosphorylée en phase G1

Figure 28: Représentation simplifiée des 5 sous-phases de la mitose



(L. Wells, Slawson, et Hart 2011). La O-GlcNAcylation de E2F pourrait ainsi réguler négativement son activité, en maintenant ou favorisant son interaction avec pRB. Au fur et à mesure de sa libération pendant la phase G1, E2F1 régulerait négativement l'expression de l'OGT et de l'OGA, créant ainsi une boucle de rétrocontrôle positive de son activité (Figure 27).

## V/ La O-GlcNAcylation et la mitose

### 1°) Le déroulement de la mitose

La mitose est la dernière étape du cycle cellulaire qui est constituée de plusieurs sous-phases et se terminant par la cytokinèse, la séparation physique des deux cellules-filles (Figure 28). Durant la majorité de la mitose, les chromosomes sont condensés et sont facilement visibles en microscopie permettant l'identification de chaque sous-phase. De plus, la mitose est caractérisée par un ensemble de mouvements chromosomiques permis par la mise en place du fuseau mitotique relié à chaque pôle de la cellule par l'intermédiaire des centrosomes (D'Angiolella et al. 2010).

Les différentes sous-phases de la mitose se succèdent ainsi (Figure 28):

- La **prophase** : Pendant cette phase, la condensation des chromosomes, initiée en début de G2, se termine. De plus, les centrosomes qui ont été dupliqués pendant la phase de réplication migrent vers les pôles opposés de la cellule et les microtubules commencent à s'organiser pour former le fuseau mitotique (E. A. Nigg et Stearns 2011). La fin de la prophase est marquée par la rupture de l'enveloppe nucléaire (NEBD ; *Nuclear envelope breackdown*).

- La **prométaphase** : Avec la disparition de l'enveloppe nucléaire, les microtubules formant le fuseau mitotique peuvent s'étendre à l'intérieur de la cellule afin d'entrer en contact avec les kinétochores de chaque chromosome, une plateforme protéique située au niveau des centromères (Maiato et Sunkel 2004). Après la capture d'un microtubule, les kinétochores sont





capables de former tout un faisceau de 15 à 30 microtubules, appelé fibres du kinétochore (ou *K-fibers*) qui permettra la séparation ultérieure des chromatides-sœurs (Maiato, Rieder, et Khodjakov 2004).

- La **métaphase** : Grâce au fuseau mitotique, les chromosomes condensés s'alignent au centre de la cellule, formant la plaque métaphasique ou plaque équatoriale. Le bon attachement du fuseau mitotique sur les chromosomes est contrôlé par le point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique (SAC ; *spindle assembly checkpoint*) et le cycle peut être arrêté en cas de détection de dommages.

- **L'anaphase** : C'est la phase de séparation des chromatides sœurs, attirées vers chaque pôle du fuseau mitotique *via* leur kinétochore.

- La **télophase** : Le fuseau mitotique disparaît puis les chromosomes se décondensent progressivement. Une nouvelle enveloppe nucléaire se forme autour de chaque jeu chromosomique, piégeant les chromosomes décondensés.

La mitose se termine par la **cytokinèse** qui est l'étape de séparation physique des deux cellules-filles marquant la fin du cycle cellulaire. Elle est caractérisée par la présence d'un anneau contractile entre les cellules-filles en devenir. Cet anneau contient différentes protéines dont l'actine et la myosine permettant à l'anneau de se contracter et former une zone dense, le corps central (ou *midbody*) contenant l'ensemble des microtubules du fuseau mitotique.

## 2°) Impact de la dynamique de O-GlcNAcylation au cours de la mitose

Comme je l'ai déjà évoqué plus haut, la surexpression de l'OGT entraîne différentes anomalies de la mitose visibles par immunofluorescence et notamment des erreurs dans la ségrégation chromosomique conduisant à la formation de cellules polyploïdes, ou le maintien du *midbody*, qui est normalement clivé lors de la cytokinèse, en phase G1 ou S du cycle suivant (C. Slawson et al. 2005; Sakabe et Hart 2010). De plus, la surexpression de l'OGT ou de



l'OGA conduit à une augmentation de la condensation des chromosomes pendant la phase M et une plus grande propension des cellules à former des fuseaux multipolaires (Tan et al. 2013). Les défauts dans la cytokinèse induits par la surexpression de l'OGT peuvent (en partie) être dus à la modification de l'abondance de certaines protéines au niveau du fuseau ou du corps central. En effet, une étude protéomique montre que la surexpression de l'OGT entraîne des variations, positives ou négatives selon la protéine considérée, des niveaux protéiques du fuseau et du *midbody* pendant la cytokinèse. Par exemple, la surexpression de l'OGT entraîne une diminution de presque 50% de l'abondance de la kinase Aurora B (AURKB) et de son partenaire d'interaction INCENP (*Inner centromere protein*) (Z. Wang et al. 2010). Cela perturbe également les niveaux de phosphorylation, suggérant un dialogue entre les deux modifications pour réguler l'expression et/ou la localisation des protéines du fuseau mitotique et du *midbody* (Z. Wang et al. 2010).

#### **a- La régulation de la kinase Aurora A par la O-GlcNAcylation**

La kinase Aurora A (AURKA ou AKA), est une Ser/Thr kinase localisée au niveau du centrosome pendant l'interphase, puis elle est recrutée au niveau des microtubules du fuseau mitotique en début de mitose. Elle est impliquée dans la formation du fuseau mitotique, la duplication du centrosome et la cytokinèse. AURKA phosphoryle de nombreuses cibles en réponse à une phosphorylation activatrice au niveau de son site catalytique et intervenant en tout début de prophase. Cette phosphorylation est assurée par différentes kinases dont la protéine kinase A (PKA), et peut être réversée par la protéine phosphatase 1 (PP1) pour l'inactiver (Walter et al. 2000; Marumoto et al. 2002; Marumoto, Zhang, et Saya 2005; Z.-S. Zhao et al. 2005).

Plusieurs études ont mis en évidence un lien entre les niveaux d'expression des enzymes de la O-GlcNAcylation et la régulation de l'expression et de l'activation de AURKA. En effet la surexpression de l'OGT ou de l'OGA pendant la mitose induit une diminution de l'expression



et de la phosphorylation de la kinase, qui se traduit par une diminution de la phosphorylation des cibles de AURKA (Tan et al. 2013). Parmi elles, **CENPA** (protéine du centromère A) est phosphorylée sur sa sérine 7 par AURKA pendant la prophase pour recruter différents facteurs au niveau des fuseaux mitotiques dont la kinase Aurora B (AURKB). Cette dernière participe au maintien de la phosphorylation et donc de l'activation de CENPA jusqu'en métaphase (Honda, Körner, et Nigg 2003; Kunitoku et al. 2003). Dans des cellules HeLa synchronisées en mitose par une incubation de 18h par le nocodazole, la surexpression de l'OGA ou de l'OGT induit une diminution de la phosphorylation de la Ser-7 de CENPA. Par contre, l'inhibition de l'OGA par le Thiamet G n'a aucun effet visible sur la phosphorylation de CENPA suggérant que l'OGA participe à la régulation de la phosphorylation de CENPA indépendamment de son activité hydrolase (Tan et al. 2013).

#### **b- Formation d'un complexe entre l'OGT et la kinase Aurora B**

Pendant la cytokinèse l'OGT forme un complexe transitoire avec l'OGA, la kinase Aurora B (AURKB ou AKB) et sa phosphatase partenaire PP1 au niveau du *midbody* afin de modifier différents substrats dont la vimentine, une protéine du cytosquelette (Chad Slawson et al. 2008). Bien que plusieurs études rapportent une diminution des niveaux d'expression de AURKB avec la surexpression de l'OGT ou de l'OGA en mitose, cela ne semble pas perturber la formation du complexe au *midbody* (L. Wells et al. 2004; C. Slawson et al. 2008; Tan et al. 2013). Cependant, l'utilisation d'un inhibiteur de AURKB perturbe la formation du complexe suggérant que l'activité kinase de AURKB est essentielle pour la formation du complexe au *midbody* (C. Slawson et al. 2008). Mais à ce jour, il est difficile de savoir si l'OGT, ou l'OGA, sont des cibles directes de la phosphorylation par AURKB.

Pendant la mitose, la vimentine fait l'objet d'une succession de phosphorylations qui la déstabilise progressivement facilitant ainsi la disparition du *midbody* et la séparation des deux cellules-filles lors de la cytokinèse (Izawa et Inagaki 2006). La vimentine est aussi O-



GlcNAcylée sur plusieurs sites à proximité, ou sur le même résidu, que les sites de phosphorylations (Z. Wang et al. 2010). Ainsi le complexe OGT/OGA/AURKB/PP1 pourrait réguler les MPTs portées par la vimentine afin de moduler sa structure et participer à la cytokinèse. En accord avec cette idée, l'étude de Slawson et collaborateurs montre que la surexpression de l'OGT dans des cellules HeLa synchronisées en phase M induit une modulation du niveau de phosphorylation de la vimentine (C. Slawson et al. 2008).

Récemment, une étude a démontré l'implication de Chk1 dans la modification de la vimentine par l'OGT. Comme je l'ai déjà évoqué, Chk1 modifie l'OGT sur la sérine 20 quand l'enzyme est localisée au niveau du *midbody* (Z. Li et al. 2017). De plus, cette modification semble nécessaire à l'accomplissement de la cytokinèse: L'utilisation d'un mutant de l'OGT (S20A) entraîne une diminution à la fois de la O-GlcNAcylation et de la phosphorylation de la vimentine et des défauts dans la cytokinèse, notamment le maintien d'un pont de vimentine empêchant la séparation des cellules-filles (Z. Li et al. 2017). Donc en fin de mitose, Chk1 phosphoryle l'OGT sur la sérine 20 et l'active pour la O-GlcNAcylation de la vimentine en association avec sa phosphorylation par AURKB. Ces modifications déstabilisent la vimentine pour favoriser la disparition du *midbody* lors de la séparation des deux cellules-filles.

### **c- Implication de la O-GlcNAcylation dans la condensation des chromosomes en mitose**

Comme je l'ai déjà mentionné des dérégulations dans la dynamique de O-GlcNAcylation entraînent des défauts dans la condensation des chromosomes dont le moteur principal est l'assemblage des nucléosomes. De plus, la O-GlcNAcylation fait partie des MPTs du code histone pouvant moduler la condensation de la chromatine et la glycosylation de certains sites est spécifique de la phase de mitose (Sakabe, Wang, et Hart 2010).





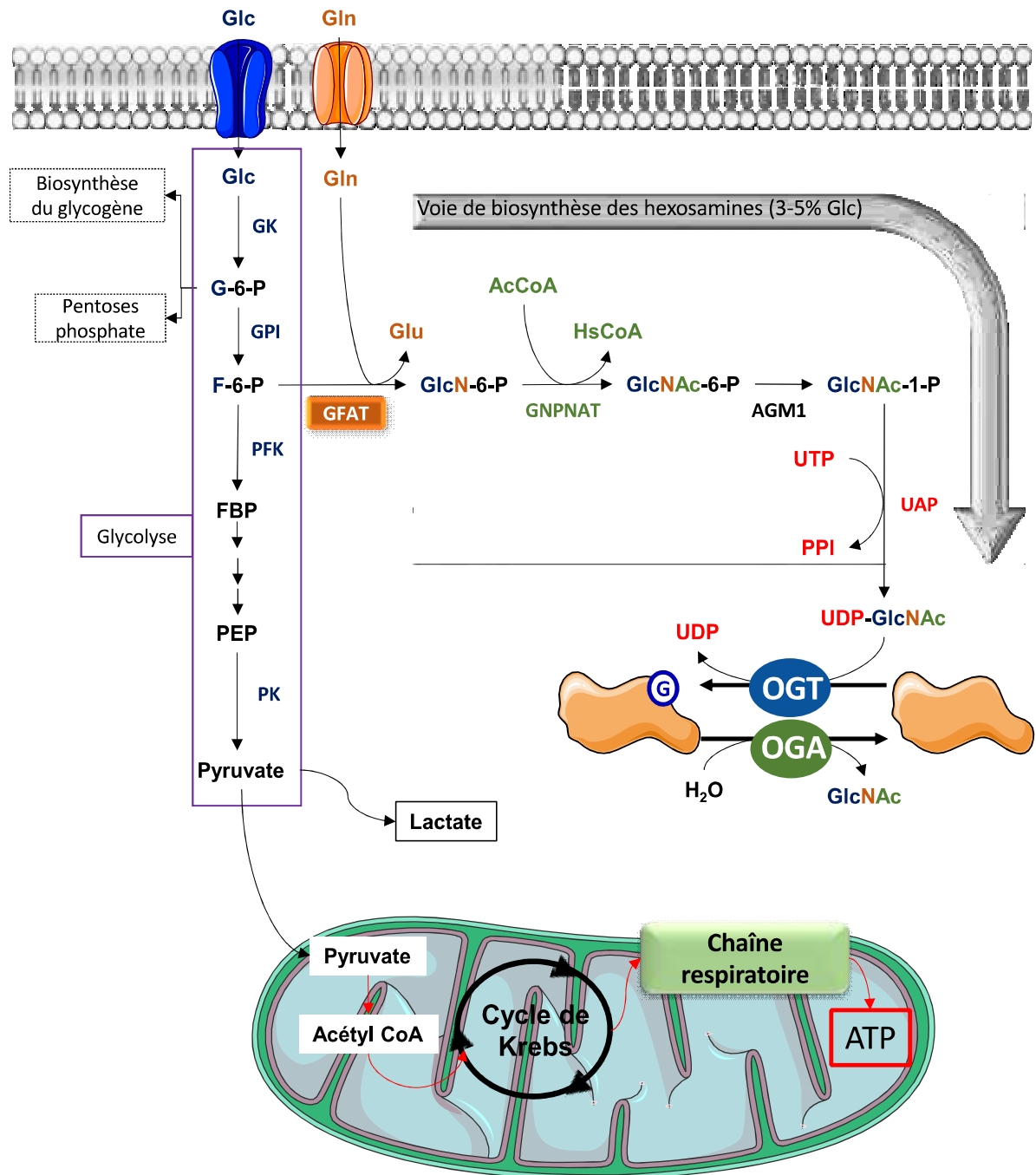
Pendant la mitose, l'histone H3 est phosphorylée sur sa sérine 10 par AURKB et déphosphorylée sur la Ser-28 par PP1 (Crosio et al. 2002). Or, ces deux enzymes sont retrouvées complexées avec l'OGT et l'OGA pendant la mitose (C. Slawson et al. 2008) suggérant un dialogue entre phosphorylation et *O*-GlcNAcylation sur l'histone H3 afin de réguler la condensation de la chromatine. Fong et collaborateurs ont démontré pour la première fois en 2012 que l'histone H3 est *O*-GlcNAcylée sur la thréonine 32. De plus il semble exister une compétition entre la *O*-GlcNAcylation sur ce site et les phosphorylations mitotiques des sites Ser-10, Ser-28 et Thr-32 car ces phosphorylations sont diminuées dans des conditions de *O*-GlcNAcylation élevées (S. Zhang et al. 2011; Fong et al. 2012). La phosphorylation H3S10 par AURKB est un signal d'entrée en mitose et la diminution de cette phosphorylation empêche le passage de la transition G2/M, effet qui est observé avec l'inhibition de l'OGA. Ainsi il semblerait que la *O*-GlcNAcylation de H3 sur la Thr-32 empêche la phosphorylation de la Ser-10 pendant l'interphase puis, au moment d'entrer en mitose, l'OGA hydrolyse le résidu de GlcNAc permettant alors à AURKB de phosphoryler la Ser-10, signal d'entrée en mitose (Fong et al. 2012).

La *O*-GlcNAcylation de l'histone H3 semble aussi impacter d'autres modifications dont l'acétylation (signal de décompaction) (S. Zhang et al. 2011) : La *O*-GlcNAcylation de H3 participerait à la régulation de la compaction de la chromatine en favorisant le maintien de l'acétylation, notamment sur le site H3K9, pour conserver une chromatine globalement décondensée pendant l'interphase. Pendant la mitose, l'acétylation sur H3K9 doit diminuer pour laisser place à des modifications favorisant la compaction de l'ADN comme la méthylation (Kaleem et al. 2008). Dans des cellules HeLa synchronisées en mitose, la surexpression de l'OGT empêche la diminution de l'acétylation H3K9 qui devrait avoir lieu en condition normale, ralentissant la compaction de l'ADN et donc la progression en mitose (Sakabe et Hart 2010).



Donc la dynamique de *O*-GlcNAcylation est impliquée dans la régulation de la progression du cycle cellulaire et ce à différents niveaux. Des dérégulations dans l'homéostasie de *O*-GlcNAcylation peuvent avoir des répercussions dramatiques sur la progression du cycle. Si les dérégulations sont trop importantes, l'accumulation des défauts du cycle peut conduire au développement de pathologies dont de nombreux types de cancer.

Figure 29: Métabolisme du glucose par les voies de la glycolyse et de biosynthèse des hexosamines



## **Partie 3: Dérégulation de la dynamique de O-GlcNAcylation et cancer**

Comme je l'ai présenté précédemment, la O-GlcNAcylation est impliquée dans la régulation d'un grand nombre de processus cellulaires et la moindre dérégulation de la dynamique de O-GlcNAcylation entraîne des défauts plus ou moins importants dans ces processus. Dans certains cas, les dérégulations peuvent conduire à différentes pathologies dont le diabète, les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives et de nombreux types de cancer. Pour les besoins de ce manuscrit je me concentrerai essentiellement sur l'implication de la O-GlcNAcylation dans le cancer mais voici quelques revues d'intérêt concernant les autres pathologies : Lefebvre et al. 2010; Hanover, Krause, et Love 2010; Vaidyanathan et Wells 2014; Marsh, Collins, et Chatham 2014; Ma et al. 2017; Wright et al. 2017; Akan et al. 2018.

### **I/ Quelques généralités sur le cancer**

Le cancer est une pathologie multifactorielle caractérisée par une prolifération anarchique des cellules et une résistance à la mort cellulaire par apoptose. Lors de leur transformation, les cellules cancéreuses subissent une reprogrammation métabolique favorisant la production d'ATP par la voie de la glycolyse et ce, même en présence d'oxygène. La voie de la glycolyse est étroitement liée à la voie de biosynthèse des hexosamines (HBP). En effet, le fructose-6-phosphate est au carrefour des deux voies et sera pris en charge par la GFAT dans la voie HBP ou par la phosphofructokinase (PFK) dans la voie de la glycolyse pour donner le fructose 1,6-bisphosphate (FBP). Après plusieurs étapes aboutissant à la production de phosphoénolpyruvate (PEP), ce dernier est pris en charge par la dernière enzyme limitante de la voie, la pyruvate kinase (PK) pour donner le pyruvate (Figure 29). De manière intéressante, nous verrons plus loin que la O-GlcNAcylation intervient sur le flux de la voie de la glycolyse notamment en régulant la stabilité et/ou l'activité de certaines enzymes de cette voie.



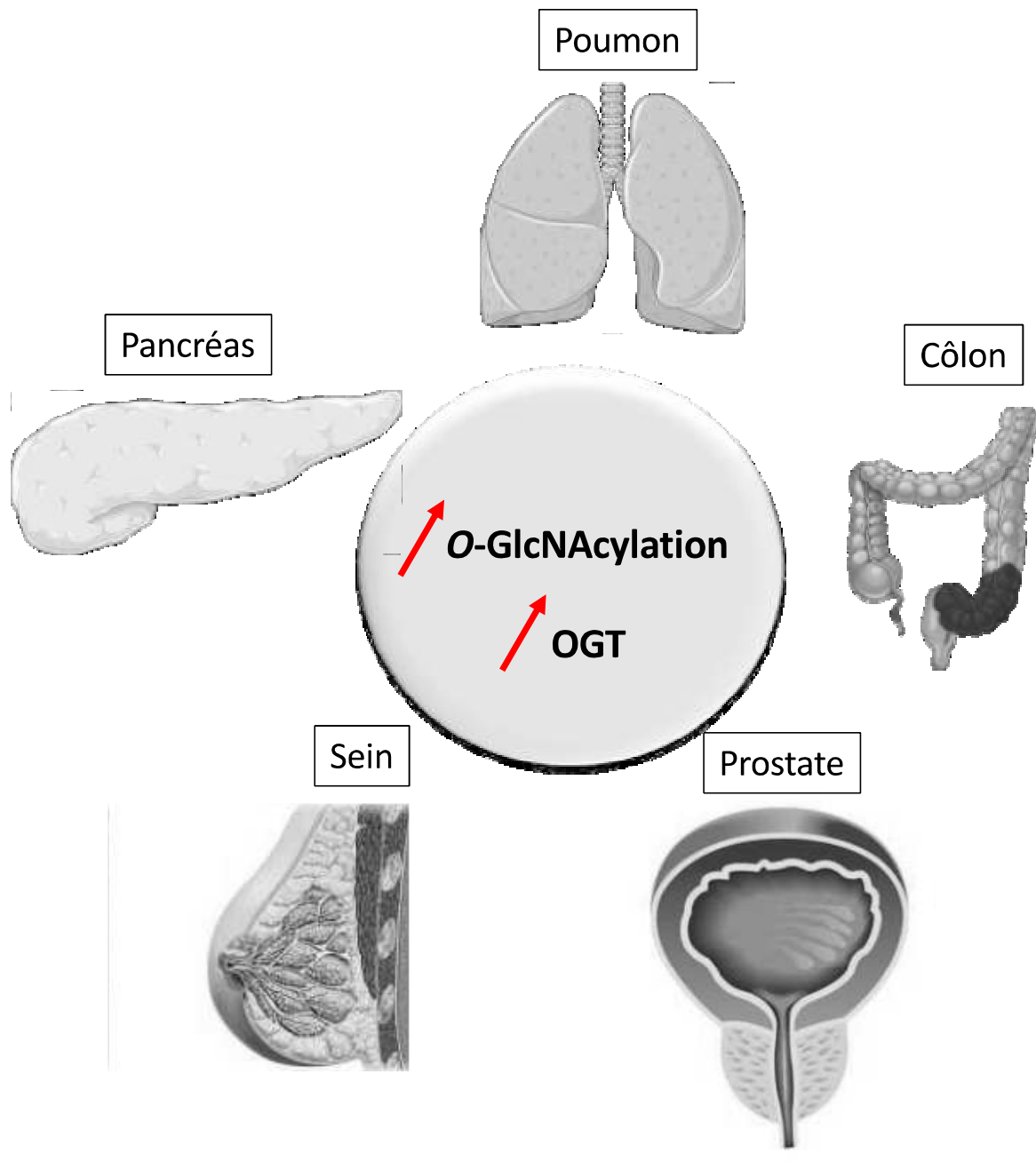
Alors que les cellules saines utilisent le pyruvate et la chaîne respiratoire de la mitochondrie pour produire 36 ATP par molécule de glucose, les cellules cancéreuses ne fournissent que deux ATP par molécule de glucose *via* la glycolyse avec la production d'acide lactique en condition normoxique (Józwiak et al. 2014). Ce shift métabolique appelé « effet Warburg » est retrouvé dans un grand nombre de cancers (Warburg 1956). Cependant, une certaine flexibilité est observable dans plusieurs cancers avec une conservation de l'activité des mitochondries et la production d'ATP venant à la fois de la glycolyse aérobie et de l'activité mitochondriale. Cette flexibilité est fortement dépendante du type cellulaire et des conditions environnementales (Potter, Newport, et Morten 2016).

Les cellules cancéreuses augmentent l'entrée du glucose d'un facteur d'environ 10 par rapport aux cellules saines afin de favoriser la production d'ATP et promouvoir leur croissance (Warburg 1956). L'entrée du glucose est permise par les transporteurs membranaires GLUT dont l'expression est augmentée dans différents types de cancer (Carvalho et al. 2011). La glutamine est aussi essentielle pour la croissance des cellules tumorales qui la consomment en grande quantité et l'utilisent comme source d'énergie (principalement au niveau de la mitochondrie)

## **II/ La O-GlcNAcylation aberrante des cellules cancéreuses**

Les concentrations élevées de glucose dans les cellules cancéreuses leur permettent d'augmenter la glycolyse mais induit aussi une augmentation des flux des voies associées à la glycolyse comme la voie HBP conduisant dans la majorité des cancers à une hyper-O-GlcNAcylation (Itkonen et al. 2013; C. Yang et al. 2016). De plus, plusieurs gènes de la voie HBP sont surexprimés dans différents types de cancer, dont le gène de la GFAT et de l'UAP, augmentant ainsi le flux de cette voie et la production d'UDP-GlcNAc (Ying et al. 2012; Itkonen et al. 2013). Ainsi, des niveaux élevés de GFAT sont associés à un mauvais pronostic

Figure 30: Une hyper-O-GlcNAcylation est retrouvée dans différents types de cancer





dans les cancers du pancréas, du sein et du foie (C. Yang et al. 2016; L. Li et al. 2017). Les cellules cancéreuses sont aussi de grandes consommatrices de glutamine qui est le substrat donneur de la GFAT, l'excès de glutamine participant également à l'augmentation du flux de la voie HBP.

Ainsi, les niveaux de *O*-GlcNAcylation de différents types de cancer ont été évalués et la majorité présente une hyper-*O*-GlcNAcylation par rapport aux tissus sains adjacents (Lynch et Reginato 2011) (Figure 30). De plus, les dérégulations de l'homéostasie de *O*-GlcNAcylation sont parfois dépendantes du type de cancer, du grade cancéreux ou du tissu concerné (C. Slawson et Hart 2011; Fardini et al. 2013; de Queiroz, Carvalho, et Dias 2014).

Une augmentation de la *O*-GlcNAcylation est observée dans le **cancer du poumon, du pancréas** et du **côlon** associée à une augmentation des niveaux d'OGT (Z. Ma, Vocadlo, et Vosseller 2013; S. Olivier-Van Stichelen et al. 2014; Steenackers et al. 2016). L'extinction de l'OGT dans plusieurs lignées de cancer du côlon entraîne une diminution de la prolifération cellulaire et de la survie *in vitro* (Steenackers et al. 2016). De plus, la réduction de la *O*-GlcNAcylation n'a pas d'effet sur la croissance des cellules du pancréas non transformées mais inhibe la prolifération et la croissance des cellules cancéreuses (Z. Ma, Vocadlo, et Vosseller 2013). Dans le **cancer du sein**, les niveaux de *O*-GlcNAcylation et d'OGT sont plus élevés que dans les tissus sains adjacents et augmentent en fonction du grade cancéreux (Caldwell et al. 2010; Yuchao Gu et al. 2010; Champattanachai et al. 2013; Trinca et al. 2017). L'extinction de l'OGT dans les lignées cancéreuses mammaires inhibe la croissance cellulaire à la fois *in vitro* et *in vivo* ainsi que l'invasion des cellules cancéreuses (Caldwell et al. 2010) L'OGT est surexprimée dans le **cancer de la prostate** et cette surexpression est nécessaire à l'invasion et l'angiogenèse. De plus, la diminution de l'expression de l'OGT inhibe la métastase osseuse chez la souris indiquant que la surexpression de l'OGT est un acteur essentiel de la croissance tumorale dans le cancer de la prostate (Lynch et al. 2012). Dans le cancer de la



prostate, l'inhibition de l'OGT entraîne une diminution de la consommation de glucose, de la production de lactate et une inhibition de la prolifération de ces cellules (Itkonen et al. 2016).

Cependant, quelques études menées sur les cancers du sein et de la thyroïde indiquent une augmentation de l'activité de l'OGA, associée à une diminution des niveaux de *O*-GlcNAcylation par rapport aux tissus sains (C. Slawson, Pidala, et Potter 2001; Krzeslak, Pomorski, et Lipinska 2010). Ceci suggérant une implication complexe de la dynamique de *O*-GlcNAcylation dans le développement cancéreux.

### **III/ La *O*-GlcNAcylation et le shift métabolique**

#### **1°) La régulation des transporteurs de glucose GLUT**

Les protéines de la famille des transporteurs de glucose (GLUT) sont des protéines transmembranaires dont le rôle consiste à faciliter l'entrée du glucose dans les cellules (Thorens et Mueckler 2010). GLUT1 est retrouvé dans la plupart des tissus avec cependant des concentrations variables selon le tissu considéré. Sa concentration est la plus faible dans les muscles et le foie et la plus élevée au niveau de la membrane des érythrocytes et de la barrière hématoencéphalique. GLUT2 est surtout retrouvé au niveau du foie, du pancréas, du rein et de l'intestin grêle, GLUT3 est surtout retrouvé dans le cerveau et GLUT4, qui est sensible à l'insuline, est localisé au niveau des muscles squelettique et du tissu adipeux (Kayano et al. 1988; Devaskar et deMello 1996).

Le transporteur GLUT4 est *O*-GlcNAcylé, cependant l'impact de la modification sur l'activité de GLUT4 est encore peu connu (Park, Ryu, et Lee 2005; Buse et al. 2002). Une des hypothèses est que la *O*-GlcNAcylation régulerait la translocation de GLUT4 à la membrane plasmique, modulant ainsi la capacité des cellules à importer le glucose, mais ceci doit encore être démontré expérimentalement (Vosseller et al. 2002; Park, Ryu, et Lee 2005; C. Slawson, Housley, et Hart 2006).



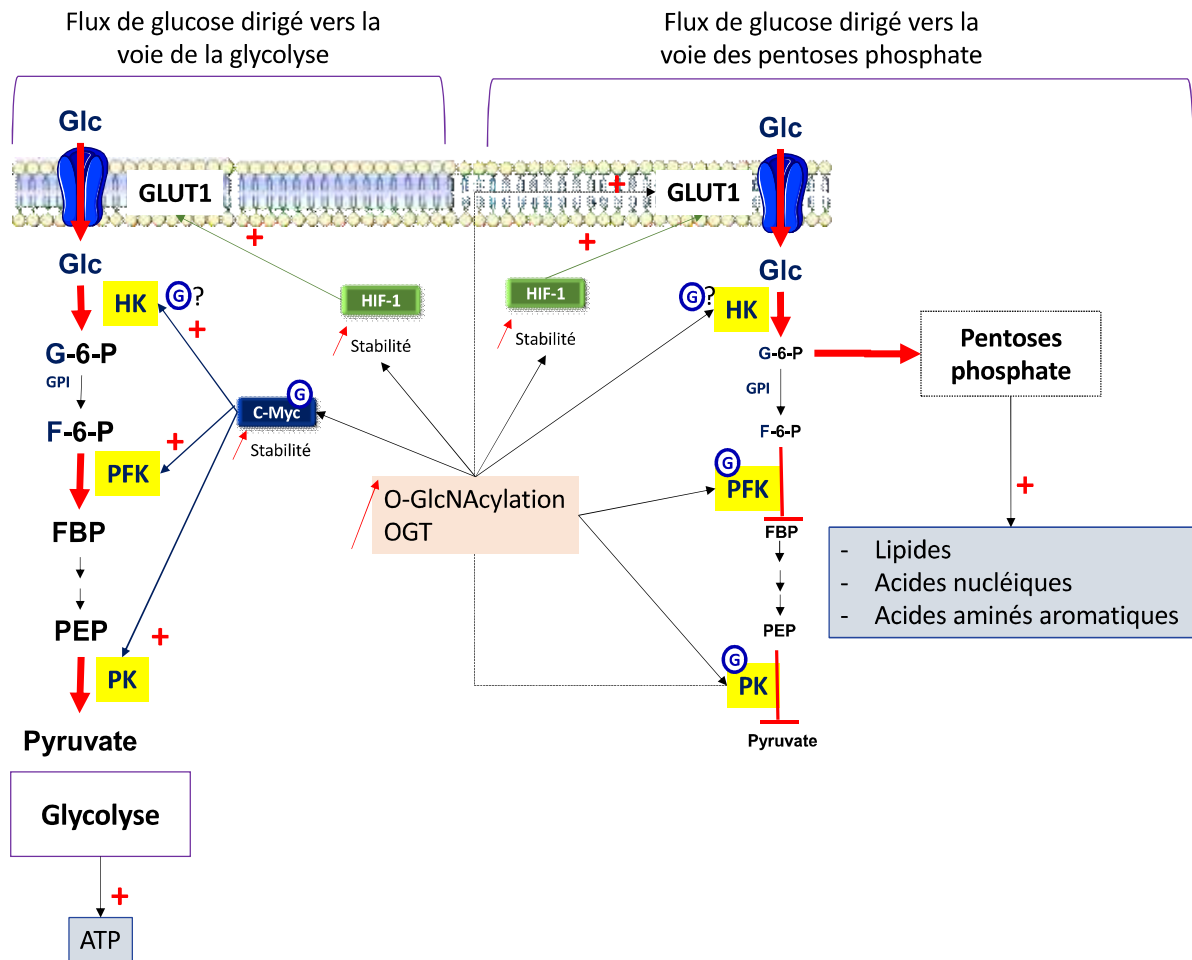
La régulation du transporteur GLUT1 par la *O*-GlcNAcylation est plus connue et passe notamment par la régulation des facteurs de transcription de la famille HIF (*Hypoxia-induced factor*). Ce sont des facteurs essentiels pour le shift métabolique de la cellule cancéreuse puisqu'ils participent à l'augmentation de la consommation de glucose et de la production de lactate en condition de faible apport oxygénique. HIF comprend deux facteurs, HIF-1 et HIF-2. HIF-1 active la transcription d'un ensemble de gènes impliqués dans la glycolyse aérobie ainsi que dans la synthèse de macromolécules importantes pour la croissance tumorale à partir du glucose et de la glucosamine (Shaw et Cantley 2012). Dans des conditions normoxiques dans des cellules saines, HIF-1 est hydroxylé et dégradé par le protéasome. A l'inverse, dans les cellules cancéreuses, HIF-1 est stabilisé, quels que soient les niveaux d'oxygène, et participe à la transcription de plusieurs gènes dont GLUT1 et l'hexokinase 2 favorisant ainsi la mise en place de l'effet Warburg et dont je reparlerai dans la partie suivante (Semenza 2010).

Une étude menée dans des cellules de cancer du sein montre que l'hyper-*O*-GlcNAcylation participe à la régulation du métabolisme des cellules cancéreuses *via* la régulation de HIF-1. En effet, l'OGT protège HIF-1 de la dégradation protéasomale car l'extinction de l'expression de l'enzyme dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 entraîne une diminution des niveaux protéiques de HIF-1, sans moduler les niveaux d'ARNm (C. M. Ferrer et al. 2014) (Figure 31). Ainsi la *O*-GlcNAcylation participerait à l'augmentation des niveaux de GLUT1 *via* l'inhibition de la dégradation de HIF-1, permettant l'entrée massive de glucose dans les cellules cancéreuses.

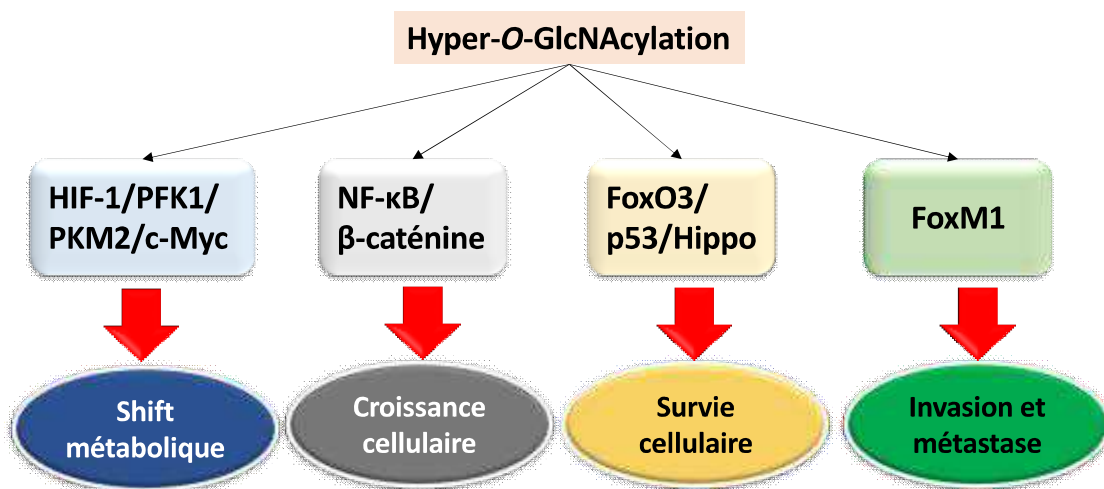
## **2°) Régulation du flux de la voie de la glycolyse par *O*-GlcNAcylation**

Après l'entrée du glucose dans la cellule, plusieurs enzymes impliquées dans la voie de la glycolyse sont modulées par l'hyper-*O*-GlcNAcylation dans les cellules cancéreuses.

**Figure 31: Implication de l'hyper-O-GlcNAcylation dans des voies métaboliques soutenant la croissance des cellules cancéreuses**



**Figure 32: Implications de l'hyper-O-GlcNAcylation dans les cellules cancéreuses.**



Dès son entrée dans la cellule, le glucose est phosphorylé par une **hexokinase** (HK ; ou glucokinase, GK) pour donner le G-6-P qui ne peut plus traverser la membrane plasmique. Les hexokinases, tout comme GLUT1, sont des cibles transcriptionnelles de HIF-1 et pourraient donc être indirectement régulées par la *O*-GlcNAcylation (Iyer, Leung, et Semenza 1998; Iyer et al. 1998; Semenza 2010). En accord avec cette hypothèse, une étude de 2012 montre qu'une surexpression de l'OGT induit une augmentation de l'activité hexokinase dans les cellules qui pourrait être due à une augmentation de leur expression (Yi et al. 2012). Toutefois, des travaux de l'équipe montrent à la fois *in vitro* et *in vivo* que l'hexokinase IV (ou glucokinase, GCK) est *O*-GlcNAcylée et pourrait donc être régulée de manière directe par l'OGT. La GCK est retrouvée au niveau du foie et des cellules  $\beta$  du pancréas et sa *O*-GlcNAcylation régule positivement son expression dans des cellules hépatiques (Baldini et al. 2016). En effet, l'inhibition de l'OGA par injection de Thiamet G dans des souris ob/ob induit une augmentation du niveau global de *O*-GlcNAcylation associée à une augmentation de l'expression protéique de GCK, sans augmentation des niveaux d'ARNm indiquant une régulation post-transcriptionnelle de la GCK par *O*-GlcNAcylation (Baldini et al. 2016). A l'inverse, l'extinction de l'OGT dans des cellules hépatiques diminue le niveau protéique de la GCK. Ainsi, l'hyper-*O*-GlcNAcylation pourrait directement stabiliser et augmenter l'activité des hexokinases et ainsi favoriser le flux de la voie de la glycolyse dans les cellules cancéreuses (Figure 31).

Ensuite, la **phosphofructokinase 1** (PFK1) est *O*-GlcNAcylée sur la sérine 529 en réponse à l'hypoxie. Cette *O*-GlcNAcylation a pour effet d'inhiber l'activité de PFK1 redirigeant le flux de glucose vers la voie des pentoses phosphate, favorisant ainsi la biosynthèse de lipides, d'acides nucléiques et d'acides aminés aromatiques (Yi et al. 2012) (Figure 31). Ce shift est particulièrement important pour la prolifération anarchique des cellules cancéreuses qui ont besoin de synthétiser un grand nombre de biomolécules indispensables à leur croissance. Ainsi





l'hyper-*O*-GlcNAcylation favorise la synthèse de ces éléments en participant à l'augmentation du flux de la voie des pentoses phosphates.

**PKM2** est une isoforme de la pyruvate kinase (PK) produite par épissage alternatif dans les cellules hautement prolifératives et les cellules cancéreuses. Les PKs sont les dernières enzymes limitantes de la voie de la glycolyse. PKM2 est *O*-GlcNAcylée sur deux sites (Thr-405 et Ser-406) dans différents types cancéreux (Y. Wang et al. 2017). Cette modification a pour effet de déstabiliser le tétramère PKM2 diminuant ainsi son activité PK tout en augmentant sa localisation nucléaire. Encore une fois, la diminution d'activité de la kinase permet de rediriger le flux de glucose vers la voie des pentoses phosphate. En effet, la mutation des deux sites de *O*-GlcNAc en alanine entraîne une diminution de la croissance des cellules cancéreuses et de la synthèse de lipides et d'acides nucléiques (Y. Wang et al. 2017). De plus, PKM2 relocalisée dans le noyau stimule l'expression de GLUT1, ce qui a pour effet d'augmenter l'entrée du glucose dans la cellule. La *O*-GlcNAcylation participe donc à la reprogrammation cellulaire *via* la régulation de l'activité et la localisation de PKM2.

Enfin, bien que la voie des pentoses phosphate soit très importante pour la croissance des cellules tumorales, la voie de la glycolyse ne doit pas être négligée afin de fournir l'ATP nécessaire à la survie des cellules. Dans cette optique, un facteur de transcription dont la stabilité est modulée par *O*-GlcNAcylation, est impliqué dans l'expression de plusieurs enzymes de la voie de la glycolyse : **c-Myc** (N. Meyer et Penn 2008). C-Myc est un oncogène, très souvent activé de manière constitutive dans les cancers, participant ainsi la croissance tumorale indépendamment des facteurs de croissance (Yeung, Pan, et Lee 2008). En effet, c-Myc active la transcription de gènes impliqués dans la voie de la glycolyse dont HK2, PFK1 et PKM2 et participe dans les cellules cancéreuses à l'augmentation du flux de cette voie pour favoriser la production d'ATP (Miller et al. 2012). La stabilité de c-Myc est régulée par une dynamique de phosphorylation/déphosphorylation sur des sites spécifiques (Sears 2004). ERK phosphoryle



c-Myc sur la sérine 62 pour le stabiliser et permettre la phosphorylation de la Thr-58 par la kinase GSK3 $\beta$ . La déphosphorylation du site Ser-62 par PP2A (Protein phosphatase 2A) entraîne l'ubiquitination de la protéine et sa dégradation par le protéasome (Yeh et al. 2004). C-Myc est aussi O-GlcNAcylé sur la thréonine 58, cette modification peut ainsi entrer en compétition avec la phosphorylation par GSK3 $\beta$  pour augmenter la stabilité du facteur de transcription (Chou, Hart, et Dang 1995; Chou, Dang, et Hart 1995; Chou et Hart 2001) (Figure 31). Itkonen et collaborateurs ont montré dans le cancer de la prostate qu'une inhibition de l'OGT induit une diminution des niveaux protéiques de c-Myc, sans modifier les niveaux d'ARNm confirmant que la O-GlcNAcylation de c-Myc augmente sa stabilité (Itkonen et al. 2013). Donc l'hyper-O-GlcNAcylation dans les cellules cancéreuses participe au maintien de c-Myc et par conséquent, à l'augmentation de l'expression des enzymes de la glycolyse favorisant ainsi la production d'énergie par cette voie métabolique.

#### **IV/ L'hyper-O-GlcNAcylation favorise la prolifération et la survie cellulaire.**

Comme je l'ai déjà évoqué plus haut, l'inhibition ou l'extinction de l'OGT dans plusieurs types cancéreux entraîne une inhibition de la croissance tumorale témoignant de l'importance de l'enzyme pour la régulation de ce processus. Nous verrons que l'hyper-O-GlcNAcylation participe à l'activation constitutive de plusieurs oncogènes, par exemple c-Myc que j'ai déjà cité, et à l'inhibition de différents suppresseurs de tumeurs.

##### **1°) Activation de proto-oncogènes.**

**NF- $\kappa$ B** est une famille de facteurs de transcription (p62, RelB, c-Rel, p50 et p52) impliquée dans la prolifération et la survie cellulaire. Ce facteur est retrouvé activé de manière constitutive dans plusieurs types de cancer (Staudt 2010). Les protéines p65 et c-Rel sont O-GlcNAcylées en condition de niveaux élevés de glucose, ce qui augmente leur interaction avec l'ADN et leur



activité transcriptionnelle (W. H. Yang et al. 2008; Ramakrishnan et al. 2013; Y. R. Yang, Kim, et al. 2015). La diminution de l'hyper-*O*-GlcNAcylation dans des lignées de cancer du pancréas inhibe la phosphorylation activatrice de la sous-unité p62, ainsi que la translocation nucléaire et l'activité transcriptionnelle du complexe NF- $\kappa$ B (Z. Ma, Vocadlo, et Vosseller 2013). Ceci indique que la *O*-GlcNAcylation de NF- $\kappa$ B participe à son activation constitutive dans le cancer.

Récemment, des sites de *O*-GlcNAcylation de p65 ont été identifiés (T305, S319, T322, S337, T352 et S374) et parmi eux, les sites T322 et T352 régulent le recrutement de p65 sur ses promoteurs-cibles (Y. R. Yang, Kim, et al. 2015; Z. Ma, Chalkley, et Vosseller 2017). La *O*-GlcNAcylation des deux sites T305 et S319 favorise l'acétylation en K310 et l'activation de NF- $\kappa$ B. De plus, l'hyper-*O*-GlcNAcylation induite par la surexpression de l'OGT augmente la phosphorylation activatrice de p65 sur la Ser-536, notamment *via* l'augmentation de l'expression des kinases IKK catalysant cette modification (Z. Ma, Chalkley, et Vosseller 2017).

La voie **Wnt/ $\beta$ -caténine** est importante pour le développement et joue aussi un rôle essentiel dans le développement du cancer, et particulièrement dans le cancer colorectal (CCR) où l'augmentation de l'expression et de l'activité de la  $\beta$ -caténine favorise la prolifération anarchique des cellules (S. Olivier-Van Stichelen et al. 2014; Zhan, Rindtorff, et Boutros 2017). Nous avons déjà vu dans le paragraphe traitant de la *O*-GlcNAcylation et la régulation de la polyubiquitination, que l'OGT régule positivement la stabilité de la  $\beta$ -caténine en inhibant sa dégradation protéasomale. Ainsi l'hyper-*O*-GlcNAcylation observée dans différentes lignées de CCR pourrait contribuer à l'augmentation des niveaux de  $\beta$ -caténine et favoriser la prolifération des cellules cancéreuses (S. Olivier-Van Stichelen et al. 2012, 2014). Ces résultats sont renforcés par une étude très récente qui montre que l'inhibition de l'OGA par le thiamet G entraîne une augmentation de l'expression de la  $\beta$ -caténine ainsi qu'une



augmentation de son activité transcriptionnelle dans le cancer colorectal (Harosh-Davidovich et Khalaila 2018a). Ainsi, l'hyper-*O*-GlcNAcylation augmente l'expression et l'activité de la  $\beta$ -caténine, ce qui contribuerait au développement des tumeurs. Comme nous venons de le voir, l'hyper-*O*-GlcNAcylation participe à l'activation constitutive de plusieurs facteurs de transcription impliqués dans la transcription de gènes favorisant la croissance des cellules cancéreuses.

## 2°) Inactivation de suppresseurs de tumeurs

**FoxO3** est un membre de la classe O de la famille de protéines *forkhead* régulant l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués dans l'apoptose et la progression du cycle cellulaire. FoxO3 est un suppresseur de tumeur connu pour inhiber la progression du cycle cellulaire *via* l'activation de la transcription de l'inhibiteur de CDK p21 (Downing 2011). FoxO3 est *O*-GlcNAcylé et ce, à des niveaux plus élevés dans plusieurs types de cancer, dont le cancer du pancréas, par rapport à des tissus sains (H. Shin et al. 2018). La *O*-GlcNAcylation sur le site Ser-284 inhibe son activité de suppresseur de tumeur avec une diminution de l'expression de p21, ce qui est connu pour faciliter la croissance tumorale. L'utilisation d'un mutant S284A entraîne à l'inverse une augmentation de l'expression de p21 et un ralentissement de la croissance des cellules tumorales *in vitro*. Une étude plus poussée montre que la diminution de l'expression de p21, avec la *O*-GlcNAcylation de FoxO3, dépend de la dégradation d'un autre suppresseur de tumeur, associé à FoxO3 : **p53** (H. Shin et al. 2018).

En condition non pathologique, p53 est ubiquitinylé par Mdm2 et continuellement dégradé par le protéasome. Toutefois, en condition de stress, p53 est stabilisé afin d'activer la transcription de gènes associés à la réponse au stress et à l'arrêt du cycle cellulaire, dont p21 (B. Gu et Zhu 2012). Ainsi, l'étude de Shin et collaborateurs montre que, dans le cancer du pancréas, la *O*-GlcNAcylation de FoxO3 conduit à la dégradation protéasomale de p53 *via*





l'ubiquitination par Mdm2 et donc à la diminution de l'expression de p21 (H. Shin et al. 2018). Ceci met en lumière une nouvelle relation entre la stabilité du suppresseur de tumeur p53 et la dynamique de O-GlcNAcylation (W. H. Yang et al. 2006). Enfin, la O-GlcNAcylation peut intervenir au niveau de la voie **Hippo** qui possède une activité de suppression de tumeur *via* l'inhibition de l'activité de l'oncogène **YAP** et l'activation de l'apoptose (Pan 2010; Fallahi, O'Driscoll, et Matallanas 2016). Dans la voie Hippo, YAP forme un complexe avec TAZ et est phosphorylée par les deux complexes kinase de la voie : MST1/2 et LAST1/2. Sous sa forme phosphorylée, YAP/TAZ est séquestré dans le cytosol où il sera continuellement dégradé par le protéasome. Sous sa forme hypophosphorylée, YAP/TAZ joue un rôle de co-activateur de facteurs de transcription dans le noyau (Zanconato, Cordenonsi, et Piccolo 2016). Une accumulation du complexe YAP/TAZ est retrouvée dans plusieurs types de cancer et une étude récente de Zhang et collaborateurs montre une corrélation entre l'expression de YAP et les niveaux de O-GlcNAcylation dans le cancer du foie (Guo et Teng 2015; X. Zhang et al. 2017). Cette même étude suggère un dialogue compétitif entre la O-GlcNAcylation de YAP sur la Thr-241 et sa phosphorylation sur la Ser-127 qui évolue de façon dépendante de la concentration en glucose. En effet, plus la concentration en glucose augmente, plus la phosphorylation diminue au profit de la O-GlcNAcylation (X. Zhang et al. 2017). L'effet inverse est obtenu après une privation de glucose dans des cellules HEK293T, HeLa et la lignée cancéreuse pancréatique L3.6. Ils montrent que la O-GlcNAcylation de YAP empêche son interaction avec la kinase LAST1 et donc sa phosphorylation, favorisant ainsi sa stabilisation (C. Peng et al. 2017; X. Zhang et al. 2017). L'induction d'une hyper-O-GlcNAcylation, par l'inhibition de l'OGA ou la surexpression de l'OGT, augmente l'activité transcriptionnelle de YAP. A l'inverse, l'extinction de l'expression de l'OGT ou la mutation des sites O-GlcNAc de YAP, déstabilise le complexe YAP/TAZ, diminue son activité et conduit à l'augmentation de sa phosphorylation et donc de sa dégradation (C. Peng et al. 2017; X. Zhang et al. 2017). *In vivo*,



l'expression de YAP mutée sur les sites de O-GlcNAcylation entraîne une diminution de la taille des tumeurs comparable à une condition d'extinction de YAP (C. Peng et al. 2017). L'ensemble de ces résultats démontre un rôle de la O-GlcNAcylation dans l'inhibition de la voie Hippo *via* un dialogue compétitif avec la phosphorylation sur l'oncogène YAP.

Ainsi l'hyper-O-GlcNAcylation dans les cellules cancéreuses facilite leur croissance en activant différents facteurs de transcription oncogéniques et les protège de la mort cellulaire en inhibant un ensemble de suppresseurs de tumeur.

## **V/ Régulation de l'invasion et de la métastase *via* FoxM1**

Gu et collaborateurs ont observé *in vivo* que l'extinction de l'OGT entraîne une inhibition de l'apparition des métastases du cancer du sein, suggérant fortement une implication de l'OGT dans la régulation de ce processus (Y. Gu et al. 2010).

FoxM1 est un facteur de transcription dont l'expression et l'activité sont augmentées dans un grand nombre de cancers. FoxM1 est essentiel pour la prolifération cellulaire puisqu'il contrôle la transcription de gènes impliqués dans le passage des transitions G1/S et G2/M tels que les gènes de la cycline B et de AURKB (I.-C. Wang et al. 2005; Myatt et Lam 2007). Il joue aussi un rôle dans le processus d'invasion cellulaire *via* la régulation des MMPs (*Matrix metalloproteinases*) (Z. Wang et al. 2007). Les MMPs sont des enzymes impliquées dans le remodelage de la matrice extracellulaire (MEC) qui possèdent une activité protéolytique facilitant l'invasion des cellules cancéreuses (Gialeli, Theocharis, et Karamanos 2011).

L'étude de Caldwell et collaborateurs menée dans des lignées cancéreuses mammaires montre que l'inhibition ou l'extinction de l'OGT entraîne une inhibition de la croissance des cellules cancéreuses ainsi qu'une diminution des niveaux protéiques de FoxM1 et de ses cibles dont MMP2. De plus, l'expression de l'inhibiteur p27<sup>Kip1</sup> est augmentée dans les mêmes conditions (Caldwell et al. 2010). L'extinction de l'OGT dans les cellules cancéreuses



mammaires entraîne aussi une diminution significative des niveaux protéiques et d'ARNm de MMP-2, qui est sous le contrôle de FoxM1 (Caldwell et al. 2010). Ceci suggérant que l'OGT participe aussi à la régulation de l'invasion des cellules cancéreuses en modulant l'activité de FoxM1 vis-à-vis de MMP-2. Une diminution similaire des métalloprotéases a été observée dans le cancer de la prostate où l'hyper-O-GlcNAcylation a été réduite, induisant par la même occasion une inhibition de l'invasion des cellules cancéreuses (Lynch et al. 2012). Toutefois, les auteurs en ont conclu que l'OGT régula indirectement l'expression de FoxM1 car ils n'ont pu identifier aucun site de O-GlcNAcylation sur ce facteur de transcription (Caldwell et al. 2010). Cette hypothèse a été confirmée dans une étude de 2017 montrant que la diminution des niveaux de O-GlcNAcylation entraîne une augmentation de la dégradation protéasomale de FoxM1 de façon dépendante de la voie MEK/ERK (C. M. Ferrer et al. 2017). Récemment, il a été démontré que l'hyper-O-GlcNAcylation induite par des concentrations élevées en glucose ou une inhibition de l'OGA par le thiamet G inhibe l'ubiquitination de FoxM1 et sa dégradation de manière indirecte *via* la régulation de GSK-3 $\beta$  (Inoue et al. 2018). En effet, cette kinase modifie FoxM1 pour induire son ubiquitination et sa dégradation (Y. Chen et al. 2016, 201). En conditions d'hyper-O-GlcNAcylation la phosphorylation GSK-3 $\beta$  en S9, connue pour inhiber son activité (Beurel, Grieco, et Jope 2015), est augmentée, réduisant ainsi la dégradation de FoxM1 (Inoue et al. 2018).

L'ensemble de ces données démontrent l'importance de la dynamique de O-GlcNAcylation dans le développement cancéreux et suggèrent que l'OGT pourrait être une cible thérapeutique intéressante dans le traitement anti-cancéreux (Figure 33). Ceci fait actuellement l'objet de nombreux travaux par différentes équipes (Lynch et Reginato 2011).



## Partie 4 : La réplication de l'ADN eucaryote

La réplication de l'ADN est un processus hautement conservé essentiel à la survie cellulaire et intervenant pendant la phase S du cycle cellulaire. C'est un processus semi-conservatif et bidirectionnel qui se déroule en trois étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison (Watson et Crick 1953; S. P. Bell et Labib 2016; Riera et al. 2017). Chacune d'elles est finement régulée par la formation de complexes protéiques spécifiques et grâce à l'intervention de différentes modifications post-traductionnelles. Ces mécanismes de régulation sont essentiels pour assurer une duplication fidèle du génome et empêcher une réplication aberrante de l'ADN comme une duplication incomplète du génome qui peut conduire à la mort cellulaire ou à de l'aneuploïdie. La cellule doit aussi assurer la duplication unique du génome par cycle cellulaire car une polyploïdie pourrait entraîner la surexpression de certains gènes dans les cellules filles comme observé dans certains cancers surexprimant les gènes impliqués dans la croissance et la survie cellulaire (Abbas, Keaton, et Dutta 2013).

L'aspect bidirectionnel de la réplication est permis par la création de deux fourches de réplication lors de l'ouverture de la double hélice d'ADN qui vont se déplacer dans des sens opposés au cours de l'élongation (P. M. J. Burgers et Kunkel 2017). Selon le sens de déplacement, une distinction est faite entre les deux brins d'ADN séparés. En effet, le brin synthétisé dans le sens de déplacement de la fourche est appelé brin sens (*Leading strand*) et est synthétisé de manière continue par la machinerie réplivative. Le brin synthétisé dans le sens inverse est quant à lui répliqué de manière discontinue et est nommé brin retard (*Lagging strand*). La réplication discontinue est permise grâce à la synthèse d'un ensemble de petits fragments d'ARN jouant le rôle d'amorces pour la synthèse des fragments d'Okazaki par les ADN polymérasés. Ceci sera détaillé dans le paragraphe traitant de l'étape d'élongation.





# A/ L'initiation de la Réplication

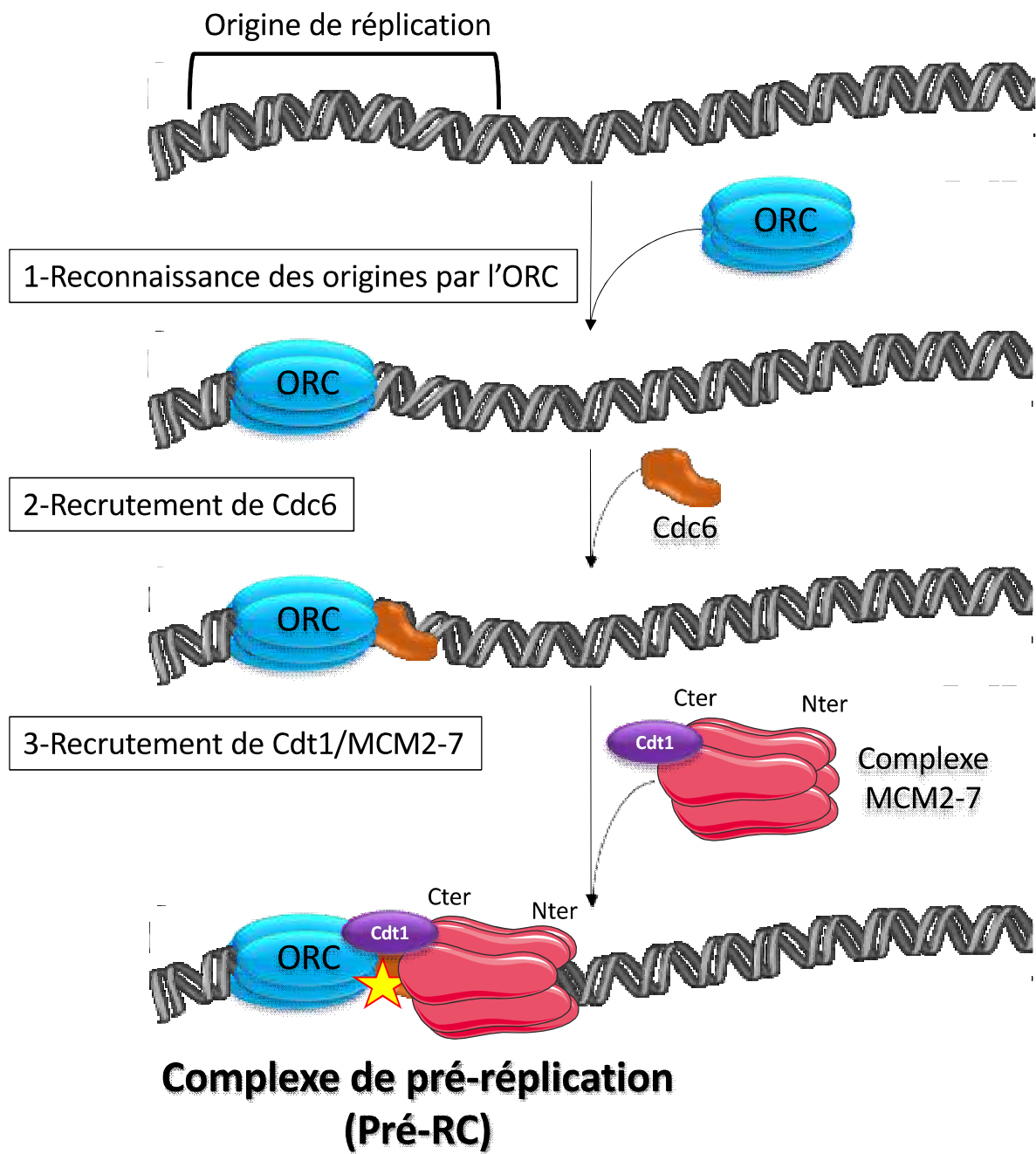
## I/ La reconnaissance des origines de réplication

La toute première étape de la réplication de l'ADN consiste à recruter un ensemble de facteurs nécessaires à l'initiation de la réplication, et notamment à l'ouverture de la double hélice d'ADN, au niveau de séquences spécifiques appelées origines de réplication (Ori). Ainsi le complexe de reconnaissance de l'origine (ORC ; *Origin Recognition Complex*), les facteurs de *licensing* Cdc6 et Cdt1 et enfin le complexe *Minichromosome Maintenance* MCM2-7 sont recrutés à la chromatine pendant cette étape (Figure 33). Ensemble, ils forment le complexe de pré-réplication, ou pré-RC, qui n'existe que pendant un laps de temps très court et qui est donc difficilement observable *in vivo* (S. P. Bell et Kaguni 2013).

Un ensemble d'origines de réplication se situe sur des sites précis de la molécule d'ADN et ont été identifiées chez la levure sous l'appellation ARS (*Autonomously replicating sequence*). Cependant, de telles séquences ne sont pas retrouvées chez les mammifères (Stinchcomb, Struhl, et Davis 1979). Malgré tout, quelques sites d'initiation de la synthèse de l'ADN ont pu être identifiés chez ces organismes comme par exemple une séquence située à l'extrémité 3' du gène de la lamine B2 humaine (G. Abdurashidova et al. 2000; Falaschi et al. 2007). L'étude de cette Ori a permis d'en apprendre un peu plus sur les mécanismes guidant le recrutement des facteurs de réplication sur une séquence précise de l'ADN (Stefanovic et al. 2003; Gulnara Abdurashidova et al. 2003).

L'état de compaction de la chromatine au niveau des Ori est un élément déterminant pour leur reconnaissance et la fixation des facteurs de réplication. En effet, les origines de réplication actives sont souvent entourées d'histones hyper-acétylées, induisant la décompaction de la chromatine et facilitant l'assemblage du pré-RC (Miotto et Struhl 2010). De plus, l'inhibition des histone déacétylases (HDAC) induit un phénomène d'extra-réplication

Figure 33: La formation du complexe de pré-réplication au niveau des origines



★ → Hydrolyse d'ATP

chez la drosophile dû à une augmentation de l'activation des origines de réplication (Aggarwal et Calvi 2004). A l'inverse, la méthylation qui est un signal de compaction induit l'inhibition de l'initiation de la réplication, inhibition annulée grâce à l'activité des déméthylases (Black et al. 2010, 201; Jacob et al. 2014). Donc, à l'image de la transcription, la réplication de l'ADN est fortement dépendante de la régulation épigénétique, autant pour la reconnaissance des origines de réplication et la formation du pré-RC pendant l'initiation que pour le déplacement des fourches pendant l'élongation (R. Wu et al. 2017; Rowlands et al. 2017).

Les origines de réplication sont reconnues par l'ORC qui est le premier facteur de réplication à interagir avec la chromatine (Lei et al. 2002; S. P. Bell et Kaguni 2013) (Figure 33). L'ORC est un complexe de 6 sous-unités dont cinq appartiennent à la famille des ATPases AAA+ (ATPases associées à diverses activités cellulaires), Orc1 à Orc5, associées à une sous-unité supplémentaire, Orc6. L'assemblage, la stabilité et l'activité de l'ORC dépendent de l'ATP (H. Li et Stillman 2012; M. O'Donnell, Langston, et Stillman 2013; Siddiqui et Stillman 2007). La dynamique d'interaction du complexe ORC avec la chromatine diffère selon l'organisme considéré. Ainsi, chez *Saccharomyces cerevisiae*, l'ORC reste lié à la chromatine tout au long du cycle cellulaire alors que chez *Saccharomyces pombe*, ORC est recruté à la chromatine principalement à la transition M/G1. Chez la drosophile, la sous-unité Orc1 est dégradée en fin de phase M par le protéasome pour être ensuite resynthétisée en fin de G1 et permettre le recrutement de l'ensemble du complexe en G1/S (H. Li et Stillman 2012). Chez l'homme, la sous-unité Orc1 interagit avec la chromatine pendant la mitose puis le reste du complexe s'assemble sur l'ADN pendant la phase G1 (Okuno et al. 2001; Siddiqui et Stillman 2007). Après activation de la synthèse de l'ADN pendant la phase S, Orc1 et Orc2 quittent les origines de réplication et Orc1 est polyubiquitinylée puis dégradée, empêchant ainsi une reréplication plus tard dans le cycle (C.-J. Li et DePamphilis 2002; G. Abdurashidova et al. 2003; DePamphilis 2003, 200). Un autre mécanisme fait intervenir le complexe cycline



A/CDK1 qui phosphoryle Orc1 empêchant ainsi son interaction avec la chromatine pendant la mitose (C. Li, Vassilev, et DePamphilis 2004).

L'interaction de l'ORC avec les Ori est essentielle pour le recrutement des autres facteurs de réplication dont le chargement à la chromatine diminue significativement en absence d'ORC ou de l'une de ses sous-unités chez la levure et la drosophile (Cuvier, Lutzmann, et Méchali 2006; H. Li et Stillman 2012). Toutefois, une étude récente montre que certaines sous-unités du complexe ORC ne sont pas indispensables à la survie cellulaire chez l'homme, suggérant que d'autres mécanismes pourraient être mis en place par la cellule pour reconnaître les origines de réplication. Les sous-unités manquantes dans cette étude, Orc1 ou Orc2 possèdent toutes les deux un domaine de liaison au facteur Cdc6, le second composant du pré-RC, suggérant qu'il suffit que l'une de ces sous-unités soit encore présente dans le complexe pour permettre le recrutement de ce facteur à la chromatine (Shibata et al. 2016; S. P. Bell 2017).

Ainsi, l'ORC chargé sur les origines de réplication recrute à la chromatine le facteur de réplication Cdc6 (*Cell division control*) pour former une plateforme nécessaire à l'interaction des facteurs suivants (Sun et al. 2012) (Figure 33). Le recrutement de Cdc6 sur l'ADN intervient en fin de mitose et pendant la phase G1 puis le facteur quitte rapidement la chromatine après le recrutement de l'hélicase MCM2-7. Le devenir de Cdc6 après avoir quitté la chromatine est dépendant de l'organisme considéré. Chez la levure, Cdc6 est exclusivement nucléaire et est ubiquitinylée pendant la phase S par l'E3 ubiquitine ligase CSF<sup>CDC4</sup> en réponse à des phosphorylations de sa région N-terminale, pour être ensuite dégradée par le protéasome (Williams, Shohet, et Stillman 1997; Yan et al. 1998; Stoeber et al. 1998; Elsasser et al. 1999; Sánchez, Calzada, et Bueno 1999; Calzada et al. 2000). Par contre, chez l'homme, Cdc6 est exportée du noyau après l'initiation de la réplication protégeant ainsi la cellule d'une reréplication en phase G2 ou M (Saha et al. 1998; Coverley et al. 2000) (Figure 34).



La localisation subcellulaire de Cdc6 chez l'homme dépend de phosphorylations catalysées par le complexe cycline A/CDK2 qui à la fois masquent les séquences NLS et permettent l'exposition de deux séquences NES (*Nuclear export sequence*) de la protéine (Delmolino, Saha, et Dutta 2001; Hwang et al. 2014).

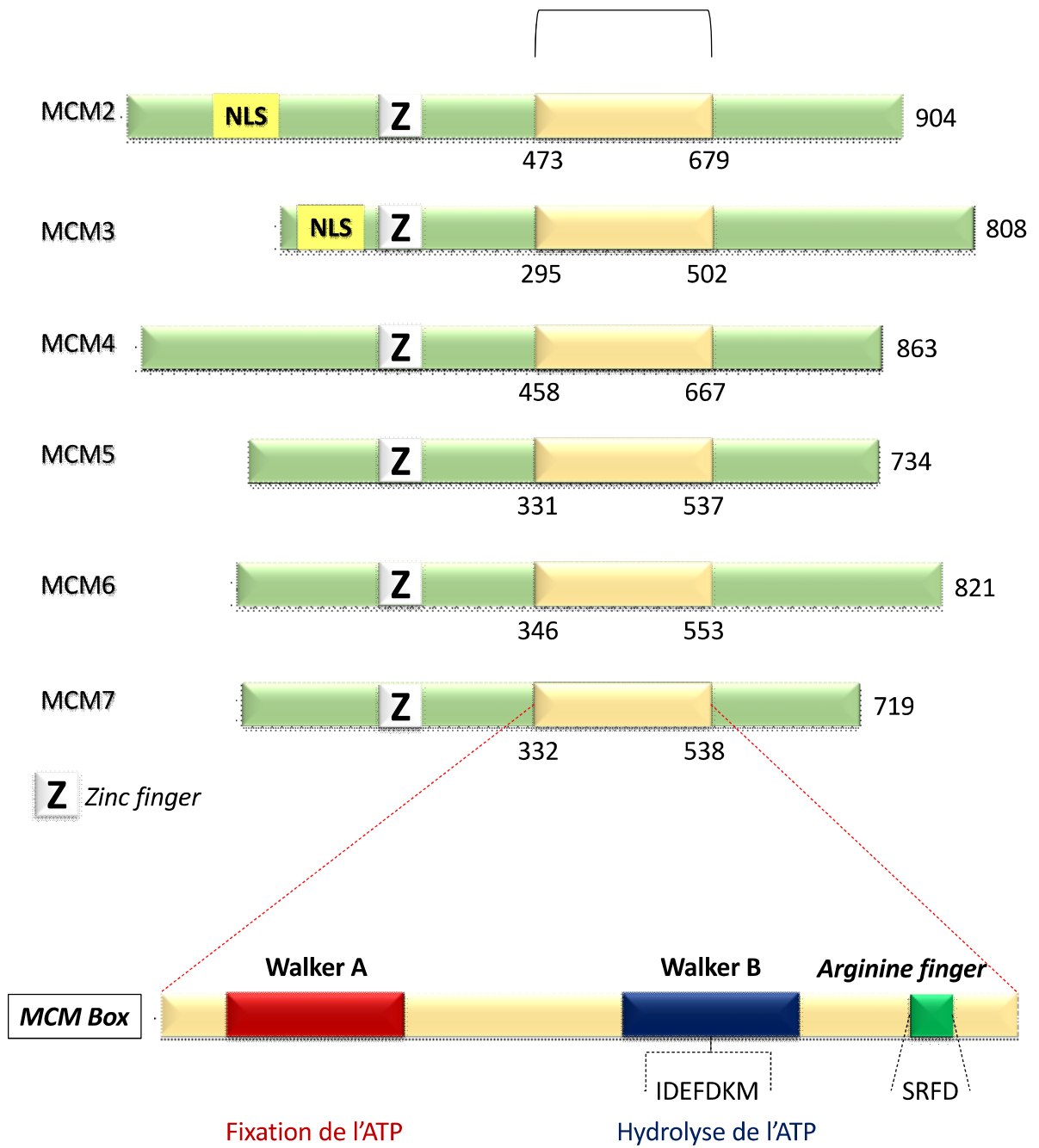
Donc, le recrutement de l'ORC et de Cdc6 sur les origines de réplication est nécessaire pour le chargement des deux derniers facteurs participant à la formation du pré-RC : Cdt1 et le complexe hexamérique MCM2-7.

## **II/ La famille des protéines *Minichromosome Maintenance***

### **1°) Description des MCM eucaryotes**

Les MCM sont des protéines dont les gènes ont été initialement identifiés chez la levure *S. cerevisiae* suite à des mutations de Mcm2, Mcm3 et Mcm5 entraînant des défauts dans le maintien des minichromosomes (Maine, Sinha, et Tye 1984). Mcm4 et Mcm7 ont été identifiés un peu plus tard dans le même organisme comme étant des gènes importants pour la réplication de l'ADN. Enfin Mcm6 a quant à lui été identifié chez *S. pombe* (Hennessy et al. 1991; K. Takahashi, Yamada, et Yanagida 1994). Ces six MCM sont très conservées parmi les eucaryotes et sont les plus connues, leur association formant le complexe à activité hélicase nécessaire à la réplication de l'ADN, MCM2-7 (Todorov et al. 1994; Chong, Thömmes, et Blow 1996; Schwacha et Bell 2001; Brewster et al. 2008). Compte-tenu de cette fonction, ces MCM sont essentielles à la viabilité cellulaire (Gómez, Catlett, et Forsburg 2002). Il a tout de même été montré chez l'Homme qu'une diminution significative des niveaux de la sous-unité MCM3 n'affecte ni la viabilité cellulaire, ni la progression du cycle indiquant que des niveaux résiduels de MCM3 sont suffisants pour la prolifération cellulaire (X. Han et al. 2015). Les protéines MCM

Figure 34: Alignement des protéines MCM2 à MCM7 humaines





sont stables tout au long du cycle cellulaire des cellules en cours de prolifération cependant, leurs niveaux sont quasiment indétectables dans les cellules sénescents et quiescentes. Suite à la stimulation de ces dernières par des facteurs mitogènes, l'expression des MCM augmentent pendant toute la phase G1, notamment grâce à l'activité du facteur de transcription E2F, jusqu'à atteindre un maximum à la transition G1/S (Ohtani et al. 1999; Stoeber et al. 2001).

Deux autres protéines, MCM8 et MCM9, ont été identifiées et semblent aussi impliquées dans la réplication de l'ADN (Lutzmann, Maiorano, et Méchali 2005; Maiorano et al. 2005) Elles ne sont cependant pas aussi conservées que les autres MCM parmi les eucaryotes et leur implication précise dans la réplication n'est pas encore totalement connue (Yuan Liu, Richards, et Aves 2009). Enfin, il existe une protéine MCM10 d'une importance capitale pour l'initiation de la réplication et dont je reparlerai un peu plus loin, mais qui n'appartient pas à la famille des protéines MCM (Maiorano, Lutzmann, et Méchali 2006). Ainsi, je me concentrerai principalement ici sur les six protéines MCM (MCM2 à MCM7) participant à la formation de l'hélicase répllicative.

Les MCM eucaryotes partagent une certaine similarité de séquence, notamment au niveau de la *MCM box*, un domaine à activité ATPasique d'environ 200 résidus (Figure 34). En effet, les protéines MCM appartiennent à la famille des ATPases AAA+ et utilisent l'énergie produite par la fixation et l'hydrolyse de l'ATP pour réorganiser leurs substrats (la molécule d'ADN dans le cas du complexe MCM2-7) (Koonin 1993, 1; Neuwald et al. 1999). La *MCM box* contient deux motifs consensus : Walker A, qui permet la fixation de l'ATP dans le site actif grâce à la présence d'une *p-loop* et Walker B, qui est globalement hydrophobe et participe à l'hydrolyse de l'ATP fixé. Ce motif contient une séquence IDEFDKM qui est très conservée entre les différentes MCM et est une caractéristique de la famille des MCM. La *MCM box* présente aussi dans sa portion C-terminale, à environ 70 résidus du motif Walker B, un motif



en doigt d'arginine (*Arginine finger*) de séquence SRFD, nécessaire pour la formation des sites actifs dans le complexe MCM2-7 (L. M. Iyer et al. 2004).

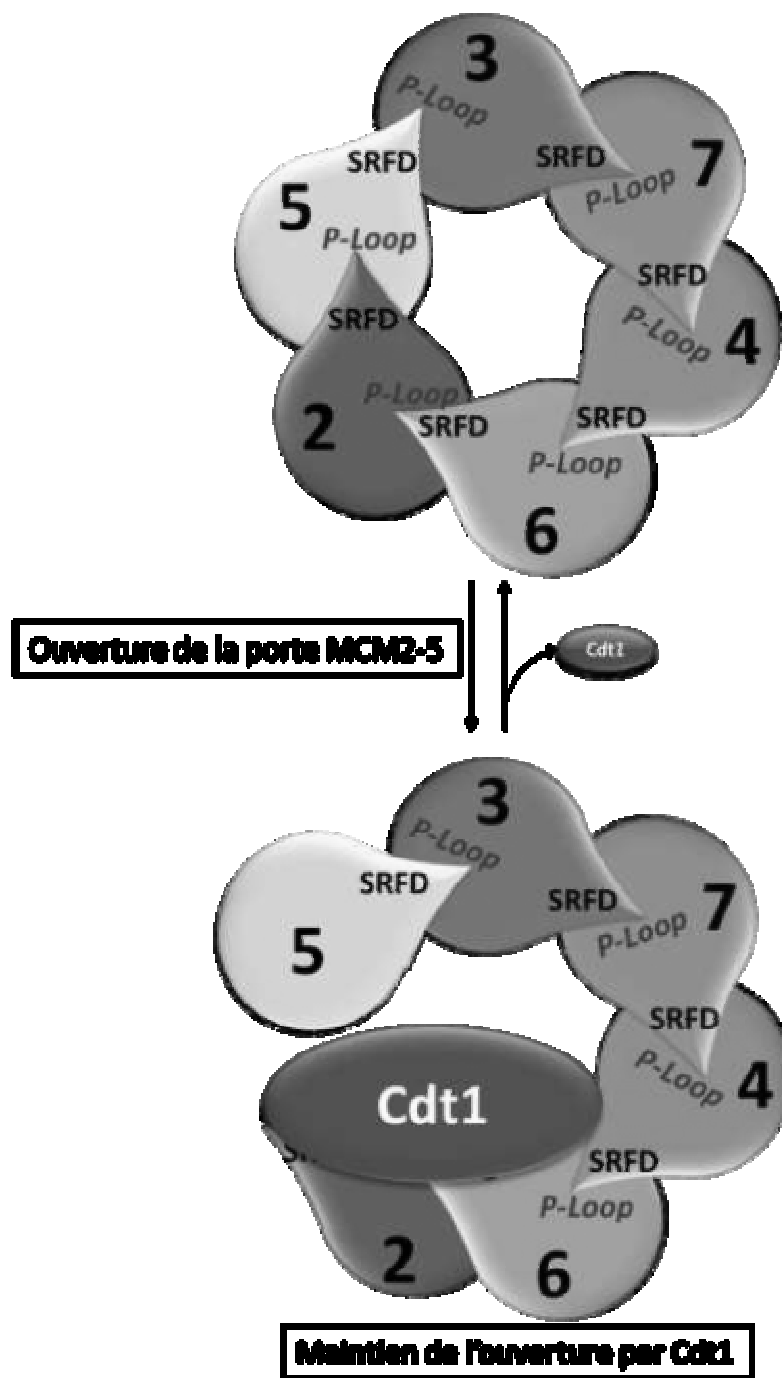
En dehors de la *MCM box*, chaque protéine MCM possède à son extrémité N-terminale un motif en doigt de zinc qui participe à la stabilité du domaine N-terminal (NTD) et à la formation du complexe (Sherman, Pasion, et Forsburg 1998; You et al. 2002). De plus, MCM2 et MCM3 sont les seules protéines portant une séquence de localisation nucléaire (NLS) en N-terminal qui est fonctionnelle chez la levure et la souris pour MCM2 (Young et al. 1997; Pasion et Forsburg 1999; Ishimi et al. 2001).

Les MCM8 et MCM9 sont les deux dernières protéines de la famille des MCM à avoir été découvertes. Elles présentent le même domaine MCM contenant les motifs Walker A et Walker B (Lutzmann, Maiorano, et Méchali 2005; Maiorano, Lutzmann, et Méchali 2006). MCM8 et MCM9 sont retrouvées chez tous les vertébrés mais leur fonction est encore peu connue. MCM8 est uniquement impliquée dans l'étape d'élongation de la réplication dans l'ovocyte de xénope (Maiorano et al. 2005). Par contre, elle est impliquée dans les étapes d'initiation et d'élongation de la réplication dans des cellules somatiques (Gozuacik et al. 2003; Volkening et Hoffmann 2005). De son côté, MCM9 est impliquée dans le chargement du complexe MCM2-7 à la chromatine chez le xénope *via* une interaction avec Cdt1, avec une inhibition la réplication de l'ADN en absence de MCM9 (Lutzmann et Méchali 2008, 2009). D'autres travaux montrent que MCM8 et MCM9 forment un complexe augmentant leur stabilité et sont impliquées dans les mécanismes de recombinaison homologue permettant la réparation des cassures double brin de l'ADN (Lutzmann et al. 2012).

## **2°) L'assemblage du complexe MCM2-7**

Le complexe MCM2-7 est un hétérohexamère formant une structure en anneau capable d'entourer la molécule d'ADN, double ou simple brin selon l'avancée de la réplication

Figure 35: L'assemblage du complexe MCM2-7 son ouverture



(Adachi, Usukura, et Yanagida 1997). En solution, les 6 sous-unités s'assemblent dans un ordre précis pour former l'hexamère MCM2-7: MCM5→3→7→4→6→2 (Crevel et al. 2001; Schwacha et Bell 2001; Davey, Indiani, et O'Donnell 2003; Bochman et Schwacha 2009; S. D. Bell et Botchan 2013) (Figure 35). Cet assemblage est essentiel pour l'activité hélicase du complexe avec la formation de sites actifs à l'interface de deux sous-unités MCM. En effet, une sous-unité fournit le motif *p-loop* du domaine Walker A qui permet la fixation de l'ATP et sa voisine fournit l'*arginine finger* (SRFD) permettant de maintenir l'ATP dans le site actif. La formation de ces six sites actifs est nécessaire pour l'hydrolyse de l'ATP et pour l'activité hélicase du complexe MCM2-7 (Davey, Indiani, et O'Donnell 2003; Hesketh et al. 2015). Cependant, l'hydrolyse de l'ATP n'est pas juste essentielle à l'activité hélicase du complexe mais est aussi nécessaire pour sa formation et son chargement à la chromatine (Kang, Warner, et Bell 2014). Initialement, aucune activité hélicase n'avait pu être identifiée pour ce complexe *in vitro*, cependant plusieurs études démontraient son activité *in vivo*, suggérant que le simple assemblage du complexe MCM2-7 n'est pas suffisant pour induire l'activité hélicase du complexe et que d'autres facteurs, présents *in vivo*, sont nécessaires à l'activation du complexe. Ce point sera décrit plus en détail par la suite (Moyer, Lewis, et Botchan 2006; Ilves et al. 2010).

L'interface entre MCM2 et MCM5 joue le rôle de porte (*MCM2-5 gate*), dont la dynamique est modulée par l'ATP, et qui permet au complexe d'entourer la molécule d'ADN double brin lors de son recrutement à la chromatine par Cdt1 (Sun et al. 2014) (Figure 35). La dynamique de cette porte est à la fois essentielle pour le chargement du complexe à la chromatine *in vitro* mais aussi pour la progression du cycle cellulaire *in vivo* (Samel et al. 2014). En effet, la porte MCM2-5 s'ouvre à deux reprises au cours de la réplication : lors du chargement pour entourer la double hélice d'ADN et, comme nous le verrons plus loin, lors de l'activation de l'hélicase pour permettre l'exclusion d'un unique brin d'ADN afin de créer les



fourches de réplication faisant de cette dynamique un élément essentiel pour l'initiation de la réplication de l'ADN (Bochman, Bell, et Schwacha 2008; S. D. Bell et Botchan 2013).

Les MCM peuvent aussi former des sous-complexes stables. Les sous-unités MCM4, MCM6 et MCM7 peuvent s'associer pour former un hexamère possédant une activité hélicase *in vitro*. Ces trois sous-unités sont d'ailleurs considérées comme les sous-unités catalytiques du complexe MCM2-7 (Ishimi 1997). Le sous-complexe MCM2/4/6/7 voit son activité hélicase inhibée par MCM2 qui déstabilise la structure hexamérique de MCM4/6/7. MCM2 est ainsi considérée comme la sous-unité régulatrice du complexe MCM2-7, tout comme MCM3 et MCM5 qui peuvent former un sous-complexe inhibiteur MCM3/5 (Sherman et Forsburg 1998; J. K. Lee et Hurwitz 2000).

Les complexes MCM2-7 sont recrutés au niveau de chaque origine de réplication potentielle dont seulement une faible portion sera effectivement activée pour initier la réplication de l'ADN. Un grand nombre de complexes MCM2-7 sont en effet chargés sur l'ADN sous une forme latente, comme des hélicases de « secours » qui pourront être activées en cas de stress réplcatif. Les futures origines actives sont sélectionnées par différents facteurs que je citerai plus loin et qui induisent l'activation de l'activité hélicase des doubles hexamères MCM2-7 (S. P. Bell et Labib 2016).

Le mécanisme exact mis en jeu par le complexe MCM2-7, et par l'ensemble des hélicases hexamériques en général, n'est pas encore totalement connu. Le mécanisme général des hélicases consiste à associer des changements conformationnels induits par l'hydrolyse de l'ATP à une manipulation physique des acides nucléiques induisant la séparation des nucléotides complémentaires (Patel et Picha 2000). Le complexe MCM2-7 appartient au groupe des hélicases se déplaçant sur un simple brin d'ADN, le brin sens, dans le sens 3' vers 5' (Costa et al. 2014).





### 3°) Régulation des MCM par les modifications post-traductionnelles

A l'image des histones, chaque protéine MCM est fortement modifiée par un panel de MPTs dont l'intervention peut être dépendante de la phase du cycle, de la localisation subcellulaire et de la sous-unité considérée. Par exemple, la phosphorylation de MCM4 est maximale en phase G2 pour les sites S3 et T110 alors que la phosphorylation des sites T7, S32 et S54 est maximale pendant la phase M (Komamura-Kohno et al. 2006). A ce jour, beaucoup de MPTs ont juste été observées par différentes études protéomiques sans pour autant déterminer l'enzyme impliquée et/ou le rôle de la modification. Cependant, quelques-unes modulent, directement ou indirectement, l'activité hélicase du complexe.

#### a- Régulation de l'activité par des kinases

Comme je l'ai déjà mentionné, le cycle cellulaire est en partie régulé par un ensemble de complexes **cycline/CDK** qui peuvent cibler les protéines MCM pendant l'interphase afin de réguler leur activité et participer au contrôle de l'initiation de la réplication. Ainsi, CDK2 phosphoryle MCM2, MCM3, MCM4 et MCM7 et CDK1 modifie MCM3, MCM4 et MCM7 (Komamura-Kohno et al. 2006; Montagnoli et al. 2006; Chi et al. 2008). CDK1 participe à la formation du complexe MCM2-7 pendant la mitose en modifiant MCM3 sur le site S112. En effet, la phosphorylation sur ce site favorise l'interaction de MCM3 avec les autres sous-unités et par la suite, le recrutement du complexe à la chromatine (Lin, Aggarwal, et Diehl 2008). Plus tard, en fin de G1, le complexe cycline E/CDK2 phosphoryle MCM3 sur la T722 et favorise son interaction avec la chromatine. Ceci est confirmé par l'utilisation d'un mutant MCM3 T722A dont le recrutement à la chromatine est diminué de façon significative par rapport au *wild type* (Junhui Li et al. 2011). Enfin, pendant la phase S, le complexe cycline A/CDK2 participe à l'inhibition de l'activité hélicase du complexe en phosphorylant MCM4 (Ishimi et Komamura-Kohno 2001). Ainsi les complexes cycline/CDK participent à la régulation du



complexe à plusieurs niveaux assurant une initiation de la réplication au bon moment et empêchant une reréplication en dehors de la phase S.

Un autre complexe kinase essentiel pour la transition G1/S est impliqué dans la régulation de l'activité de MCM2-7 : le **complexe DDK** (*Dbf4 dependent kinase*) (Bousset et Diffley 1998). Ce complexe est composé de deux sous-unités interdépendantes : La kinase Cdc7 et son régulateur Dbf4 (*Dumbbell former 4*). Le complexe DDK interagit avec le pré-RC, et notamment avec le complexe MCM2-7, *via* l'extrémité N-terminale de Dbf4, afin de le phosphoryler et participer à l'initiation de la réplication (Francis et al. 2009). L'interaction DDK-MCM2-7 ainsi que la phosphorylation du complexe sont souvent dépendantes de l'activité en amont des complexes cycline/CDK (Francis et al. 2009). Par exemple, le complexe cycline E/CDK2 participe à l'assemblage du pré-RC en favorisant de manière indirecte le recrutement de MCM2 à la chromatine. En effet, l'activité du complexe cycline E/CDK2 favorise l'expression de Cdc7 et donc son activité kinase vis-à-vis de MCM2 (Chuang et al. 2009). Le complexe DDK présente une forte affinité pour MCM2 *in vitro*, suggérant que cette sous-unité est une cible privilégiée de la kinase. Ainsi DDK phosphoryle MCM2 principalement dans sa région N-terminale à la fois chez la levure et l'homme afin de favoriser son incorporation dans le pré-RC et l'activité hélicase du complexe (Cho et al. 2006; Tsuji, Ficarro, et Jiang 2006; Charych et al. 2008; Bruck et Kaplan 2009; Chuang et al. 2009). Plusieurs sites ont été identifiés sur MCM2 chez la levure dont un site nécessaire à la croissance cellulaire (S170), cependant ce site n'est pas conservé chez l'homme (Bruck et Kaplan 2009). Il a été montré chez la levure que DDK est aussi capable d'interagir avec MCM4 *via* un domaine non-structuré en N-terminal (1-174), nommé NSD (*Serine/threonine-rich domain* ou *Kinase-docking domain*), pour permettre une phosphorylation processive de la protéine sur plusieurs sites autour de ce domaine.



Le NSD est impliqué dans l'inhibition de l'activité ATPasique de la sous-unité, inhibition levée par l'activité du complexe DDK (Sheu et Stillman 2010; Sheu et al. 2014). Ainsi, DDK participe à l'activation du complexe MCM2-7 en début de phase S en ciblant différentes sous-unités afin d'activer leur activité hélicase.

Enfin, la kinase Chk1 (*Checkpoint kinase 1*) est impliquée dans le passage du point de contrôle de la réplication en condition normale de croissance et dans la réponse aux dommages à l'ADN en majorité. Une étude de 2015 montre que Chk1, qui est capable d'interagir avec le complexe MCM2-7, phosphoryle MCM3 en condition normale sur sa S205. Cette modification régule négativement la réplication de l'ADN et la mutation du site S205 en Alanine réduit significativement la durée de la phase S (X. Han et al. 2014, 2015).

#### **b- L'acétylation des MCMs**

L'acétylation des résidus lysine est une modification post-traductionnelle réversible des protéines qui joue un rôle fondamental dans la régulation de l'expression des gènes. Par spectrométrie de masse, différents sites d'acétylation ont été identifiés sur les protéines MCM chez l'homme : MCM2 (K216, K896), MCM3 (K569, K570), MCM4 (K220, K450), MCM5 (KK392, K696, K396) et MCM6 (K775, K599, K643, K646) (Choudhary et al. 2009).

Il a été montré que MCM3 est acétylée *in vivo* par une protéine particulière, l'acétyltransférase MCM3AP, identifiée en 2001. Cette enzyme aurait pour rôle d'inhiber l'initiation de la réplication de l'ADN en ciblant MCM3 liée à la chromatine (Takei et al. 2001). Cependant, le mécanisme induisant l'inhibition de la réplication n'est pas encore connu.

De plus, une étude protéomique montre que 5 des 6 sous-unités du complexe MCM2-7 (MCM2 à MCM6) peuvent être Nt-acétylées chez l'homme par la N-terminale acétyltransférase B (NatB) (Van Damme et al. 2012). Cette modification covalente est l'une des plus communes chez les eucaryotes et consiste en l'ajout d'un groupement acétyl à partir de l'acétyl-CoA sur



l'amine  $\alpha$  d'un résidu en position Nter d'une protéine en cours de synthèse. Le rôle de cette modification est encore peu connu mais elle pourrait réguler la dégradation des protéines ou leur translocation dans le réticulum endoplasmique (Forte, Pool, et Stirling 2011).

### **c- L'ubiquitination de MCM7**

Des sites d'ubiquitination ont été identifiés par protéomique sur chaque MCM. Cependant aucun rôle, ou aucune enzyme spécifique n'a pu être déterminé, sauf pour un site précis de MCM7. Il a été montré chez la levure et le xénope qu'une polyubiquitination en N-terminal de MCM7 lié à la chromatine pendant la phase S entraîne, non pas sa dégradation par le protéasome, mais une dissociation de l'hélicase active de façon dépendante du complexe à activité ATPasique p97/*valosin-containing protein* (VCP)/Cdc48 (ou p97) (Moreno et al. 2014; Maric et al. 2017; Dewar et al. 2017). Ce complexe est connu pour son rôle d'extraction de protéines modifiées avec des chaînes d'ubiquitine liées en Lys-48 du réticulum endoplasmique, ou de la chromatine. Ainsi MCM7 est polyubiquitinylée puis reconnue par le complexe p97, lui-même identifié par spectrométrie de masse comme un partenaire d'interaction de MCM3 sur la chromatine pendant la phase S. L'utilisation d'un mutant inactif de p97 chez le xénope induit un maintien des hélicases actives et une accumulation de MCM7 polyubiquitinylée sur la chromatine indiquant que p97 reconnaît MCM7 polyubiquitinylée et induit son décrochage de la chromatine pendant la phase S, au moment de l'étape de terminaison de la réplication. En effet l'inhibition des ADN polymérase, bloquant les cellules en tout début de phase S, diminue fortement la polyubiquitination de MCM7 et le décrochage de l'hélicase (Moreno et al. 2014).

Plusieurs études indiquent que les enzymes responsables de l'ubiquitination de MCM7 sont différentes entre la levure et les eucaryotes supérieurs. Chez ces derniers, la famille des cullin-RING ubiquitine ligases (CRL) comprenant 7 membres (Cul1, 2, 3, 4A, 4B, 5 et 7) serait responsable de cette modification, Cul1, Cul2 et Cul4 étant connues pour être impliquées dans la régulation de la réplication de l'ADN ou dans la progression de la phase S





(Moreno et al. 2014; Bailey, Priego Moreno, et Gambus 2015). Une étude récente a identifié l'ubiquitine ligase CRL2<sup>Lrr1</sup> (*a Cul2-based RING E3 ubiquitin ligase*) comme étant responsable de l'ubiquitination de MCM7 chez le xénope puisqu'en absence de cette ligase, MCM7 n'est pas modifiée et la terminaison de la réplication est altérée (Dewar et al. 2017).

Chez la levure, c'est la protéine à F-box Dia2 qui permet l'ubiquitination de MCM7 sur sa lysine 29 à la fin de la réplication, ce qui conduit à son désassemblage par l'intermédiaire de p97 (Maric et al. 2017). Dia2 possède un domaine de liaison à ses substrats qui est un domaine riche en leucine, et un domaine TPR en N-terminal qui lui permet d'interagir avec différentes sous-unités du réplisome. Grâce à ce domaine TPR, le complexe SCF<sup>Dia2</sup> (Skp1/Cullin/Fbox protein) peut être recruté au niveau du réplisome, ceci participant à la polyubiquitination de MCM7 *in vitro* et *in vivo* (Maric et al. 2017).

#### **d- La sumoylation des protéines MCM**

La sumoylation est une modification post-traductionnelle réversible consistant à ajouter une petite protéine SUMO sur les résidus lysine des protéines-cibles. Cette modification peut moduler les interactions protéine-protéine et l'activité enzymatique de ses cibles régulant ainsi de nombreux processus cellulaires (Geiss-Friedlander et Melchior 2007). Une étude de 2016 menée chez la levure montre que les 6 protéines MCM sont sumoylées et ce, principalement au niveau de la chromatine. De plus, les niveaux de sumoylation des MCM varient en fonction de la progression du cycle cellulaire de manière opposée aux niveaux de phosphorylation. Des niveaux élevés de sumoylation sont associés à de faibles niveaux de phosphorylation sur les MCM, probablement *via* le recrutement de la phosphatase PP1 qui reverse l'action de DDK, et à une inhibition de l'initiation de la réplication de l'ADN (Wei et Zhao 2016).

Dans l'ensemble, ces modifications participent donc à une régulation fine et complexe de l'activité de l'hélicase MCM2-7 et ce, pendant toute la durée du cycle cellulaire. Cette régulation est essentielle pour le bon déroulement de la réplication. Cependant des



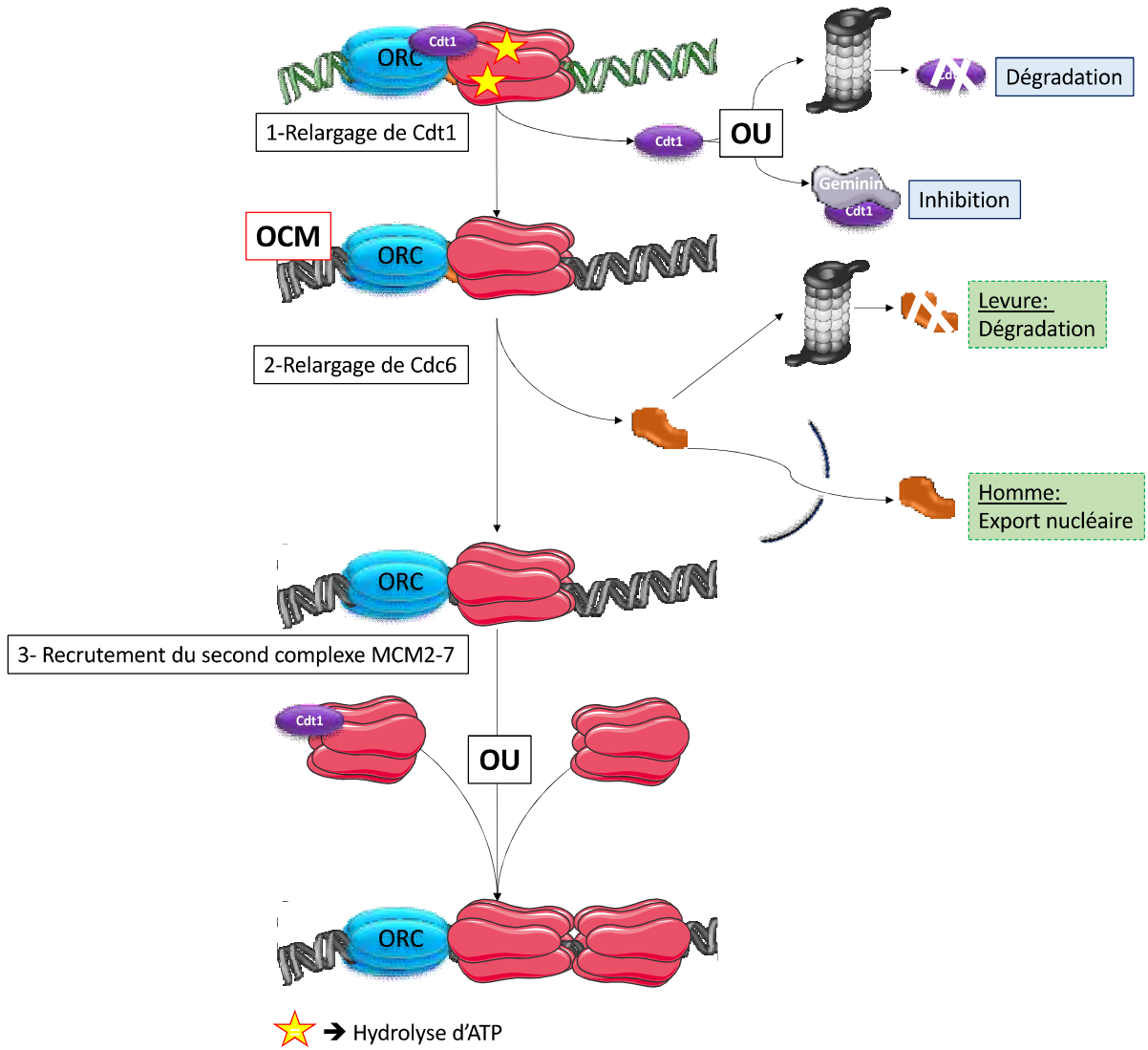
dérégulations dans l'activité de l'hélicase peuvent conduire à des erreurs de réplication transmises aux cellules-filles en fin de cycle, pouvant entraîner différentes pathologies. Une augmentation de l'activité hélicase induite par une surexpression des MCM est notamment rapportée dans plusieurs cas de cancers.

### III/ Le recrutement de l'hélicase pour former le pré-RC

Après la formation du complexe MCM2-7, celui-ci doit être recruté au niveau des origines de réplication marquées par la plateforme protéique ORC-Cdc6. Le facteur de *licensing* Cdt1 (*Cdc10-dependent transcript 1*) est essentiel pour cette étape de l'initiation de la réplication de l'ADN (Fragkos et al. 2015). Cdt1 est une protéine faiblement conservée parmi les eucaryotes et ne possède pas d'activité enzymatique (Lutzmann et Méchali 2009; S. P. Bell et Kaguni 2013). Elle est toutefois nécessaire pour le recrutement du complexe à activité ATPasique MCM2-7 comme cela a été démontré en 2013 dans des cellules MCF7 présentant une extinction d'expression de Cdt1. Dans ces cellules, la fraction des protéines MCM liées à la chromatine est fortement diminuée par rapport aux cellules contrôle (Symeonidou et al. 2013). Cependant, Cdt1 n'interagit pas stablement avec l'ensemble des sous-unités du complexe MCM2-7 mais seulement avec l'extrémité C-terminale de MCM2, MCM4 et MCM6 (Hein et al. 2015; Frigola et al. 2017). Ces interactions participent à l'ouverture de la porte MCM2-5 et à son maintien ouverte jusqu'au chargement du complexe sur l'ADN double-brin (Figure 36). De plus, pour permettre le recrutement de l'hélicase au niveau des origines de réplication, Cdt1 interagit directement avec Cdc6 et la sous-unité Orc6. Le complexe MCM2-7 est ainsi recruté à la chromatine dès la fin de phase M (en télophase pour être plus précis), formant tout d'abord une association transitoire avec la chromatine qui est ensuite convertie, grâce à l'hydrolyse de l'ATP par Cdc6, en interaction stable pendant la phase G1, à la fois *in vitro* et *in vivo* (Symeonidou et al. 2013) (Figure 33). Le pré-RC est alors formé au niveau des origines de réplication.

Figure 36: Modèle proposé de recrutement du double hexamère MCM2-7 avec un seul

ORC



Il faut noter que c'est en réalité un double hexamère MCM2-7 qui est recruté à la chromatine, dans une conformation où les extrémités N-terminales des deux complexes sont en vis-à-vis, participant ainsi à la formation de deux fourches de réplication et à la réplication bidirectionnelle de l'ADN (Symeonidou et al. 2013) (Figure 36). Toutefois, ce recrutement reste encore peu compris aujourd'hui. Plusieurs études analysant les différents complexes formés séquentiellement à la chromatine pendant l'initiation de la réplication démontrent que chaque hexamère est recruté individuellement à la chromatine (Sun et al. 2013; Fernández-Cid et al. 2013; Samel et al. 2014, 20; Ticaou et al. 2015). Il reste donc à déterminer comment est recruté le second complexe MCM2-7.

Il a été montré chez la levure que sous l'action de l'activité ATPasique de ORC et Cdc6, favorisée par une interaction avec la sous-unité MCM3, Cdt1 quitte la chromatine après avoir participé au recrutement de MCM2-7, pour n'y laisser que le complexe OCM (ORC/Cdc6/MCM2-7), un complexe intermédiaire avant le pré-RC (Sun et al. 2014). Toutefois, plusieurs études suggèrent que l'ORC et Cdc6 ne font que participer à l'activation de l'activité ATPasique du complexe MCM2-7 qui serait nécessaire au décrochage de Cdt1 (Coster et al. 2014; Frigola et al. 2017). Ainsi une activation mutuelle de ORC/Cdc6 et du complexe MCM2-7 serait à l'origine du décrochage de Cdt1 qui est une étape essentielle pour le recrutement du second complexe MCM2-7.

Le second hexamère serait apporté soit grâce à l'intervention d'un autre facteur Cdt1, soit *via* l'interaction directe entre les domaines N-terminaux des deux complexes MCM2-7 (Sun et al. 2014). Une autre étude suggère que suite à la fixation du premier complexe MCM2-7, Cdc6 et Cdt1 quittent la chromatine pour n'y laisser que l'ORC, avant le recrutement du second complexe (Ticaou et al. 2015) (Figure 36). Un seul complexe ORC serait nécessaire dans ces deux cas pour le recrutement séquentiel du double hexamère MCM2-7 (Fernández-Cid et al. 2013). Cependant, d'autres données expérimentales sont en faveur d'un second modèle



impliquant la fixation de deux ORC au niveau des origines de réplication, chacun conduisant au recrutement d'un complexe MCM2-7 (Frigola et al. 2013; S. P. Bell et Labib 2016). D'après ces études, il semble que l'interaction MCM-ORC/Cdc6 soit nécessaire pour le chargement de chacun des deux hexamères MCM2-7, l'interaction des extrémités N-terminales des complexes n'étant pas suffisante pour ce recrutement.

Tout comme les autres facteurs cités jusqu'alors, Cdt1 est la cible d'une régulation fine pour assurer un cycle unique de réplication pendant la phase S. La régulation de Cdt1 s'effectue selon deux grands axes. Tout d'abord par la régulation de ses niveaux d'expression. En effet, l'expression de Cdt1 dépend fortement de la progression du cycle cellulaire comme cela a été montré chez la drosophile pour qui les niveaux de Cdt1 sont élevés pendant la phase G1, pour l'étape de *Licensing*, puis diminuent fortement à la transition G1/S, empêchant ainsi le chargement de nouveaux complexes MCM2-7 à la chromatine. Dès la transition G1/S, Cdt1 est phosphorylé en N-terminal par le complexe Cycline E/CDK2 entraînant sa dégradation (Thomer et al. 2004). Ce mécanisme de dégradation de Cdt1 existe aussi chez les mammifères et le xénope (Sugimoto et al. 2004; Sansam et al. 2006; Havens et Walter 2009).

L'activité de Cdt1 est aussi régulée par son interaction dépendante du cycle avec une protéine spécifique, la : **Géminine** (Tada et al. 2001). Géminine est une protéine dont les niveaux d'expression sont fortement dépendants de la progression du cycle cellulaire avec une accumulation en phase S et une diminution en début de phase G1 chez l'homme. Pendant la phase S, géminine est phosphorylée par la kinase Aurora A afin d'assurer sa stabilité jusqu'en fin de phase M et permettre ainsi son interaction avec Cdt1 (Tsunematsu et al. 2013). Géminine est essentielle pour assurer une réplication unique de l'ADN par cycle cellulaire et l'extinction de cette protéine peut entraîner une reréplication chez le xénope (Yoshida, Takisawa, et Kubota 2005). Une autre étude menée chez le xénope montre que le complexe géminine-Cdt1 existe sur la chromatine pendant l'étape de *licensing* (Maiorano, Rul, et Méchali 2004). Ce complexe





n'inhibe pas l'initiation de la réplication, même s'il est injecté en large excès dans des ovocytes de xénope, mais l'ajout de géminine seule tend à inhiber le recrutement de MCM2-7 à la chromatine. De plus, la forte concentration de géminine-Cdt1 n'induit pas de reréplication, alors que l'injection de Cdt1 seul entraîne ce défaut de réplication. Toutes ces données suggèrent que chez le xénope, c'est l'homéostasie du complexe géminine-Cdt1 qui est essentielle pour le contrôle de l'activité de Cdt1 (Lutzmann, Maiorano, et Méchali 2006).

## IV/ L'activation de l'hélicase

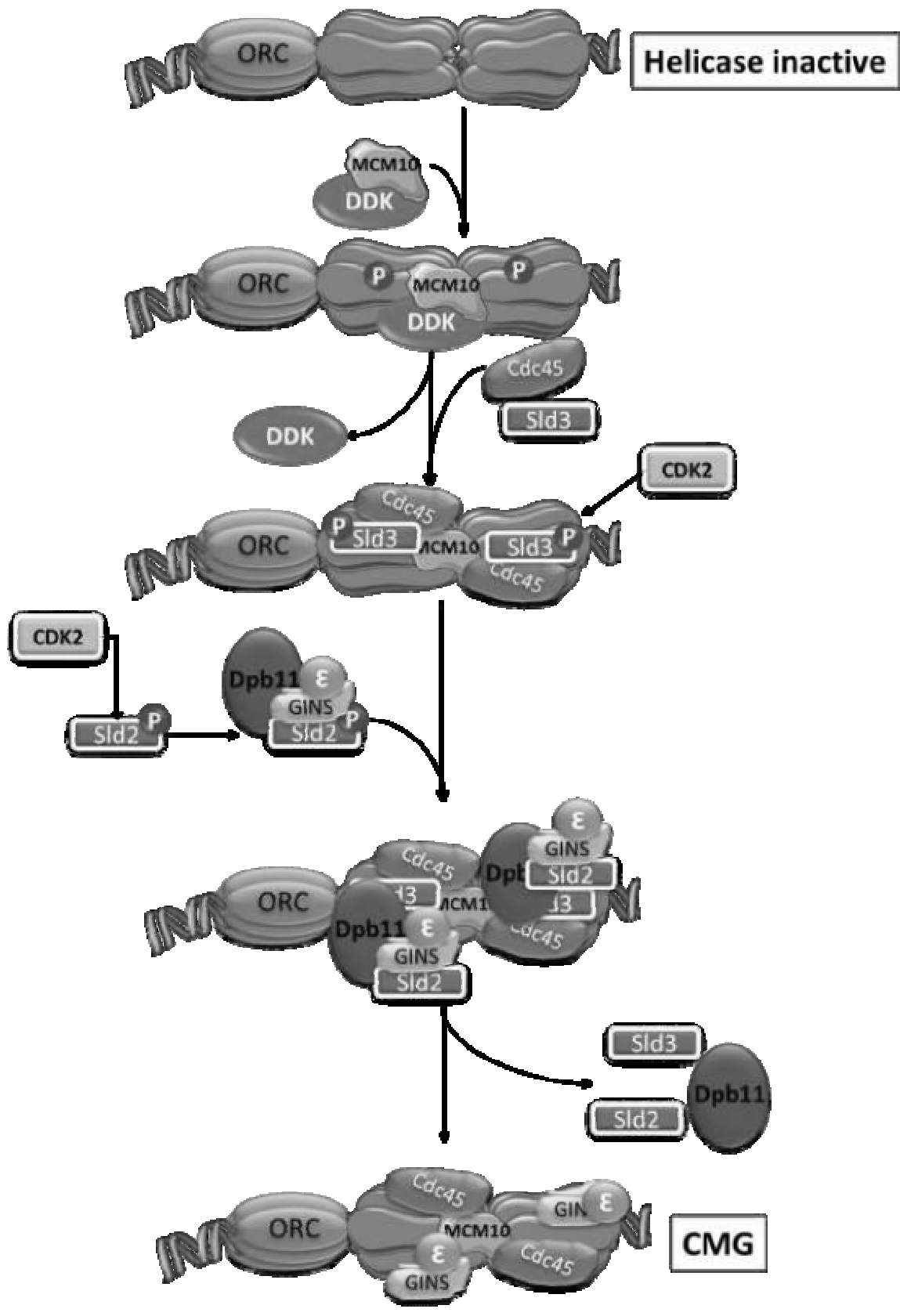
Pendant la phase G1, le pré-RC est chargé sur la chromatine mais demeure inactif. C'est l'activité de kinases citées plus haut (DDK, CDK) et l'interaction du pré-RC avec de nouveaux partenaires qui vont permettre la formation du complexe de pré-initiation (pré-IC) et l'activation de l'hélicase. La formation du pré-IC est un processus complexe qui a surtout été étudié chez la levure, et c'est l'activation chez cet organisme que je décrirais ici.

### 1°) La formation du pré-IC

Le complexe pré-IC est formé par l'association au niveau de chaque hélicase MCM2-7 de MCM10, Cdc45, le complexe GINS, Sld3, Sld2, Dpb11 et l'ADN polymérase  $\epsilon$ , le tout guidé par l'activité des kinases (Heller et al. 2011; Yeeles et al. 2015). Je vais présenter ici un modèle pour la formation du pré-IC construit à partir de données obtenues chez la levure (Riera et al. 2017).

Le premier facteur important pour la formation du pré-IC est **MCM10**. Cette protéine interagit avec le complexe MCM2-7 lié à l'ADN et participe à sa phosphorylation par le complexe DDK en recrutant ce dernier à la chromatine (Sheu et Stillman 2006; Francis et al. 2009; Sheu et Stillman 2010; Sun et al. 2014; Quan et al. 2015). La phosphorylation de MCM2-7, et particulièrement de MCM2, par **DDK** est un signal pour le recrutement de **Cdc45** et **Sld3**

Figure 37: Formation du complexe CMG, d'après des études chez la levure



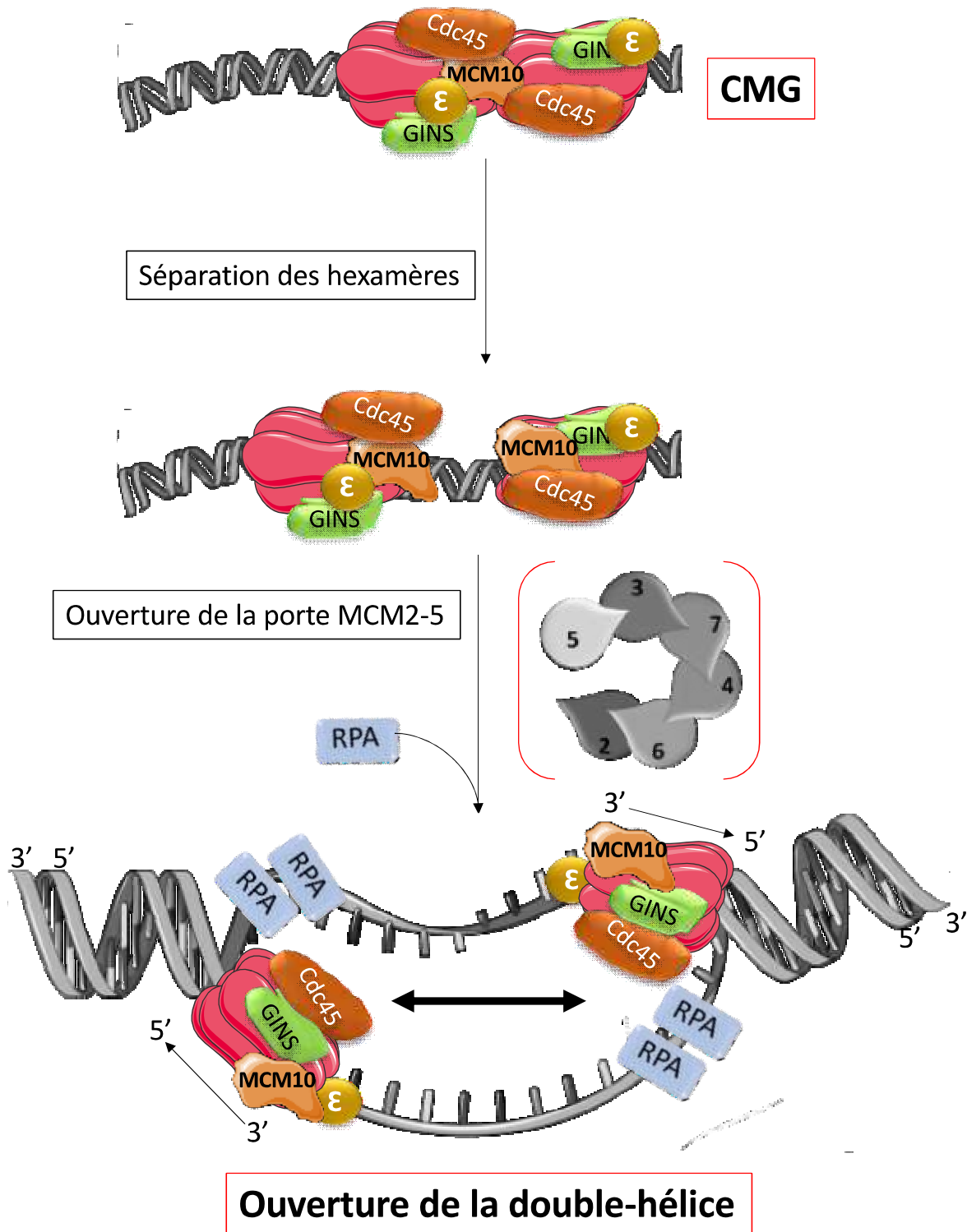
(Bruck et Kaplan 2015a; Deegan, Yeeles, et Diffley 2016). **Cdc45** est une protéine conservée chez les eucaryotes et initialement identifiée chez la levure, en même temps que la première identification des protéines MCM.

En parallèle, le facteur **Sld2** est modifié en dehors de la chromatine par **CDK2** afin de promouvoir son association avec **Dpb11**, le complexe **GINS** (*go-ichi-ni-san*, numéros 5-1-2-3 en japonais) et la **polymérase  $\epsilon$**  (Muramatsu et al. 2010). Le complexe **GINS** est un complexe conservé et essentiel pour la viabilité cellulaire composé de quatre sous-unités (Sld5, Psf1, Psf2 et Psf3) (Takayama et al. 2003; Muramatsu et al. 2010; Sengupta et al. 2013). De la même façon, Sld3 lié à la chromatine est aussi phosphorylé par CDK2, ce qui entraîne son interaction avec Dpb11 (Tanaka et al. 2007; Zegerman et Diffley 2007). Ainsi grâce à cette interaction et à la formation de la plateforme Cdc45/MCM2-7, le complexe Sld2/Dpb11/GINS/Pol $\epsilon$  est recruté à la chromatine où Sld3 interagit avec Dpb11 et où l'extrémité N-terminale de MCM2 interagit avec GINS (Costa et al. 2011). La fonction principale des facteurs Sld2, Sld3 et Dpb11 est de recruter le complexe GINS et la pol  $\epsilon$  à la chromatine. Une fois ce recrutement effectué, ces facteurs quittent la chromatine pour n'y laisser que le complexe **CMG (Cdc45-MCM2-7-GINS)** (Kanemaki et Labib 2006; Heller et al. 2011; Yeeles et al. 2015). Ce complexe est actif et est capable d'initier l'ouverture de la double hélice grâce à l'hydrolyse de l'ATP par le complexe MCM2-7 (Moyer, Lewis, et Botchan 2006; Pacek et al. 2006; Ilves et al. 2010) (Figure 37).

## 2°) La formation des fourches de réplication

Le mécanisme conduisant à la formation des deux fourches de réplication est encore peu connu. Il semble que pendant cette étape, le double-hexamère MCM2-7 se sépare, formant ainsi deux complexes CMG individualisés (Quan et al. 2015). Grâce à l'ouverture de la porte MCM2-5, un brin d'ADN est exclu de chaque hélicase formant deux fourches de réplication avec un complexe CMG situé sur chaque brin parent, qui devient le brin sens (un brin sens par fourche

**Figure 38: Ouverture de la double hélice d'ADN pour former les fourches de répliation**



de réplication) (Costa et al. 2014). Chaque complexe peut ensuite progresser dans des directions opposées afin de séparer les deux brins d'ADN de façon dépendante de l'ATP et permettre l'activité des polymérasés (Fu et al. 2011; Bruck et Kaplan 2015a) (Figure 38).

Dès l'ouverture de la double-hélice d'ADN, des protéines sont recrutées afin de protéger l'ADN simple brin ainsi exposé. Ces protéines sont les complexes **RPA** (*Replication Protein A*) composés de trois sous-unités nommées selon leur masse moléculaire : RPA11, RPA34 et RPA70, et dont le recrutement dépend en partie de MCM10 (Adachi et Laemmli 1992; Perez-Arnaiz et Kaplan 2016; Perez-Arnaiz et al. 2017). Les RPA quittent ensuite la chromatine à la fin de la réplication de l'ADN, elles sont donc souvent utilisées comme des marqueurs d'une réplication active de l'ADN.

La synthèse de l'ADN est dépendante de l'activité de trois ADN polymérasés : pol  $\alpha$ , pol  $\delta$  et pol  $\epsilon$ . Cette dernière est déjà recrutée à la chromatine lors de l'ouverture des fourches de réplication. Cependant, les deux autres doivent s'associer avec chaque CMG pour permettre la phase d'élongation de la réplication de l'ADN (Gambus et al. 2006; A. C. Simon et al. 2014). MCM10 participe au recrutement de l'ADN polymérase  $\alpha$  après l'ouverture de la double-hélice (Perez-Arnaiz et Kaplan 2016). La pol  $\alpha$  initie la synthèse d'ADN en produisant des *primers* sur chaque brin parent qui seront ensuite polymérisés par la pol  $\epsilon$  pour le brin principal et la pol  $\delta$  pour le brin retard (Pursell et al. 2007; N. McElhinny et al. 2008).

## **B/ L'élongation de la réplication**

Cette étape, dirigée en grande partie par les ADN polymérasés, peut être séparée en deux avec d'un côté la réplication continue du brin sens, et de l'autre la réplication discontinue du brin tardif. En effet, les trois polymérasés impliqués fonctionnent dans le sens 5'-3'. Le brin sens à synthétiser apparaît donc dans le bon sens dans le site actif de la polymérase, ce qui n'est pas le cas pour le brin retard. Comme je l'ai déjà évoqué, la première polymérase mise en jeu



est la pol  $\alpha$  qui forme un tétramère avec une ADN primase (2 sous-unités primases, 2 sous-unités polymérase) afin de synthétiser *de novo* une courte séquence d'ARN (d'environ 10 nucléotides) à laquelle la polymérase ajoute une séquence d'ADN pour un total qui peut aller jusque 40 nucléotides. Cette amorce sera ensuite prolongée par la pol  $\epsilon$  sur le brin principal. La pol  $\alpha$  est aussi responsable de la formation des amorces d'ARN des fragments d'Okasaki, portions d'ADN allant jusque 200 paires de bases synthétisées par la pol  $\delta$  (Fukui et al. 2004; Johansson et Dixon 2013).

La synthèse du brin sens est assurée de manière continue par la pol  $\epsilon$  dont la sous-unité catalytique présente un domaine N-terminal nécessaire à l'activité catalytique de l'enzyme et un domaine inactif en C-terminal (CTD) qui permet l'interaction avec la machinerie de réplication, notamment avec MCM5 (Ohya et al. 2002). Pol  $\epsilon$  interagit aussi avec GINS *via* une autre de ses sous-unités, Dpb2 (Sengupta et al. 2013; Sun et al. 2015). Ces interactions permettent à la polymérase de rester fixée sur l'ADN, et notamment sur le brin sens qu'elle synthétise en suivant l'avancée de la fourche de réplication (Aparicio, Weinstein, et Bell 1997).

D'un autre côté, l'élongation du brin retard, dont la synthèse s'effectue de manière discontinue, dépend d'amorces d'ARN synthétisées par la pol  $\alpha$  environ tous les 200 nucléotides. Après leur synthèse, le facteur RFC (*Replication factor C*) induit le décrochage de la polymérase et son remplacement par un complexe d'élongation formé par PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*) et la pol  $\delta$  (Tsurimoto et Stillman 1991). PCNA est un homotrimère qui entoure l'ADN simple brin et qui augmente la processivité de la pol  $\delta$  (P. M. Burgers 1991). Le complexe d'élongation synthétise l'ADN complémentaire au brin tardif à partir de l'amorce d'ARN, formant ainsi un fragment d'Okazaki. La rencontre du complexe d'élongation avec l'amorce du fragment d'Okazaki précédent entraîne son décrochage et la dégradation de l'amorce d'ARN par FEN1 (*Flap endonuclease 1*). L'ADN ligase I se charge





ensuite de relier chaque fragment d'ADN synthétisé par la pol  $\delta$  (Balakrishnan, Gloor, et Bambara 2010).

## **C/ La terminaison de la réplication**

Durant l'élongation, les complexes réplcatifs se déplacent sur l'ADN simple brin jusqu'à rencontrer un complexe venant dans le sens opposé. Cette rencontre conduit à la terminaison de la réplication de l'ADN avec la dissociation des réplisomes mais cette dissociation reste encore très peu comprise dans les organismes eucaryotes (Bailey, Priego Moreno, et Gambus 2015; Akopian et Rape 2017). Comme je l'ai indiqué précédemment, la polyubiquitination de MCM7, et d'aucun autre membre du CMG, semble être un élément central de la terminaison. L'inhibition de la polyubiquitination entraîne un maintien du CMG sur la chromatine et des défauts dans la terminaison (Gillespie, Gambus, et Blow 2012, ).

La polyubiquitination crée un signal qui est reconnu par la ségrégase p97 (ou Cdc48) qui entraîne le désassemblage du CMG (H. Meyer 2012). Cependant, p97 nécessite différents facteurs induisant son recrutement au niveau des fourches de réplication au moment de la terminaison. Parmi eux, l'hétérodimère Ufd1-Npl4 a été identifié chez la levure comme un facteur efficace pour le recrutement de p97 auprès de MCM7 polyubiquitinylée (Jentsch et Rumpf 2007; Maric et al. 2017). Cette modification de MCM7 n'intervient qu'au moment de la terminaison, en réponse à la rencontre de deux réplisomes. Si l'avancée de la réplication est bloquée, en inhibant les polymérase par exemple, la polyubiquitination de MCM7 est inhibée. De plus, il semble que la polyubiquitination de MCM7 ne touche que les complexes MCM2-7 actifs, soit 5 à 10% de la totalité des complexes recrutés à la chromatine. Cette modification serait donc vraiment spécifique de la terminaison et en serait le principal moteur (Bailey, Priego Moreno, et Gambus 2015).

Il existe plusieurs hypothèses concernant le décrochage des complexes MCM des origines dormantes, la première suggérant que le passage de la fourche de réplication est



suffisant pour les exclure de la chromatine. Une autre hypothèse implique la protéine MCM-BP (*MCM-binding protein*) et son partenaire d'interaction Usp7, une déubiquitinase, qui pourraient induire le décrochage des MCM de la chromatine (Jagannathan et al. 2012, 2014). L'absence de MCM-BP augmente significativement les niveaux de MCM à la chromatine, indiquant que cette protéine est nécessaire au décrochage de la majorité des MCM (les 90% de MCM inactives sur les origines dormantes) (Nishiyama, Frappier, et Méchali 2011).

Il est important de noter qu'un défaut lors d'un seul événement de la terminaison suffit à perturber la ségrégation des chromosomes et peut causer de l'instabilité génomique alors que des erreurs lors de l'initiation peuvent être rapidement réparées en activant des origines dormantes.

## **D/ La surexpression des MCM dans le cancer**

Un certain nombre d'études montre une surexpression des protéines MCM dans différents types cancéreux avec souvent une corrélation entre la surexpression et le potentiel prolifératif (Perou et al. 1999; Pütz et al. 2010; Giaginis et al. 2010). Ainsi, plusieurs protéines MCM sont aujourd'hui considérées comme des marqueurs tumoraux. Par exemple, la surexpression de MCM7 est un biomarqueur du cancer de col de l'utérus (Brake et al. 2003). De plus, le gène *Mcm7* est amplifié et la protéine est surexprimée dans le cancer de la prostate et de l'œsophage. La surexpression de MCM7 induit une augmentation de la synthèse de l'ADN, de la prolifération cellulaire *in vitro*, et une augmentation des métastases *in vivo* (B. Ren et al. 2006; Honeycutt et al. 2006; Qiu et al. 2017).

En contradiction avec cette observation, une étude de 2011 identifie les protéines MCM3 et MCM7 comme des inhibiteurs du facteur HIF-1 dont j'ai déjà évoqué l'importance lors du shift métabolique des cellules cancéreuses. MCM7 interagit avec la sous-unité HIF-1 $\alpha$  pour augmenter son ubiquitination et sa dégradation et MCM3 inhibe l'activité du facteur (Hubbi et al. 2011). Un maintien des niveaux protéiques des MCMs pourrait être nécessaire à



leur activité d'inhibition de HIF-1 et, en cas de surexpression, leur activité pourrait être dérégulée, levant ainsi l'inhibition de HIF-1. D'un autre côté, la surexpression des MCM dans le cancer pourrait réguler d'autres aspects du développement cancéreux, ceci nécessite encore d'être étudié pour évaluer le lien entre surexpression des MCM et cancer.

La surexpression de MCM2 est considérée comme un marqueur de prolifération dans le cancer du poumon et est associée à une faible survie des patients atteints de cette pathologie (C. H. Y. Cheung et al. 2017). De plus, l'expression de MCM2 est associée au grade tumoral dans le cancer du sein et au potentiel cancéreux dans le cancer du côlon, en association avec MCM5 (Giaginis et al. 2009; Wojnar et al. 2011)

L'ensemble de ces données indique qu'une dérégulation de l'homéostasie des protéines MCM favoriserait une instabilité génétique entraînant le développement de cancer (Blow et Gillespie 2008).



*Contexte  
scientifique*





## Contexte scientifique des travaux de thèse

Comme je l'ai déjà expliqué dans mon introduction, la dynamique de *O*-GlcNAcylation est un élément essentiel de la régulation de divers processus cellulaires et la perte de l'homéostasie de *O*-GlcNAcylation est associée à certaines pathologies dont le cancer, le diabète, les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives (C. Slawson, Copeland, et Hart 2010; P. S. Banerjee, Lagerlöf, et Hart 2016; Gong, Liu, et Iqbal 2016). La *O*-GlcNAcylation peut moduler l'activité enzymatique, la stabilité, la localisation subcellulaire des protéines ou encore les interactions protéine-protéine et un dialogue complexe peut s'établir entre la *O*-GlcNAcylation et la phosphorylation qui cible les mêmes résidus.

Il est maintenant établi que la régulation du niveau de *O*-GlcNAcylation est essentielle à la progression normale du cycle cellulaire, en particulier lors de la transition G0/G1 (S. Olivier-Van Stichelen et al. 2012), la transition G1/S (Drougat et al. 2012) et la mitose (C. Slawson et al. 2005; Dehennaut et al. 2007; C. Slawson et al. 2008; Dehennaut, Hanouille, et al. 2008; Y. R. Yang et al. 2012). Parmi les protéines nucléocytoplasmiques différenciellement *O*-GlcNAcylées entre les phases G1 et S du cycle cellulaire, nous avons précédemment identifiées les protéines nucléaires Minichromosome Maintenance MCM2, MCM3, MCM6 et MCM7.

Dans ce contexte scientifique, j'ai cherché à comprendre le rôle de la *O*-GlcNAcylation sur le complexe MCM2-7 dans des lignées cellulaires humaines synchronisées dans le cycle cellulaire. Dans un premier temps j'ai démontré que les six protéines MCM sont *O*-GlcNAcylées et que cette modification n'intervient que sur la fraction des MCM liées à la chromatine. Ensuite, j'ai identifié par différentes approches une interaction stable entre l'OGT et certaines sous-unités du complexe MCM2-7. Dans un second temps j'ai étudié l'effet de la dérégulation de la *O*-GlcNAcylation sur les protéines MCM. J'ai ainsi pu montrer que, bien que la dérégulation de la dynamique de *O*-GlcNAcylation ne perturbe pas le niveau protéique global des MCM, l'extinction de l'expression de l'OGT par siRNA dans les cellules MCF7 modifie le

recrutement à la chromatine de certaines sous-unités. De plus, la perturbation de la dynamique O-GlcNAc induite par l'extinction de l'OGT ou de l'OGA tend à déstabiliser le complexe MCM2-7.

Une grande partie de ces résultats fait l'objet d'une publication parue en 2018 dans le journal *Cellular and Molecular Life Sciences* (Leturcq et al. 2018)..

# *Matériels et Méthodes*



# Matériels et méthodes

## I/ Culture cellulaire

### 1°) Entretien des lignées

Les cellules épithéliales de cancer du sein MCF7 (hormono-dépendantes) et MDA-MB-231 (hormono-indépendantes), les cellules de cancer colorectal HCT116 ainsi que les cellules embryonnaires de rein HEK293T sont cultivées en routine dans un milieu complet DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Lonza) contenant 4.5 g/L de glucose, 200 mM de L-Glutamine et enrichi avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Lonza). Les cellules sont incubées à 37°C, sous atmosphère humide enrichie avec 5% de CO<sub>2</sub>.

La lignée cellulaire MCF-10A non-cancéreuse dérivée de l'épithélium mammaire humain (ATCC) est cultivée dans du milieu MEGM (milieu MEBM (Lonza) complétement avec un mélange de facteurs mitogènes : 0,004%(v/v) BPE, 0,001%(v/v) hEGF, 0,001%(v/v) Insuline, 0,001%(v/v) Hydrocortisone et 0,001%(v/v) GA-1000).

### 2°) Synchronisation cellulaire

Les cellules sont synchronisées par sevrage ou par différents composés chimiques (Drougat et al. 2012).

Pour le sevrage les cellules MCF7 et MDA-MB-231 sontensemencées à  $1,5 \cdot 10^6$  et  $750 \cdot 10^3$  respectivement dans des boîtes de Pétri de 100 mm de diamètre (Corning). Après 24h de culture, le tapis cellulaire est rincé deux fois avec du PBS puis les cellules MCF7 sont incubées pour 48h dans un milieu DMEM enrichi avec 0.5% de SVF alors que les cellules MDA-MB-231 sont incubées 24h dans un milieu DMEM sans SVF. Ce milieu est ensuite aspiré pour récolter les cellules (Temps 0) ou être remplacé par du DMEM avec 10% de SVF pour les deux lignées. Les cellules sont arrêtées à différents temps selon la manipulation.

Le sevrage des cellules MCF10A est effectué en milieu MEBM (Lonza) pendant 24 heures avant remise en milieu complet et une récolte à différents temps.

Différentes méthodes de synchronisation chimique ont été utilisées sur les cellules MCF7. Elles sontensemencées en boîte de Pétri de 100 mm de diamètre à  $1.5 \cdot 10^6$  cellules/boîte puis cultivées pendant 24h en milieu DMEM à 10% de SVF. Les différents traitements chimiques appliqués ensuite se déroulent comme suit :

- **Simple blocage par un excès de thymidine** : Les cellules sont incubées avec de la thymidine (T1895, Sigma) à une concentration finale de 5 mM ou 2 mM pendant 24h ou 20h respectivement. Le tapis cellulaire est ensuite lavé deux fois au PBS puis récolté, ou réincubé en milieu sans thymidine pour différents temps.

- **Double blocage à la thymidine** : Les cellules sont incubées avec la thymidine à une concentration finale de 2 mM pendant 24h. Le tapis cellulaire est ensuite lavé deux fois au PBS puis recouvert de milieu sans thymidine pendant 12h. Enfin les cellules sont réincubées dans un milieu avec la thymidine à 2 mM pendant 14h puis lavées deux fois au PBS et récoltées ou restimulées pendant 4h (Bostock et al, 1971).

- **Double blocage Thymidine/Aphidicoline** : Cette méthode repose sur le même principe que la précédente avec le remplacement de la thymidine par l'aphidicoline à 5 µg/mL dans le milieu de culture du deuxième blocage.

### 3°) Traitement avec les inhibiteurs et transfection

Les inhibiteurs d'OGT (Acétyl-5S-GlcNAc ; 50 µM, Laboratoire de Gerald Hart, John Hopkins Institute, Baltimore, USA) ou d'OGA (Thiamet G, Sigma Aldrich ; 1 µM) sont ajoutés dans le milieu de culture des différentes lignées cellulaires soit pour une nuit (~15h) dans le cas des cellules asynchrones, soit au moment de la remise en milieu avec 10% de SVF dans le cas des cellules synchronisées par sevrage. Un contrôle est effectué en parallèle avec l'ajout de DMSO (1 : 1000) dans les mêmes conditions.

La transfection transitoire par les siRNA (*small interfering RNA*) des cellules MCF10A (300.10<sup>3</sup> cellules/puits de plaque 6 puits), MCF7 (1,5.10<sup>6</sup> cellules/boîte 100 mm) et MDA-MB-231 (425.10<sup>3</sup> cellules/boîte 100 mm) s'effectue au moment de l'ensemencement des cellules avec la Lipofectamine® RNAiMAX (Thermofisher) et 60 pmol de siContrôle (siRNA univ. Negative control, Sigma-Aldrich), siOGT (GGAGGCUAUUCGAAUCAGU[cT][dT] sens, ACUGAUUCGAAUAGCCUCC[dT][dT] anti-sens ; Sigma-Aldrich) ou siOGA (siGENOME Human MGEA5 (10724) siRNA SMARTpool ; Dharmacon, GE Healthcare) par boîte de Pétri de 100 mm. En condition asynchrone, les cellules sont récoltées au bout d'environ 60h et 72h de transfection pour les MCF7 et MDA-MB-231 respectivement. En condition de synchronisation par sevrage, les cellules sont ensemencées avec les siRNA puis sevrées au bout de 24h de transfection. Le protocole de synchronisation est ensuite suivi comme décrit précédemment.

Pour la transfection transitoire de l'OGT-HA, les cellules HEK293T et MCF7 sont cultivées comme détaillé précédemment et après avoir atteint environ 60 % de confluence, elles sont transfectées avec l'OGT-HA (1,25 µg plasmide/boîte de 100 mm de diamètre) en utilisant la Lipofectamine® LIPO2000 (ThermoFisher). Les cellules sont ensuite récoltées au bout de 48h de transfection.

## **II/ Lyse cellulaire**

### **1°) Fraction totale**

En sortie de culture, les cellules sont lavées deux fois au PBS froid puis incubées 10 minutes sur glace avec le tampon de lyse Ripa (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH7.5, 1% (v/v) Triton-X100, 0.2% (w/v) NaDoc) avec ou sans 0.1% (w/v) de SDS selon la manipulation effectuée après la lyse. Des inhibiteurs de phosphatases (1 mM orthovanadate, 10 mM sodium fluoride ; Sigma-Aldrich) et de protéases (protease inhibitor cocktail tablets ; Sigma-Aldrich) sont ajoutés au tampon de lyse. Les lysats sont ensuite centrifugés 15 minutes à 18.800xg pour éliminer les débris. Les surnageants sont conservés à -20°C ou -80°C avant utilisation.

### **2°) Fractionnement subcellulaire**

Tout comme pour la lyse totale, les cellules sont lavées deux fois au PBS froid puis incubées 20 minutes sur glace avec un tampon CSK (cytoskeleton extraction buffer ; 100 mM NaCl, 10 mM PIPES pH 7, 300 mM Sucrose, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% (v/v) NP-40) avec les différents inhibiteurs de protéases et phosphatases cités plus haut. Les lysats sont centrifugés 5 minutes à 300xg et les surnageants sont conservés. Les culots sont lavés avec le tampon CSK et le surnageant est récupéré et ajouté au précédent. L'ensemble est centrifugé à 18.800xg pendant 15 minutes pour clarifier le surnageant qui forme la fraction protéique nucléocytoplasmique soluble (Sol.) (Yonghong Zhu et al. 2005). Les culots précédents sont incubés pendant 20 minutes sur glace avec un tampon Chrom (tampon Ripa modifié ; 350 mM NaCl, 20 mM Tris pH7.5, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1% (v/v) Triton-X100) contenant les mêmes inhibiteurs de protéases et de phosphatases que précédemment. Les échantillons sont ensuite soumis à une sonication de 3 minutes pour casser la molécule d'ADN et enfin centrifugés à 18.800xg pendant 15 min. Le surnageant forme la fraction des protéines liées à la chromatine (Chrom.).

### **3°) Dosage protéique**

Après la lyse cellulaire, chaque échantillon est dosé en utilisant le kit Micro-BCA (Pierce) et une gamme étalon de BSA. Une gamme étalon est réalisée pour chaque tampon de lyse utilisé.

### **III/ Western-Blot et Immunoprécipitation**

#### **1°) Western-blot**

Dans un premier temps, les protéines à analyser sont dénaturées avec un tampon Laemmli pendant 7 minutes à 95°C. 20 µg de chaque échantillon (quelle que soit la fraction) sont déposés par puits d'un gel de SDS-PAGE (*Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*) dont la réticulation dépend du type d'échantillon à analyser (de 6 à 15%). La migration s'effectue à 25 mA par gel dans le gel de concentration puis à 40 mA par gel quand les protéines entrent dans le gel de séparation. Les protéines sont ensuite transférées sur membrane de nitrocellulose (Protran supported 0.45 µm NC, GE Healthcare) pendant 2h à 100 mA par gel dans un tampon de transfert (25 mM Tris, 192 mM Glycine) contenant 20% de méthanol.

Après le transfert, les membranes sont colorées au rouge Ponceau, attestant de l'équichargement des pistes, puis décolorées par une incubation avec du TBS-Tween (15 mM Tris pH 8.0, 140 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween-20). Les membranes sont saturées pendant une heure à température ambiante dans une solution de TBS-Tween contenant 5% (w/v) de lait écrémé en poudre. Les membranes sont ensuite incubées avec les différents anticorps primaires dilués dans la solution de saturation pendant une nuit à 4°C (Tableau 1). Les membranes sont lavées 3 fois 7 minutes avec du TBS-Tween puis incubées une heure à température ambiante avec les anticorps secondaires couplés à la peroxydase et dilués au 1/10.000<sup>ème</sup> dans du TBS-Tween pour les anti-mouse et -rabbit (GE Healthcare) ou au 1/30 000<sup>ème</sup> pour l'anti-goat (Santa-Cruz). Après 3 lavages (7 minutes) des membranes au TBS-Tween, les protéines sont révélées par le réactif de chimioluminescence (ECL prime reagent, GE Healthcare ; Supersignal West pico Plus ou Supersignal West femto, thermoscientific, Fisher scientific). L'acquisition des images est effectuée avec une caméra CCD (Fusion solo, Vilbert Lourmat). Dans certain cas, les membranes sont déshybridées par une incubation de 10 minutes à température ambiante avec un tampon de déshybridation (Gene-bio-Application LTD, Euromedex), puis lavées 3 fois 10 minutes à l'eau distillée et enfin 3 fois 10 minutes au TBS-Tween avant de les saturer.

#### **2°) (Co)-Immunoprécipitation**

Pour les manipulations de co-immunoprécipitation à partir d'extraits totaux, les cellules sont lysées dans un tampon Ripa sans SDS, le même tampon sera utilisé pour les étapes de lavages, pour conserver au maximum les interactions protéine-protéine. De plus, dans le cas d'une (co)-immunoprécipitation effectuée à partir d'une fraction protéique chromatiniennne, les



extraits sont dilués au ½ dans un tampon Chrom sans NaCl pour réduire la concentration saline avant la manipulation.

La manipulation commence par une étape de pré-clearing durant laquelle les extraits sont incubés avec un mélange de billes de sépharose couplées aux protéines A et G (50 :50) (GE Healthcare) dans le tampon de lyse, à raison de 20 µL de billes par mg de protéine, pendant 2h à 4°C. Les extraits sont ensuite centrifugés 5 minutes à 5 000xg et l'immunoprécipitation est effectuée sur le surnageant. Ce dernier est d'abord incubé avec les anticorps dirigés contre la protéine d'intérêt (Tableau 1), pendant 2h à 4°C (ou sur la nuit selon les cas), puis le mélange de protéines A- et G-sépharose est ajouté pour 1h à 4°C (30 µL/mg de protéine). Après une première centrifugation (5 min à 5 000xg) les billes sont lavées 3 fois avec du tampon Ripa (avec ou sans SDS selon la manipulation) puis une dernière fois avec un tampon Ripa à 300 mM de NaCl. Enfin, les billes sont reprises dans un tampon Laemmli puis chauffées 7 minutes à 95°C avant de déposer les protéines précipitées sur gel de SDS-PAGE.

## **IV/ Enrichissement en protéines O-GlcNAcylées**

### **1°) La chromatographie d'affinité sur billes de sWGA**

La manipulation s'effectue à partir des fractions cellulaires nucléocytoplasmique soluble et chromatinienne. Les protéines O-GlcNAcylées sont enrichies en utilisant la lectine sWGA couplée à des billes d'agarose (Vector laboratories, Clinisciences) (Zachara 2009). Avant utilisation, les billes de sWGA sont équilibrées dans un tampon Chrom dilué au ½ et les échantillons sont préparés comme suit : Le volume correspondant à 1 mg de protéine est ajusté à 500 µL avec le tampon de lyse (CSK ou Chrom) puis complété jusque 1 mL avec du PBS pour obtenir une concentration finale de 1 mg/mL. Chaque échantillon est incubé pendant 2h à 4°C avec 50 µL de billes de sWGA puis, après une centrifugation de 3 minutes à 1 000xg, les billes sont à deux reprises avec le tampon chrom dilué au ½ et deux fois avec ce même tampon à 300 mM de NaCl. Un contrôle négatif est effectué en ajoutant de la GlcNAc libre (0.5 M) dans le lysat avant le passage sur les billes de sWGA. Les billes sont enfin reprises dans un tampon Laemmli et chauffées 7 minutes à 95°C avant le dépôt sur gel de SDS-PAGE.

### **2°) La chimie-click**

Dans cette approche, les protéines des deux fractions subcellulaires, soluble et chromatinienne, sont précipitées (Chloroforme/méthanol) puis resolubilisées dans un tampon HEPES (20 mM) pH 7.9 contenant 1% de SDS. Les protéines O-GlcNAcylées sont ensuite soumises à un marquage enzymatique grâce à une GalactosylTransférase mutée (Gal-

T1(Y289L)) capable de prendre en charge l'UDP- GalNAz et de transférer le résidu de GalNAz sur les motifs O-GlcNAc des protéines-cibles (Click-It O-GlcNAc enzymatic Labelling, ThermoScientific, Fisher). Un contrôle négatif consistant à omettre la GalT(Y286L) est effectué en parallèle.

Les protéines marquées sont ensuite enrichies *via* une réaction chimique entre le groupement azido du GalNAz et le groupement alcyne d'une biotine-alcyne (Click-It biotin glycoprotein systems, ThermoScientific, Fisher). Après cette étape, 10% de chaque fraction sont retirés pour former les inputs (Input Click-It) attestant de la présence des protéines d'intérêt dans nos fractions. Les protéines O-GlcNAcylées sont enfin enrichies sur des billes d'agarose couplées à la streptavidine (Merck) puis déposées sur gel de SDS-PAGE.

## **V/ Visualisation des protéines O-GlcNAcylées**

### **1°) Marquage métabolique avec la [<sup>3</sup>H]-Glucosamine ([<sup>3</sup>H]-GlcNH<sub>2</sub>)**

Cette manipulation est effectuée sur les cellules de cancer colorectal HCT116 initialement ensemencées dans des boîtes de Pétri de 100 mm de diamètre. Quand les cellules atteignent 70% de confluence, elles sont privées de sérum pour une durée de 48h. Ensuite les cellules sont incubées dans un milieu DMEM contenant du sérum (10% SVF), à faible concentration en glucose (1 g/L) et avec de l'UDP-[<sup>3</sup>H]-Glucosamine (100 µCi/ boîte de 100 mm ; Perkin Elmer) pendant 16h. Les cellules sont ensuite rincées deux fois au PBS froid puis lysées avec un tampon Ripa. La lyse est suivie de l'immunoprécipitation de MCM3 à partir de 3 mg de protéines totales et du dépôt du précipitat sur deux gels de SDS-PAGE. Le premier est utilisé pour une analyse par western-blot, le second est séché pour autoradiographie. L'autoradiogramme est exposé pendant 3 mois à -80°C (Amersham hyperfilm MP).

### **2°) PEG mass-Tag**

Après le marquage enzymatique des protéines O-GlcNAcylées (Click-It O-GlcNAc enzymatic Labelling), 50 µg de protéines sont resuspendus dans un tampon HEPES (20 mM, pH7.9) contenant 1% de SDS puis incubées pendant 1h à température ambiante avec un DBCO-PEG (4.4KDa) à une concentration finale de 10 mM (PEG +) ou avec du DMSO (PEG -). Les protéines sont ensuite précipitées par un mélange de chloroforme/méthanol pour retirer l'excès de DBCO-PEG, incubées avec un tampon Laemmli puis chauffées à 95°C pendant 7 minutes avant le dépôt sur gel de SDS-PAGE.

Pour chaque MCM, les rapports frontaux sont calculés fin de déterminer la masse moléculaire de chaque bande, non-PEGylée ou PEGylée, et ainsi estimer le nombre de résidus O-GlcNAc sur chaque protéine. La stœchiométrie de O-GlcNAcylation a été déterminée par la quantification des intensités relatives de chaque spot.

## **VI/ Cytométrie en flux**

### **1°) Analyse du cycle cellulaire**

La progression des différentes lignées dans le cycle cellulaire est analysée par cytométrie en flux. Au moment de la récolte, le tapis cellulaire est rincé deux fois au PBS froid puis trypsinisé pour décrocher les cellules (1 mL de trypsine-EDTA/boîte 100 mm). Les cellules sont centrifugées à 400 g pendant 5 minutes puis le culot est lavé à deux reprises avec du PBS et enfin repris dans 100 µL de PBS. Les cellules sont fixées dans 5 mL d'éthanol glacé à 70% pendant minimum 1h à -20°C. Les cellules sont centrifugées (600 g, 5 minutes) pour retirer l'excès d'éthanol puis le culot est lavé deux fois au PBS. Les cellules sont ensuite incubées dans 300 µL d'une solution d'iodure de propidium (50 µg/mL d'iodure de propidium (P4864, Sigma), 50 µg/mL de RNase A (R4875, Sigma) dans du PBS à 5mM MgCl<sub>2</sub>) pendant 1h dans un bain-marie à 37°C et à l'obscurité. Les échantillons sont conservés à 4°C et à l'obscurité jusqu'à leur analyse en cytométrie en flux. L'analyse se fait sur le cytomètre FacScalibur (Beckman Dickinson) avec le logiciel Cell Quest Pro. L'émission de fluorescence de l'iodure de propidium ( $\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$  ;  $\lambda_{ém} = 637 \text{ nm}$ ) est lue sur le canal FL2 avec un maximum d'évènements analysés limité à 10 000. L'analyse des données se fait sur le logiciel ModFit LT (BD) avec le module « synchronization wizard ».

### **2°) Analyse de la synthèse d'ADN**

Pour cette analyse, nous utilisons l'approche de Click-EdU qui permet de marquer l'ADN en cours de synthèse (Click-It® EdU flow cytometry assay kit, ThermoScientific, Fisher). L'EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine), analogue de l'uridine portant un groupement alcyne est incubé avec les cellules en culture à une concentration de 10 µM, 15 minutes avant la récolte, afin d'être incorporé à l'ADN en cours de synthèse. Grâce à une réaction de chimie-click avec une molécule fluorescente portant un groupement azido (Dans notre cas, un Alexa Fluor® 647, AF647) la synthèse de l'ADN peut être détectée par cytométrie en flux.

Puis l'ADN total est marqué par l'iodure de propidium selon le protocole décrit plus haut avant l'analyse en cytométrie. Différents contrôles sont effectués afin d'attester de la sélectivité de la manipulation et de régler les paramètres d'analyse du cytomètre : Des cellules non

marquées, des cellules uniquement marquées à l'iodure de propidium (PI+), des cellules uniquement marquées par l'AF647 (K+) et enfin des cellules qui n'ont pas été incubées avec l'EdU mais incubées avec l'AF647 (K-/PI-).

L'analyse s'effectue sur le cytomètre CyAN ADP LX9 avec le logiciel d'acquisition Summit V4.3.04 (Beckman Coulter, Lefe Sciences). Les signaux de l'AF647 et du PI sont détectés respectivement sur en FL8 (laser 635 nm,  $\lambda_{em}$  : 665/20 nm) et en FL3 (laser 488 nm,  $\lambda_{em}$  : 613/20 nm) et les données sont analysées avec le logiciel FlowJo.

## **VII/ GST-Pull-Down**

### **1°) Expression des protéines recombinantes**

Pour compléter cette étude d'interactions, nous avons obtenu par le Dr X. Yang quatre plasmides (pGEX-2T) codant pour les formes entière ou tronquées de l'OGT couplée à la GST en N-terminal (GST-FL-OGT [Full Length], GST-OGT 1-485 (TPR1 à 11), GST-OGT 1-286 (TPR 1 à 6) et GST-OGT 282-1036 ( $\Delta$ TPR1 à 6) (Yale University School of Medicine, New Haven, USA). Durant cette année, avec l'aide du Dr Olivier Vidal de notre UMR, nous avons exprimé, amplifié et purifié ces 4 formes de l'OGT, ainsi que la GST seule, fournie par le Dr D. Leprince, pour les contrôles.

L'expression des protéines recombinantes s'effectue chez E. Coli (BL21 DE-3). Les bactéries sont transformées avec les différents plasmides et cultivées en milieu LB avec 50  $\mu$ g/mL d'ampicilline. Quand les bactéries atteignent leur phase exponentielle de croissance, l'expression est induite par 0.1 mM d'IPTG pendant 4h à température ambiante. Les bactéries sont ensuite centrifugées et les culots sont repris dans du PBS contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma-Aldrich). Les cellules sont lysées sous haute pression en utilisant l'Emulsiflex-C3 (Avestin) puis centrifugées à 10.400xg pendant 45 minutes. Les protéines de fusion sont immobilisées sur billes de Glutathion (GE Healthcare) pendant 2h à 4°C puis lavées deux fois 5 minutes (centrifugation à 500xg, 5 min) dans un tampon contenant 20 mM Tris pH7.4 et 0.1% (v/v) Triton-X100 suivi de deux lavages avec le même tampon avec 100 mM de NaCl. Les protéines de fusion sont ensuite éluées en ajoutant 50 mM de glutathion réduit (Sigma-Aldrich) dans le tampon d'éluion.

### **2°) GST-Pull down**

Pour cette manipulation, 700  $\mu$ g de protéines provenant des différentes fractions (sol. et Chrom.) sont incubés en présence des billes de glutathion couplées à chacune des protéines de

fusion (un tube par protéine) pendant une nuit à 4°C. Les billes sont ensuite lavées 3 fois avec du PBS contenant 0.1% (v/v) de Triton-X100, une fois avec du PBS contenant 0.1% de Triton-X100 et 150 mM de NaCl et enfin 2 fois avec un tampon contenant 50 mM Tris pH8 et 0.1% Triton-X100 avant l'éluion comme décrit plus haut. Chaque fraction d'éluion est incubée dans un tampon Laemmli, et chauffée à 95°C pendant 5 minutes avant d'être déposée sur gel de SDS-PAGE.

## **VIII/ Immunofluorescence et PLA (Proximity Ligation Assay)**

Des cellules MCF7 sont cultivées sur des lamelles de verre pendant 72h puis lavées trois fois au PBS froid avant la fixation au paraformaldéhyde (PAF) à 4% dans du PBS pendant 20 minutes à température ambiante. Après 3 lavages au PBS (5 minutes) les cellules sont perméabilisées avec une solution de PBS contenant 0.5% (v/v) de Triton-X100 pendant 2 minutes ou avec une solution de tampon CSK modifié (sans NP-40, avec 0.5% (v/v) de Triton-X100) pendant 20 minutes selon la fraction protéique que l'on souhaite observer.

La perméabilisation est suivie d'une étape de *quenching* à la glycine (100 mM, pH 7.4) dans du PBS pendant 20 minutes, puis 3 lavages au PBS. Les lamelles sont ensuite incubées avec le tampon de blocage (2% (v/v) SVF, 2% (w/v) SAB, 0.2% (w/v) de gélatine dans du PBS) pendant 1h à température ambiante avant l'incubation avec les anticorps primaires, dilué au 1/100 dans le tampon de blocage (Tableau 1) pour une nuit à 4°C.

Dans le cas de l'immunofluorescence, les lamelles sont lavées 3 fois au PBS contenant 0.5% de Tween-20 puis incubées avec les anticorps secondaire couplés avec un Alexa Fluor dilué au 1/600<sup>ème</sup> dans le tampon de blocage pour une heure à température ambiante et à l'obscurité. Les contrôles négatifs sont effectués en incubant les lamelles uniquement avec les anticorps secondaires.

Dans le cas de la PLA (Duolink® in situ kit, Sigma-Aldrich), les lamelles sont lavées deux fois au PBS, puis incubées avec les différentes *PLA probes* (Mouse PLUS et Rabbit MINUS) pendant une heure, avec la ligase pendant 30 minutes (étape de ligation) et avec la polymérase pendant 2h (étape d'amplification), le tout en chambre humide à 37°C. Les témoins négatifs sont effectués en utilisant un seul des deux anticorps primaires incubé avec les deux *PLA probes*.

Pour terminer les deux manipulations, les lamelles sont lavées à trois reprises dans du PBS contenant 0.5% (v/v) de Tween 20, une fois avec du PBS seul avant de marquer les noyaux

avec une solution de DAPI (50 µg/mL) pendant 2 minutes. Les lamelles sont rincées une dernière fois à l'eau ultrapure et montées sur lame en utilisant une solution de Mowiol (Calbiochem, Merck chemicals).

L'immunofluorescence est détectée sur un microscope confocal (Zeiss LSM700) en utilisant le logiciel ZEN 2010 (Zeiss). Les images de PLA sont analysées avec le logiciel ImageJ® (Plugin développé par TISBio).

## **IX/ Electrophorèse bidimensionnelle (2D)**

Pour cette manipulation, 200 µg de protéines (solubles ou liées à la chromatine) sont concentrés par précipitation au chloroforme/méthanol et resolubilisés dans le tampon de réhydratation (8 M urée, 2 M Thiourée, 2% (w/v) CHAPS, 10 mM dithiothreitol (DTT), bleu de bromophénol) contenant 1.2% d'ampholytes pH 4-7 ou pH 6-11. Les échantillons sont soumis à une forte agitation pendant au moins 30 minutes pour bien dissoudre les culots puis chargés sur des IPG strips (7 cm, pH 4-7, GE Healthcare) pour une étape de réhydratation des strips d'une nuit à température ambiante. Pour la première dimension, l'étape d'isoélectrofocalisation s'effectue sur un système Protean IEF cell (Bio-Rad Laboratories) en suivant le programme : 2h à 250 V, 2h à 1000 V, 12h à 8000 V et 9h à 500 V pour une intensité maximale de 50 µA/Strip. Ensuite les strips sont incubés pendant 15 minutes à température ambiante dans le tampon d'équilibration (375 mM Tris-HCl pH 8.8, 6 M Urée, 2% (w/v) SDS, 30 % (v/v) glycérol) contenant 1% (w/v) de DTT puis une seconde fois dans le même tampon mais contenant 2% (w/v) d'iodoacétamide à la place du DTT. Pour la seconde dimension, les strips sont déposés à la surface d'un gel de SDS-PAGE dont la migration s'effectue comme décrit plus haut. Les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose et sont analysées par western-blot.

<b>Tableau 1:Dilution des anticorps pour les différentes manipulations</b>			
Anticorps	Western-blot (dilution)	Immunoprécipitation ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ de protéine)	Immunofluorescence (Dilution)
MCM2 PLA0060 ; Sigma-Aldrich	1 : 3000	5 $\mu\text{g}/\text{mg}$	1:100
MCM3 (N-19) Santa- Cruz	1 : 3000	5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	
MCM3 (3E1) Abgent			1:100
MCM4 (H-300) Santa- cruz	1:3000	5 $\mu\text{g}/\text{mg}$	1:100
MCM5 PLA0064; Sigma Aldrich	1:3000	5 $\mu\text{g}/\text{mg}$	1: 100
MCM6 (H-8) Santa- Cruz	1: 3000	5 $\mu\text{g}/\text{mg}$	1: 100
MCM7 (141.2) Santa- Cruz	1: 3000		1: 100
MCM7 (D10A11) Cell signaling		5 $\mu\text{g}/\text{mg}$	
OGT (DM17 ou T1-14) Sigma-Aldrich	1:3000	5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1: 100
OGA Ab124807; Abcam	1: 10 000		
Cdc6 (DCS-180) Merck	1: 1000		
Cdt1 (H-300) Santa- Cruz	1:1000		
GAPDH (0411)	Santa-Cruz (1: 3000)		
RL2	Thermoscientific, Fisher scientific (1:3000)		

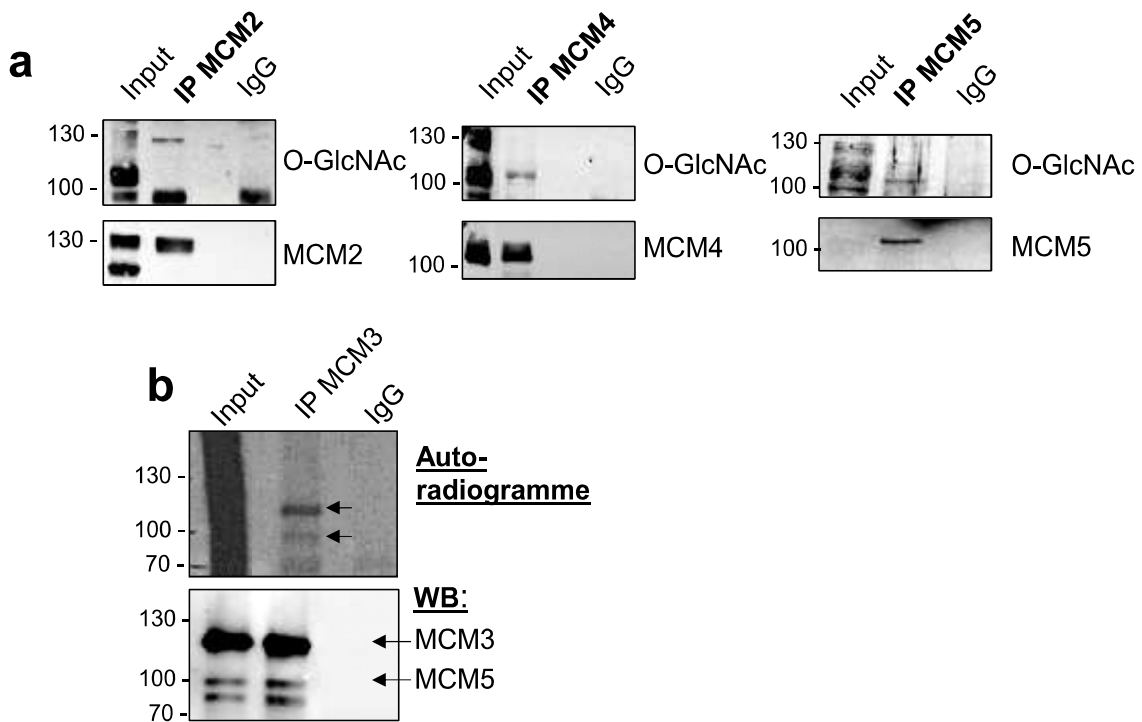




# *Résultats*







**Figure 39: Chaque sous-unité du complexe MCM2-7 est O-GlcNAcylée.**

a. Après traitement de cellules MCF7 asynchrones avec du Thiamet G (1  $\mu$ M) sur la nuit, les cellules sont lysées et MCM2, MCM4 et MCM5 sont immunoprécipitées à partir du lysat total. Chaque précipitat est déposé sur gel de SDS-PAGE et analysé par Western-Blot avec l'anticorps RL2 et les anticorps anti-MCM après déshybridation des membranes.

b. Des cellules HCT116 sont incubées une nuit avec de l'UDP-[ $^3$ H]-GlcNH<sub>2</sub> puis lysées en RIPA. MCM3 est immunoprécipitée et déposée sur gel de SDS-PAGE. Le gel est soit séché pour autoradiographie (b. haut) soit transféré sur membrane pour effectuer un Western-blot MCM3 et MCM5 (b. Bas)

# Résultats

## A/ Les protéines MCM sont O-GlcNAcylées

### I/ Etude de la O-GlcNAcylation des protéines du complexe

#### MCM2-7

Les résultats précédents du laboratoire ont montré par immunoprécipitation (IP) que les MCM 3, 6 et 7 sont O-GlcNAcylées dans les cellules MCF7 (Drougat et al. 2012). Nous avons donc voulu déterminer si les trois autres sous-unités MCM étaient aussi glycosylées dans la même lignée cellulaire mais aussi dans la lignée MDA-MB-231.

#### 1°) Identification de la O-GlcNAcylation par immunoprécipitation

Par cette méthode, la O-GlcNAcylation des MCM3, 6 et 7 a déjà été démontrée (Drougat et al. 2012). Nous nous sommes donc concentrées sur les trois sous-unités restantes, MCM2, 4 et 5. Nous avons utilisé des cellules MCF7 asynchrones, traitées pendant une nuit avec l'inhibiteur d'OGA Thiamet G afin de favoriser la présence de résidus O-GlcNAc sur les protéines MCM. Les cellules sont lysées dans du tampon Ripa contenant 0.1% de SDS afin de récupérer la fraction protéique totale et de séparer au maximum les différentes sous-unités du complexe MCM2-7. Chaque MCM est ensuite immunoprécipitée à partir de 2 mg de protéines totales, déposée sur gel de SDS-PAGE puis transférée sur membrane de nitrocellulose. La O-GlcNAcylation de chaque MCM est détectée par western-blot avec l'anticorps anti-O-GlcNAc RL2 (piste IP) et l'efficacité de chaque immunoprécipitation est vérifiée par un western-blot avec les anticorps anti-MCM (Figure 39 a).

Ainsi, nous montrons par cette approche que MCM2, MCM4 et MCM5 sont aussi O-GlcNAcylées dans les cellules MCF7 asynchrones.



## **2°) Marquage métabolique des protéines O-GlcNAcylées avec de la glucosamine tritiée**

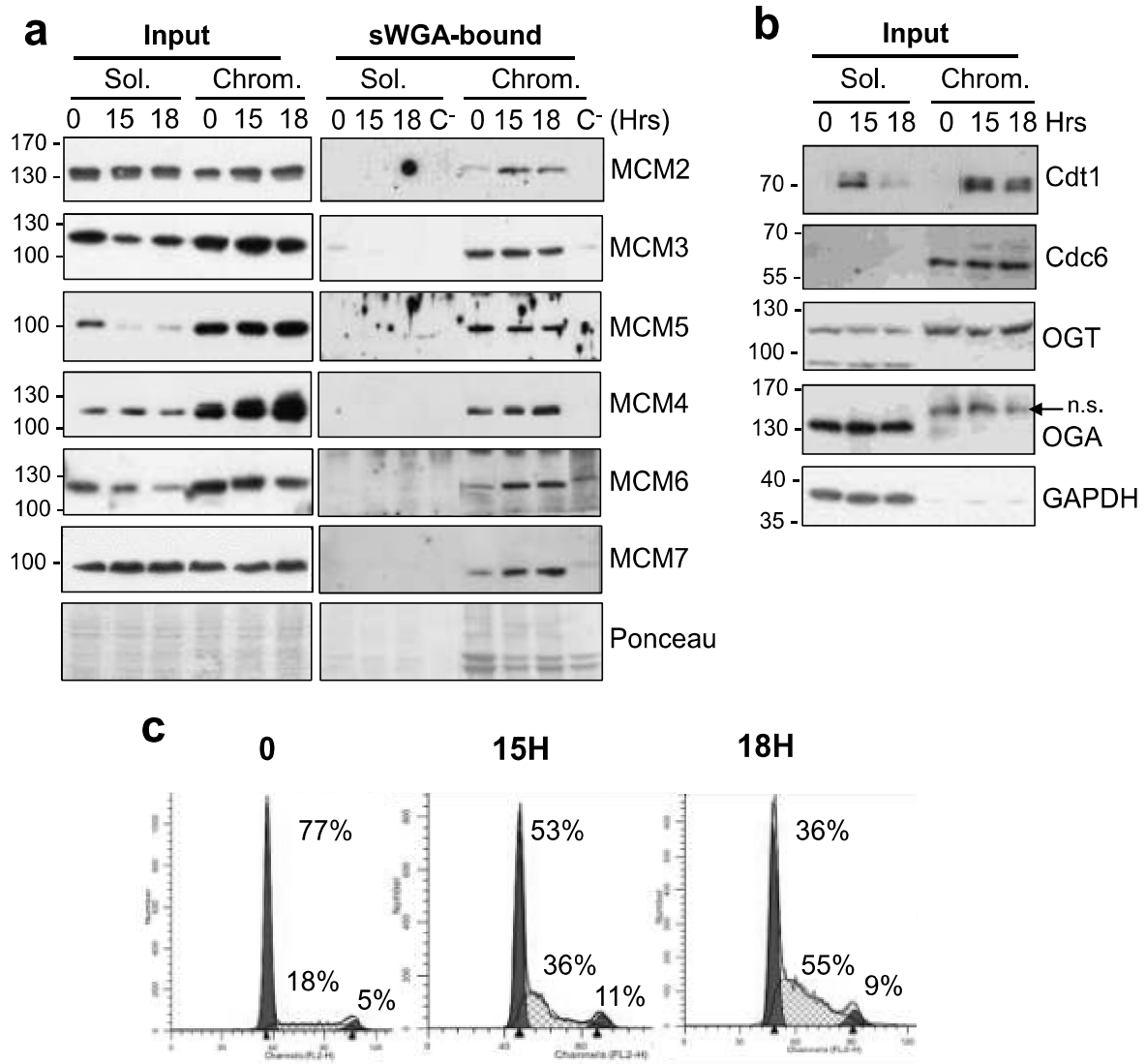
Cette approche a été effectuée sur la lignée colique HCT116 qui est cultivée en routine jusqu'à atteindre 70% de confluence puis incubée dans un milieu à faible concentration en glucose (1 g/L) en présence d'UDP-[<sup>3</sup>H]-GlcNH<sub>2</sub> pendant une nuit avant la récolte. Par cette manipulation nous favorisons la prise en charge de [<sup>3</sup>H]-GlcNH<sub>2</sub> par la machinerie de la voie HBP afin d'induire le marquage radioactif des protéines O-GlcNAcylées qui pourront ensuite être détectées par autoradiographie (Holt et Hart 1986). Les cellules sont lysées dans le tampon Ripa avec 0.1 % de SDS et MCM3 est immunoprécipitée. Le précipitat est déposé sur deux gels de SDS-PAGE. Le premier est séché pour effectuer l'autoradiogramme et visualiser après une exposition de 3 mois à -80°C, la O-GlcNAcylation des protéines immunoprécipitées. Le second gel est transféré sur membrane de nitrocellulose pour effectuer les Western-blots de contrôle, ici MCM3 et MCM5.

L'autoradiogramme présenté en figure 39b montre deux bandes aux alentours de 100 KDa que nous avons identifiées comme étant MCM3 (pour la bande la plus élevée) et sa sous-unité partenaire, MCM5 (pour la bande la plus basse) grâce aux WB contrôles (Figure 39b). Ainsi cette manipulation nous apporte confirmation de la O-GlcNAcylation de MCM3 et MCM5 dans des extraits totaux d'une autre lignée cellulaire humaine, les cellules HCT116.

## **II/ Etude de la localisation subcellulaire des MCM O-GlcNAcylées**

La régulation de la localisation subcellulaire des protéines MCM est un élément central dans la régulation de l'activité du complexe MCM2-7. Nous avons vu que les interactions protéine-protéine et les modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation des MCM participent à la régulation de leur localisation subcellulaire. Afin d'étudier un impact potentiel de la O-GlcNAcylation des MCM sur leur localisation, nous avons d'abord voulu

MCF7



**Figure 40: Les MCM O-GlcNAcylées sont localisées sur la chromatine dans les cellules MCF7**

a. Les protéines O-GlcNAcylées de la fraction soluble (Sol.) et chromatinienne (Chrom.) des cellules MCF7 synchronisées par sevrage sont enrichies par chromatographie d'affinité sur billes de sWGA. Les *input* correspondent aux extraits avant enrichissement et le témoin négatif (C-) est effectué en ajoutant de la GlcNAc libre à 0,5 M.

b. Les cellules MCF7 sont lysées de façon à obtenir une fraction protéique soluble (sol.) et chromatinienne (Chrom.) qui est ensuite analysée par Western-blot. (n.s. = bande non spécifique)

c. Les cellules MCF7 sont synchronisées par sevrage, restimulées par le sérum puis récoltées à différents temps. La synchronisation est vérifiée par cytométrie en flux après marquage de l'ADN par l'iodure de propidium. Le pourcentage de cellules dans chaque phase est indiqué.



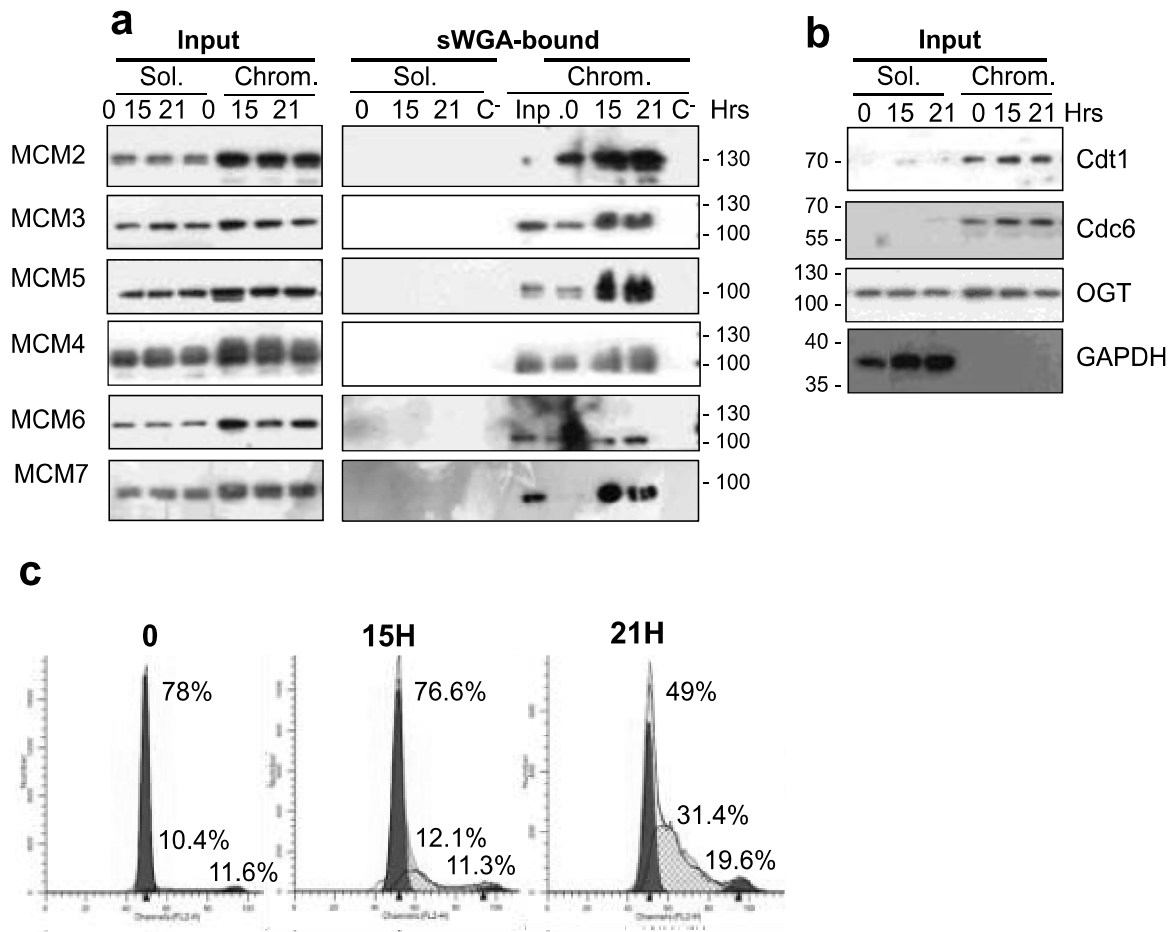
déterminer si la O-GlcNAcylation des MCM est dépendante de leur localisation subcellulaire au cours du cycle.

### **1°) Chromatographie d'affinité avec la lectine sWGA**

Pour cette approche nous avons utilisé les lignées cellulaires MCF7 et MDA-MB-231 que nous avons synchronisées par privation de sérum, comme décrit dans la section « matériels et méthodes », en G0 (T0), en début de phase S (T15h) et en fin de phase S (T18h pour les MCF7/T21h pour les MDA-MB-231). L'efficacité de la synchronisation est vérifiée par cytométrie en flux (Figure 40/41c). Les cellules sont ensuite lysées afin d'obtenir une fraction protéique soluble d'un côté (Sol.) et une fraction de protéines liées à la chromatine de l'autre (Chrom.) (Yonghong Zhu et al. 2005). L'efficacité du fractionnement est vérifiée par western-blot avec les anticorps anti-GAPDH et anti-OGA qui sont des marqueurs de la fraction soluble (Figure 40b). En effet, et de manière intéressante, l'OGA est absente de la fraction protéique liée à la chromatine alors que l'OGT, qui est présente dans les deux fractions est plutôt enrichie dans cette fraction par rapport à la fraction soluble. L'anticorps anti-Cdc6 est quant à lui utilisé comme marqueur de la fraction chromatinienne (Figure 40/41b) (Coverley et al. 2000).

Les protéines O-GlcNAcylées sont enrichies à partir des deux fractions, soluble et chromatinienne, par chromatographie d'affinité avec une colonne remplie de billes d'agarose couplées à la sWGA (Moullier et al. 1986; P. S. Banerjee, Hart, et Cho 2013). Après élution, les protéines retenues sur les billes (*sWGA-bound*) sont déposées sur gel de SDS-PAGE et analysées par Western-blot. Un contrôle négatif est effectué en présence de GlcNAc libre pour vérifier la spécificité de l'interaction des protéines O-GlcNAcylées avec la sWGA. Alors que les protéines MCM sont retrouvées dans les deux fractions subcellulaires (*input*) avec pour la plupart un enrichissement dans la fraction chromatinienne, les MCM O-GlcNAcylées ne sont retrouvées que dans la fraction Chrom. et ce, dans les deux lignées cellulaires (Figure 40/41 a ; *sWGA-bound*).

## MDA-MB-231



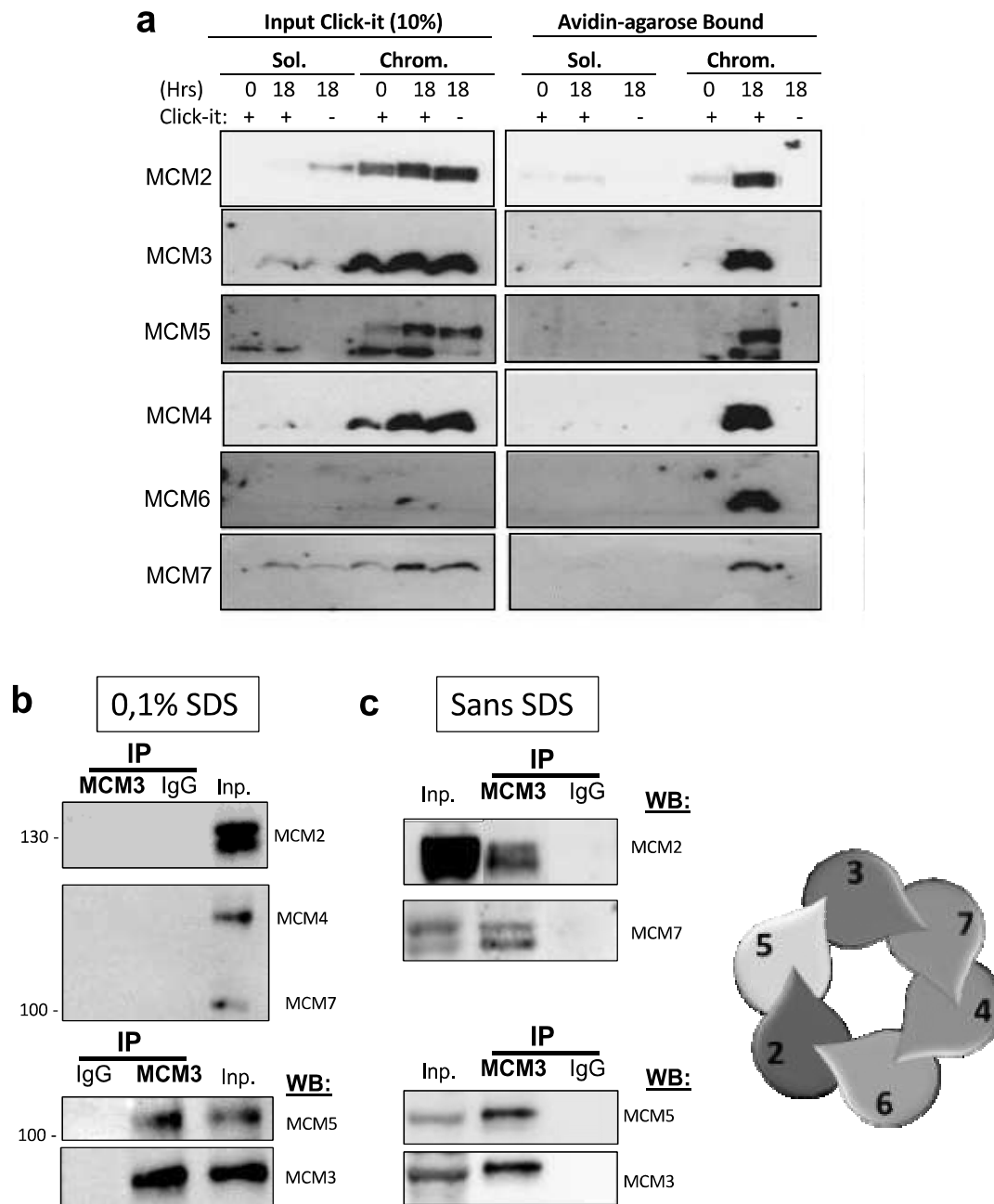
**Figure 41: Les MCM O-GlcNAcylées sont localisées sur la chromatine dans les cellules MDA-MB-231**

- a. Les protéines O-GlcNAcylées de la fraction soluble (Sol.) et chromatinienne (Chrom.) des cellules MDA-MB-231 synchronisées par sevrage sont enrichies par chromatographie d'affinité sur billes de sWGA. Les *input* correspondent aux extraits avant enrichissement et le témoin négatif (C-) est effectué en ajoutant de la GlcNAc libre à 0,5 M.
- b. Les cellules MDA-MB-231 sont lysées de façon à obtenir une fraction protéique soluble (sol.) et chromatinienne (Chrom.) qui est ensuite analysée par Western-blot. (n.s. = bande non spécifique)
- c. Les cellules MDA-MB-231 sont synchronisées par sevrage, restimulées par le sérum puis récoltées à différents temps. La synchronisation est vérifiée par cytométrie en flux après marquage de l'ADN par l'iodure de propidium. Le pourcentage de cellules dans chaque phase est indiqué.

Cette approche nous a tout d'abord permis de confirmer que, dans les deux lignées cellulaires MCF7 et MDA-MB-231, les six protéines MCM2 à MCM7 sont O-GlcNAcylées puisqu'elles sont toutes retenues sur les billes de sWGA. Cependant, cette manipulation s'effectue dans des conditions de lyse et de lavages des billes assez douces, qui ne déstabilisent pas le complexe MCM2-7. Ainsi nous ne pouvons pas affirmer ici que les six protéines sont individuellement O-GlcNAcylées car il est possible que l'interaction d'une MCM O-GlcNAcylée avec la sWGA entraîne aussi la fixation de ses partenaires dans le complexe MCM2-7, ou un autre sous-complexe. Donc, afin de confirmer les résultats obtenus avec la sWGA nous avons utilisé une autre approche dans des conditions plus dénaturantes afin de dissocier les interactions MCM-MCM.

## **2°) Enrichissement en protéines O-GlcNAcylées par chimie-click**

Comme précédemment, nous avons utilisé les fractions de protéines nucléocytoplasmiques solubles (Sol.) et liées la chromatine (Chrom.) de cellules MCF7 synchronisées par sevrage pour effectuer un enrichissement en protéines O-GlcNAcylées par une approche chimio-enzymatique. C'est une approche très sensible et efficace pour la détection et l'enrichissement *in vitro* en protéines O-GlcNAcylées. De plus, cette méthode utilise des solutions contenant 1% (w/v) de SDS, ce qui est suffisant pour dénaturer les protéines et dissocier les complexes. Comme expliqué dans l'introduction, les protéines sont d'abord marquées avec un résidu de GalNAz grâce à l'activité de la GalT(Y289L), puis soumises à une réaction de chimie-click avec une sonde biotine-alcyne. Cette dernière permet l'enrichissement en protéines O-GlcNAcylées sur des billes d'agarose couplées à l'avidine (Vercoutter-Edouart et al. 2015). La présence des protéines MCM dans chaque fraction juste avant l'étape d'enrichissement sur billes d'avidine (*input click-it*) est vérifiée par western-blot (Figure 42 a). Toutefois, les inputs ne révèlent que très peu de protéines MCM dans la fraction



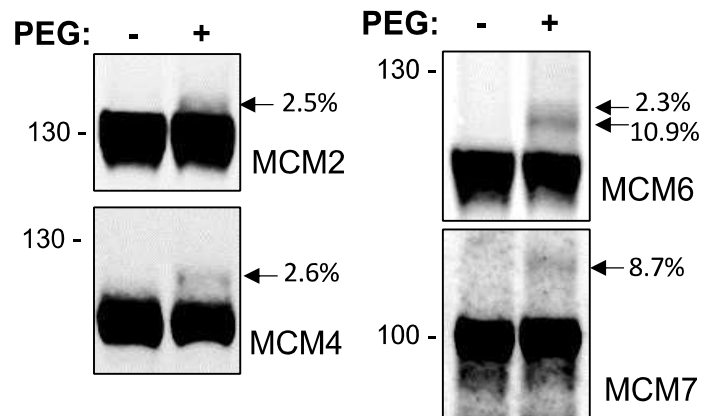
**Figure 42: Les six protéines MCM sont O-GlcNAcylées dans les cellules MCF7**

a. Les protéines O-GlcNAcylées des fractions soluble (sol.) et chromatinienne (Chrom.) de cellules MCF7 synchronisées sont marquées avec une GalNAz et une biotine-alcyne (input click-It) avant d'être enrichies sur billes d'avidine. Les contrôles négatifs (-) correspondent aux conditions sans UDP-GalNAz. Les protéines MCM sont analysées par western-blot avant et après enrichissement sur les billes d'avidine.

b./c. La protéine MCM3 est immunoprécipitée à partir d'extraits totaux de cellules MCF7 lysées en présence (b) ou en absence (c) de 0,1% de SDS. Les protéines sont ensuite déposées sur gel de SDS-PAGE et leurs partenaires sont identifiés par Western-blot.

nucléocytoplasmique soluble (Sol.) alors qu'elles sont très présentes dans la fraction liée à la chromatine (Chrom.), exception faite de MCM6 pour qui le signal est faible.

Ainsi, nous observons bien que chaque MCM est retenue sur les billes d'avidine (*Avidin-agarose bound*) et presque exclusivement dans la fraction Chrom. Nous observons un signal pour la protéine MCM2 soluble *O*-GlcNAcylée, indiquant que cette sous-unité pourrait être retrouvée modifiée dans la fraction soluble des cellules MCF7. Pour MCM4 et MCM6, compte-tenu de l'absence de signal dans les inputs click-It, due très certainement à un problème de resolubilisation de l'échantillon après les précipitations chloroforme/méthanol, nous ne pouvons pas exclure que ces deux sous-unités seraient également *O*-GlcNAcylées dans la fraction soluble. Enfin, les sous-unités MCM3, MCM5 et MCM7 sont quant à elles retrouvées *O*-GlcNAcylées uniquement dans la fraction chromatinienne, ce qui est en accord avec les résultats obtenus précédemment par chromatographie d'affinité avec la lectine sWGA. Cette approche nous permet donc de confirmer que MCM3, MCM5 et MCM7 ne sont modifiées que sur la chromatine, et suggère que MCM2 pourrait être faiblement glycosylée dans la fraction soluble des cellules MCF7. De plus, nous confirmons que les six protéines MCM sont individuellement *O*-GlcNAcylées car toutes sont retenues sur les billes et la présence de 1% de SDS dans les différents tampons permet la dissociation du complexe. Ceci a d'ailleurs fait l'objet d'une vérification par l'immunoprécipitation de MCM3 suivie de western-blot anti-MCM en présence (figure 42b) ou en absence (figure 42c) de SDS dans les tampons de lyse et de lavage. Ainsi nous avons constaté que dans les conditions sans SDS les protéines MCM2, MCM5 et MCM7 sont détectées après IP MCM3, cependant l'interaction MCM3-MCM5 est la seule qui subsiste en présence de 0.1% de SDS dans les différents tampons. Ceci nous indique que les interactions MCM-MCM sont fortement perturbées en présence de 0.1% de SDS et indique que, dans l'approche de Click-It (1% SDS), nous détectons bien la *O*-GlcNAcylation individuelle de chaque MCM.



**Figure 43: Evaluation de la stœchiométrie de O-GlcNAcylation des MCM**

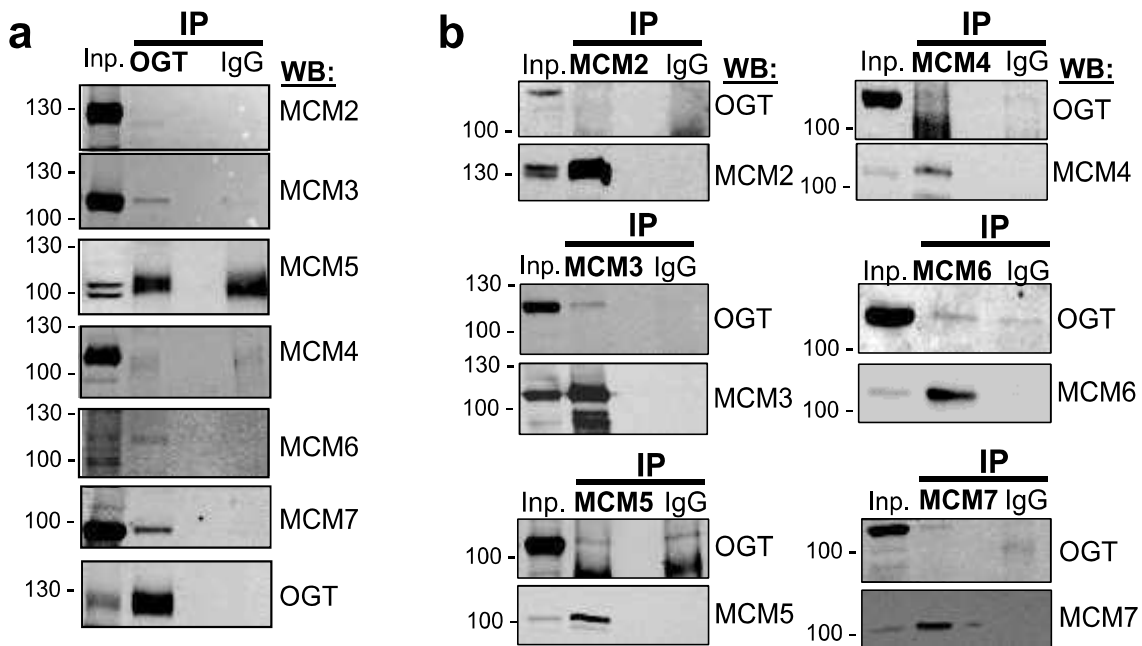
Les protéines O-GlcNAcylées de la fraction chromatiniennne de cellules MCF7 asynchrones sont marquées par la GalNAz puis par un ou plusieurs PEG d'une masse de 4,4kDa chacune (PEG +) ou incubées avec du DMSO (PEG -). Les protéines MCM sont détectées par western-blot.

### III/ Détermination de la stœchiométrie de O-GlcNAcylation

Nous avons voulu ensuite déterminer le nombre de sites de O-GlcNAcylation présents sur chaque MCM et le pourcentage de protéines O-GlcNAcylées par rapport aux protéines totales. Pour cela, nous avons utilisé une approche basée sur la fixation de molécules de polyéthylène glycol (PEG +) après le marquage enzymatique des sites O-GlcNAc par la GalNAz. Le PEG utilisé ici présente une masse de 4.4 KDa qui induit donc un shift de masse de la protéine O-GlcNAcylée sur laquelle il se fixe et qui est visible en western-blot (Rexach et al. 2010; Clark, Rexach, et Hsieh-Wilson 2013). En parallèle, une fraction des protéines marquées par la GalNAz sont incubées avec du DMSO (PEG -) comme contrôle négatif.

Nous avons effectué cette manipulation à partir de la fraction des protéines liées à la chromatine de cellules MCF7 asynchrones. Le but étant ici de sélectionner la fraction dans laquelle les MCM sont le plus O-GlcNAcylées pour en faciliter la détection. Après le marquage enzymatique et la fixation du PEG, les protéines sont séparées sur gel de SDS-PAGE et identifiées par Western-blot. La séparation sur un grand gel nous permet de distinguer les formes non-glycosylées des formes glycosylées (indiquées par une flèche). Ainsi nous avons pu détecter deux sites de O-GlcNAcylation sur MCM2 et MCM4 (avec un shift de masse de  $10.1 \pm 1.5$  KDa et  $9.3 \pm 1.1$  KDa respectivement) avec une très faible stœchiométrie d'environ 3% pour ces deux protéines (Figure 43). Pour MCM6, nous détectons deux formes glycosylées distinctes avec 2 sites (10.9%) et 3 sites de O-GlcNAcylation (2.3%). Enfin, nous détectons pour MCM7 une seule forme glycosylée avec 3 sites O-GlcNAc avec une stœchiométrie de 9%.

Nous n'excluons pas la possibilité que plus de sites de O-GlcNAcylation pourraient exister sur ces protéines mais ne seraient pas visibles dans nos conditions. Un trop grand nombre de PEG sur une même protéine pourrait bloquer l'accès aux anticorps et empêcher la détection de la protéine. D'un autre côté, la stœchiométrie d'une forme glycosylée pourrait aussi être trop



**Figure 44: L'OGT interagit préférentiellement avec certaines sous-unités MCM dans les cellules HEK293T transfectées avec l'OGT-HA**

l'OGT (a.) ou chaque protéine MCM (b.) est immunoprécipitée à partir de la fraction totale des cellules HEK293T transfectées avec OGT-HA puis, après dépôt sur gel de SDS-PAGE, les protéines partenaires sont détectées par western-blot.

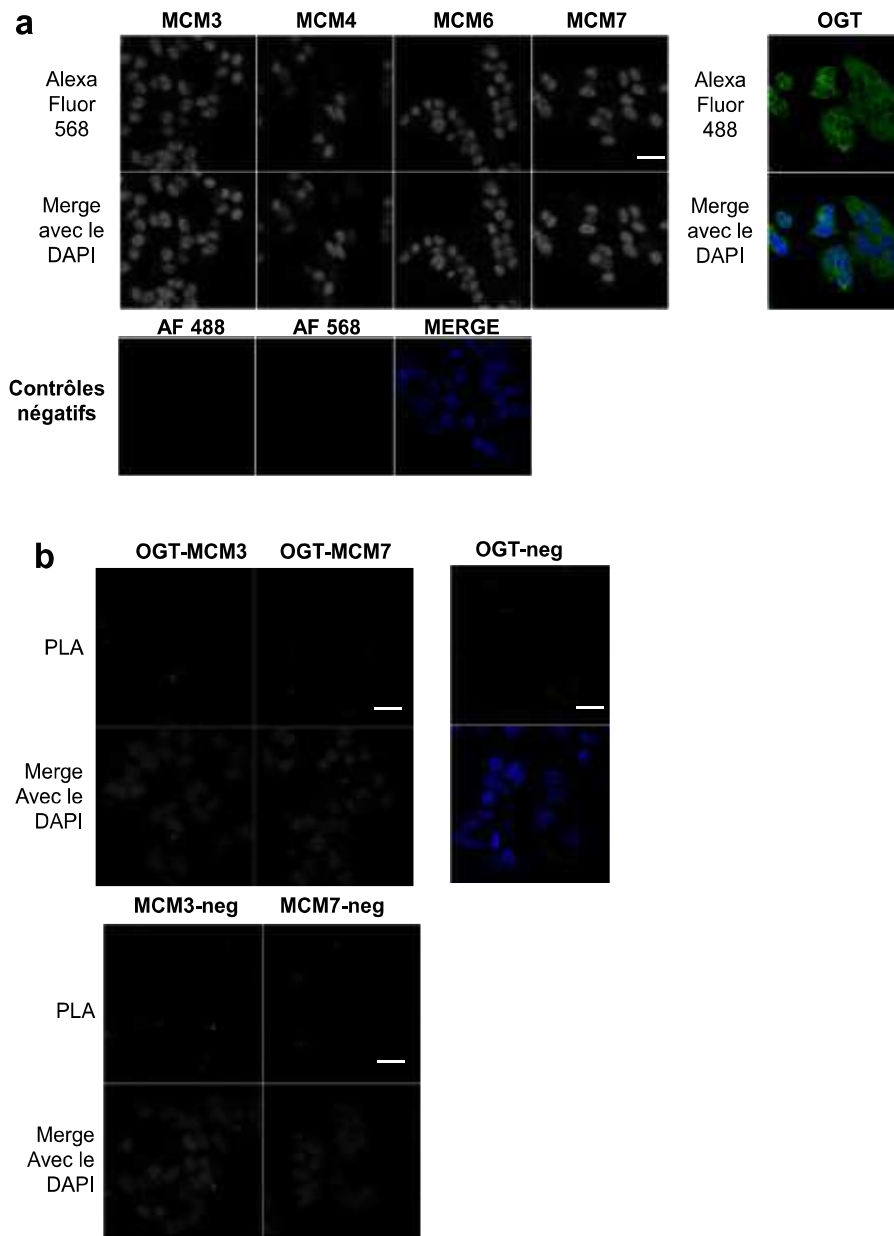


faible pour être détectable par western-blot. Malgré tout, cette approche nous apporte des informations concernant le nombre de site *O*-GlcNAc qui pourraient être présents sur les 4 MCM étudiées ici et indique que la stœchiométrie de *O*-GlcNAcylation est assez faible dans les cellules MCF7

## **B/ L'OGT interagit spécifiquement avec certaines sous-unités du complexe MCM2-7**

### **I/ Etude des interactions OGT-MCM par co-Immunoprécipitation (co-IP)**

Nous avons tout d'abord fait des essais de co-IP à partir d'extraits totaux de cellules MCF7. Cependant, nous n'avons pas pu détecter d'interaction de l'OGT endogène avec les MCM. Nous avons donc décidé de surexprimer une forme taggée de l'OGT humaine (OGT-HA) dans la lignée cellulaire HEK293T, qui se transfecte facilement. A partir de 1 mg de la fraction totale de ces cellules, nous avons immunoprécipité l'OGT ou chacune des protéines MCM et les échantillons ont été analysés par Western blot afin de détecter les MCM ou l'OGT. Ainsi, après immunoprécipitation de l'OGT, nous avons pu détecter MCM3, MCM6 et MCM7 alors qu'aucun signal spécifique n'est détecté pour les autres MCM (figure 44). De manière très intéressante, les IP inverses confirment ces résultats. En effet, nous détectons de manière spécifique l'OGT après immunoprécipitation de MCM3 et de MCM7. L'OGT est aussi détectée après précipitation de MCM6, cependant un faible signal apparaît dans la piste IgG témoignant d'un manque de spécificité. Il en est de même pour MCM4. Par contre, dans le cas de MCM5, le signal obtenu dans la piste IgG est plus intense que dans la piste IP indiquant qu'aucune interaction spécifique OGT-MCM5 n'existe dans ces conditions. Ainsi, dans les cellules



**Figure 45: Mise au point de la visualisation *in cellulo* des interactions OGT-MCM**

a. Vérification de l'efficacité des anticorps en immunofluorescence. Les cellules MCF7 asynchrones sont incubées avec les anticorps primaires anti-MCM3, MCM4, MCM6, MCM7 et OGT puis avec les secondaires anti-*mouse* (AF568) pour les MCM et anti-*rabbit* (AF488) pour l'OGT. Les noyaux sont marqués au DAPI et les contrôles négatifs sont effectués en incubant les cellules uniquement avec les anticorps secondaires. Les lamelles sont ensuite analysées en microscopie confocale.

b. Après une perméabilisation de 20 minutes des cellules MCF7 au Triton-X100 (0,5% dans PBS), mise en évidence par PLA des interactions entre l'OGT endogène et MCM3, ou MCM7. Les noyaux sont marqués au DAPI et les contrôles négatifs sont effectués en incubant les cellules avec un seul des deux anticorps primaires. Les lamelles sont ensuite analysées en microscopie confocale.

Barre d'échelle: 30  $\mu$ m.

HEK293T surexprimant l'OGT, nos résultats montrent que l'OGT interagit préférentiellement avec MCM3, MCM7 et peut-être MCM6.

L'approche par co-immunoprécipitation est assez laborieuse car elle nécessite une quantité très importante de cellules et la détection par western blot est parfois difficile. Nous avons donc utilisé une autre approche basée sur l'immunofluorescence pour visualiser les interactions OGT-MCM directement *in cellulo*.

## **II/ Visualisation des interactions *in cellulo* OGT-MCM par PLA**

### **(*Proximity ligation assay*)**

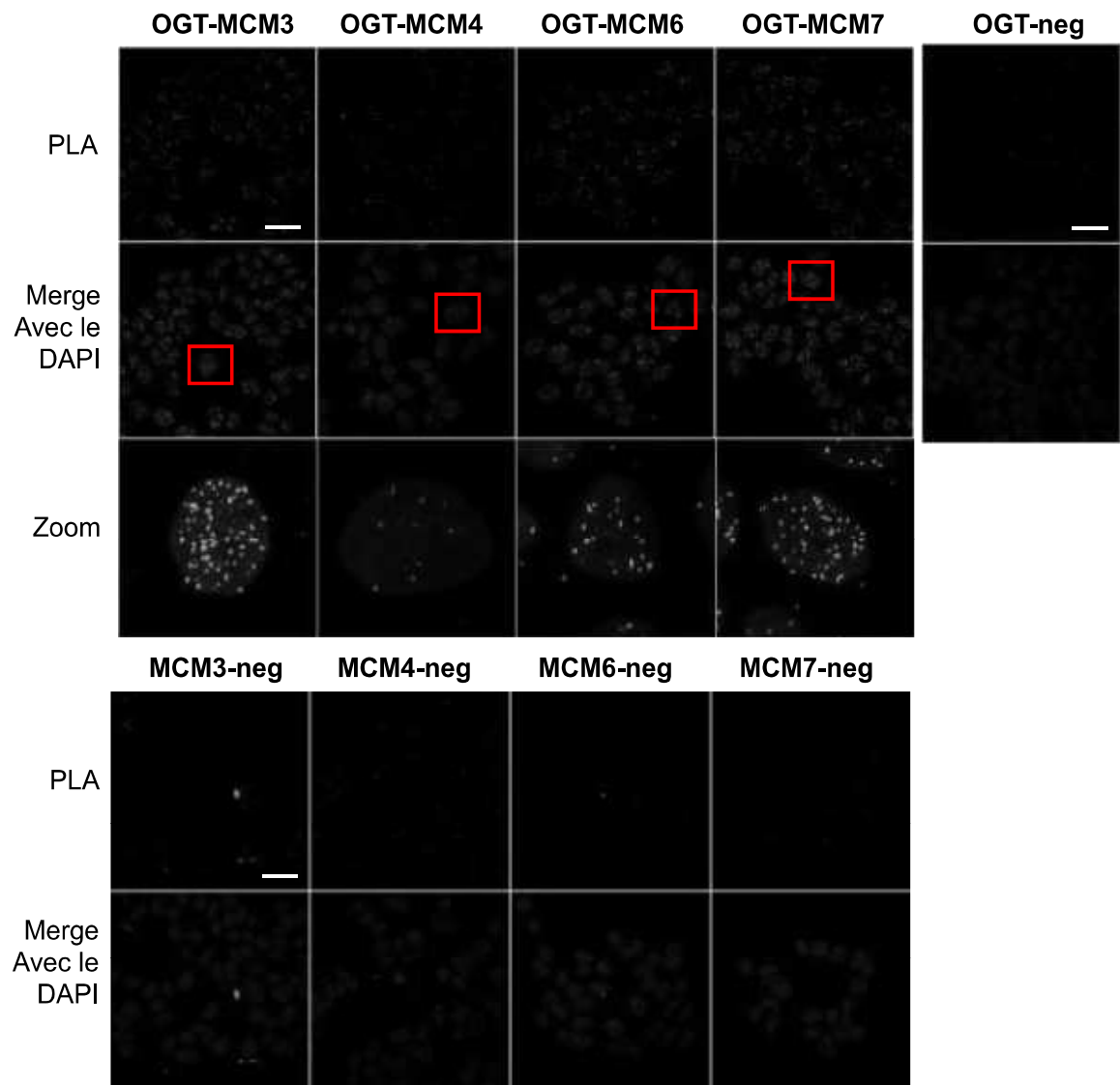
Dans un premier temps, nous avons testé l'efficacité des anticorps, qui seront utilisés au cours des différentes manipulations de PLA, par immunofluorescence (IF). Pour cette section de résultats, les anticorps qui nous intéressent particulièrement sont les anti-OGT, -MCM3, -MCM4, -MCM6 et -MCM7. L'anticorps anti-OGT étant produit chez le lapin nous avons dû utiliser des anticorps anti-MCM provenant d'un autre organisme pour pouvoir effectuer la PLA. Ces anticorps proviennent donc tous de la souris. Après incubation avec les anticorps primaires, les cellules sont incubées pendant une heure avec les anticorps secondaires couplés à un Alexa Fluor (488 pour les anti-rabbit, fluorescence verte ; 568 pour les anti-mouse, fluorescence rouge). Les contrôles négatifs sont effectués en incubant les cellules dans le tampon de blocage sans les anticorps primaires suivi de l'incubation normale avec les anticorps secondaires (voir matériels et méthodes). Nous observons bien le signal fluorescent pour chaque MCM, localisé dans le noyau des cellules, et le signal de l'OGT qui est plutôt périnucléaire (Figure 45a). Nous avons de cette façon confirmé que nos anticorps sont efficaces pour l'immunofluorescence et qu'ils sont utilisables pour la manipulation de PLA.

Dans notre cas, l'intérêt de l'approche de PLA réside dans son système d'amplification. En effet, comme le suggèrent nos résultats de co-IP dans les MCF7, il est fort probable que



l'interaction OGT-MCM soit très minoritaire par rapport aux protéines 'libres'. Nous avons donc besoin de ce système pour la visualiser, afin de s'affranchir de la surexpression de l'OGT et pouvoir ainsi observer les interactions de l'OGT endogène avec les MCM. Nous avons d'abord effectué la PLA dans les mêmes conditions que l'IF : sur des cellules MCF7 asynchrones cultivées sur lamelle. Après la fixation, les cellules sont incubées avec les couples d'anticorps primaires suivants : OGT-MCM3/OGT-MCM4/OGT-MCM6/OGT-MCM7. Nous nous sommes concentrés ici sur l'étude des interactions qui nous semblaient intéressantes d'après les résultats obtenus par co-IP. Les contrôles négatifs sont réalisés en incubant les cellules avec un seul des deux anticorps primaires mais avec les deux *PLA probes* (neg) confirmant la spécificité de chaque expérience.

Après analyse des lamelles en microscopie confocale, nous observons un signal fluorescent dans le noyau des cellules pour les conditions OGT-MCM3, OGT-MCM6 et OGT-MCM7 (Figure 45b). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus précédemment après l'immunoprécipitation de l'OGT. De manière intéressante, le signal obtenu pour la condition OGT-MCM4 n'est pas significatif par rapport aux témoins négatifs, confirmant que l'interaction OGT-MCM4 observée par co-IP n'est pas spécifique. Lors de la mise au point de cette manipulation, nous avons commencé par perméabiliser les cellules pendant 20 minutes dans une solution de PBS avec 0.5% de Triton-X100 dans l'optique d'éliminer un maximum de protéines solubles (protocole adapté de Scovassi et Prospero 2006). En effet, nos premiers résultats indiquent que les protéines MCM O-GlcNAcylées sont presque exclusivement liées à la chromatine. Nous avons donc supposé dans un premier temps que l'interaction OGT-MCM devait s'effectuer au niveau de l'ADN. Cependant dans ces conditions de perméabilisation nous observons toujours la présence de l'OGT dans le cytoplasme en immunofluorescence (Figure 45a) et paradoxalement, nous n'obtenons aucun signal fluorescent, quelque-soit la protéine MCM considérée en PLA (Figure 45b). Alors que les MCM sont directement et fortement



**Figure 46: Visualisation *in cellulo* des interactions OGT-MCM**

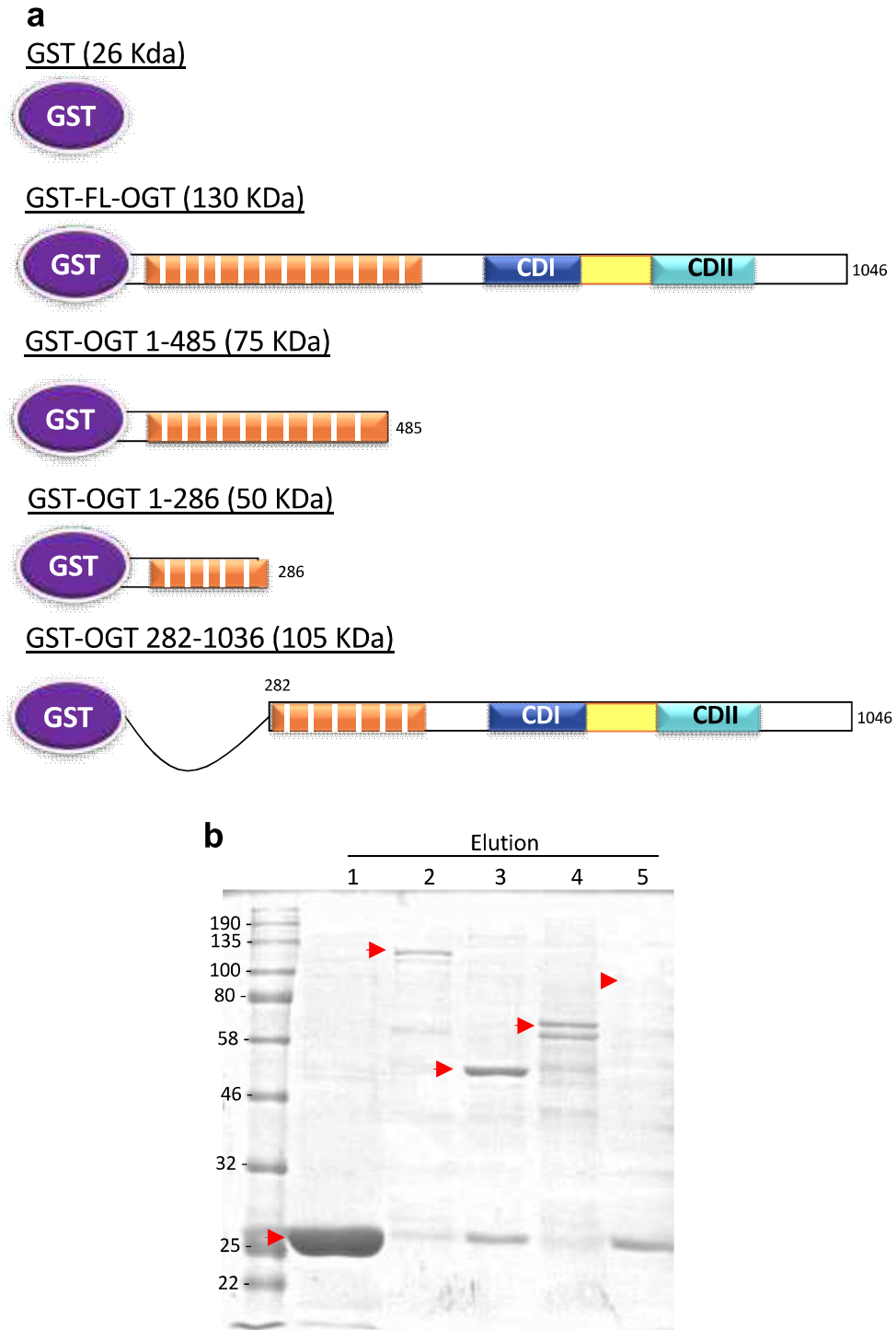
Après une courte perméabilisation des cellules MCF7 au Triton-X100 (0,5% dans PBS), mise en évidence par PLA des interactions entre l'OGT endogène et les MCM3, MCM4, MCM6 ou MCM7. Les noyaux sont marqués au DAPI et les contrôles négatifs sont effectués en incubant les cellules avec un seul des deux anticorps primaires. Les lamelles sont ensuite analysées en microscopie confocale.

Barre d'échelle: 30  $\mu$ m.

fixées à l'ADN, l'OGT ne l'est que par l'intermédiaire de ses nombreux partenaires, dont les protéines MCM. Ceci expliquerait l'absence de signal PLA lorsque l'étape de perméabilisation des cellules est trop longue. Nous avons donc réduit le temps d'incubation avec le tampon de perméabilisation à 2 minutes comme décrit par Kuipers et collaborateurs (Kuipers et al. 2011). C'est dans ces conditions que nous observons un signal fluorescent pour OGT-MCM3, OGT-MCM6 et OGT-MCM7 (Figure 46). L'ensemble de ces résultats indiquent que l'OGT interagit avec MCM3, MCM6 et MCM7.

### **III/ Identification des partenaires MCM de l'OGT par *GST-Pull down***

Nous avons obtenu par le Dr X. Yang quatre plasmides codant pour les formes entière ou tronquées de l'OGT couplée à la GST en N-terminal (GST-FL-OGT [Full Length], GST-OGT 1-485 (TPR1 à 11), GST-OGT 1-286 (TPR 1 à 6) et GST-OGT 282-1046 ( $\Delta$ TPR1 à 6) (Yale University School of Medicine, New Haven, USA, (Xiaoyong Yang, Zhang, et Kudlow 2002) (Figure 47a). Avec l'aide du Dr Olivier Vidal de notre UMR, nous avons exprimé, amplifié et purifié ces 4 formes de l'OGT, ainsi que la GST seule en guise de contrôle (Figure 47b). Le but est ici dans un premier temps de confirmer les interactions observées en co-IP et par PLA mais aussi dans un second temps de déterminer une zone d'interaction avec les MCM sur l'OGT. Le principal problème rencontré lors de la mise au point du *GST-pull Down* fut l'agrégation des protéines GST-OGT, principalement l'OGT-FL, qui rendait leur purification difficile après la lyse des bactéries. Plusieurs méthodes d'induction douce ont donc été testées afin de limiter cette agrégation et le protocole retenu fut l'induction à l'IPTG à 0,1 mM pendant 4h à température ambiante. À cela s'ajoute un cycle de congélation-décongélation avant la lyse des bactéries par pression (Emulsiflex) et la purification des protéines couplées à la GST sur des billes de Glutathion-sépharose.

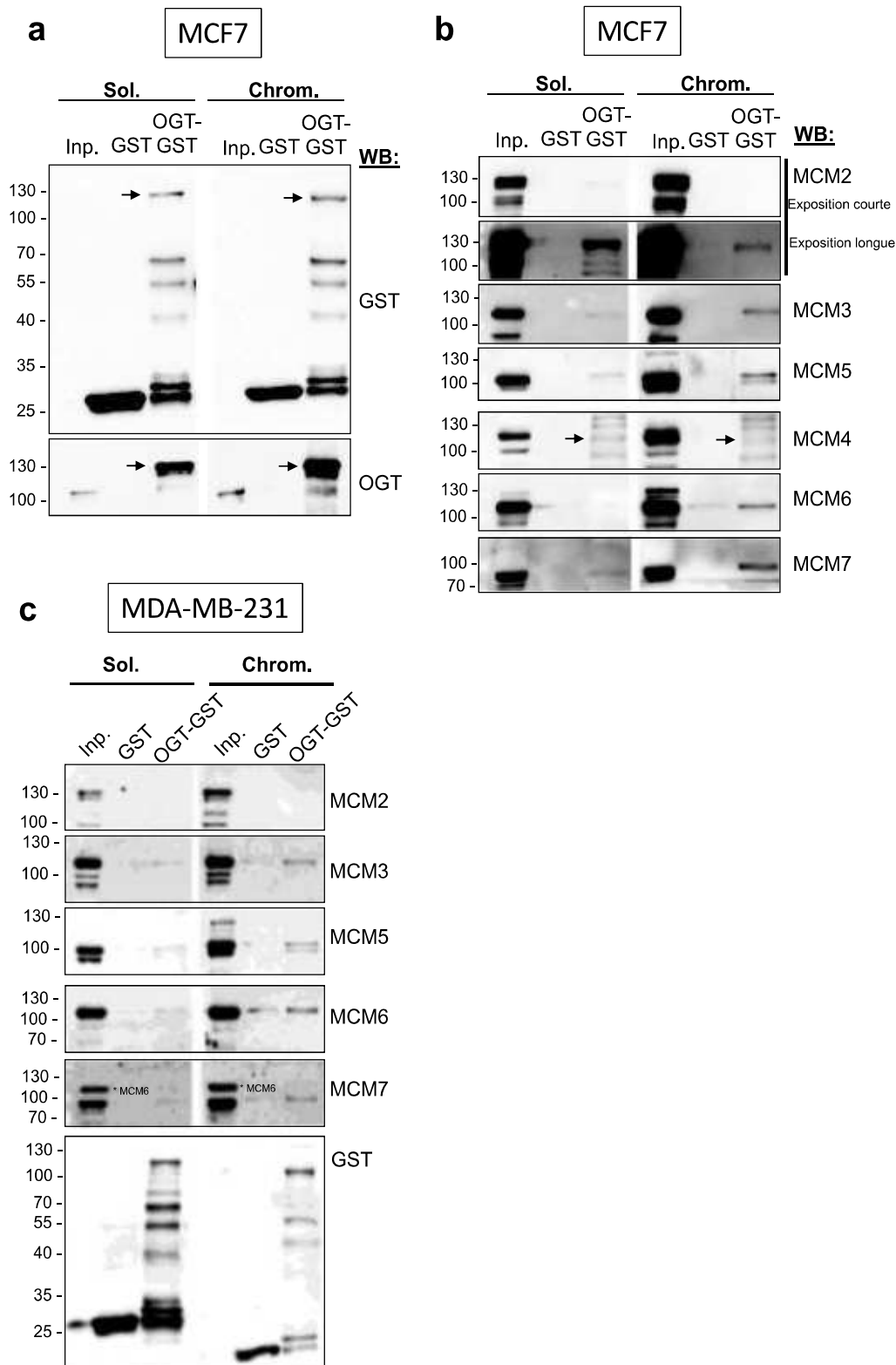


**Figure 47: Expression et purification des différentes protéines recombinantes GST-OGT**

- Schéma des différentes GST-OGT recombinantes.
- Les protéines recombinantes sont exprimées puis purifiées à partir de 10 mg de lysat bactérien. Les protéines sont ensuite déposées sur gel de SDS-PAGE qui est coloré au bleu de Coomassie. 1-GST ; 2-OGT-FL ; 3-OGT 1-286 ; 4-OGT 1-485 ; 5-OGT  $\Delta$ TPR1-6



Nous nous sommes concentrés sur l'utilisation de la GST-FL-OGT. Nous avons utilisé les fractions soluble et liée à la chromatine des cellules MCF7 asynchrones que nous avons incubées avec des billes de glutathion-sépharose associées à la GST-OGT, ou à la GST seule. Après élution des protéines retenues avec un excès de glutathion nous avons tout d'abord vérifié par western-blot avec les anticorps anti-GST et anti-OGT que la GST et la GST-OGT ont bien été éluées (Figure 48a). Ensuite, la présence de protéines MCM dans chaque fraction a été vérifiée par un western-blot fait en parallèle du pull down (Figure 48b, Inp.). Enfin, après le dépôt des éluats sur gel de SDS-PAGE les protéines sont analysées par Western-blot (Figure 48b). Nous avons constaté que chaque protéine MCM, provenant des deux fractions subcellulaires, est retenue avec la GST-OGT à l'exception de MCM6 dont la portion provenant de la fraction soluble n'interagit pas avec la GST-OGT. De plus, il semble que MCM6 interagissent aussi faiblement et de manière non-spécifique avec la GST seule puisqu'elle est détectée dans la piste GST. MCM2 semble aussi n'interagir que très faiblement avec la GST-OGT car il faut forcer l'exposition pour réussir à distinguer un signal pour cette protéine en Western-blot. Les mêmes résultats sont obtenus à partir de fractions subcellulaires de cellules MDA-MB-231 à l'exception de MCM2 qui n'apparaît dans aucune fraction (Figure 48c). Ces résultats sont en désaccord avec ceux obtenus précédemment qui suggèrent une interaction préférentielle de l'OGT avec certaines MCM. Toutefois, les conditions expérimentales utilisées ici, notamment les tampons de lavage et d'élution, sont assez douces afin de maintenir l'OGT recombinante dans une forme non dénaturée, capable de se lier à ses partenaires. Dans ces conditions, les interactions MCM-MCM sont maintenues. Ainsi d'après nos résultats de PLA et co-IP, nous pensons que les protéines MCM éluées lors de la manipulation peuvent interagir de manière indirecte avec la GST-OGT, *via* leur association dans le complexe MCM2-7 ou ses sous-complexes (Ishimi 1997; Sherman et Forsburg 1998; Coué et al. 1998; J. K. Lee et Hurwitz 2000; Z. Yu, Feng, et Liang 2004; S. D. Bell et Botchan 2013).



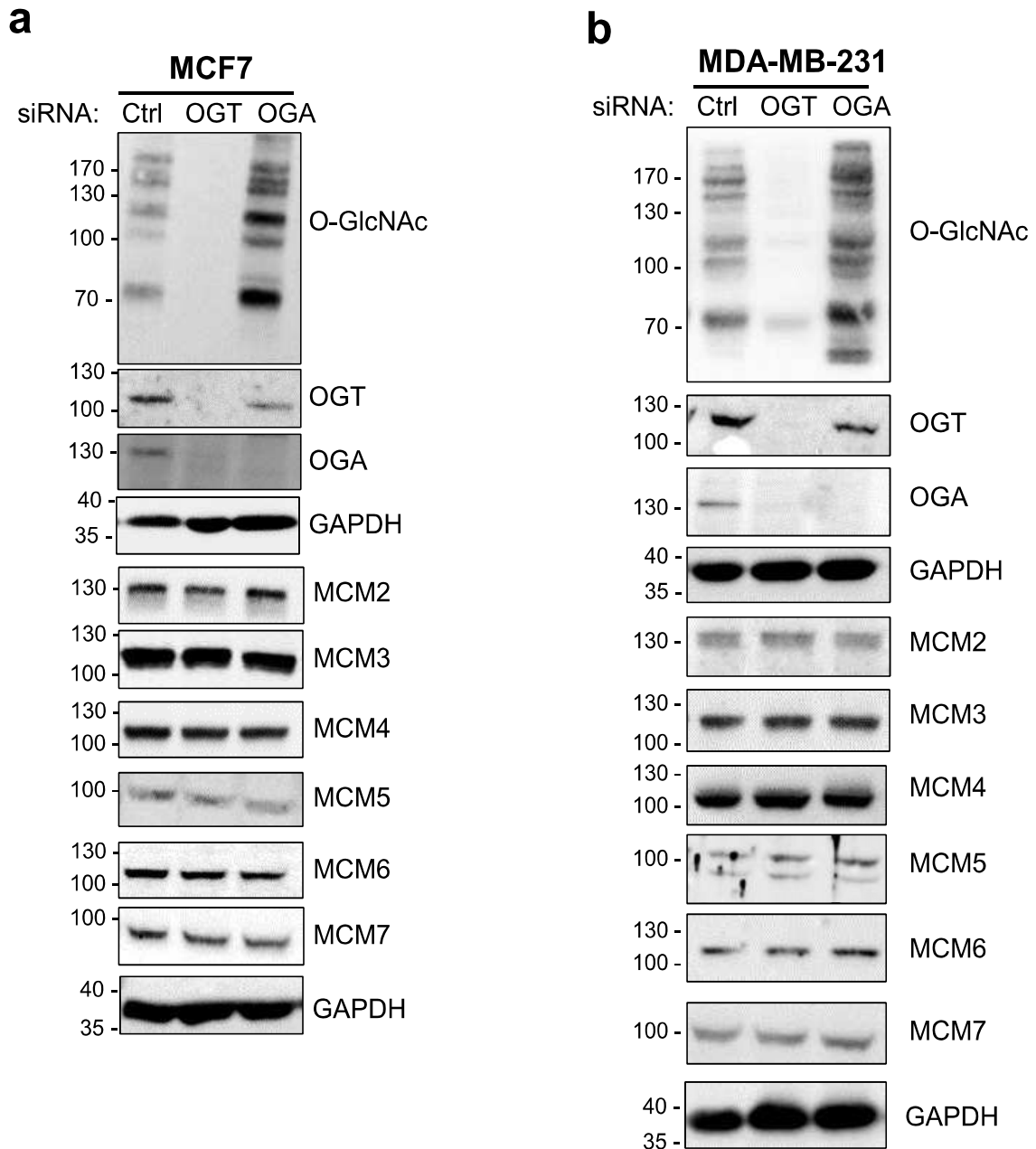
**Figure 48: Etude des interactions OGT-MCM par GST-Pull down**

Les fractions solubles (Sol.) et liées à la chromatine (Chrom.) des cellules MCF7 (a,b) et MDA-MB-231 (c.) ont été incubées avec les billes couplées à la GST ou GST-OGT. Les protéines MCM de la fraction éluées sont détectées par Western-blot avec les anticorps correspondants.

Nous avons effectué un ensemble de mises au point pour parvenir à exprimer et purifier la GST et la GST-FL-OGT en quantité suffisante pour pouvoir effectuer la manipulation de GST-Pull down que je viens de décrire. Ces mises au point ont fait l'objet du stage de BTS de Lucie Hurtevent, que je remercie ici pour son aide et son implication. Cependant, nos conditions ne nous ont pas permis de purifier de façon optimale les protéines recombinantes GST-OGT 1-485 (TPR1-11, Figure 47b, piste 4) et GST-OGT 282-1046 ( $\Delta$ TPR1-6, Figure 47b, piste 5). En effet, après leur production, purification et dépôt sur gel de SDS-PAGE nous détectons un ensemble de bandes contaminantes et une intensité très faible pour l'OGT [ $\Delta$ TPR1-6] (~105 kDa) qui peuvent fausser les résultats de GST-Pull down et les rendre difficilement exploitables. Par manque de temps, je n'ai pas pu améliorer la production et la purification des formes tronquées de l'OGT. Ainsi, malgré les essais de GST-pull down effectués avec ces protéines recombinantes, nous n'avons pas été en mesure de discriminer une zone d'interaction entre l'OGT et les MCM.

## **C/ La dérégulation de la dynamique de O-GlcNAcylation impacte les MCM à différents niveaux**

Il est connu que l'OGT peut moduler l'expression, la stabilité, la localisation subcellulaire ou encore l'activité de ses protéines-cibles (W. D. Cheung et Hart 2008; Z. Ma, Chalkley, et Vosseller 2017; Sodi et al. 2017; Harosh-Davidovich et Khalaila 2018b). Les résultats présentés jusqu'ici seraient plutôt en faveur d'une régulation de la localisation subcellulaire des MCM *via* l'interaction avec l'OGT et/ou la modification des six protéines. Nous avons donc mené un ensemble de manipulations afin d'étudier l'implication de la O-GlcNAcylation dans la régulation des niveaux protéiques, de la localisation et de l'activité du complexe MCM2-7. Pour cela, nous avons fait varier les niveaux de O-GlcNAcylation en utilisant les inhibiteurs



**Figure 49: Etude de l'expression des MCM avec la dérégulation de la dynamique de O-GlcNAcylation**

La fraction protéique totale des MCF7 (a.) et MDA-MB-231 (b.) est analysée par western-blot pour évaluer les niveaux des MCM dans les conditions de siRNA (Ctrl, OGT, OGA). L'efficacité des siRNA est vérifiée par western-blot anti-OGT, -OGA et -O-GlcNAc (RL2) et l'équichargement est contrôlé avec la GAPDH.

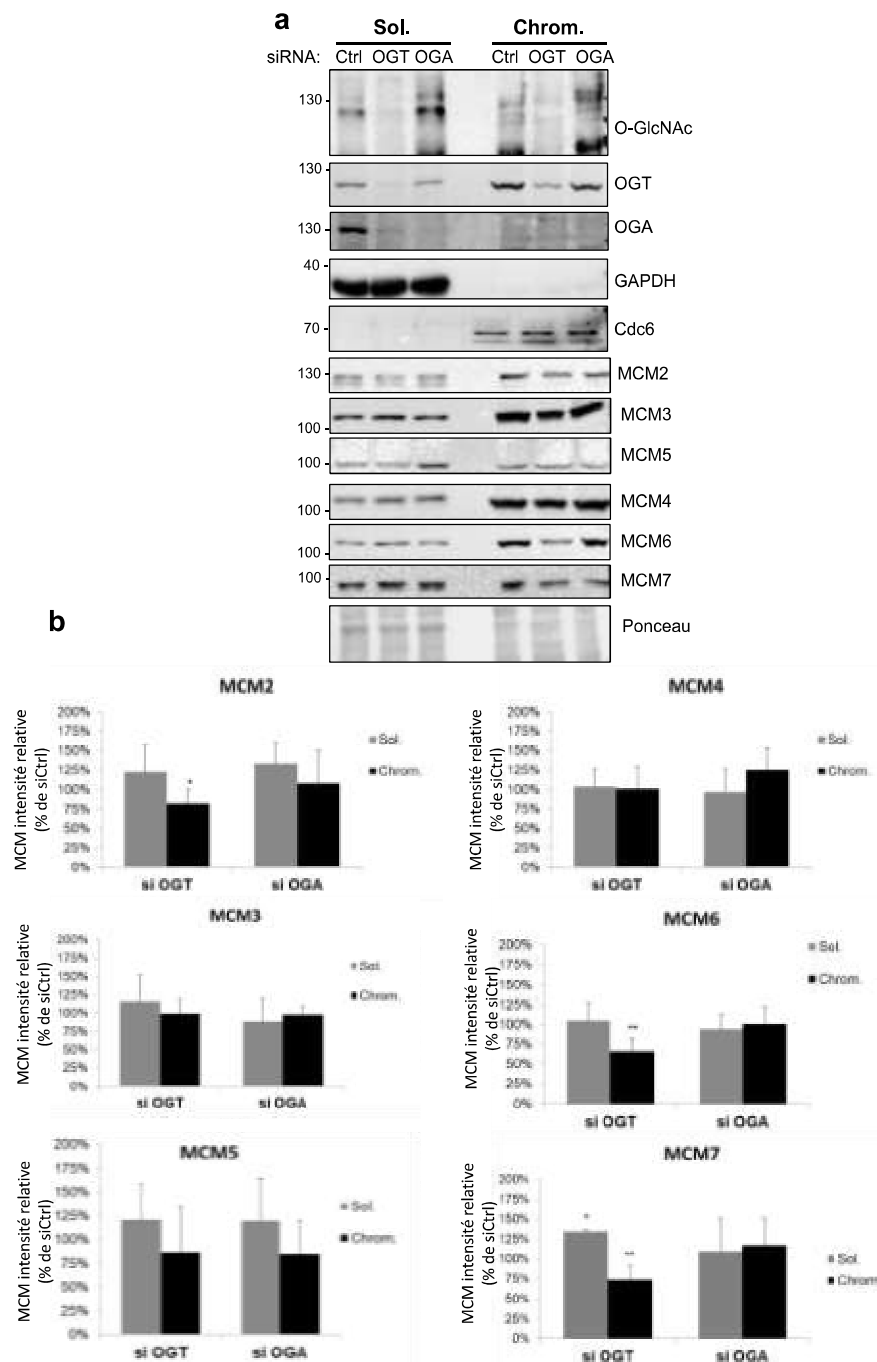
spécifiques de l'OGT (Ac-5S-GlcNAc) ou de l'OGA (Thiamet G) ou encore en diminuant les niveaux d'OGT ou d'OGA par ARN interférence (*small interfering RNA* ou siRNA).

## **I/ Etude de l'expression des protéines MCM**

Nous nous sommes d'abord demandé si la *O*-GlcNAcylation des MCM participait à la régulation de leur expression et /ou de leur stabilité. Pour répondre à cette question, nous avons transfecté des cellules MCF7 et MDA-MB-231 asynchrones avec des siRNA (siOGT, siOGA et siCtrl) et, après lyse cellulaire, nous avons analysé les niveaux protéiques de chaque MCM par Western-blot. L'équichargement est contrôlé avec la GAPDH. L'efficacité de chaque siRNA est vérifiée par western-blot avec les anticorps anti-*O*-GlcNAc, anti-OGT et anti-OGA, montrant une hyper-*O*-GlcNAcylation lorsque l'OGA est réduite, et à l'inverse, une forte baisse de la *O*-GlcNAcylation en présence du siOGT. Il faut noter également que le niveau d'OGA est fortement diminué dans les cellules siOGT et réciproquement, le niveau d'OGT diminue, quoique d'une manière moindre, dans les cellules siOGA (Figure 49). En revanche, nous observons ici que, quelque soient le traitement appliqué (siOGT ou siOGA) et la lignée cellulaire utilisée (MCF7 et MDA-MB-231), les niveaux d'expression des protéines MCM ne sont pas modifiés dans les cellules asynchrones (Figure 49a, b).

Les protéines MCM sont assez stables au cours du cycle et sont faiblement dégradées dans des cellules prolifératives. Chez la levure, leurs niveaux d'expression restent assez stables, alors que leur expression est augmentée pendant la phase G1 des cellules de mammifères *via* l'activité des facteurs de transcription E2F (Tsuruga et al. 1997; Ohtani et al. 1999). Par contre, les cellules quiescentes, différenciées ou sénescents présentent des niveaux très faibles, voire une absence, de protéines MCM (Stoeber et al, 2001).

Bien que nous n'observons pas de différence significative d'expression des MCM dans les cellules asynchrones traitées par ARN interférence (siOGT/siOGA), il serait intéressant de



**Figure 50: Etude de la localisation des MCM avec la dérégulation de la dynamique de O-GlcNAcylation.**

a. Les fractions soluble (Sol.) et chromatinienne (Chrom.) des MCF7 sont analysées par western-blot dans des conditions de siRNA (Ctrl, OGT, OGA). L'efficacité des siRNA est vérifiée par western-blot anti-OGT, -OGT et l'anticorps RL2 et le fractionnement est contrôlé par la GAPDH et Cdc6.

b. L'intensité de chaque bande est quantifiée par le logiciel ImageJ. L'intensité relative de chaque MCM dans les conditions siOGT ou siOGA est normalisée sur la condition siCtrl. Les analyses statistiques sont réalisées par un Test Student (sur au moins 4 expériences indépendantes). \*,  $p < 0.1$  ; \*\*,  $p < 0.05$ .

reproduire cette étude dans des cellules synchronisées en phase G0 et en milieu de G1 afin d'étudier l'induction de la dynamique O-GlcNAc sur l'expression des protéines MCM lors de l'entrée en phase G1 et à la transition G1/S respectivement.

## **II/ Etude de la localisation subcellulaire des MCM**

La régulation de la localisation subcellulaire des MCM est un axe majeur pour le contrôle de l'activité du complexe MCM2-7. En effet, Les protéines MCM s'associent avec la chromatine pendant la phase G1 grâce à leur interaction avec Cdt1 puis quittent les origines de réplication au cours de la phase S et ne se réassocient par avec l'ADN avant le début du cycle suivant, empêchant ainsi une reréplication au cours du même cycle cellulaire (J. Zhang et al. 2010, 1; Nishiyama, Frappier, et Méchali 2011; Changdong Liu et al. 2012; Gillespie, Gambus, et Blow 2012). Des modifications post-traductionnelles des MCM sont également impliquées dans la régulation de leur localisation subcellulaire et notamment la phosphorylation et l'ubiquitination (Junhui Li et al. 2011, 3; Moreno et al. 2014). Dans ce contexte, nous avons cherché à savoir si la O-GlcNAcylation fait partie des MPTs pouvant réguler le chargement et/ou le maintien des MCM à la chromatine.

Pour cette étude nous avons utilisé les fractions protéiques soluble et liée à la chromatine de cellules MCF7 asynchrones transfectées avec les différents siRNA (siCtrl, siOGT et siOGA) que nous avons analysées par Western-blot. Comme précédemment, l'efficacité de chaque traitement est vérifiée par western-blot anti-OGT, OGA et O-GlcNAc (RL2). De plus, différents marqueurs sont utilisés pour vérifier l'efficacité du fractionnement subcellulaire : La GAPDH pour la fraction nucléocytoplasmique soluble et Cdc6 pour la fraction de protéines liées à la chromatine (Figure 50).

Nous observons que la localisation subcellulaire des MCM3, MCM4 et MCM5 n'est pas modifiée par la dérégulation de la O-GlcNAcylation. Cependant, la diminution de l'OGT





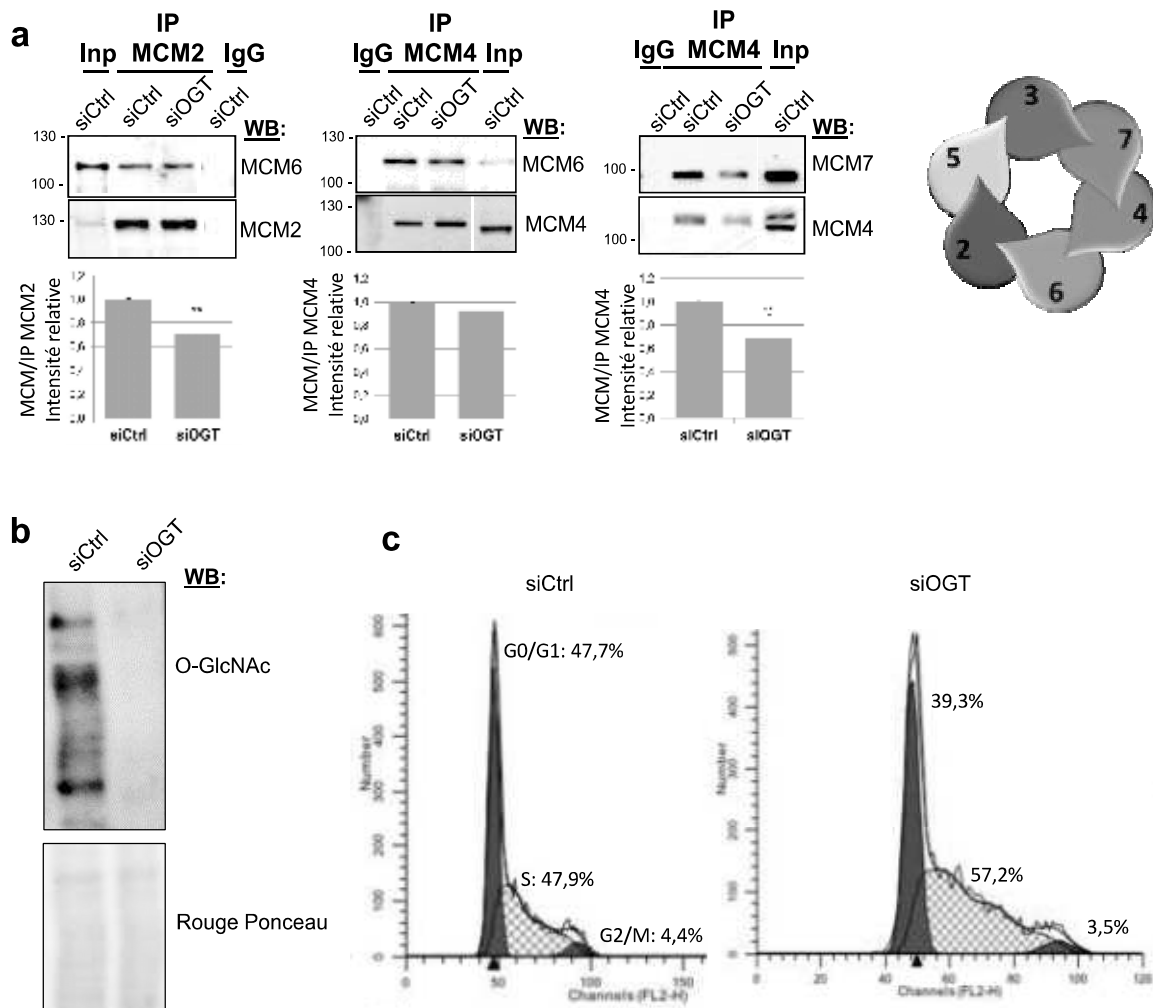
par le siOGT entraîne une diminution significative de MCM6 et MCM7 à la chromatine et aussi, mais plus faiblement, de MCM2. Cette baisse des protéines à la chromatine n'est accompagnée d'une augmentation dans la fraction soluble que pour MCM7 (Figure 50). Ceci suggère que le recrutement et/ou le maintien de cette protéine à la chromatine pourrait être régulé par la O-GlcNAcylation. Toutefois, l'utilisation du siOGA n'a pas d'impact significatif sur la répartition subcellulaire des MCM, ceci indiquant que la présence de l'OGT est importante pour la régulation de la localisation subcellulaire de certaines MCM dans les cellules MCF7. De manière intéressante, nous avons précédemment identifié MCM6 et MCM7 comme étant des partenaires d'interaction de l'OGT. Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggèrent fortement que l'OGT serait impliquée dans la régulation du chargement de ces protéines à la chromatine.

Par la suite, nous avons étudié l'impact de la dérégulation de la dynamique de O-GlcNAcylation sur les interactions MCM-MCM, reflétant la formation du complexe MCM2-7.

### **III/ Etude de l'impact de la dérégulation de la O-GlcNAcylation sur la formation du complexe MCM2-7**

L'activité hélicase du complexe MCM2-7 est fortement dépendante de l'association dans un ordre précis des 6 sous-unités afin de former, à l'interface de deux sous-unités voisines, les sites actifs nécessaires à l'hydrolyse de l'ATP (Bochman et Schwacha 2009). De plus, il est connu que l'OGT peut moduler les interactions protéine-protéine de certaines de ses cibles (Hart et al. 2011). Ainsi, compte-tenu de l'identification de l'interaction de l'OGT avec les MCM3, MCM6 et MCM7, et de la diminution de MCM6 et MCM7 à la chromatine, nous nous sommes demandé si l'OGT intervenait dans la régulation de la formation du complexe MCM2-7, ou des différents sous-complexes (Ishimi 1997; J. K. Lee et Hurwitz 2000).

Comme pour l'étude des interactions OGT-MCM, nous avons utilisé les deux approches de co-IP et de PLA pour étudier les interactions MCM-MCM dans des cellules MCF7 dont la



**Figure 51: L'extinction de l'OGT par siRNA entraîne une déstabilisation des interactions MCM-MCM dans les cellules MCF7 synchronisées en phase S**

Des cellules MCF7 sont transfectées avec les siRNA contrôle et OGT puis synchronisées par privation de sérum.

a. Après une stimulation de 18h les cellules sont lysées pour effectuer des IP MCM2 et MCM4 à partir de la fraction chromatiniene.

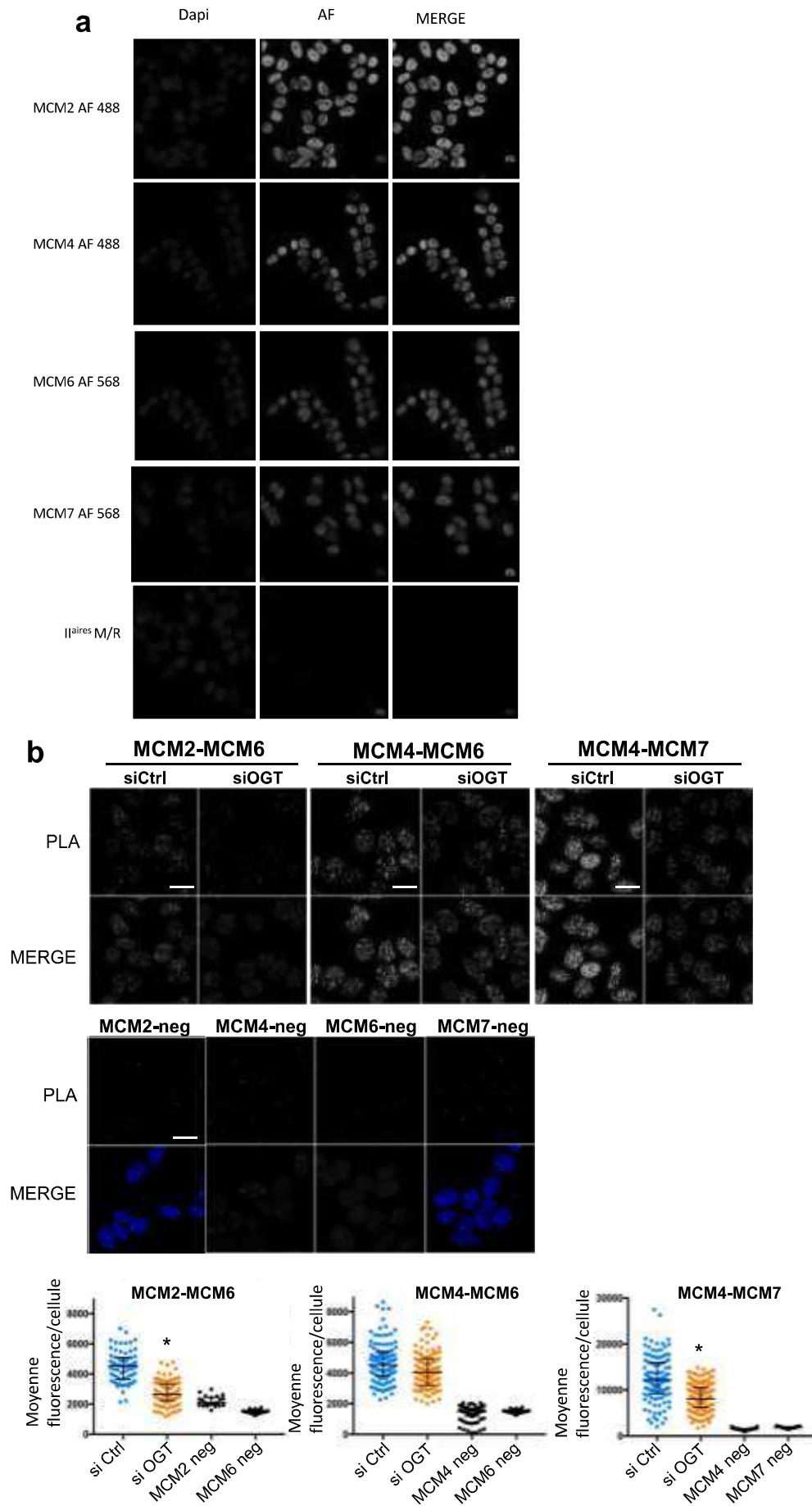
L'intensité relative des bandes de western-blot est mesurée *via* le logiciel ImageJ (3 expériences indépendantes).

b. L'efficacité de l'extinction de l'OGT par siRNA est vérifiée par un Western-blot anti-O-GlcNAc.

c. La répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire est analysée par cytométrie en flux après marquage de l'ADN par l'iodure de propidium.

dynamique de *O*-GlcNAcylation a été perturbée par siRNA ou avec des inhibiteurs spécifiques. Pour cette étude nous avons voulu nous placer dans des conditions où les protéines MCM forment en majorité le complexe hétérohexamérique MCM2-7. Pour cela nous avons utilisé des cellules MCF7 synchronisées par privation de sérum et restimulées pendant 18h pour les avoir en majorité en début de phase S et nous avons effectué les co-IP sur la fraction des protéines liées à la chromatine.

Nous avons commencé par une transfection des cellules MCF7 avec le siOGT ou le siCtrl puis nous avons immunoprécipité les protéines MCM à partir de la fraction chrom. en absence de SDS dans les tampons (de lyse et de lavage). Les protéines partenaires sont ensuite révélées par western-blot. L'efficacité des siRNA est vérifiée par un Western-blot anti-*O*-GlcNAc (Figure 51b) et la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle est analysée par cytométrie en flux après marquage de l'ADN par l'iodure de propidium. Après 18h de remise en sérum, 47.9% et 57.2% de cellules sont en phase S en siCtrl et siOGT respectivement (Figure 51c). Cette augmentation des cellules en phase S dans la condition siOGT après 18h de stimulation est un résultat reproductible dont je discuterais dans le paragraphe traitant de l'impact de la dérégulation de la *O*-GlcNAcylation sur la progression du cycle cellulaire. De manière intéressante, nous observons une diminution d'environ 25% de la détection de MCM6 et MCM7 après immunoprécipitation de MCM2 et MCM4 respectivement en condition siOGT (Figure 51a). Malheureusement, bien que nous ayons réalisé les IP MCM3 et MCM6, nous n'avons pas obtenu de résultats significativement différents entre les deux conditions siCtrl et siOGT pour en tirer des conclusions. Nous avons donc en priorité répété les expériences qui nous donnaient les résultats les plus intéressants, soit les IP MCM2 et MCM4.



**Figure 52: L'extinction de l'OGT par siRNA entraîne une déstabilisation des interactions MCM-MCM dans les cellules MCF7 synchronisées en phase S**

a. Les anticorps anti-MCM2, MCM4, MCM6 et MCM7 sont testés en immunofluorescence sur des cellules MCF7 asynchrones fixées. Un contrôle négatif est réalisé en incubant les cellules uniquement avec les anticorps secondaires couplés aux Alexa Fluor 488 (anti-rabbit) ou 568 (anti-mouse).

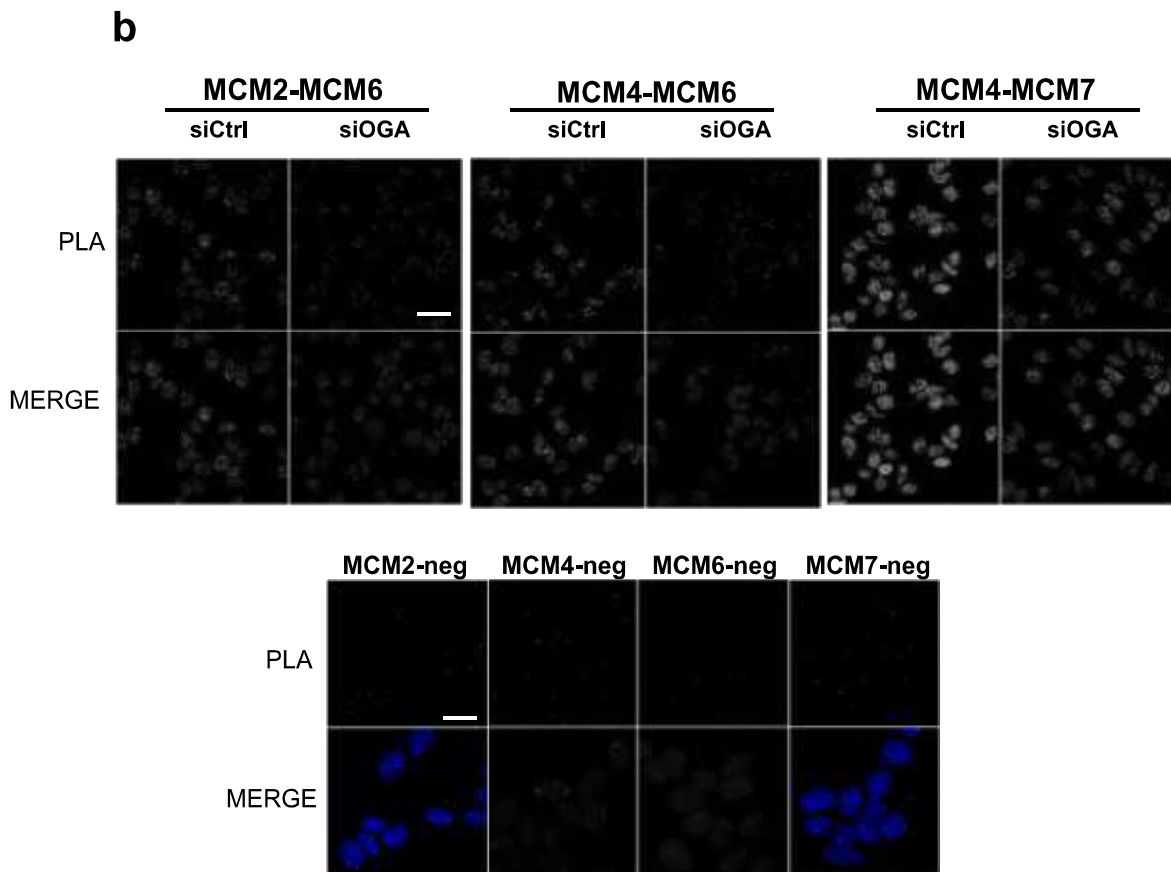
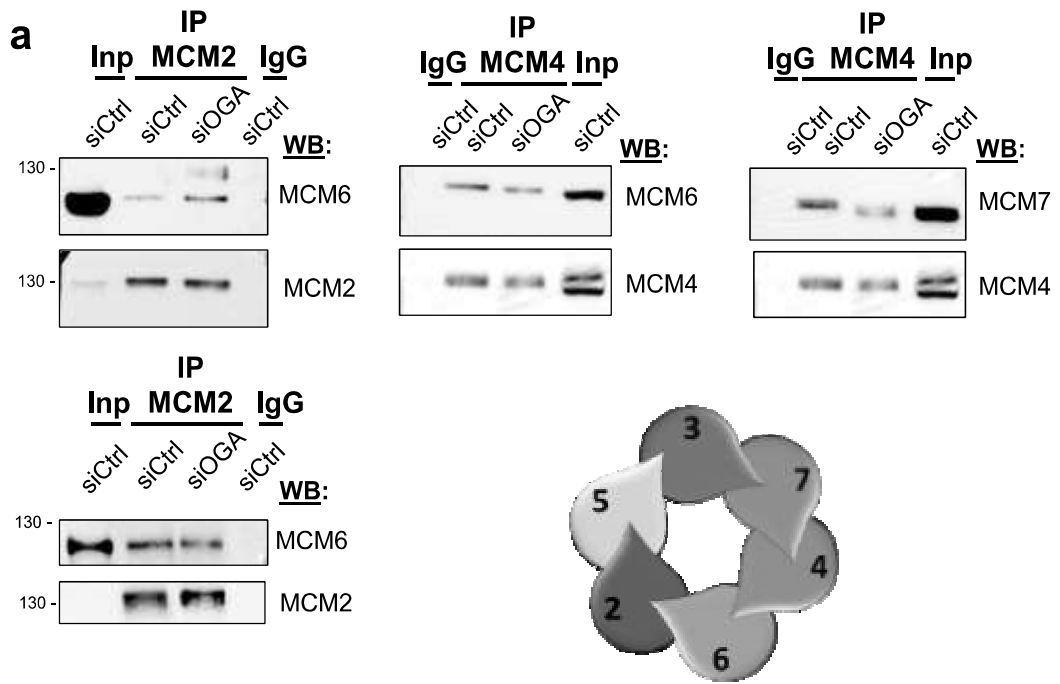
b. Des cellules MCF7 sont transfectées avec les siRNA contrôle et OGT puis synchronisées par privation de sérum. Après une stimulation de 18h les cellules sont incubées avec les anticorps anti-MCM et les différentes sondes de PLA pour la détection des interactions par PLA. Les témoins négatifs sont effectués en incubant les cellules avec un seul des anticorps primaires mais avec les deux sondes de PLA.

La quantification de la PLA est représentée sous forme d'histogrammes où chaque point correspond au signal total de fluorescence dans le noyau de chaque cellule.

Barre d'échelle: 30  $\mu$ m

Nous avons ensuite utilisé l'approche de PLA afin de visualiser les interactions MCM-MCM *in cellulo* à partir de cellules MCF7 synchronisées par sevrage. Nous avons d'abord validé les anticorps anti-MCM en immunofluorescence car il a fallu tester d'autres références, pour avoir des couples d'anticorps souris/lapin pour la PLA (Figure 52a). Puis nous avons démarré la manipulation en nous concentrant sur les interactions précédemment étudiées par co-IP. La quantification de l'intensité des spots PLA fluorescents contenus dans le noyau de chaque cellule est effectuée à l'aide d'une macro dans le logiciel ImageJ écrite par le Dr Corentin Spriet (Plateforme TISBio de l'UGSF). La moyenne et les écart-types ont été calculés et l'analyse statistique est effectuée *via* un test ANOVA entre les différentes conditions.

Ainsi, nous visualisons une baisse significative des signaux MCM2-MCM6 et MCM4-MCM7 en siOGT par rapport à la condition contrôle (Figure 52b), alors que la diminution du signal MCM4-6 en PLA n'est pas significative par rapport au contrôle. Ces résultats confirment donc ceux obtenus par co-IP, soit une diminution significative de MCM6 et MCM7 en condition siOGT après IP MCM2 et MCM4 respectivement (Figure 51a), et reflètent la légère diminution du signal de MCM6 en siOGT après IP MCM4. Ces résultats sont très intéressants dans la



**Figure 53: L'extinction de l'OGA par siRNA entraîne une déstabilisation des interactions MCM-MCM dans les cellules MCF7 synchronisées en phase S.**

Des cellules MCF7 sont transfectées avec les siRNA contrôle et OGA puis synchronisées par privation de sérum.

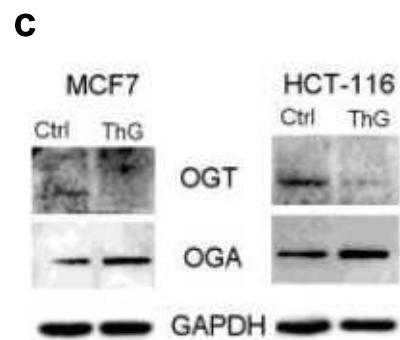
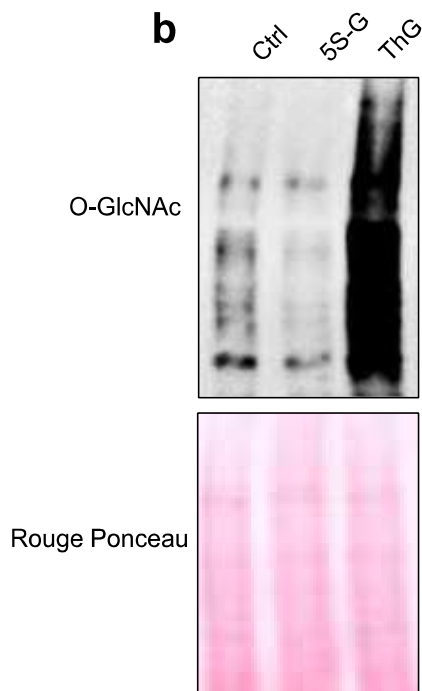
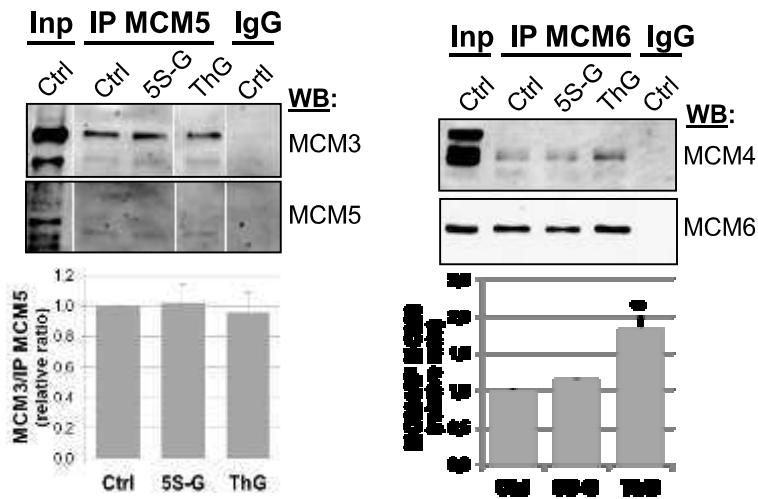
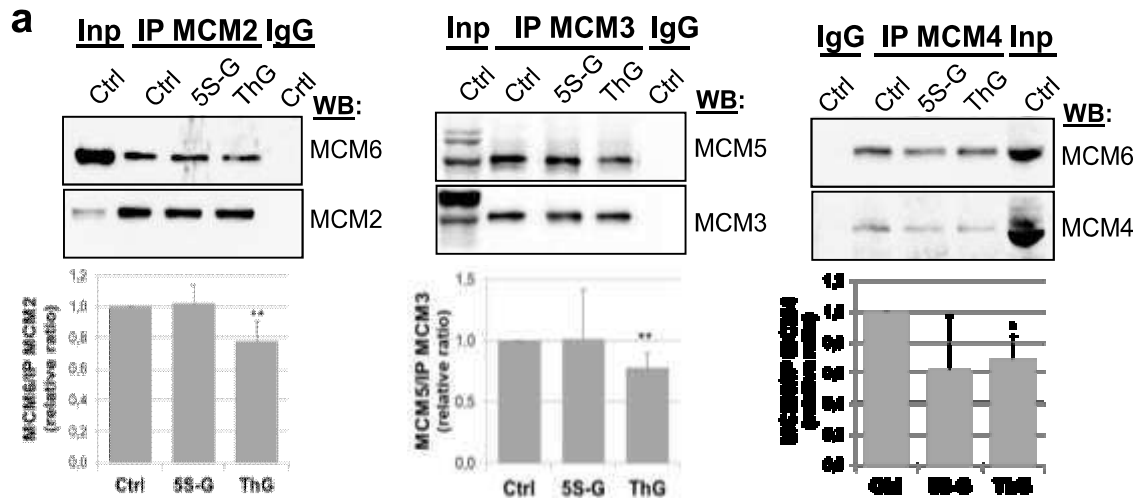
a. Après une stimulation de 18h les cellules sont lysées pour effectuer des IP MCM2 et MCM4 à partir de la fraction chromatiniene.

b. Des cellules MCF7 sont transfectées avec les siRNA contrôle et siOGA puis synchronisées par privation de sérum. Après une stimulation de 18h les cellules sont incubées avec les anticorps anti-MCM et les différentes sondes de PLA pour la détection des interactions par PLA. Les témoins négatifs sont effectués en incubant les cellules avec un seul des anticorps primaires mais avec les deux sondes de PLA.

Barre d'échelle: 30  $\mu$ m

mesure où nous avons identifié MCM6 et MCM7 comme des partenaires d'interaction de l'OGT et que leur localisation à la chromatine diminue avec l'extinction de l'OGT par siRNA. Ainsi l'OGT pourrait jouer un rôle dans le maintien du complexe MCM2-7 sous sa forme hexamérique liée à la chromatine *via* une interaction directe avec les sous-unités MCM6 et MCM7.

En parallèle, nous avons aussi étudié l'effet des siOGA sur les interactions MCM-MCM. Nous pouvons cependant difficilement pu conclure sur nos résultats à cause d'un manque de reproductibilité. Après IP MCM2, nous observons sur deux expériences indépendantes une augmentation et une diminution de MCM6 en siOGA par rapport au contrôle. Nous n'avons pu réaliser qu'une IP MCM4 en condition siOGA pour laquelle nous obtenons une diminution du signal de MCM6 et MCM7 (Figure 53a). Par PLA, nous observons une diminution des signaux MCM2-MCM6, MCM4-MCM6 et MCM4-MCM7 en siOGA par rapport au siCtrl (Résultats obtenus une fois sur deux expériences indépendantes par couple de MCM) (Figure 53b). Ces résultats suggèrent que l'OGA est aussi impliquée dans la régulation de la stabilité des interactions MCM-MCM. De plus, nous observons systématiquement une diminution des





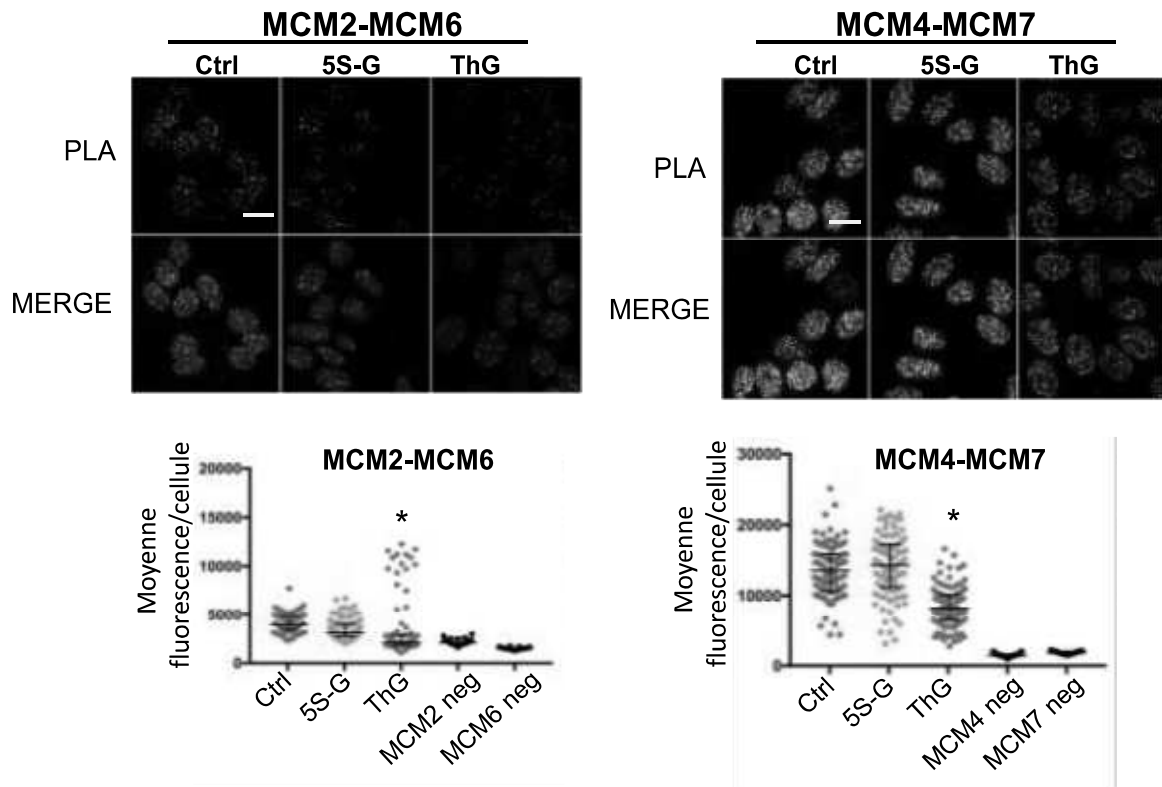
**Figure 54: L'inhibition de l'OGT ne modifie significativement les interactions MCM-MCM.**

Des cellules MCF7 sont synchronisées par privation de sérum et traitées avec les inhibiteurs de la dynamique de O-GlcNAcylation : Thiamet G (ThG) ou Ac-5S-GlcNAc (5S-G) en même temps que la remise en sérum. a. Après une stimulation de 18h les cellules sont lysées pour effectuer les IP MCM à partir de la fraction chromatiniennne des cellules. L'intensité relative des bandes de western-blot est mesurée *via* le logiciel ImageJ. b. L'efficacité des inhibiteurs est vérifiée par un Western-blot anti-O-GlcNAc. c. Des cellules MCF7 et HCT116 asynchrones sont traitées pendant 18h au Thiamet G (1  $\mu$ M) puis leurs niveaux protéiques d'OGT et d'OGA sont analysés par Western-blot.

niveaux d'OGT en condition siOGA (Figure 49) qui est pourrait être responsable de la modulation des interactions MCM-MCM observée ici.

Afin de déterminer si l'altération des interactions MCM2-6 et MCM4-7 observée en présence de siRNA est due à l'absence des enzymes et/ou de leur activité, nous avons reconduit les mêmes approches d'étude des interactions MCM-MCM mais en utilisant cette fois les inhibiteurs Ac-5S-GlcNAc (inhibiteur d'OGT) et Thiamet G (Inhibiteur d'OGA).

De manière surprenante, nous n'observons pas d'effet significatif de l'inhibition de l'OGT sur les interactions MCM2-6, MCM3-5 et MCM6-4 (Figure 54a). Ceci suggère que c'est l'interaction de l'OGT plutôt que son activité qui serait impliquée dans la régulation des interactions MCM-MCM. A l'inverse, l'inhibition de l'OGA par le Thiamet G entraîne des modulations, positives ou négatives selon les couples MCM-MCM considérés. En effet, nous observons une diminution significative de MCM6 après IP MCM2 et MCM4 ainsi qu'une baisse de MCM5 après IP MCM3. De façon surprenante, quand nous effectuons les IP réverses MCM6 et MCM5 nous observons respectivement une augmentation de MCM4 et aucune différence significative de MCM3 avec le Thiamet G par rapport à la condition contrôle. Il faut noter que le traitement au ThG induit une diminution importante du niveau protéique de l'OGT, et une augmentation de celle de l'OGA, et ce, quelle que soit la lignée cellulaire (Chad Slawson et al. 2005) (Figure 54c). Comme ce que nous avons observé en PLA en présence du



**Figure 55: Visualisation des interactions MCM-MCM par PLA après traitements des cellules par les inhibiteurs de la dynamique de O-GlcNAcylation.**

Après une stimulation de 18h en présence de sérum +/- inhibiteur, les cellules sont incubées avec les anticorps anti-MCM et les différentes sondes de PLA pour la détection des interactions par PLA. Les témoins négatifs sont effectués en incubant les cellules avec un seul des anticorps primaires mais avec les deux sondes de PLA.

La quantification de la PLA est représentée sous forme d'histogrammes où chaque point correspond au signal total de fluorescence dans le noyau de chaque cellule.

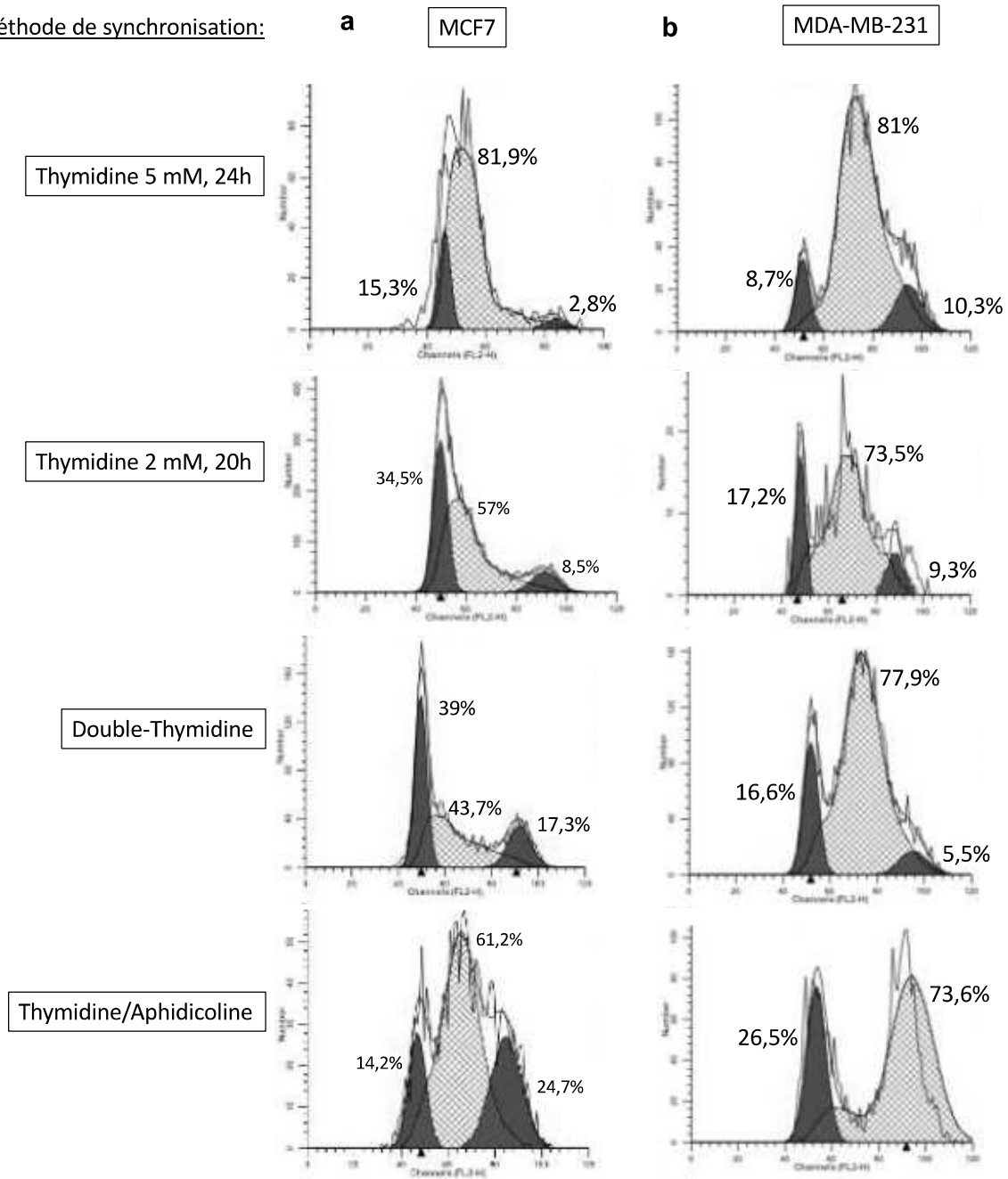
Barre d'échelle: 30  $\mu$ m

siOGA (Figure 53), les perturbations des interactions MCM-MCM induites par le ThG pourraient être dues en partie à la diminution de l'OGT dans les cellules traitées. Par PLA, nous observons une diminution significative du signal MCM2-MCM6 en présence de Thiamet G, et pas de différence avec l'Ac-5S-GlcNAc, confirmant le résultat obtenu par co-IP. Nous détectons les mêmes variations pour le signal MCM4-7 (Figure 55). Dans l'ensemble, ces résultats indiquent que la dynamique de *O*-GlcNAcylation est importante pour le maintien des interactions MCM-MCM et donc pour la stabilité des sites actifs formés à l'interface de deux sous-unités MCM, mais qu'il n'y a pas forcément de réciprocité entre l'hyper-*O*-GlcNAcylation induite par siOGA ou le ThG, et l'hypo-*O*-GlcNAcylation induite par siOGT ou l'Ac-5-SG.

#### **IV/ Etude de l'impact des variations de *O*-GlcNAcylation sur la synthèse d'ADN**

Nous venons de voir que l'OGT est impliqué dans la régulation de certaines interactions MCM-MCM, ceci pouvant avoir des répercussions sur l'activité hélicase du complexe MCM2-7. En effet, comme détaillé dans l'introduction, cette activité est fortement dépendante de l'association des 6 sous-unités MCM afin de former les sites actifs nécessaires à l'hydrolyse de l'ATP (Bochman et Schwacha 2009). Pour étudier l'effet de la dérégulation de la dynamique de *O*-GlcNAcylation sur l'activité hélicase du complexe, nous avons utilisé une approche indirecte consistant à mesurer le taux de synthèse d'ADN pendant un temps précis et dans différentes conditions. En effet, la réplication de l'ADN est fortement dépendante de l'activité hélicase du complexe MCM2-7 au sein du CMG (Chong et al, 1996 ; Schwacha et al, 2001 ; Brewster et al, 2008). Ainsi, notre hypothèse est que des défauts dans l'activité hélicase du complexe MCM2-7 induits par des dérégulations de la *O*-GlcNAcylation devraient avoir des répercussions sur l'efficacité de la synthèse de l'ADN. L'approche utilisée ici est la technique

Méthode de synchronisation:



**Figure 56: Test de synchronisation en phase S par différentes méthodes chimiques.**

Les cellules MCF7 (a) et MDA-MB-231 (b) sont synchronisées en phase S par un excès de thymidine (5 mM 24h ou 2 mM 20h) ou par un double blocage (Thymidine ou thymidine + aphidicoline). Après chaque synchronisation, le pourcentage de cellules dans chaque phase du cycle cellulaire est déterminé par une analyse par cytométrie de flux après marquage de l'ADN à l'iodure de propidium.

de Click-EdU permettant de marquer l'ADN en cours de synthèse *via* l'incorporation de l'EdU, un analogue de l'uridine portant un groupement alcyne, qui peut être pris en charge par les ADN polymérase.

## 1°) Tests de différentes méthodes de synchronisation

Avant de mener cette étude, nous avons testé différentes méthodes de synchronisation chimique afin de maximiser la quantité de cellules entrant en phase de réplication au moment de l'incubation avec l'EdU. En effet, la synchronisation par privation de sérum ne nous apporte qu'un maximum de 40% de cellules en phase S après 15h de stimulation alors que des méthodes chimiques pourraient nous permettre de doubler ce pourcentage (Ma et Poon, 2011).

Nous avons donc testé le blocage en phase S par un excès de thymidine, seule ou en association avec l'aphidicoline (Knehh M., 1995) sur des cellules MCF7. L'excès de thymidine inhibe la synthèse de l'ADN en bloquant le métabolisme des désoxynucléotides et synchronise les cellules en début de phase S et l'aphidicoline est un inhibiteur des ADN polymérase (Ma et Poon, 2011) (voir introduction). La répartition dans les phases du cycle cellulaire a été ensuite analysée par cytométrie en flux et comparée entre chaque méthode de synchronisation utilisée (Figure 56a).

Les différentes méthodes de synchronisation sont :

- **Simple blocage par un excès de thymidine** (2 mM pendant 24h ou 5 mM pendant 20h)
- **Double blocage à la thymidine.** (2 mM Thy pendant 24h, 12h sans Thy; 2 mM Thy pendant 14h) (Bostock et al, 1971).
- **Double blocage Thymidine/Aphidicoline** : Cette méthode repose sur le même principe que la précédente avec le remplacement de la thymidine par l'aphidicoline à 5 µg/mL dans le milieu de culture du deuxième blocage.



L'analyse par cytométrie en flux des MCF7 synchronisées par ces différentes méthodes nous indique que la méthode donnant le meilleur taux de cellules en phase S est celle utilisant un simple blocage par la thymidine à une concentration de 5 mM pendant 24h, suivie de deux lavages PBS et d'une incubation de 4h en milieu normal (DMEM + 10% de SVF). Par cette approche nous obtenons jusqu'à 80% de cellules en phase S (Figure 56a).

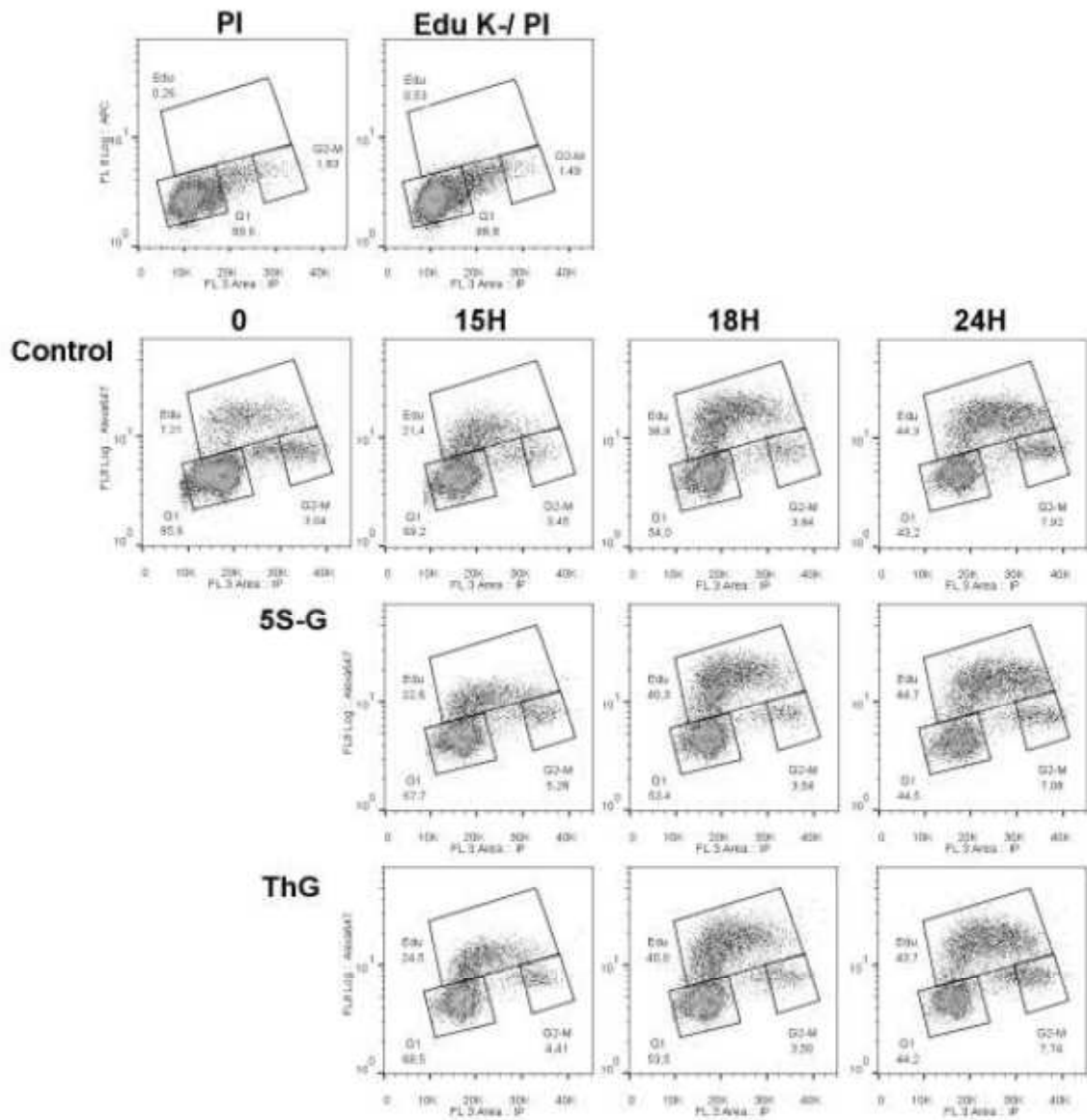
Les mêmes essais ont été réalisés sur les cellules MDA-MB-231 pour lesquelles nous arrivons à la même conclusion, c'est-à-dire que la meilleure méthode de synchronisation en phase S pour ces cellules est le simple blocage par la thymidine à 5 mM pendant 24h, suivie de 4h en milieu sans thymidine, pour laquelle 81% des cellules sont en phase S (Figure 56b). Dans le cas des cellules MDA-MB-231, la synchronisation par double blocage thymidine/aphidicoline nous donne un résultat aberrant puisque dans ces conditions, le logiciel d'analyse (ModFit) ne parvient pas à distinguer la phase S de G2/M et considère qu'aucune cellule ne se situe dans ces dernières phases.

Nous avons donc fait des essais d'analyse de la synthèse d'ADN par l'approche de click-EdU dans les cellules MCF7 synchronisées par un excès de thymidine (5 mM) comme décrit plus haut. Malheureusement, l'utilisation de la thymidine est incompatible avec l'incorporation de l'EdU dans l'ADN des cellules. En effet, l'excès de thymidine entre en compétition avec l'EdU et ce, malgré de nombreux lavages au PBS du tapis cellulaire après le retrait de la thymidine et avant l'ajout de l'EdU dans le milieu de culture. Nous avons donc conservé la synchronisation par privation de sérum pour le reste de cette partie.

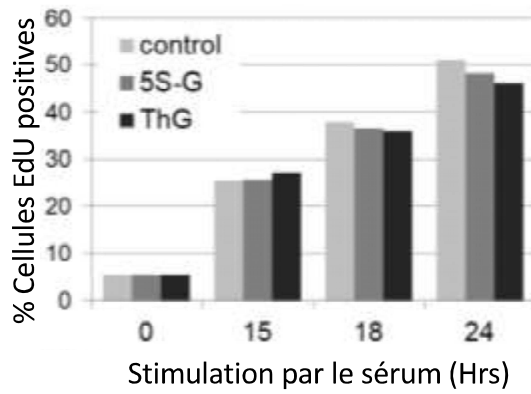
## **2°) Analyse de la synthèse d'ADN sur des cellules synchronisées par sevrage**

Nous avons synchronisé des cellules MCF7 par privation de sérum suivie d'une stimulation pendant différents temps et nous avons en parallèle dérégulé la dynamique de O-GlcNAcylation par différentes méthodes : l'utilisation de siRNA (siOGT et siOGA) ou

**a**



**b**





**Figure 57: L'inhibition des enzymes de la O-GlcNAc n'affecte pas la synthèse de l'ADN des cellules MCF7**

Les cellules MCF7 synchronisées par privation de sérum sont incubées avec les inhibiteurs de l'OGT (5S-G ; 50  $\mu$ M) ou de l'OGA (ThG ; 1  $\mu$ M) puis stimulées pendant différents temps. Les cellules sont incubées avec l'EdU (10  $\mu$ M) 15 min avant la récolte puis l'ADN est marqué par AF647-azido et P.I.

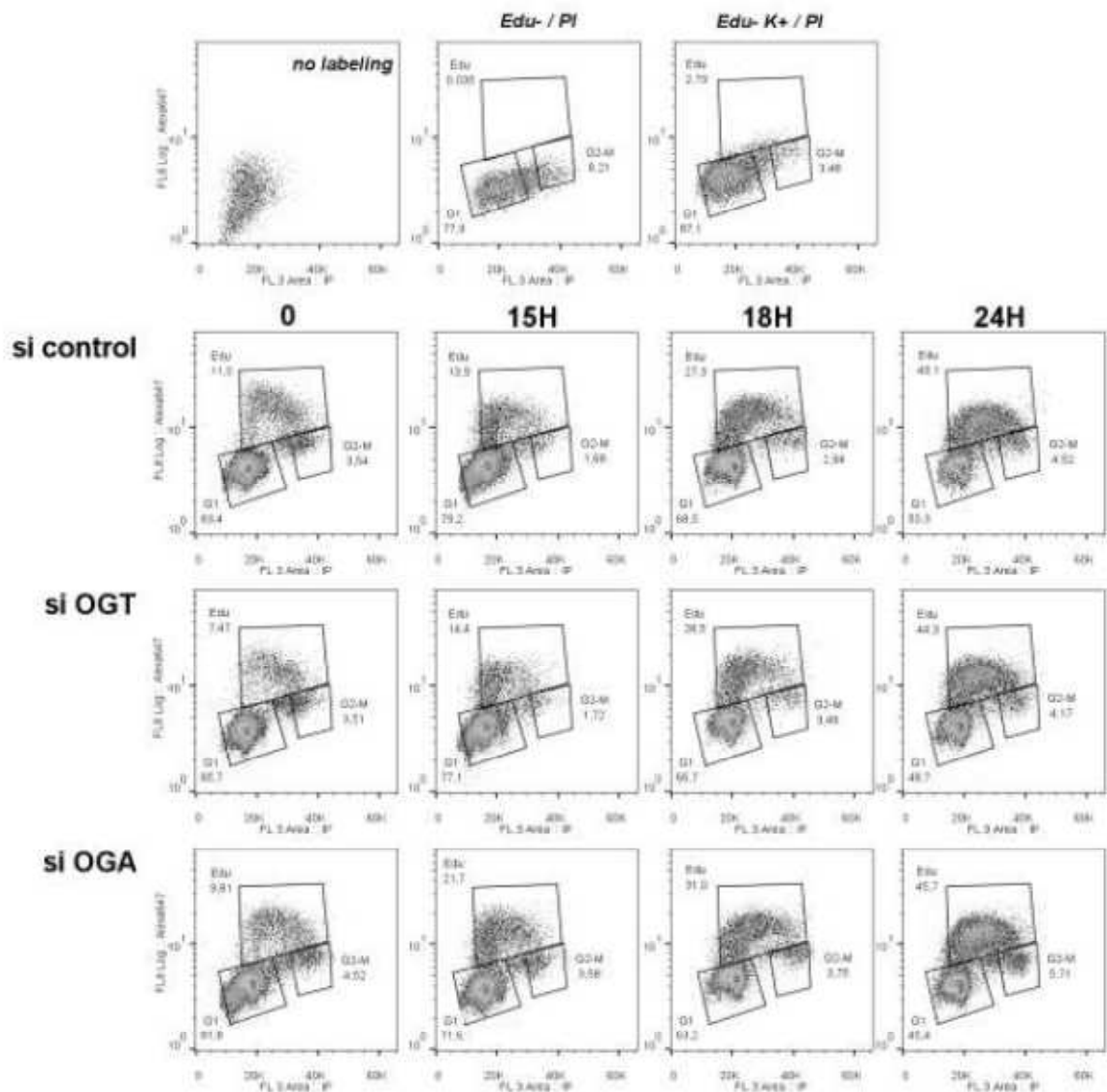
a. Les signaux sont détectés par cytométrie en flux et les résultats sont représentés sous forme de graphes du signal AF647 en fonction du signal P.I. Des contrôles négatifs sont effectués avec le P.I. seul (PI) et en présence d'AF647 + P.I. sans l'incubation préalable avec l'EdU (EdU K-/PI)

b. Le pourcentage de cellules EdU + sont représentés sous forme d'histogramme (deux expériences indépendantes réalisées pour chaque condition Edu-Click It).

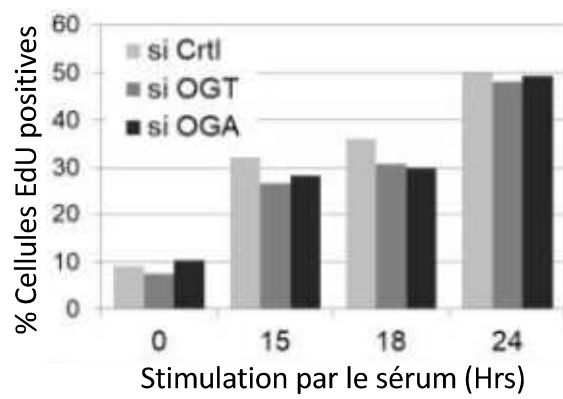
l'utilisation d'inhibiteurs de l'OGT (Ac-5S-GlcNAc) et de l'OGA (Thiamet G). Les cellules sont incubées avec l'EdU (10  $\mu$ M) 15 minutes avant la récolte, la réaction de chimie-click est ensuite réalisée pour lier covalamment la sonde fluorescente (AF647-azido) à l'EdU incorporé dans l'ADN naissant, puis tout l'ADN est marqué à l'iodure de propidium (P.I.). Les deux signaux fluorescents sont ensuite détectés et quantifiés par cytométrie en flux, le P.I. nous permettant de vérifier la synchronisation dans le cycle cellulaire. Pour chaque condition, le pourcentage de cellules EdU positives qui reflète une synthèse active de l'ADN est déterminé par cytométrie en flux. De plus, en parallèle nous avons effectué un comptage cellulaire (un comptage par jour pendant 5 jours) dans les mêmes conditions de dérégulation de la O-GlcNAc que pour l'approche de click-EdU.

Ainsi nous suivons 3 paramètres pour chaque condition : la croissance cellulaire réalisée par comptage, la progression du cycle (marquage P.I. seul) et la synthèse de l'ADN (Edu-Click-It+P.I.). Nous observons que, dans les cellules MCF7 synchronisées, la synthèse de l'ADN n'est pas perturbée car les niveaux de cellules EdU positives ne varient pas de manière significative et ce, quelque-soit la condition considérée (siOGT/siOGA *versus* siCtrl, ou 5S-G/ThG *versus* Control) (figures 57 et 58).

**a**



**b**



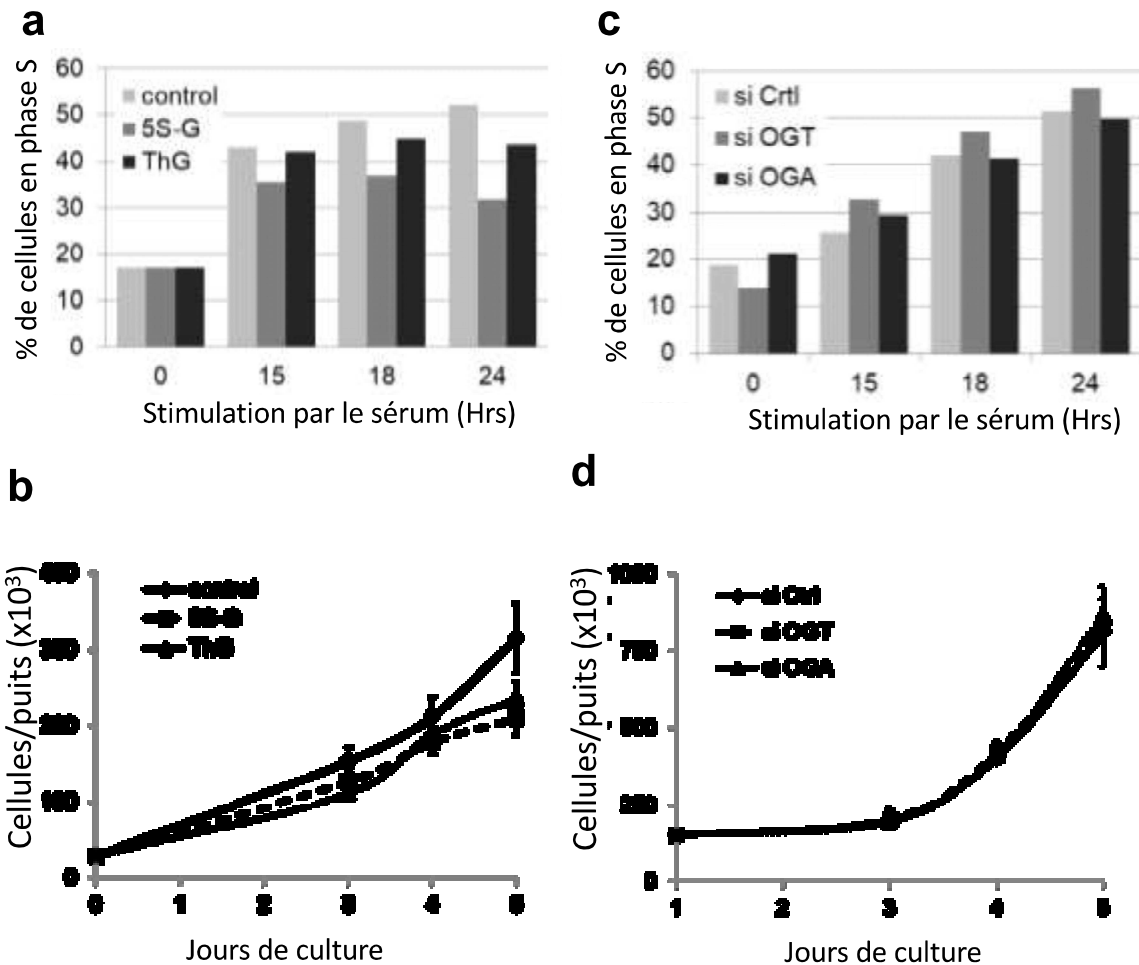
### **Figure 58: Les siOGT et siOGA n'affectent pas la synthèse de l'ADN des cellules MCF7**

Les cellules MCF7 transfectées avec les siRNA (Ctrl, OGT, OGA) sont synchronisées par privation de sérum puis stimulées pendant différents temps. Les cellules sont incubées avec l'EdU (10  $\mu$ M) 15 min avant la récolte puis l'ADN est marqué par AF647-azido et P.I.

a. Les signaux sont détectés par cytométrie en flux et les résultats sont représentés sous forme de graphes du signal AF647 en fonction du signal P.I. Des contrôles négatifs sont effectués avec le P.I. seul (PI) et en présence d'AF647 + P.I. sans l'incubation préalable avec l'EdU (EdU K-/PI)

b. Le pourcentage de cellules EdU + sont représentés sous forme d'histogramme (deux expériences indépendantes réalisées pour chaque condition Edu-Click It).

Toutefois, la progression de la phase S semble ralentie dans les cellules MCF7 traitées avec l'inhibiteur de l'OGT, Ac-5S-GlcNAc (5S-G, Figure 59a). En effet, nous observons une diminution de la quantité de cellules MCF7 en phase S à partir de 15h de stimulation avec l'inhibition de l'OGT : Nous obtenons de 35.6% (à 15h) à 32% (à 24h) de cellules en phase S avec le 5S-G, contre 43% et 52% dans la condition contrôle incubée avec du DMSO. Ceci corrèle avec une diminution significative de la croissance cellulaire en présence d'Ac-5S-GlcNAc, diminution d'environ 30% par rapport à la condition contrôle au bout de 5 jours de culture (Figure 59b) (cet effet inhibiteur sur la croissance cellulaire étant beaucoup plus marqué avec 100  $\mu$ M de 5S-G). L'inhibition de l'OGA par le Thiamet G (ThG) diminue elle aussi la quantité de cellules en phase S mais de façon plus mesurée qu'avec l'inhibition de l'OGT, sans pour autant moduler significativement le taux de synthèse d'ADN (Figure 59a). Cependant, cette condition entraîne une diminution de croissance similaire à la condition Ac-5S-GlcNAc (d'environ 25% par rapport au contrôle après 5 jours de culture) (figure 59 b). De manière surprenante, les traitements par siOGA ne modifient pas de manière significative les trois paramètres observés ici dans les cellules MCF7 par rapport au siControl (Figures 58, 59c, d).

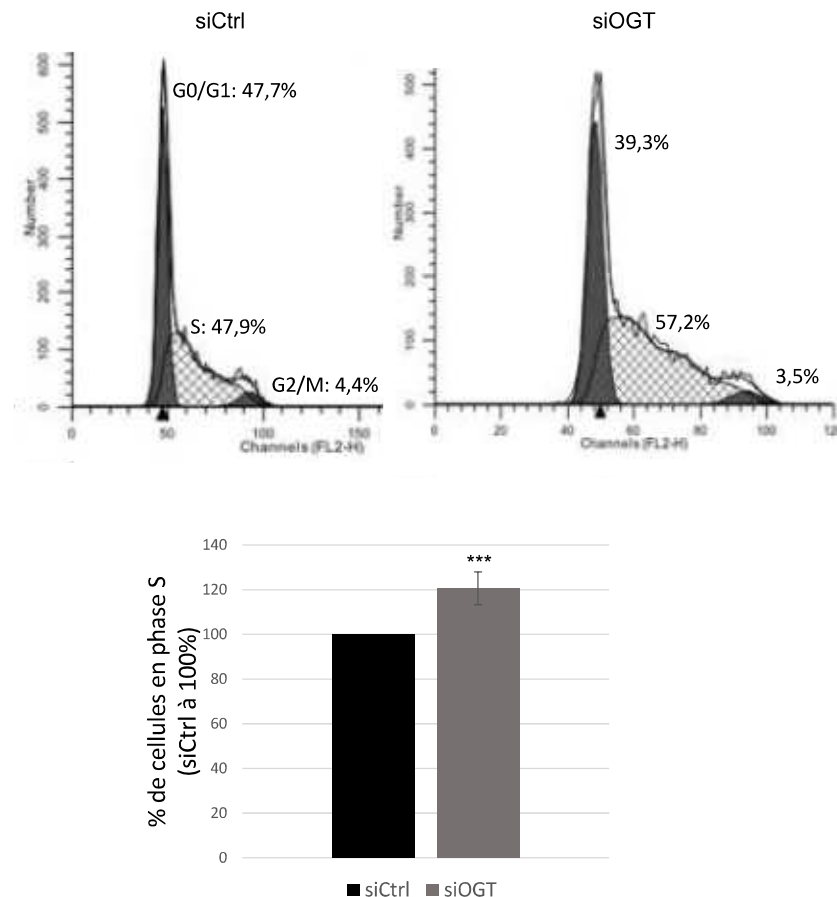


**Figure 59: Effet de la dérégulation de la dynamique O-GlcNAc sur la croissance des cellules MCF7**

Les cellules MCF7 sont synchronisées par privation de sérum et traitées avec les inhibiteurs une nuit avant la récolte (50  $\mu$ M 5S-G, 1  $\mu$ M ThG). La quantité de cellules en phase S est analysée par cytométrie en flux après marquage de l'ADN avec l'iodure de propidium seul (a) 24h après l'ensemencement, les cellules sont incubées avec les différents inhibiteurs ou le contrôle DMSO puis comptées chaque jour pendant 5 jours (b). Le milieu est remplacé tous les deux jours avec les inhibiteurs. (Statistiques sur 3 expériences)

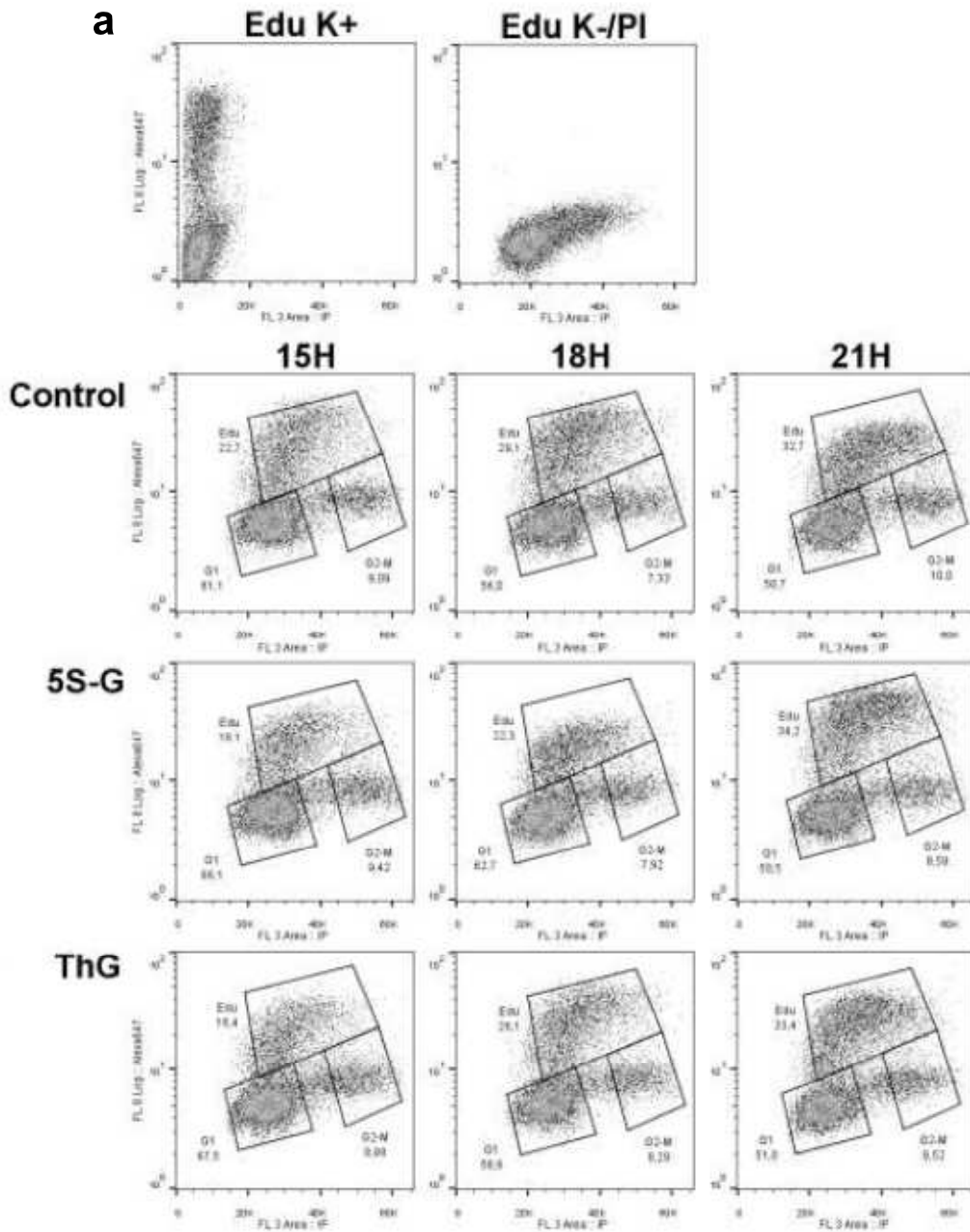
Les cellules MCF7 sont transfectées avec les siRNA contrôle, OGT ou OGA puis synchronisées par sevrage. La quantité de cellules en phase S est évaluée par cytométrie en flux après marquage par l'iodure de propidium. (c) Les cellules MCF7 sont transfectées avec les siRNA Contrôle, OGT ou OGA puis comptées tous les jours pendant 5 jours (d). Le milieu de culture est changé tous les deux jours avec les siRNA

Toutefois, nous remarquons une légère augmentation de la quantité de cellules en phase S dans la condition siOGT par rapport au siCtrl entre 15 et 24h de stimulation par le sérum. Nous avons déjà remarqué une telle augmentation lors de nos contrôles de répartition des cellules dans le cycle cellulaire au cours de l'étude des interactions MCM-MCM (voir plus haut). Nous avons donc reproduit la manipulation, soit une transfection des cellules MCF7 avec siOGT ou siCtrl, une synchronisation par sevrage et une restimulation pendant 18h, afin de pouvoir effectuer une étude statistique par le test de Student. Après analyse des cellules par cytométrie en flux nous observons une augmentation moyenne de 20% des cellules en phase S en siOGT (*versus* siCtrl) à 18h (figure 60).

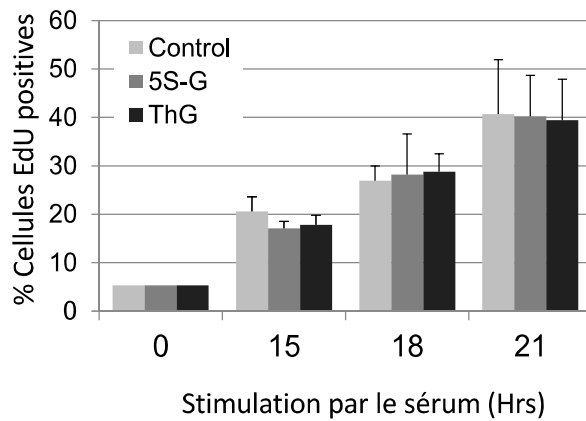


**Figure 60: Le siOGT augmente la quantité de cellules MCF7 en phase S à 18h**

Les cellules MCF7 sont transfectées avec les siRNA contrôle ou OGT puis synchronisées par sevrage. La quantité de cellules en phase S est évaluée par cytométrie en flux après marquage par l'iodure de propidium. (Statistiques effectuées sur 6 expériences indépendantes)



**b**



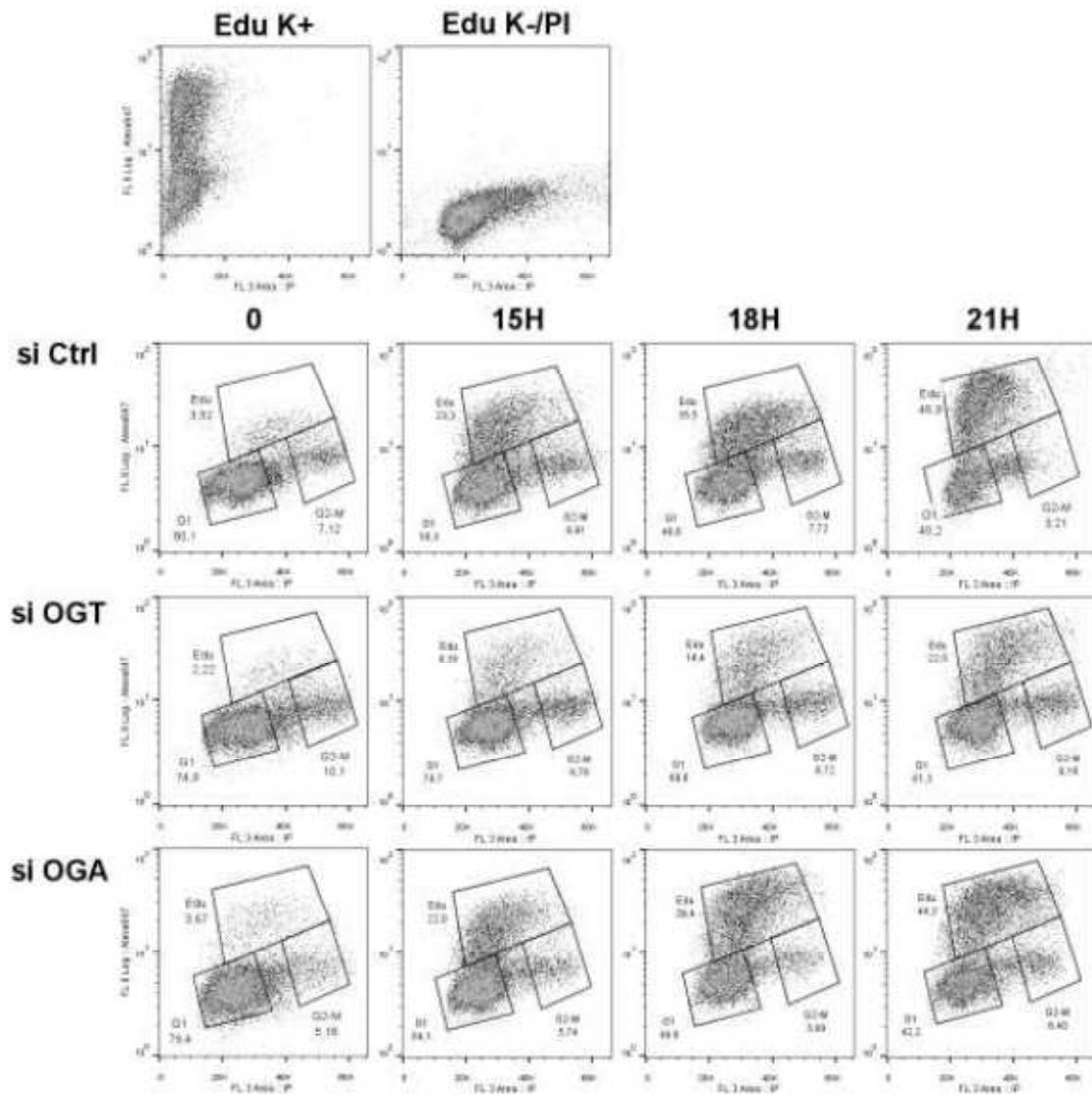
**Figure 61: L'inhibition des enzymes de la *O*-GlcNAc n'affecte pas la synthèse de l'ADN des cellules MDA-MB-231**

Les cellules MDA-MB-231 synchronisées par privation de sérum sont incubées avec les inhibiteurs de l'OGT (5S-G ; 50  $\mu$ M) ou de l'OGA (ThG ; 1  $\mu$ M) puis stimulées pendant différents temps. Les cellules sont incubées avec l'EdU (10  $\mu$ M) 15 min avant la récolte puis l'ADN est marqué par AF647-azido et P.I.

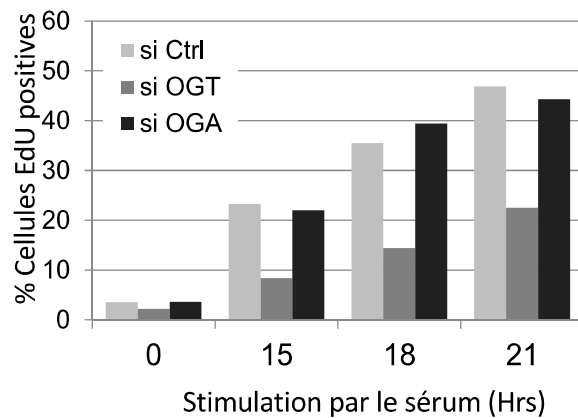
- a. Les signaux sont détectés par cytométrie en flux et les résultats sont représentés sous forme de graphes du signal AF647 en fonction du signal P.I. Des contrôles négatifs sont effectués en présence d'AF647 avec (EdU K+) ou sans l'incubation préalable avec l'EdU (EdU K-/PI)
- b. Le pourcentage de cellules EdU + sont représentés sous forme d'histogramme (deux expériences indépendantes réalisées pour chaque condition Edu-Click It).

Nous avons ensuite effectué les mêmes manipulations sur les cellules MDA-MB-231 afin de comparer nos résultats entre différents types cancéreux (hormono-dépendant pour MCF7 et hormono-indépendant pour MDA-MB-231). Comme pour les MCF7, l'utilisation des inhibiteurs ne modifie pas significativement le taux de synthèse de l'ADN (Figure 61). Cependant l'inhibition de l'OGT entraîne une diminution de la quantité de cellules en phase S et de la croissance des cellules (Figure 63).

**a**



**b**





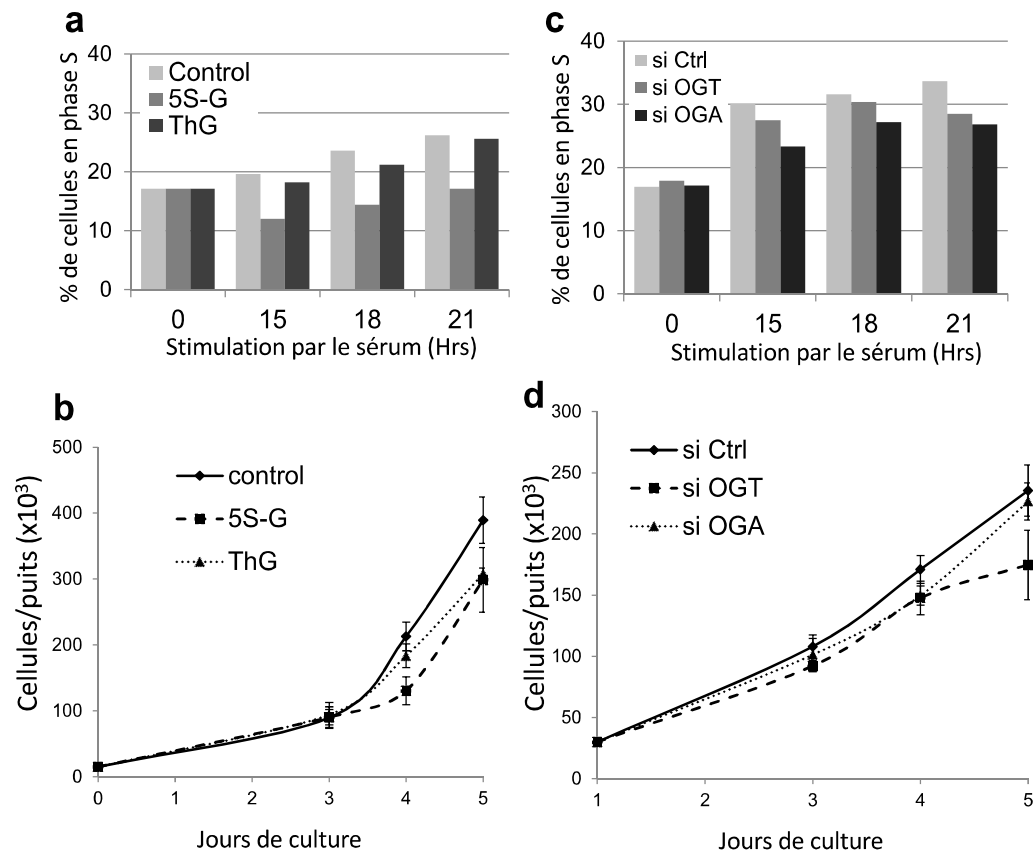
### **Figure 62: Les siOGT affectent la synthèse de l'ADN des cellules MDA-MB-231**

Les cellules MCF7 transfectées avec les siRNA (Ctrl, OGT, OGA) sont synchronisées par privation de sérum puis stimulées pendant différents temps. Les cellules sont incubées avec l'EdU (10  $\mu$ M) 15 min avant la récolte puis l'ADN est marqué par AF647-azido et P.I.

a. Les signaux sont détectés par cytométrie en flux et les résultats sont représentés sous forme de graphes du signal AF647 en fonction du signal P.I. Des contrôles négatifs sont effectués avec le P.I. seul (PI) et en présence d'AF647 + P.I. sans l'incubation préalable avec l'EdU (EdU K-/PI)

b. Le pourcentage de cellules EdU + sont représentés sous forme d'histogramme (deux expériences indépendantes réalisées pour chaque condition Edu-Click It).

De manière très intéressante, et contrairement aux cellules MCF7, l'extinction de l'expression de l'OGT par siOGT entraîne une diminution significative du taux de synthèse d'ADN par rapport à la condition contrôle (diminution de 15%, à 15h à 25%, à 24h) (Figure 62). Ceci est accompagné d'une légère diminution de la quantité de cellules en phase S (Figure 63c), à l'inverse des cellules MCF7, et d'une diminution de la prolifération cellulaire (Figure 63d). Nos résultats indiquent que l'OGT est particulièrement importante pour la régulation de la synthèse d'ADN dans les cellules MDA-MB-231, qui par ailleurs sont plus sensibles à l'absence d'OGT que les cellules MCF7. Ceci est en accord avec les travaux de Caldwell et collaborateurs qui ont montré que l'extinction de l'OGT affecte la prolifération des cellules à caractère cancéreux agressif (Caldwell et al. 2010). Cette approche ne nous permet pas de déterminer si la diminution du taux de synthèse d'ADN est due à une inhibition de l'activité hélicase du complexe. Une étude plus directe de l'activité hélicase, que je discuterais dans la section « Perspectives », sera nécessaire pour relier les résultats de l'approche click-EdU à la régulation de l'activité du complexe MCM2-7 (X. Wang et al. 2014).

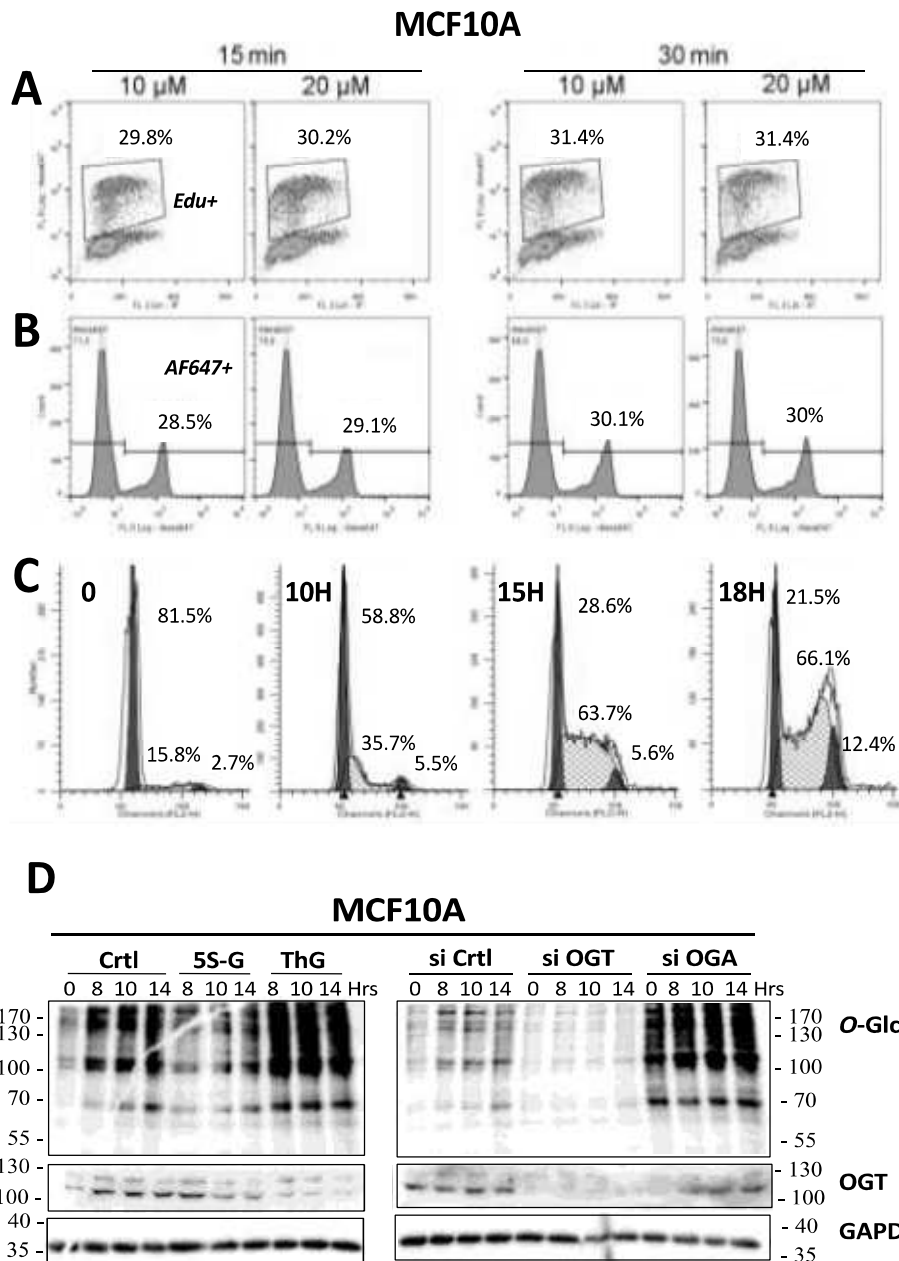


**Figure 63: Effet de la dérégulation de la dynamique O-GlcNAc sur la croissance des cellules MDA-MB-231**

Les cellules MDA-MB-231 sont synchronisées par privation de sérum et traitées avec les inhibiteurs une nuit avant la récolte (50  $\mu$ M 5S-G, 1  $\mu$ M ThG). La quantité de cellules en phase S est analysée par cytométrie en flux après marquage de l'ADN avec l'iodure de propidium seul (**a**) 24h après l'ensemencement, les cellules sont incubées avec les différents inhibiteurs ou le contrôle DMSO puis comptées chaque jour pendant 5 jours (**b**). Le milieu est remplacé tous les deux jours avec les inhibiteurs. (Statistiques sur 3 expériences)

Les cellules MDA-MB-231 sont transfectées avec les siRNA contrôle, OGT ou OGA puis synchronisées par sevrage. La quantité de cellules en phase S est évaluée par cytométrie en flux après marquage par l'iodure de propidium. (**c**) Les cellules MCF7 sont transfectées avec les siRNA Contrôle, OGT ou OGA puis comptées tous les jours pendant 5 jours (**d**). Le milieu de culture est changé tous les deux jours avec les siRNA

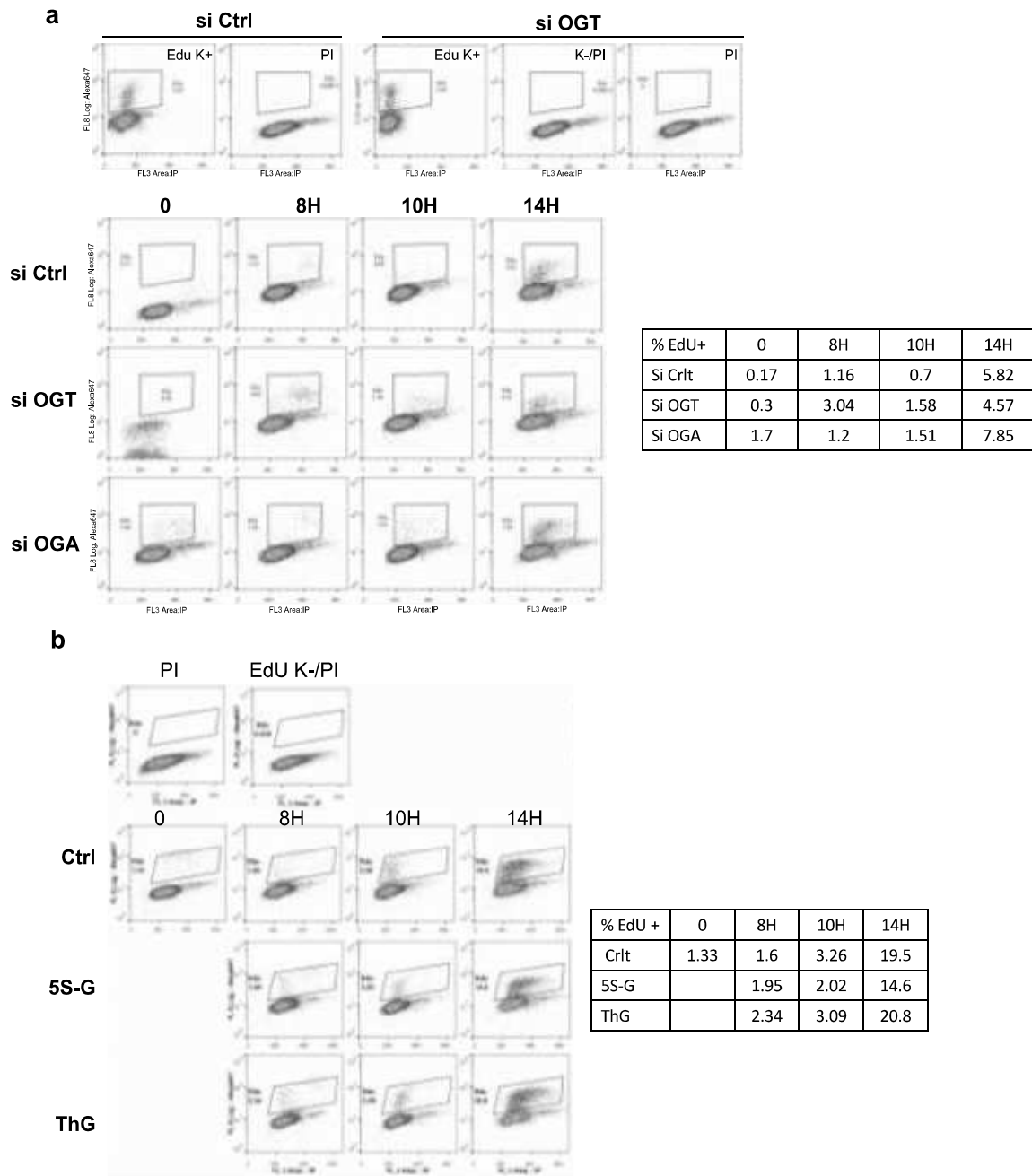




**Figure 63: Mises au point de l'approche de Click-EdU sur les cellules non cancéreuses MCF10A**

Les cellules MCF10A asynchrones sont incubées avec 10 ou 20  $\mu$ M d'EdU pendant 15 à 30 minutes avant la récolte. L'ADN est ensuite marqué par AF647-azido et P.I. puis les cellules sont analysées en cytométrie en flux. A. Graphes du signal AF647 en fonction du signal P.I. B. Histogrammes représentant le nombre de cellules en fonction du signal AF647. Les pourcentages représentent la quantité de cellules EdU+. C. Les cellules MCF10A sont synchronisées par sevrage puis restimulées pendant différents temps. La répartition des cellules dans chaque phase du cycle est déterminée par cytométrie en flux. D les cellules MCF10A sont synchronisées et traitées par siRNA (Ctrl, OGT ou OGA) ou par les inhibiteurs de l'OGT (5S-G) ou de l'OGA (ThG) et l'efficacité de chaque traitement est vérifiée par western-blot après lyse totale des cellules.

La différence de résultats observées entre les lignées MCF7 et MDA-MB-231 suggère que l'impact de la O-GlcNAcylation sur la synthèse de l'ADN et la progression du cycle est dépendante du phénotype cancéreux. Afin d'apporter une autre dimension à cette étude, nous avons initié quelques essais sur les cellules non cancéreuses MCF10A. Cette étude faisait partie intégrante du projet de stage de Master 1 de Riad Yagoubi, que je remercie pour sa contribution à ce projet. Un premier test de double marquage AF647/P.I. a été effectué sur cellules asynchrones avec des concentrations (10 à 20  $\mu\text{M}$ ) et des temps d'incubation variables (15 à 30 minutes) avec l'EdU (Figure 64a, b). Ainsi l'incorporation de l'EdU et le double marquage sont efficaces dans les cellules MCF10A et ce, quelle que soit la concentration ou le temps d'incubation avec l'EdU (environ 30% de cellules EdU positives dans chaque condition). Nous avons donc choisi d'utiliser par la suite une incubation de 15 minutes des cellules MCF10A avec l'EdU à 10  $\mu\text{M}$  avant la récolte. La deuxième étape de la mise au point consistait à valider une méthode de synchronisation des cellules pour maximiser la quantité de cellules entrant en phase S au moment de l'étude de la synthèse d'ADN. Nous avons effectué une synchronisation par privation de sérum suivie d'une stimulation à différents temps : 0, 10h, 15h et 18h. Après la récolte, les cellules sont analysées par cytométrie en flux après marquage de l'ADN par le P.I. pour évaluer la répartition des cellules dans la chaque phase et déterminer le temps de stimulation adéquat pour notre étude. Ainsi nous obtenons 25.7% de cellules en phase S après 10h de stimulation puis 64 et 66% après 15 et 18h de stimulation respectivement (figure 64c). Ainsi pour nous positionner en tout début de phase S nous avons choisi de stimuler les cellules pendant des temps courts, entre 8 et 14h pour la suite de l'étude.



**Figure 64: La dérégulation de la dynamique O-GlcNAc n'affecte pas la synthèse d'ADN des cellules non-cancéreuses MCF10A.**

Les cellules MCF10A synchronisées par privation de sérum sont transfectées avec les siRNA (Ctrl, OGT ou OGA) (a) ou traitées par les inhibiteurs (5S-G ou ThG) (b). Les cellules sont incubées avec l'EdU (10  $\mu$ M) 15 min avant la récolte puis l'ADN est marqué par AF647-azido et P.I. Les signaux sont ensuite détectés par cytométrie en flux et les résultats sont représentés sous forme de graphes du signal AF647 en fonction du signal P.I. Des contrôles négatifs sont effectués avec le P.I. seul (PI) et en présence d'AF647 + P.I. sans l'incubation préalable avec l'EdU (EdU K-/PI).

Comme pour les cellules cancéreuses étudiées plus haut, la dynamique de *O*-GlcNAcylation dans les MCF10A est dérégulée par la transfection de siRNA (OGT/OGA) ou par l'incubation avec des inhibiteurs (Ac-5S-GlcNAc ou Thiamet G). L'efficacité de chacun de ces traitements est vérifiée par western-blot à partir de la fraction totale des cellules MCF7A (Figure 64d). Encore une fois, nous observons que l'inhibition de l'OGA par le Thiamet G, ou son extinction par siRNA entraîne une diminution des niveaux protéiques de l'OGT.

Suite à la validation de nos conditions expérimentales nous avons effectué des premiers essais d'analyse de la synthèse d'ADN par click-EdU dans les cellules MCF10A synchronisées et transfectées avec les siRNA (Ctrl, OGT, OGA) (figure 66a) ou incubées avec les inhibiteurs (figure 65b). Bien qu'une légère diminution soit observée avec le 5S-GlcNAc après 14h de stimulation (diminution d'environ 5% par rapport au contrôle) (figure 65b) aucune différence marquante dans le taux de synthèse de l'ADN n'est observée, quelle que soit la condition de dérégulation de la *O*-GlcNAcylation. Ainsi, la synthèse d'ADN des cellules MCF10A est peu sensible aux variations de la dynamique de *O*-GlcNAcylation, corrélant ainsi avec son phénotype non cancéreux. Ces résultats doivent cependant être reproduits et confirmés. L'ensemble de ces résultats indiquent fortement une corrélation entre le phénotype cancéreux des cellules et l'implication de la *O*-GlcNAcylation dans la régulation de la synthèse d'ADN.



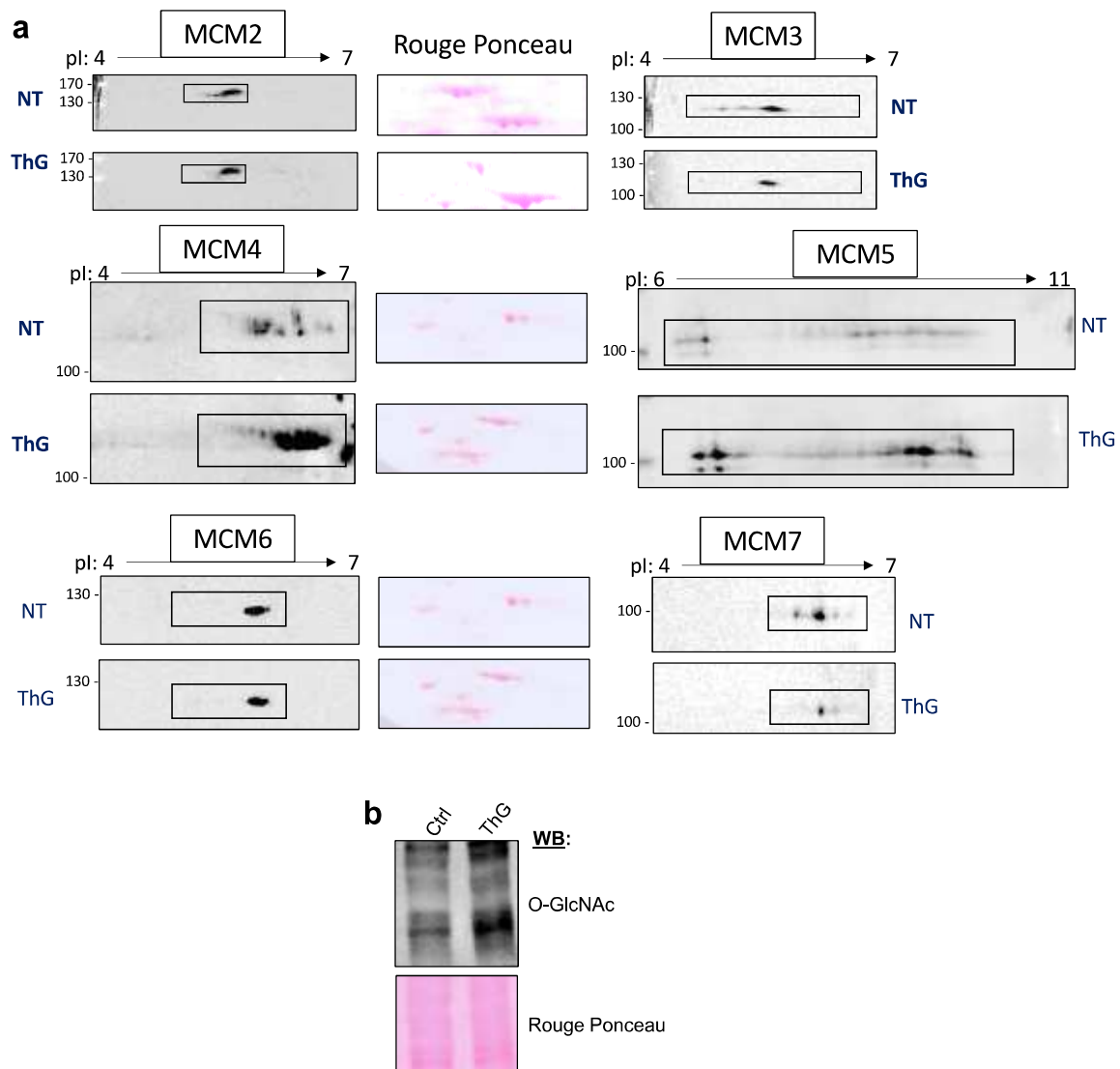


## **D/ Etude du dialogue Phosphorylation/*O*-GlcNAcylation sur les protéines MCM**

Comme je l'ai développé dans l'introduction, plusieurs études ont mis en évidence différents sites de phosphorylation sur les protéines MCM présentant un rôle qui dépend de la phase du cycle et de la sous-unité modifiée. Par exemple, la phosphorylation de MCM3 sur la sérine 112 est impliquée dans la régulation de la formation du complexe MCM2-7 alors que la phosphorylation sur la thréonine 722 participe au recrutement du complexe MCM2-7 à la chromatine (Lin, Aggarwal, et Diehl 2008; Junhui Li et al. 2011). Les 6 protéines MCM étant *O*-GlcNAcylées, il est possible que cette modification entre en compétition ou coopère avec la phosphorylation afin de réguler le complexe MCM2-7. De plus, la dynamique de *O*-GlcNAcylation semble impliquée dans le maintien du complexe hexamérique à la chromatine et dans la régulation de sa localisation subcellulaire, deux évènements auxquels participe la phosphorylation.

Dans ce contexte, nous avons dérégulé la dynamique de *O*-GlcNAcylation et observé l'effet sur le profil de phosphorylation global de chaque protéine MCM obtenu après électrophorèse bidimensionnelle (2D) et Western-blot anti-MCM. L'intérêt de cette méthode est que l'ajout de groupements phosphate sur une protéine induit un shift acide de son point isoélectrique (pI) qui est visible en 2D, surtout en utilisant des strips avec une gamme de pH étroite pour la première dimension. La *O*-GlcNAcylation étant quant à elle une modification neutre, elle ne modifie pas le point isoélectrique de la protéine. Si la *O*-GlcNAcylation entre en compétition ou modifie la phosphorylation des protéines MCM, la perturbation des niveaux de *O*-GlcNAcylation devrait induire un shift de leur pI, shift visible par western-blot.

Pour cette manipulation nous nous sommes concentrées sur la fraction des protéines liées à la chromatine de cellules MCF7 car c'est dans cette fraction que se situent les protéines

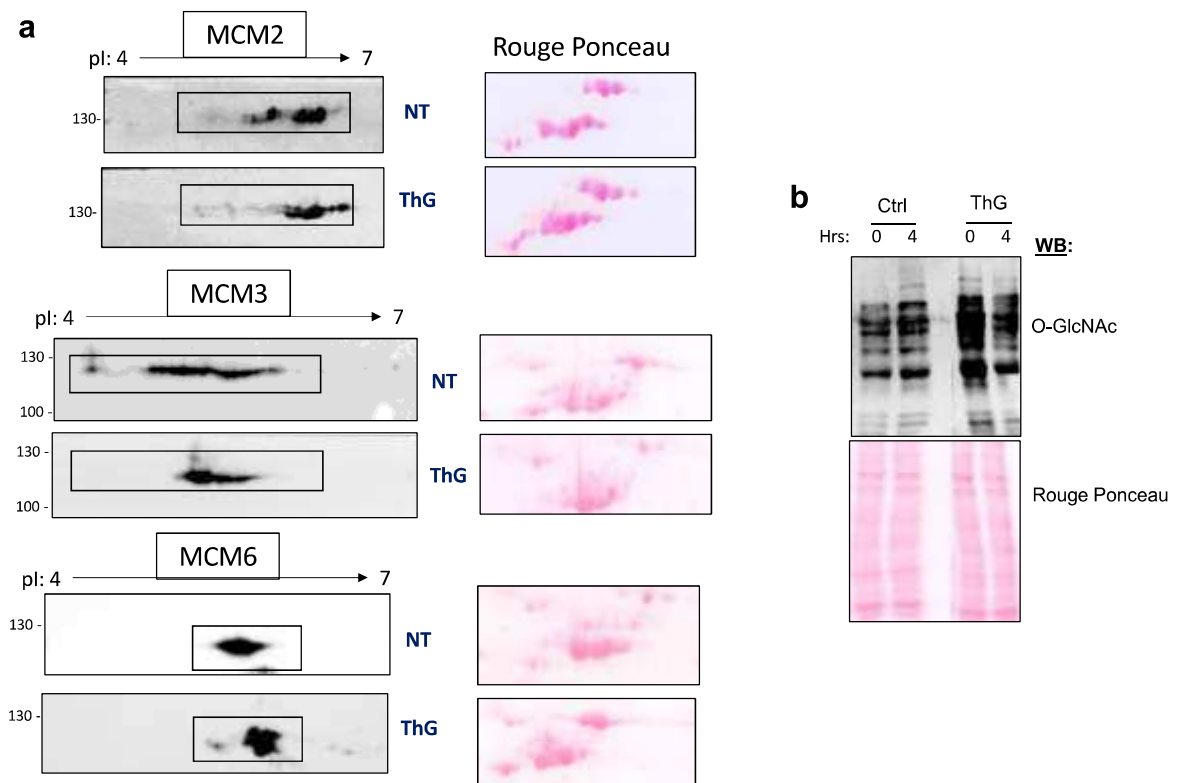


**Figure 65: L'utilisation du Thiamet G perturbe le profil de migration isoélectrophorétique de certaines MCM.**

Des cellules MCF7 asynchrones sont incubées avec le thiamet G (1  $\mu$ M, ThG) ou du DMSO (NT) avant leur lyse pour récupérer la fraction des protéines liées à la chromatine. Ces dernières sont séparées par électrophorèse 2D avant d'être révélées par western blot avec les anticorps anti-MCM (a) ou déposées sur gel de SDS-PAGE pour vérifier l'efficacité du thiamet G par western-blot anti-O-GlcNAc (b). Le rouge ponceau atteste de l'équichargement des membranes de 2D.

MCM O-GlcNAcylées. Si une compétition existe entre phosphorylation et O-GlcNAcylation, elle devrait être plus facilement visible dans cette fraction. Nous avons réalisé un ensemble d'analyses 2D après différents traitements des MCF7 : 1- les cellules asynchrones sont traitées avec ou sans Thiamet G pour inhiber l'OGA (Figure 66), 2- Les cellules sont synchronisées par un excès de thymidine (5 mM), avec ou sans Thiamet G, pendant 24h puis remises dans un milieu sans thymidine pendant 4h (Figure 67), 3- Les cellules asynchrones sont transfectées avec les siRNA Contrôle, OGT ou OGA (Figure 67). Pour la première dimension, nous avons choisi des strips avec une gamme de pH étroite, encadrant le pI de chaque MCM que nous voulons révéler par la suite, afin de séparer au maximum les différentes isoformes des MCM, dont celles phosphorylées. Ainsi, pour MCM2 (pI : 5.34) MCM3 (pI : 5.53), MCM4 (pI : 6.28), MCM6 (pI : 5.29) et MCM7 (pI : 6.08) nous utilisons des strips de pH 4-7, alors que pour l'analyse de MCM5 (pI : 8.64), nous utilisons des strips de pH 6-11. Après migration en deuxième dimension (7.5% SDS-PAGE) et transfert sur membrane de nitrocellulose, les profils de 2D ont été analysés par Western-blot avec les anticorps anti-MCM.

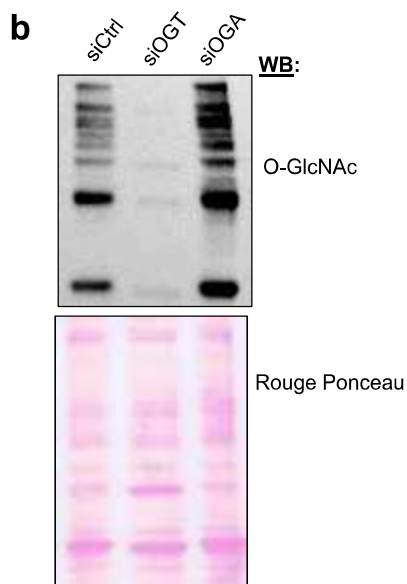
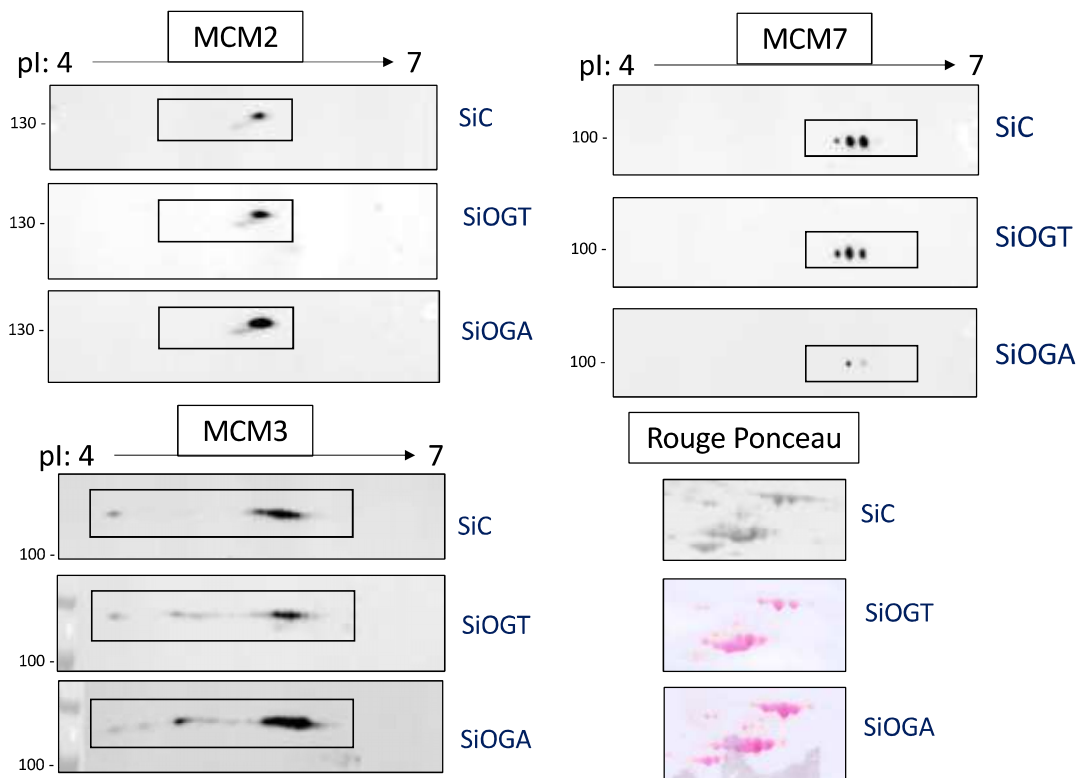
Ainsi, nous observons que le profil global de MCM2 et MCM6 n'est pas affecté par la dérégulation de la O-GlcNAcylation, quelle que soit la condition appliquée aux cellules (Figure 66, 67, 68). Il en va de même pour MCM4 et MCM5 qui ne présentent pas de shift de point isoélectrique avec le Thiamet G dans les cellules asynchrones. Nous observons cependant une augmentation de ces deux protéines dans la fraction chromatiniennne par rapport au contrôle (Figure 66). La manipulation nécessite toutefois d'être reproduite pour confirmer ce résultat. Un problème d'anticorps a empêché l'analyse de MCM4 et MCM5 dans les deux autres conditions. La phosphorylation globale de MCM3, et dans une moindre mesure celle de MCM7, semble par contre être modulée dans nos différentes conditions (Figures 67, 68).



**Figure 66: Effet du thiamet G sur le profil de migration isoélectrophorétique des MCM dans des cellules MCF7 synchronisées à la thymidine**

a. Des cellules MCF7 synchronisées par la thymidine 5 mM sont incubées avec le thiamet G (1  $\mu$ M, ThG) ou du DMSO (NT) avant leur lyse pour récupérer la fraction des protéines liées à la chromatine. Ces dernières sont séparées par électrophorèse 2D avant d'être révélées par western blot avec les anticorps anti-MCM. Le rouge ponceau atteste de l'équichargement des membranes de 2D.

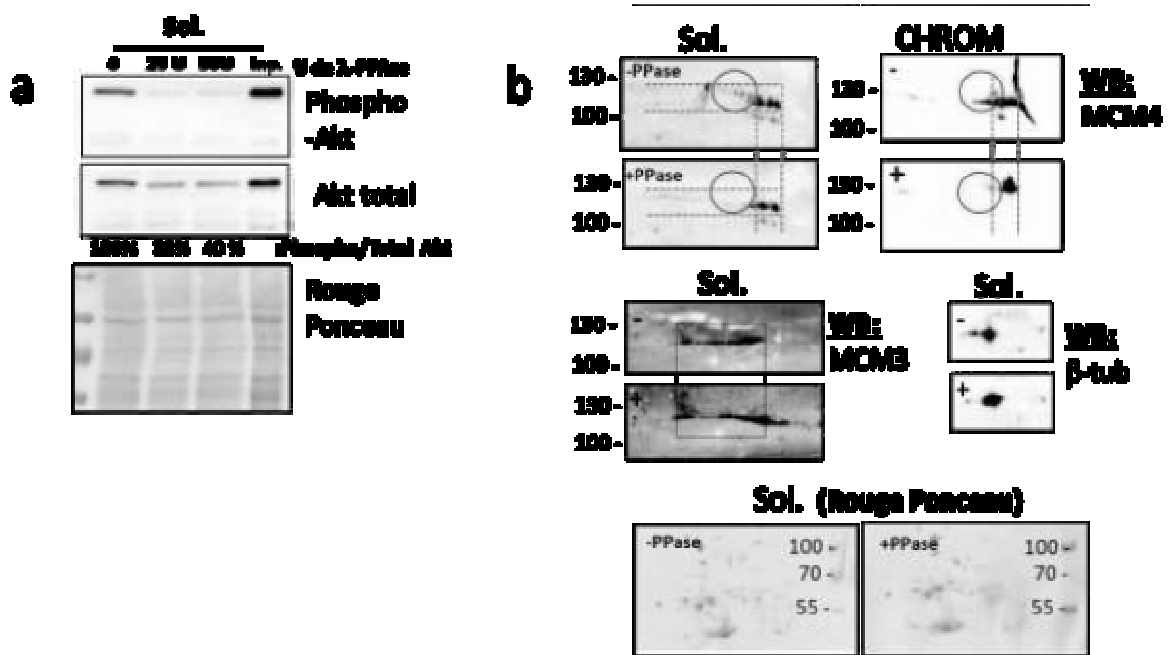
b. La fraction chromatinienne des MCF7 synchronisées à la thymidine est déposée sur gel de SDS-PAGE pour vérifier l'efficacité du Thiamet G par un western-blot anti-O-GlcNAc. Les cellules sont arrêtées juste après l'incubation avec la thymidine (T0) ou après 4h de remise en milieu sans thymidine.



**Figure 67: Effet des siRNA (OGT/OGA) sur le profil de migration isoélectrophorétique des MCM dans les cellules MCF7 asynchrones**

a. Des cellules MCF7 asynchrones sont transfectées avec les siRNA (Ctrl, OGT, OGA) pendant 60h avant leur lyse pour récupérer la fraction des protéines liées à la chromatine. Ces dernières sont séparées par électrophorèse 2D avant d'être révélées par western blot avec les anticorps anti-MCM. Le rouge ponceau atteste de l'équichargement des membranes de 2D.

b La fraction chromatinienne des MCF7 est déposée sur gel de SDS-PAGE pour vérifier l'efficacité des siRNA (Ctrl, OGT et OGA) par un western-blot anti-O-GlcNAc.



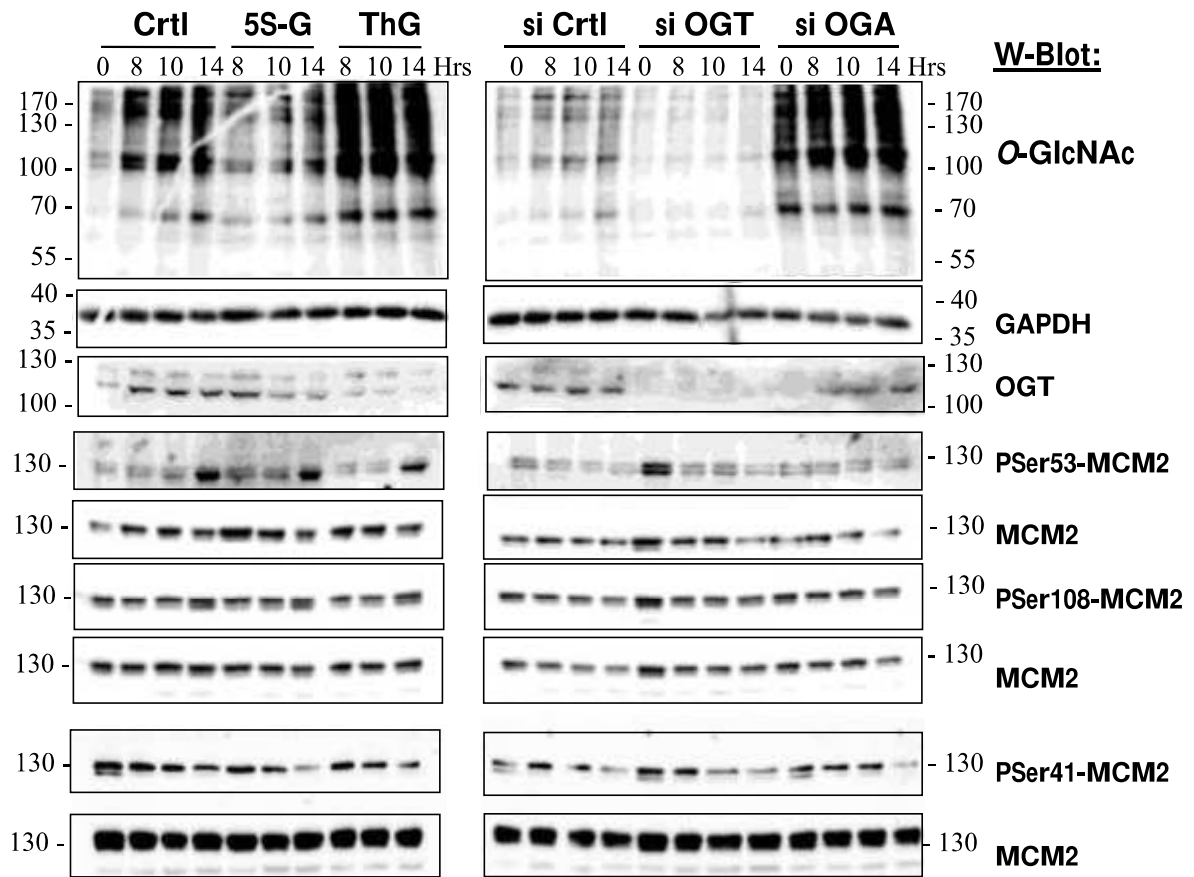
**Figure 68: Test à la  $\gamma$ -phosphatase**

Les protéines solubles (Sol.) ou de la fraction *chrom.* ont été précipitées au Chloroforme/méthanol. **(a)** Après resolubilisation dans le tampon PPase, elles ont été traitées pendant 30 min à 30°C avec 0, 25 U ou 50 U de gamma phosphatase (PPase).Après SDS-PAGE et transfert, Western-blot avec un anti-PThr473-Akt (*phospho-Akt*) pour vérifier l'action de la PPase. Après déshybridation de la membrane, réhybridation avec un anti-Akt (*total*). **(b)** Séparation par électrophorèse 2D (strips pH 4-7, 7.5% SDS-PAGE) des protéines des fractions Sol. Ou Chrom. après traitement (+) ou non (-) avec 50 U de PPase pendant 30 min à 30°C. Les protéines MCM4, MCM3, beta-tubuline ont été révélées par Western-blot. La coloration des membranes au rouge Ponceau montre l'équichargement des strips. Les marqueurs de poids moléculaires sont indiqués en kDa.

Pour s'assurer que les différents spots 2D étaient bien des isoformes de phosphorylation des MCM, nous avons testé l'effet de la  $\gamma$ -phosphatase (PPase) (de chez NEB) sur nos échantillons. Deux quantités de PPase ont d'abord été testées : 20 U ou 50 U. Les résultats du Western-blot avec un anti-phospho Akt indique que les deux concentrations ont un effet identique (Figure 69a), mais nous avons choisi de garder celle à 50 U/ 200  $\mu$ g de protéines pour assurer un maximum de déphosphorylation des protéines. L'expérience a été refaite sur des fractions *sol.* et *chrom.* de cellules MCF7 qui ont ensuite été séparées par électrophorèse 2D. Les Western-Blot contre MCM4 montrent bien une disparition des spots les plus hauts révélés avec l'anti-MCM4 dans les fractions soluble et chromatinienne, indiquant que ces spots sont des isoformes phosphorylées de MCM4 qui sont absentes après traitement à la PPase (Figure 69b). Par contre, seul un léger shift de pI est observé pour MCM3, indiquant que la déphosphorylation de cette protéine doit être incomplète (Figure 39b). On ne peut exclure non plus que ces isoformes soient modifiées par d'autres MPTs (Takei et al. 2001; Choudhary et al. 2009; Wei et Zhao 2016).

Ainsi nous observons des réponses variées du profil de phosphorylation des MCM en fonction de la dérégulation de la dynamique de O-GlcNAcylation. Dans le cas des protéines dont le profil n'est pas/peu modifié, en particulier pour MCM2 et MCM6, nos résultats sont assez reproductibles. Par contre, pour les MCM3 et MCM7, nous avons obtenu parfois des profils 2D-WB très différents d'une expérience à une autre, et ce, même dans des conditions identiques de dérégulation de la O-GlcNAcylation.

Ces résultats doivent donc être reproduits afin de pouvoir tirer une conclusion claire. D'après les résultats obtenus dans les précédentes parties de ma thèse, les conditions expérimentales à refaire en priorité sont les siCtrl vs siOGT sur les cellules MCF7 synchronisées. Toutefois, cela nous permet de conclure que la dynamique O-GlcNAc affecte



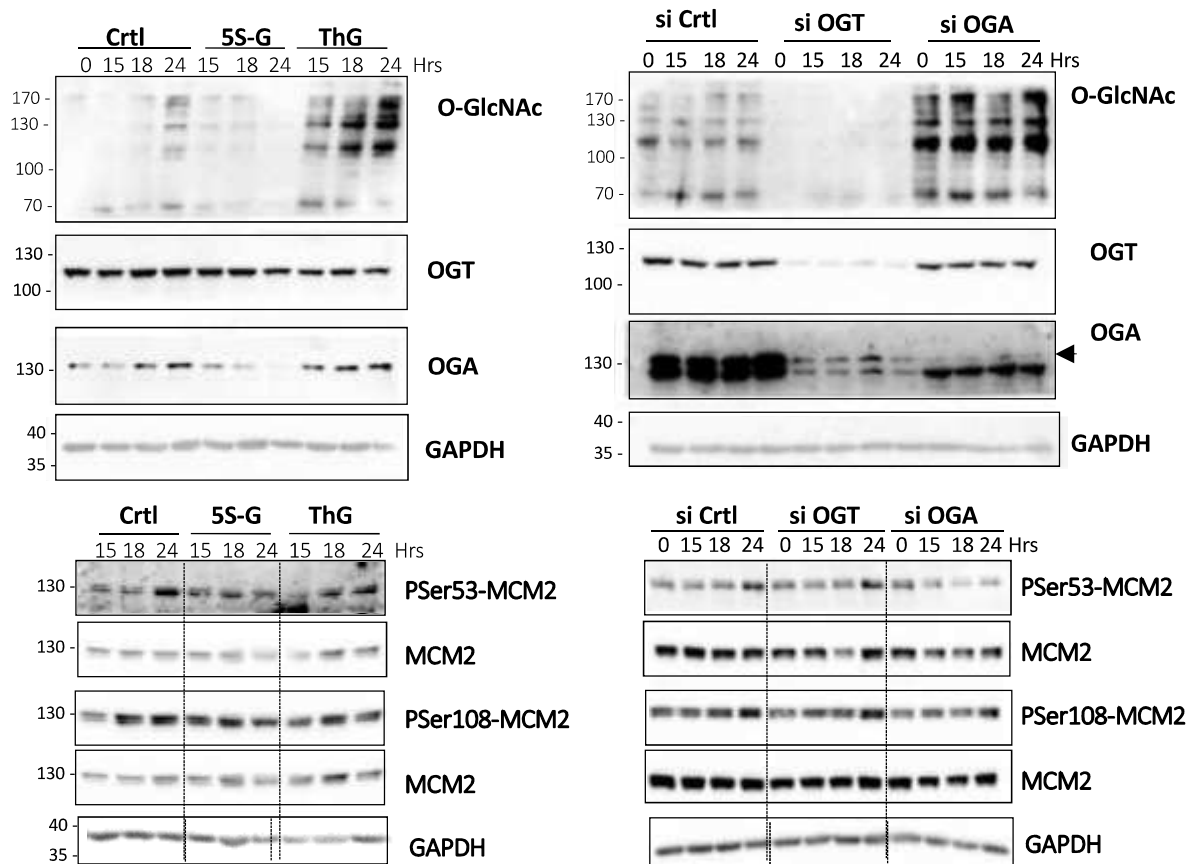
**Figure 69: Etude de 3 phosphosites de MCM2 dans les cellules MCF10A synchronisées**

Les cellules sont synchronisées par sevrage et traitées avec les inhibiteurs d'OGT (5S-G) et d'OGA (ThG) ou transfectées avec les siRNA (Ctrl, OGT ou OGA). Après la lyse totale, les protéines sont déposées sur gel de SDS-PAGE et analysées par Western-blot. L'équichargement est vérifié par le western-blot anti-GAPDH.



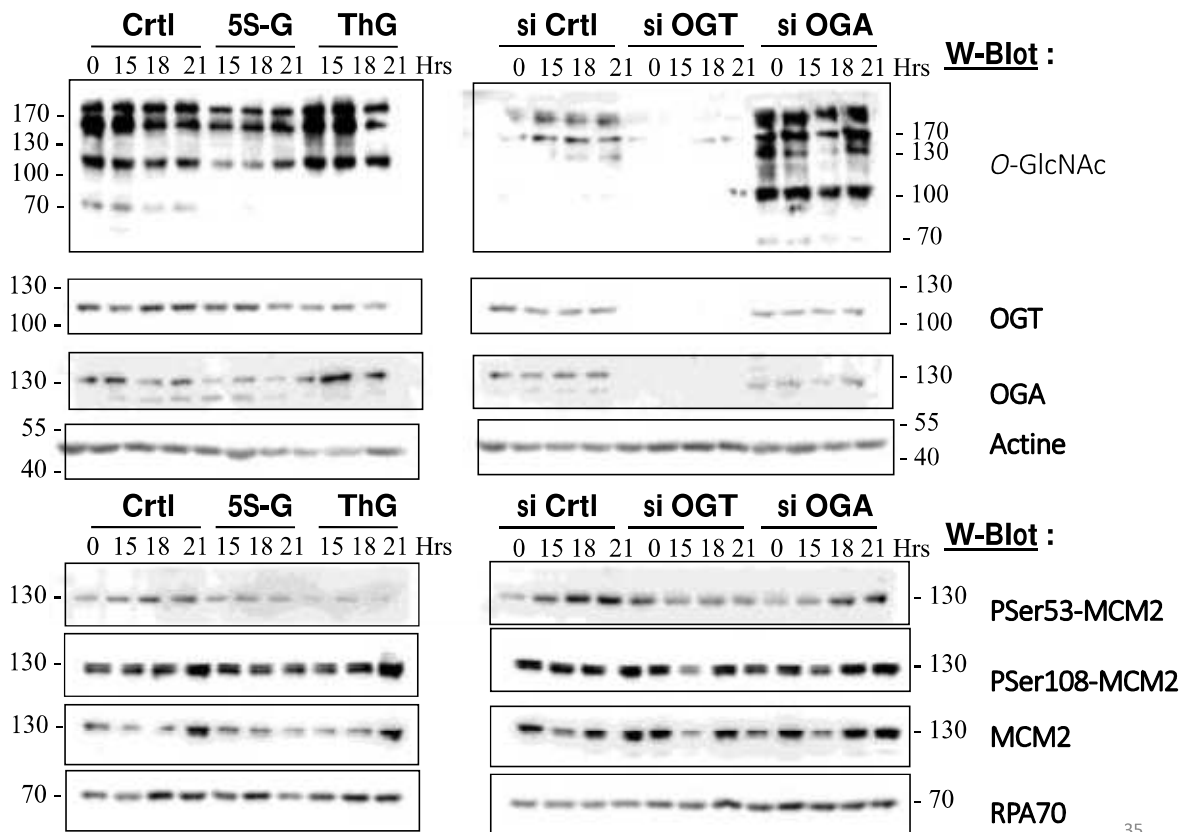
les MPTs des MCM3 et MCM7 liées à la chromatine, et en particulier leur état de phosphorylation.

En parallèle des analyses de la phosphorylation globale des MCM par une approche de 2D, nous avons utilisé des anticorps spécifiques de certains sites de phosphorylation de MCM2 ayant un rôle connu dans la régulation du complexe MCM2-7. Les anticorps que nous avons utilisés ciblent des sites modifiés par la kinase DDK: S41, S53 et S108. Ces sites appartiennent à un ensemble de résidus en N-terminal de MCM2 modifiés suite à la stimulation de DDK par la tresline (l'homologue humain de Sld3) (Bruck et Kaplan 2015c). Ce processus est conservé de la levure à l'homme et est impliqué dans l'ouverture de la porte MCM2-5, régulant de cette manière l'initiation de la réplication de l'ADN (Bruck et Kaplan 2015b, 2015c, 2015a). Nous avons utilisé les 3 anticorps en western-blot sur la fraction totale des cellules MCF10A (Figure 70), MCF7 (Figure 71) et MDA-MB-231 (Figure 72) synchronisées par sevrage et traitées par ARN interférence (siOGT/siOGA) ou par les inhibiteurs de l'OGT ou de l'OGA. Cependant, nous n'observons aucun effet reproductible de la dérégulation de la dynamique O-GlcNAc sur la phosphorylation des résidus sérine 41, 53 et 108 et ce, quelle que soit la condition considérée. Ceci est en accord avec les résultats obtenus en 2D pour MCM2 dont le profil global de phosphorylation n'est pas significativement modifié avec la dérégulation de la dynamique de O-GlcNAcylation.



**Figure 70: Etude de phosphosites de MCM2 dans les cellules MCF7 synchronisées**

Les cellules sont synchronisées par sevrage et traitées avec les inhibiteurs d'OGT (5S-G) et d'OGA (ThG) ou transfectées avec les siRNA (Ctrl, OGT ou OGA). Après la lyse totale, les protéines sont déposées sur gel de SDS-PAGE et analysées par Western-blot. L'équichargement est vérifié par le western-blot anti-GAPDH.



**Figure 71: Etude de phosphosites de MCM2 dans les cellules MDA-MB-231 synchronisées**

Les cellules sont synchronisées par sevrage et traitées avec les inhibiteurs d'OGT (5S-G) et d'OGA (ThG) ou transfectées avec les siRNA (Ctrl, OGT ou OGA). Après la lyse totale, les protéines sont déposées sur gel de SDS-PAGE et analysées par Western-blot. L'équichargement est vérifié par le western-blot anti-actine.



*Conclusions*

*et*

*Discussion*



## Conclusions et discussion

Dans l'ensemble, les résultats obtenus au cours de ma thèse démontrent que chaque sous-unité du complexe MCM2-7 est *O*-GlcNAcylée dans les cellules cancéreuses mammaires MCF7 et MDA-MB-231. Ces résultats, en plus de compléter ceux obtenus par l'équipe en 2012 (Drougat et al. 2012), font écho à deux études récentes identifiant MCM2, MCM4, MCM5 ainsi que MCM-MB, l'ADN ligase et l'ADN polymérase  $\alpha$  comme étant *O*-GlcNAcylées (Jing Li et al. 2016; Chuh et al. 2017). Le tout suggérant une implication de la dynamique de *O*-GlcNAcylation dans la régulation du processus de réplication de l'ADN au niveau des étapes d'initiation et d'élongation. La prochaine étape de ce travail consisterait à identifier le ou les sites *O*-GlcNAcylé(s) par spectrométrie de masse après immunoprécipitation de chaque MCM. Toutefois, la faible stœchiométrie de *O*-GlcNAc des MCM que nous avons pu déterminer pour certaines d'entre elles, et la labilité de la modification la rendent difficile à analyser par spectrométrie de masse (Chalkley et al. 2009; W. Cao et al. 2013). Il sera nécessaire au préalable de traiter les cellules afin de maximiser la quantité de *O*-GlcNAcylation sur les protéines MCM, en utilisant le thiamet G (inhibiteur de l'OGA) ou la transfection de siOGA ou encore d'OGT-HA. De plus, il sera préférable d'effectuer une immunoprécipitation sur une grande quantité de protéines de départ (3-5 mg) à partir de la fraction Chrom. des cellules car nos résultats indiquent que la *O*-GlcNAcylation des MCM est restreinte à la chromatine. La connaissance des sites de *O*-GlcNAcylation nous permettrait de produire des mutants de GlcNAc par mutagenèse dirigée (Hardivillé et al. 2010), et d'étudier spécifiquement le rôle de ces sites sur l'activité ou la localisation des protéines MCM.

Comme je l'ai déjà rapidement cité plus haut, nous avons montré par une approche de sWGA que les MCM *O*-GlcNAcylées ne sont présentes que dans la fraction des protéines liées à la chromatine au niveau de laquelle l'OGT est fortement concentrée, mais où l'OGA est





absente. Dans la fraction soluble des noyaux, les MCM peuvent être non glycosylées ou être les cibles d'une dynamique de *O*-GlcNAcylation trop rapide pour être détectable par les différentes approches que nous avons utilisées. Toutefois, l'approche de chimie-click nous montre que la protéine MCM2 *O*-GlcNAcyliée est aussi présente en faible quantité dans la fraction soluble. Or, cette sous-unité participe au recrutement du complexe MCM2-7 à la chromatine en réponse à des phosphorylations de son extrémité N-terminale par le complexe Cdc7/Dbf4 (Chuang et al. 2009). La *O*-GlcNAcylation pourrait donc avoir un effet sur le recrutement du complexe MCM2-7 à la chromatine *via* une compétition ou une coopération avec la phosphorylation sur la sous-unité MCM2. Cependant, l'étude de la phosphorylation de MCM2 (par 2D-WB et en utilisant des anticorps phosphospécifiques) nous indique qu'il est peu probable qu'un dialogue phosphorylation/*O*-GlcNAcylation existe sur cette sous-unité. De plus, sa localisation subcellulaire ne semble pas être modulée par la *O*-GlcNAcylation dans des cellules asynchrones. La localisation majoritairement chromatinienne des protéines MCM *O*-GlcNAcyliées nous a laissé supposer un rôle de la *O*-GlcNAcylation dans la régulation de la localisation subcellulaire des protéines, comme c'est le cas pour la  $\beta$ -caténine (Sayat et al. 2008; J. R. Ha et al. 2014) ou dans la régulation de l'activité hélicase du complexe et notamment *via* la régulation de la formation des sites actifs à l'interface de deux sous-unités MCM (Moreau et al. 2007; Costa et al. 2014). L'un des premiers résultats obtenus au cours de ma thèse indique que la *O*-GlcNAcylation n'impacte pas les niveaux protéiques des MCM dans les cellules MCF7 et MDA-MB-231 asynchrones. Bien que les protéines MCM soient relativement stables au cours du cycle, leur expression est induite, notamment via l'activité du facteur de transcription E2F, quand les cellules quittent la quiescence en réponse à des facteurs mitogènes (Ohtani et al. 1999; Stoeber et al. 2001). L'expression des MCM augmente alors pendant toute la phase G1 jusqu'à atteindre un maximum à la transition G1/S. Il serait donc intéressant de



suivre les niveaux d'expression des MCM, de la phase de quiescence au milieu de la phase S, dans des conditions de dérégulation de la dynamique *O*-GlcNAc. La surexpression de certaines protéines MCM est considérée comme un marqueur de développement tumoral dans différents cancers comme le cancer du côlon, de la prostate et du pancréas (Padmanabhan et al. 2004; Giaginis et al. 2009; Choy et al. 2016; Y.-P. Peng et al. 2016). La surexpression des MCM tend à faciliter une réplication rapide de l'ADN et donc une prolifération anarchique des cellules. De nombreux cancers sont aussi caractérisés par une surexpression de l'OGT et une hyper-*O*-GlcNAcylation (Caldwell et al. 2010; Chaiyawat et al. 2014; Christina M. Ferrer, Sodi, et Reginato 2016). Il pourrait donc exister une corrélation entre l'hyper-*O*-GlcNAcylation et les niveaux élevés de protéines MCM et/ou de leur activité hélicase dans les tumeurs. Une série de manipulations nous permettant de suivre la synthèse d'ADN par une approche de click-EdU nous laisse penser qu'une telle corrélation pourrait exister. En effet, nous avons analysé le taux de synthèse d'ADN dans différents types de cellules synchronisées, allant des cellules mammaires non cancéreuses (MCF10A) aux cellules cancéreuses hormono-indépendantes (MDA-MB-231). Nous observons que l'extinction de l'OGT a un effet dramatique sur la synthèse d'ADN que dans les cellules MDA-MB-231 (Figure 62). L'OGT serait donc particulièrement importante pour la régulation de la synthèse d'ADN dans les cellules MDA-MB-231, résultat en accord avec Caldwell et collaborateurs qui ont montré que l'extinction de l'OGT affecte la prolifération des cellules à caractère cancéreux agressif (Caldwell et al. 2010). Notre approche ne nous montre pas directement ici l'effet des siOGT sur la régulation des MCM mais nous pouvons supposer que la diminution du taux de synthèse d'ADN pourrait être due à une diminution d'activité des hélicases MCM dans les cellules MDA-MB-231. Une étude plus directe de l'activité hélicase sera nécessaire pour relier les résultats de l'approche click-EdU à la régulation de l'activité du complexe MCM2-7 (N. Simon et al. 2013), et la comparaison des



trois lignées cellulaires nous permettrait de faire le lien entre le phénotype cancéreux, l'hyper-O-GlcNAcylation et l'activité des MCM (X. Wang et al. 2014).

J'ai également démontré par différentes approches que l'OGT interagit de manière stable avec les sous-unités MCM3, MCM6 et MCM7. J'ai précisé que pour détecter l'interaction OGT-MCM par PLA, nous avons dû réduire considérablement le temps de perméabilisation des cellules en passant de 20 à 2 minutes d'incubation avec le Triton-X100 (Figure 46) (Scovassi et Prosperi 2006; Kuipers et al. 2011). Nous ne pouvons donc pas totalement exclure que l'OGT interagirait aussi avec des MCM non liées à la chromatine, d'autant plus que les résultats de *GST-pull down* montrent une interaction possible des protéines MCM issues de la fraction solubles des cellules avec l'OGT recombinante (Figure 48). Compte-tenu de l'ensemble de nos résultats, nous suggérons que l'OGT participe au recrutement des protéines MCM à la chromatine, notamment en modulant leur interaction avec certains partenaires. En effet, comme je l'ai déjà décrit dans l'introduction, le recrutement du complexe MCM2-7 à la chromatine dépend de son interaction avec le facteur Cdt1 *via* la sous-unité MCM6 (J. Zhang et al. 2010). De plus, il a été montré chez la levure et les mammifères que l'interaction de MCM7 avec la protéine du rétinoblastome (pRB) inhibe la formation du pré-RC (Sterner et al. 1998; Gladden et Diehl 2003). Cette inhibition est levée grâce à l'intervention du complexe cycline D/CDK4 qui dissocie pRB de MCM7 permettant ainsi son intégration dans le pré-RC. De plus, l'interaction MCM3-ORC-Cdc6 joue un rôle déterminant dans le recrutement de Cdt1 et MCM2-7 à la chromatine (Mukherjee, Winter, et Alexandrow 2010; Frigola et al. 2013). Ainsi, l'OGT pourrait moduler la formation du pré-RC *via* ses interactions spécifiques avec MCM3, MCM6 et MCM7 et participer à la progression des cellules en phase G1. De façon intéressante, nous observons une diminution de la quantité de cellules MCF7 et MDA-MB-231 en phase S quand l'activité de l'OGT est inhibée (Figures 59 et 63). Il serait donc intéressant de vérifier si l'interaction de l'OGT avec les MCM est dépendante de l'activité



catalytique de l'OGT en utilisant une forme non catalytiquement active de l'OGT (*catalytic dead*, H558F, (Martinez-Fleites et al. 2008), et en vérifiant par les mêmes approches que précédemment si les interactions OGT-MCM s'effectuent toujours dans ce cas. A l'inverse, l'interaction OGT-MCM dans la fraction soluble du noyau pourrait favoriser le recrutement de l'OGT à la chromatine comme cela a déjà été observé pour les protéines TET (Q. Chen et al. 2013; Ito et al. 2014). Suite à son recrutement à la chromatine, l'OGT pourrait alors interagir avec et modifier ses cibles liées à la chromatine comme les six protéines MCM et les histones (Sakabe, Wang, et Hart 2010). Afin de mieux comprendre le rôle de cette interaction, il serait intéressant d'effectuer un suivi de l'interaction OGT-MCM en fonction de la progression du cycle cellulaire afin de déterminer si l'OGT est recrutée, ou participe au recrutement des MCM à la chromatine (fin de mitose et phase G1), si elle favorise le maintien du complexe à la chromatine (de la fin de G1 au début de S) ou encore si elle participe au dérochage du complexe (phase S) (M. Fujita et al. 1997; Kuipers et al. 2011). Afin de déterminer si ce sont les protéines MCM qui participent au recrutement de l'OGT à la chromatine, nous pourrions utiliser des siRNA ciblant les MCM interagissant avec l'OGT sur des cellules synchronisées en fin de phase M afin de déterminer si ce traitement induit une diminution de la localisation de l'OGT à la chromatine (Ibarra, Schwob, et Méndez 2008; P. Liu et al. 2009).

Mes résultats seraient plutôt en faveur d'un modèle dans lequel l'OGT participerait au recrutement ou au maintien des MCM à la chromatine. En effet, nous observons une modulation de la localisation subcellulaire des MCM6 et MCM7 dans des conditions de dérégulation de la dynamique de O-GlcNAcylation par siRNA. Ainsi l'ensemble du complexe hexamérique ne serait pas touché par cette dérégulation, comme cela a déjà été montré avec la dérégulation du complexe cycline E (Ekholm-Reed et al. 2004). Ceci pourrait indiquer que l'OGT participe à la formation de sous-complexes MCM à la chromatine. De manière intéressante, il a été montré chez le xénope que les MCM ne sont pas toujours associées à la chromatine sous forme





d'hétérohexamère et que seulement quelques sous-complexes sont intégrés aux complexes de pré-réplication. Les sous-complexes n'ont pas clairement été identifiés mais leurs masses moléculaires indiquent qu'ils sont composés de 4, 5 ou 6 sous-unités (Coué et al. 1998). De plus, une étude menée *in vitro* montre que le double-trimère MCM4-MCM6-MCM7 est capable d'interagir avec l'ADN simple brin (M. Sato et al. 2000). Ensuite, les interactions MCM2-MCM6 et MCM4-MCM7 sont perturbées à la chromatine en condition d'extinction de l'OGT par siRNA, suggérant fortement que l'OGT participe au maintien des interactions MCM-MCM. Ces interactions sont nécessaires à la formation des sites actifs de l'hélicase MCM2-7 et une déstabilisation pourrait entraîner une dérégulation de l'activité du complexe. Cependant nous n'observons pas d'effet de la dérégulation de la dynamique O-GlcNAc sur le taux de synthèse de l'ADN des cellules MCF7 synchronisées, suggérant que l'activité de l'hélicase, essentielle au processus de réplication, n'est pas perturbée dans ces cellules. Ceci nous laisse supposer que les interactions perturbées en condition siOGT ne concernent pas le complexe hétérohexamérique mais quelques-uns des différents sous-complexes capables de se former à la chromatine (Coué et al. 1998). Afin de vérifier cela, nous pourrions utiliser la protéine recombinante GST-OGT afin de recueillir les potentiels sous-complexes interagissant avec l'OGT par GST-pull down pour ensuite les séparer sur un gel non-dénaturant afin de conserver ces complexes et de pouvoir les identifier par western-blot. De manière surprenante, nous n'observons pas d'effet significatif de l'inhibition de l'OGT par l'Ac-5S-GlcNAc sur les interactions MCM2-6, MCM3-5 et MCM6-4 (Figure 54a). Ceci suggère que c'est l'interaction de l'OGT plutôt que son activité qui serait impliquée dans la régulation des interactions MCM-MCM. Ceci peut être vérifié en réitérant les manipulations de co-IP et de PLA en transfectant à la fois les cellules avec le siOGT, afin de diminuer massivement les formes endogènes de l'OGT, et avec la forme « *catalytic dead* » de l'OGT (*rescue*). Dans le cas où l'activité



catalytique de l'OGT n'est pas nécessaire au maintien des interactions MCM-MCM, nous devrions conserver les interactions dans ces conditions.

Le cas de MCM7 est particulièrement intéressant ici. En effet, sa localisation à la chromatine est diminuée en condition de siOGT dans les cellules MCF7 et sa présence est légèrement augmentée dans la fraction soluble de ces cellules. De plus, MCM7 est l'une des cibles d'interaction de l'OGT. Nous pouvons donc supposer que l'OGT joue un rôle dans le recrutement, le maintien ou même le décrochage de MCM7 de la chromatine. Il est important de noter que cette sous-unité est la seule à être polyubiquitinylée pendant l'étape de terminaison de la réplication afin d'induire le décrochage du CMG (Moreno et al. 2014; Bailey, Priego Moreno, et Gambus 2015). Ainsi, il existe peut-être un dialogue entre l'ubiquitination et l'OGT pour réguler le maintien du complexe à la chromatine. Il serait donc intéressant d'effectuer une immunoprécipitation de MCM7 à partir de cellules synchronisées en phase S et transfectées avec les siCtrl ou siOGT afin d'évaluer les niveaux d'ubiquitination de la protéine dans ces différentes conditions. Si notre hypothèse est correcte, en cas d'extinction de l'OGT nous devrions observer une augmentation des formes polyubiquitinylées de MCM7.

Un autre dialogue phospho/O-GlcNAc est susceptible d'intervenir sur MCM7 et MCM3. En effet, d'après notre étude de la phosphorylation globale des MCM par 2D, nous suggérons qu'un dialogue entre la phosphorylation et la O-GlcNAcylation existe sur les protéines MCM3 et MCM7 afin de les réguler. Une séquence consensus récemment identifiée pour le dialogue phosphorylation/O-GlcNAcylation (S/T)-P-(V/A/T)-(gT/gS)) nous a permis d'effectuer une analyse *in silico* des sites potentiels de dialogue sur les MCM (Leney et al. 2017). Nous avons associé la connaissance de ce site à la prédiction des sites de O-GlcNAcylation par le serveur YinOYang1.2 ([www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang](http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang)). Un site potentiel de O-GlcNAcylation sur MCM3, T610, se situe à proximité d'un site consensus de dialogue entre les deux modifications (<sup>611</sup>SPVT<sup>614</sup>) dont la S611 a été identifiée par



spectrométrie de masse comme étant phosphorylée (H. Zhou et al. 2013). La région N-terminale de MCM4, connue pour être fortement phosphorylée présente la séquence <sup>3</sup>SPAS<sup>6</sup> ainsi que 3 sites potentiels de O-GlcNAcylation sur les résidus S2, S3 et T7 (Ishimi et Komamura-Kohno 2001; Komamura-Kohno et al. 2006). Le motif <sup>133</sup>SPSS<sup>136</sup> est retrouvé au niveau de la région N-terminale de MCM5, les résidus sérine 135 et 136 étant des sites prédictifs de O-GlcNAcylation et le résidu S133, un site de phosphorylation dont le rôle n'est pas encore connu (Mertins et al. 2014). Cette approche *in silico* suggère qu'un dialogue existerait sur les protéines MCM3, MCM4 et MCM5. Nous avons en effet montré par 2D qu'un tel dialogue pouvait expliquer sur la protéine MCM3, cependant des études supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre la teneur de ce dialogue.

Une autre hypothèse sur le rôle de la O-GlcNAcylation dans la régulation des MCM tient compte du fait qu'un grand nombre de complexes MCM2-7 interagissent avec la chromatine pendant la phase G1, mais très peu seront réellement activés lors de l'initiation de la réplication (entre 5 et 10% des complexes totaux liés à la chromatine), les non-actifs formant les origines dormantes (Méchalí 2010). Nous ne comprenons pas encore totalement les mécanismes de régulation entraînant l'activation ou le maintien d'une origine dormante chez les mammifères, notamment pourquoi le pré-RC puis le CMG se forment au niveau d'une origine spécifique et comment sont activées les origines dormantes en cas de stress répliatif (Anglana et al. 2003; DePamphilis et al. 2006; Courbet et al. 2008; Rhind, Yang, et Bechhoefer 2010; Fragkos et al. 2015). La structure de la chromatine aux alentours des origines de réplication, souvent localisées dans des régions riche en GC, est déterminante pour leur reconnaissance et leur activation (Delgado et al. 1998; Besnard et al. 2012). De plus, en cas de stress répliatif, des kinases sont impliquées dans l'inhibition des origines afin d'arrêter le cycle et de permettre une réparation de l'ADN avant l'entrée en mitose. Parmi les kinases impliquées, Chk1 modifie MCM3 en S205 pour inhiber la réplication



(X. Han et al. 2015; Fragkos et al. 2015). Ainsi, la *O*-GlcNAcylation pourrait être impliquée dans l'activation des origines dormantes, peut-être en créant un signal reconnu par les différentes protéines de la machinerie répliative.

Nous avons vu grâce à l'utilisation du PEG, que la stœchiométrie de *O*-GlcNAcylation pour les MCM2, 4, 6 et 7 est comprise entre 3 et 10% des MCM liées à la chromatine dans des cellules asynchrones ce qui est en accord avec la stœchiométrie de *O*-GlcNAc de la plupart des protéines (<10%) (Clark, Rexach, et Hsieh-Wilson 2013). Mais de manière intéressante, ce pourcentage corrèle aussi avec la quantité de complexes MCM2-7 réellement activés lors de la réplication (Méchali M., 2010). Les résultats obtenus par click-EdU seraient plutôt en faveur de cette hypothèse puisque l'extinction de l'OGT par siRNA n'a pas d'impact sur le taux de synthèse d'ADN, indiquant que les origines actives ne sont probablement pas affectées par ce traitement. Nous pouvons expliquer ce résultat en considérant que l'OGT régulerait principalement les MCM des origines dormantes et que son absence n'a pas d'impact significatif la réplication, mais pourrait moduler l'interaction des 90-95% de MCM non-actives avec la chromatine. Il serait intéressant de se concentrer sur la *O*-GlcNAcylation des protéines situées au niveau d'une des origines de réplication identifiées chez l'homme, celle située au niveau du gène de la LaminB (G. Abdurashidova et al. 2000). L'étude de la *O*-GlcNAcylation des MCM interagissant avec ce site de réplication pourrait nous renseigner sur l'impact de cette modification au niveau des origines actives de réplication spécifiquement. D'un autre côté, il serait aussi intéressant de se placer en condition de stress répliatif grâce à différents agents comme l'aphidicoline ou l'hydroxyurée, afin de déterminer si un dialogue existe entre la *O*-GlcNAcylation de MCM3 et l'activité de Chk1 (X. Han et al. 2015). Pour cela nous pouvons effectuer une étude spécifique de la phosphorylation sur le site S205 de MCM3 par spectrométrie de masse dans différentes condition de stress répliatif et de dérégulation de la *O*-GlcNAcylation.





# *Bibliographie*



# Bibliographie

## A

- Abbas, Tarek, Mignon A. Keaton, et Anindya Dutta. 2013. « Genomic Instability in Cancer ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (3): a012914. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012914>.
- Abdurashidova, G., M. Deganuto, R. Klima, S. Riva, G. Biamonti, M. Giacca, et A. Falaschi. 2000. « Start Sites of Bidirectional DNA Synthesis at the Human Lamin B2 Origin ». *Science (New York, N.Y.)* 287 (5460): 2023-26.
- Abdurashidova, Gulnara, Miltcho B. Danailov, Alexander Ochem, Gianluca Triolo, Vera Djeliova, Sorina Radulescu, Alessandro Vindigni, Silvano Riva, et Arturo Falaschi. 2003. « Localization of Proteins Bound to a Replication Origin of Human DNA along the Cell Cycle ». *The EMBO Journal* 22 (16): 4294-4303. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg404>.
- Acker, Michael G., et Jon R. Lorsch. 2008. « Mechanism of Ribosomal Subunit Joining during Eukaryotic Translation Initiation ». *Biochemical Society Transactions* 36 (Pt 4): 653-57. <https://doi.org/10.1042/BST0360653>.
- Acosta, D. M., L. L. Soprano, M. Ferrero, M. Landoni, M. I. Esteva, A. S. Couto, et V. G. Duschak. 2011. « A Striking Common O-Linked N-Acetylglucosaminyl Moiety between Cruzipain and Myosin ». *Parasite Immunology* 33 (7): 363-70. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2011.01291.x>.
- Adachi, Y., et U. K. Laemmli. 1992. « Identification of Nuclear Pre-Replication Centers Poised for DNA Synthesis in Xenopus Egg Extracts: Immunolocalization Study of Replication Protein A ». *The Journal of Cell Biology* 119 (1): 1-15.
- Adachi, Y., J. Usukura, et M. Yanagida. 1997. « A Globular Complex Formation by Nda1 and the Other Five Members of the MCM Protein Family in Fission Yeast ». *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 2 (7): 467-79.
- Aggarwal, Bhagwan D., et Brian R. Calvi. 2004. « Chromatin Regulates Origin Activity in Drosophila Follicle Cells ». *Nature* 430 (6997): 372-76. <https://doi.org/10.1038/nature02694>.
- Akan, Ilhan, Stephanie Olivier-Van Stichelen, Michelle R. Bond, et John A. Hanover. 2018. « Nutrient-Driven O-GlcNAc in Proteostasis and Neurodegeneration ». *Journal of Neurochemistry* 144 (1): 7-34. <https://doi.org/10.1111/jnc.14242>.
- Akimoto, Y., L. K. Kreppel, H. Hirano, et G. W. Hart. 2000. « Increased O-GlcNAc Transferase in Pancreas of Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes ». *Diabetologia* 43 (10): 1239-47. <https://doi.org/10.1007/s001250051519>.
- Akopian, David, et Michael Rape. 2017. « Conducting the Finale of DNA Replication ». *Genes & Development* 31 (3): 226-27. <https://doi.org/10.1101/gad.297184.117>.
- Albanese, C., J. Johnson, G. Watanabe, N. Eklund, D. Vu, A. Arnold, et R. G. Pestell. 1995. « Transforming P21ras Mutants and C-Ets-2 Activate the Cyclin D1 Promoter through Distinguishable Regions ». *The Journal of Biological Chemistry* 270 (40): 23589-97.
- Alfaro, Joshua F., Cheng-Xin Gong, Matthew E. Monroe, Joshua T. Aldrich, Therese R. W. Claus, Samuel O. Purvine, Zihao 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 of the United States of America* 109 (19): 7280-85. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200425109>.
- Aloia, Luigi, Bruno Di Stefano, et Luciano Di Croce. 2013. « Polycomb Complexes in Stem Cells and Embryonic Development ». *Development (Cambridge, England)* 140 (12): 2525-34. <https://doi.org/10.1242/dev.091553>.

- Amano Tomokazu, Tani Tetsuya, Kato Yoko, et Tsunoda Yukio. 2001. « Mouse cloned from embryonic stem (ES) cells synchronized in metaphase with nocodazole ». *Journal of Experimental Zoology* 289 (2): 139-45. [https://doi.org/10.1002/1097-010X\(20010201\)289:2<139::AID-JEZ7>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/1097-010X(20010201)289:2<139::AID-JEZ7>3.0.CO;2-6).
- Andres, Lissette M., Ian W. Blong, Angela C. Evans, Neil G. Rumachik, Teppei Yamaguchi, Nam D. Pham, Pamela Thompson, Jennifer J. Kohler, et Carolyn R. Bertozzi. 2017. « Chemical Modulation of Protein O-GlcNAcylation via OGT Inhibition Promotes Human Neural Cell Differentiation ». *ACS Chemical Biology*, mai. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00232>.
- Anglana, Mauro, Françoise Apiou, Aaron Bensimon, et Michelle Debatisse. 2003. « Dynamics of DNA Replication in Mammalian Somatic Cells: Nucleotide Pool Modulates Origin Choice and Interorigin Spacing ». *Cell* 114 (3): 385-94.
- Aparicio, O. M., D. M. Weinstein, et S. P. Bell. 1997. « Components and Dynamics of DNA Replication Complexes in *S. Cerevisiae*: Redistribution of MCM Proteins and Cdc45p during S Phase ». *Cell* 91 (1): 59-69.
- Aprelikova, O., Y. Xiong, et E. T. Liu. 1995. « Both P16 and P21 Families of Cyclin-Dependent Kinase (CDK) Inhibitors Block the Phosphorylation of Cyclin-Dependent Kinases by the CDK-Activating Kinase ». *The Journal of Biological Chemistry* 270 (31): 18195-97.
- Arnold, C. S., G. V. Johnson, R. N. Cole, D. L. Dong, M. Lee, et G. W. Hart. 1996. « The Microtubule-Associated Protein Tau Is Extensively Modified with O-Linked N-Acetylglucosamine ». *The Journal of Biological Chemistry* 271 (46): 28741-44.

## B

- Bailey, Rachael, Sara Priego Moreno, et Agnieszka Gambus. 2015. « Termination of DNA Replication Forks: "Breaking up Is Hard to Do" ». *Nucleus (Austin, Tex.)* 6 (3): 187-96. <https://doi.org/10.1080/19491034.2015.1035843>.
- Balakrishnan, Lata, Jason W. Gloor, et Robert A. Bambara. 2010. « RECONSTITUTION OF EUKARYOTIC LAGGING STRAND DNA REPLICATION ». *Methods (San Diego, Calif.)* 51 (3): 347-57. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2010.02.017>.
- Baldin, V., J. Lukas, M. J. Marcote, M. Pagano, et G. Draetta. 1993. « Cyclin D1 Is a Nuclear Protein Required for Cell Cycle Progression in G1 ». *Genes & Development* 7 (5): 812-21.
- Baldini, Steffi F., Agata Steenackers, Stéphanie Olivier-Van Stichelen, Anne-Marie Mir, Marlène Mortuaire, Tony Lefebvre, et Céline Guinez. 2016. « Glucokinase Expression Is Regulated by Glucose through O-GlcNAc Glycosylation ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 478 (2): 942-48. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.08.056>.
- Banerjee, Partha S., Gerald W. Hart, et Jin Won Cho. 2013. « Chemical Approaches to Study O-GlcNAcylation ». *Chemical Society Reviews* 42 (10): 4345-57. <https://doi.org/10.1039/c2cs35412h>.
- Banerjee, Partha S., Olof Lagerlöf, et Gerald W. Hart. 2016. « Roles of O-GlcNAc in Chronic Diseases of Aging ». *Molecular Aspects of Medicine*, mai. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.05.005>.
- Banerjee, Partha S., Junfeng Ma, et Gerald W. Hart. 2015. « Diabetes-Associated Dysregulation of O-GlcNAcylation in Rat Cardiac Mitochondria ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (19): 6050-55. <https://doi.org/10.1073/pnas.1424017112>.
- Banerjee, Sulagna, Phillips W. Robbins, et John Samuelson. 2009. « Molecular Characterization of Nucleocytoplasmic O-GlcNAc Transferases of *Giardia Lamblia* and *Cryptosporidium Parvum* ». *Glycobiology* 19 (4): 331-36. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwn107>.
- Barth, A. I., A. L. Pollack, Y. Altschuler, K. E. Mostov, et W. J. Nelson. 1997. « NH2-Terminal Deletion of Beta-Catenin Results in Stable Colocalization of Mutant Beta-Catenin with Adenomatous

- Polyposis Coli Protein and Altered MDCK Cell Adhesion ». *The Journal of Cell Biology* 136 (3): 693-706.
- Bell, Stephen D., et Michael R. Botchan. 2013. « The Minichromosome Maintenance Replicative Helicase ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (11): a012807. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012807>.
- Bell, Stephen P. 2017. « Rethinking Origin Licensing ». *ELife* 6 (janvier). <https://doi.org/10.7554/eLife.24052>.
- Bell, Stephen P., et Jon M. Kaguni. 2013. « Helicase Loading at Chromosomal Origins of Replication ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (6). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010124>.
- Bell, Stephen P., et Karim Labib. 2016. « Chromosome Duplication in *Saccharomyces Cerevisiae* ». *Genetics* 203 (3): 1027-67. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.186452>.
- Benko, D. M., R. S. Haltiwanger, G. W. Hart, et W. Gibson. 1988. « Virion Basic Phosphoprotein from Human Cytomegalovirus Contains O-Linked N-Acetylglucosamine ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (8): 2573-77.
- Besnard, Emilie, Amélie Babled, Laure Lapasset, Ollivier Milhavet, Hugues Parrinello, Christelle Dantec, Jean-Michel Marin, et Jean-Marc Lemaître. 2012. « Unraveling Cell Type-Specific and Reprogrammable Human Replication Origin Signatures Associated with G-Quadruplex Consensus Motifs ». *Nature Structural & Molecular Biology* 19 (8): 837-44. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2339>.
- Beurel, Eleonore, Steven F. Grieco, et Richard S. Jope. 2015. « Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases ». *Pharmacology & therapeutics* 0 (avril): 114-31. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.11.016>.
- Bhuiyan, Tanja, Patrice Waridel, Vaibhav Kapuria, Vincent Zoete, et Winship Herr. 2015. « Distinct OGT-Binding Sites Promote HCF-1 Cleavage ». *PLoS One* 10 (8): e0136636. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136636>.
- Black, Joshua C., Andrew Allen, Capucine Van Rechem, Emily Forbes, Michelle Longworth, Katrin Tschöp, Claire Rinehart, et al. 2010. « Conserved Antagonism between JMJD2A/KDM4A and HP1 $\gamma$  during Cell Cycle Progression ». *Molecular Cell* 40 (5): 736-48. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.11.008>.
- Blomberg, I., et I. Hoffmann. 1999. « Ectopic Expression of Cdc25A Accelerates the G(1)/S Transition and Leads to Premature Activation of Cyclin E- and Cyclin A-Dependent Kinases ». *Molecular and Cellular Biology* 19 (9): 6183-94.
- Blow, J. Julian, et Peter J. Gillespie. 2008. « Replication Licensing and Cancer--a Fatal Entanglement? ». *Nature Reviews. Cancer* 8 (10): 799-806. <https://doi.org/10.1038/nrc2500>.
- Bochman, Matthew L., Stephen P. Bell, et Anthony Schwacha. 2008. « Subunit Organization of Mcm2-7 and the Unequal Role of Active Sites in ATP Hydrolysis and Viability ». *Molecular and Cellular Biology* 28 (19): 5865-73. <https://doi.org/10.1128/MCB.00161-08>.
- Bochman, Matthew L., et Anthony Schwacha. 2009. « The Mcm Complex: Unwinding the Mechanism of a Replicative Helicase ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 73 (4): 652-83. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00019-09>.
- 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 (19): 5092-5104. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.19.5092>.
- Borodkin, Vladimir S., Marianne Schimpl, Mehmet Gundogdu, Karim Rafie, Helge C. Dorfmueller, David A. Robinson, et Daan M. F. van Aalten. 2014. « Bisubstrate UDP-Peptide Conjugates as Human O-GlcNAc Transferase Inhibitors ». *The Biochemical Journal* 457 (3): 497-502. <https://doi.org/10.1042/BJ20131272>.
- Bouazzi, Habib, Gaetan Lesca, Carlos Trujillo, Mohammad Khalid Alwasiyah, et Arnold Munnich. 2015. « Nonsyndromic X-Linked Intellectual Deficiency in Three Brothers with a Novel MED12 Missense Mutation [c.5922G>T (p.Glu1974His)] ». *Clinical Case Reports* 3 (7): 604-9. <https://doi.org/10.1002/ccr3.301>.

- Bousset, K., et J. F. Diffley. 1998. « The Cdc7 Protein Kinase Is Required for Origin Firing during S Phase ». *Genes & Development* 12 (4): 480-90.
- Boyce, Michael, Isaac S. Carrico, Anjali S. Ganguli, Seok-Ho Yu, Matthew J. Hangauer, Sarah C. Hubbard, Jennifer J. Kohler, et Carolyn R. Bertozzi. 2011. « Metabolic Cross-Talk Allows Labeling of O-Linked Beta-N-Acetylglucosamine-Modified Proteins via the N-Acetylgalactosamine Salvage Pathway ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (8): 3141-46. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010045108>.
- Brake, Tiffany, Joseph P. Connor, Daniel G. Petereit, et Paul F. Lambert. 2003. « Comparative Analysis of Cervical Cancer in Women and in a Human Papillomavirus-Transgenic Mouse Model: Identification of Minichromosome Maintenance Protein 7 as an Informative Biomarker for Human Cervical Cancer ». *Cancer Research* 63 (23): 8173-80.
- Breton, Mathilde, Christophe Mariller, Monique Benaïssa, Katia Caillaux, Edith Browaeys, Maryse Masson, Jean-Pierre Vilain, Joël Mazurier, et Annick Pierce. 2004. « Expression of Delta-Lactoferrin Induces Cell Cycle Arrest ». *Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine* 17 (3): 325-29.
- Brewster, Aaron S., Ganggang Wang, Xian Yu, William B. Greenleaf, José María Carazo, Matthew Tjajadi, Michael G. Klein, et Xiaojiang S. Chen. 2008. « Crystal Structure of a Near-Full-Length Archaeal MCM: Functional Insights for an AAA+ Hexameric Helicase ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (51): 20191-96. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808037105>.
- Bruck, Irina, et Daniel Kaplan. 2009. « Dbf4-Cdc7 Phosphorylation of Mcm2 Is Required for Cell Growth ». *The Journal of Biological Chemistry* 284 (42): 28823-31. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.039123>.
- Bruck, Irina, et Daniel L. Kaplan. 2015a. « The Dbf4-Cdc7 Kinase Promotes Mcm2-7 Ring Opening to Allow for Single-Stranded DNA Extrusion and Helicase Assembly ». *The Journal of Biological Chemistry* 290 (2): 1210-21. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.608232>.
- . 2015b. « Conserved Mechanism for Coordinating Replication Fork Helicase Assembly with Phosphorylation of the Helicase ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (36): 11223-28. <https://doi.org/10.1073/pnas.1509608112>.
- . 2015c. « The Replication Initiation Protein Sld3/Treslin Orchestrates the Assembly of the Replication Fork Helicase during S Phase ». *The Journal of Biological Chemistry* 290 (45): 27414-24. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.688424>.
- Bullen, John W., Jeremy L. Balsbaugh, Dipanjan Chanda, Jeffrey Shabanowitz, Donald F. Hunt, Dietbert Neumann, et Gerald 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 (15): 10592-606. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.523068>.
- Burgers, P. M. 1991. « Saccharomyces Cerevisiae Replication Factor C. II. Formation and Activity of Complexes with the Proliferating Cell Nuclear Antigen and with DNA Polymerases Delta and Epsilon ». *The Journal of Biological Chemistry* 266 (33): 22698-706.
- Burgers, Peter M. J., et Thomas A. Kunkel. 2017. « Eukaryotic DNA Replication Fork ». *Annual Review of Biochemistry* 86 (juin): 417-38. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-044709>.
- Burke, Jason R., Alison J. Deshong, Jeffrey G. Pelton, et Seth M. Rubin. 2010. « Phosphorylation-Induced Conformational Changes in the Retinoblastoma Protein Inhibit E2F Transactivation Domain Binding ». *The Journal of Biological Chemistry* 285 (21): 16286-93. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.108167>.
- Buse, Maria G., Katherine A. Robinson, Bess A. Marshall, Richard C. Hresko, et Mike M. Mueckler. 2002. « Enhanced O-GlcNAc Protein Modification Is Associated with Insulin Resistance in GLUT1-Overexpressing Muscles ». *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 283 (2): E241-250. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00060.2002>.
- Butkinaree, Chutikarn, Win D. Cheung, Sungjin Park, Kyoungsook Park, Megan Barber, et Gerald W. Hart. 2008. « Characterization of Beta-N-Acetylglucosaminidase Cleavage by Caspase-3

during Apoptosis ». *The Journal of Biological Chemistry* 283 (35): 23557-66.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M804116200>.

Butkinaree, Chutikarn, Kyoungsook Park, et Gerald W. Hart. 2010. « O-Linked Beta-N-Acetylglucosamine (O-GlcNAc): Extensive Crosstalk with Phosphorylation to Regulate Signaling and Transcription in Response to Nutrients and Stress ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1800 (2): 96-106. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.07.018>.

## C

Caldwell, S. A., S. R. Jackson, K. S. Shahriari, T. P. Lynch, G. Sethi, S. Walker, K. Vosseller, et M. J. Reginato. 2010. « Nutrient Sensor O-GlcNAc Transferase Regulates Breast Cancer Tumorigenesis through Targeting of the Oncogenic Transcription Factor FoxM1 ». *Oncogene* 29 (19): 2831-42. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.41>.

Calzada, A., M. Sánchez, E. Sánchez, et A. Bueno. 2000. « The Stability of the Cdc6 Protein Is Regulated by Cyclin-Dependent Kinase/Cyclin B Complexes in *Saccharomyces Cerevisiae* ». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (13): 9734-41.

Cao, Lihuan, Fang Chen, Xianmei Yang, Weijin Xu, Jun Xie, et Long Yu. 2014. « Phylogenetic Analysis of CDK and Cyclin Proteins in Premetazoan Lineages ». *BMC Evolutionary Biology* 14 (janvier): 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-14-10>.

Cao, Weiqian, Jing Cao, Jiangming Huang, Jun Yao, Guoquan Yan, Haoqi Xu, et Pengyuan Yang. 2013. « Discovery and Confirmation of O-GlcNAcylated Proteins in Rat Liver Mitochondria by Combination of Mass Spectrometry and Immunological Methods ». *PLoS One* 8 (10): e76399. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076399>.

Capotosti, Francesca, Sophie Guernier, Fabienne Lammers, Patrice Waridel, Yong Cai, Jingji Jin, Joan W. Conaway, Ronald C. Conaway, et Winship Herr. 2011. « O-GlcNAc Transferase Catalyzes Site-Specific Proteolysis of HCF-1 ». *Cell* 144 (3): 376-88. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.12.030>.

Carpenter, C. L., K. R. Auger, M. Chanudhuri, M. Yoakim, B. Schaffhausen, S. Shoelson, et L. C. Cantley. 1993. « Phosphoinositide 3-Kinase Is Activated by Phosphopeptides That Bind to the SH2 Domains of the 85-KDa Subunit ». *The Journal of Biological Chemistry* 268 (13): 9478-83.

Cartwright, P., H. Müller, C. Wagener, K. Holm, et K. Helin. 1998. « E2F-6: A Novel Member of the E2F Family Is an Inhibitor of E2F-Dependent Transcription ». *Oncogene* 17 (5): 611-23. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201975>.

Carvalho, Kátia C., Isabela W. Cunha, Rafael M. Rocha, Fernanda R. Ayala, Mariana M. Cajaíba, Maria D. Begnami, Rafael S. Vilela, Geise R. Paiva, Rodrigo G. Andrade, et Fernando A. Soares. 2011. « GLUT1 Expression in Malignant Tumors and Its Use as an Immunodiagnostic Marker ». *Clinics (Sao Paulo, Brazil)* 66 (6): 965-72.

Cetinbaş, Naniye, Matthew S. Macauley, Keith A. Stubbs, Robert Drapala, et David J. Vocadlo. 2006. « Identification of Asp174 and Asp175 as the Key Catalytic Residues of Human O-GlcNAcase by Functional Analysis of Site-Directed Mutants ». *Biochemistry* 45 (11): 3835-44. <https://doi.org/10.1021/bi052370b>.

Chaiyawat, Parunya, Pukkavadee Netsirisawan, Jisnuson Svasti, et Voraratt Champattanachai. 2014. « Aberrant O-GlcNAcylated Proteins: New Perspectives in Breast and Colorectal Cancer ». *Frontiers in Endocrinology* 5: 193. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00193>.

Chalkley, Robert J., et A. L. Burlingame. 2003. « Identification of Novel Sites of O-N-Acetylglucosamine Modification of Serum Response Factor Using Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry ». *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 2 (3): 182-90. <https://doi.org/10.1074/mcp.M300027-MCP200>.

Chalkley, Robert J., Agnes Thalhammer, Ralf Schoepfer, et A. L. Burlingame. 2009. « Identification of Protein O-GlcNAcylation Sites Using Electron Transfer Dissociation Mass Spectrometry on

- Native Peptides ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (22): 8894-99. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900288106>.
- Champattanachai, Voraratt, Pukkavadee Netsirisawan, Parunya Chaiyawat, Thanong Phueaouan, Ratana Charoenwattanasatien, Daranee Chokchaichamnankit, Phaibul Punyarit, Chantragan Srisomsap, et Jisnusun Svasti. 2013. « Proteomic Analysis and Abrogated Expression of O-GlcNAcylated Proteins Associated with Primary Breast Cancer ». *Proteomics* 13 (14): 2088-99. <https://doi.org/10.1002/pmic.201200126>.
- Charoensuksai, Purin, Peter Kuhn, Lu Wang, Nathan Sherer, et Wei Xu. 2015. « O-GlcNAcylation of Co-Activator-Associated Arginine Methyltransferase 1 Regulates Its Protein Substrate Specificity ». *The Biochemical Journal* 466 (3): 587-99. <https://doi.org/10.1042/BJ20141072>.
- Charych, Deborah H., Mazie Coyne, Asha Yabannavar, Jamie Narberes, Sylvia Chow, Marco Wallroth, Cynthia Shafer, et Annette O. Walter. 2008. « Inhibition of Cdc7/Dbf4 Kinase Activity Affects Specific Phosphorylation Sites on MCM2 in Cancer Cells ». *Journal of Cellular Biochemistry* 104 (3): 1075-86. <https://doi.org/10.1002/jcb.21698>.
- Chen, Mengfei, Jingjing Huang, Xuejiao Yang, Bingqian Liu, Weizhong Zhang, Li Huang, Fei Deng, et al. 2012. « Serum Starvation Induced Cell Cycle Synchronization Facilitates Human Somatic Cells Reprogramming ». *PLoS ONE* 7 (4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028203>.
- Chen, Qiang, Yibin Chen, Chunjing Bian, Ryoji Fujiki, et Xiaochun Yu. 2013. « TET2 Promotes Histone O-GlcNAcylation during Gene Transcription ». *Nature* 493 (7433): 561-64. <https://doi.org/10.1038/nature11742>.
- Chen, Yaohui, Yu Li, Jianfei Xue, Aihua Gong, Guanzhen Yu, Aidong Zhou, Kangyu Lin, et al. 2016. « Wnt-Induced Deubiquitination FoxM1 Ensures Nucleus  $\beta$ -Catenin Transactivation ». *The EMBO Journal* 35 (6): 668-84. <https://doi.org/10.15252/embj.201592810>.
- Cheng, A., K. E. Ross, P. Kaldis, et M. J. Solomon. 1999. « Dephosphorylation of Cyclin-Dependent Kinases by Type 2C Protein Phosphatases ». *Genes & Development* 13 (22): 2946-57.
- Cheng, X., et G. W. Hart. 2000. « Glycosylation of the Murine Estrogen Receptor-Alpha ». *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 75 (2-3): 147-58.
- Cheung, Chantal Hoi Yin, Chia-Lang Hsu, Kai-Pu Chen, Siao-Ting Chong, Chang-Hsun Wu, Hsuan-Cheng Huang, et Hsueh-Fen Juan. 2017. « MCM2-Regulated Functional Networks in Lung Cancer by Multi-Dimensional Proteomic Approach ». *Scientific Reports* 7 (1): 13302. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13440-x>.
- Cheung, Win D., et Gerald W. Hart. 2008. « AMP-Activated Protein Kinase and P38 MAPK Activate O-GlcNAcylation of Neuronal Proteins during Glucose Deprivation ». *The Journal of Biological Chemistry* 283 (19): 13009-20. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801222200>.
- Cheung, Win D., Kaoru Sakabe, Michael P. Housley, Wagner B. Dias, et Gerald 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 (49): 33935-41. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806199200>.
- Chi, Yong, Markus Welcker, Asli A. Hizli, Jeffrey J. Posakony, Ruedi Aebersold, et Bruce E. Clurman. 2008. « Identification of CDK2 Substrates in Human Cell Lysates ». *Genome Biology* 9 (10): R149. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-10-r149>.
- Cho, Won-Ho, Young-Joo Lee, Soo-Im Kong, Jerard Hurwitz, et Joon-Kyu Lee. 2006. « CDC7 Kinase Phosphorylates Serine Residues Adjacent to Acidic Amino Acids in the Minichromosome Maintenance 2 Protein ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (31): 11521-26. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604990103>.
- Chong, J. P., P. Thömmes, et J. J. Blow. 1996. « The Role of MCM/P1 Proteins in the Licensing of DNA Replication ». *Trends in Biochemical Sciences* 21 (3): 102-6.
- Chou, T. Y., C. V. Dang, et 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 (10): 4417-21.
- Chou, T. Y., et G. W. Hart. 2001. « O-Linked N-Acetylglucosamine and Cancer: Messages from the Glycosylation of c-Myc ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 491: 413-18.



- Chou, T. Y., G. W. Hart, et 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 (32): 18961-65.
- Choudhary, Chunaram, Chanchal Kumar, Florian Gnad, Michael L. Nielsen, Michael Rehman, Tobias C. Walther, Jesper V. Olsen, et Matthias Mann. 2009. « Lysine Acetylation Targets Protein Complexes and Co-Regulates Major Cellular Functions ». *Science (New York, N.Y.)* 325 (5942): 834-40. <https://doi.org/10.1126/science.1175371>.
- Chow, J. P. H., et R. Y. C. Poon. 2013. « The CDK1 Inhibitory Kinase MYT1 in DNA Damage Checkpoint Recovery ». *Oncogene* 32 (40): 4778-88. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.504>.
- Choy, Bonnie, Amy LaLonde, Jianwen Que, Tongtong Wu, et Zhongren Zhou. 2016. « MCM4 and MCM7, Potential Novel Proliferation Markers, Significantly Correlated with Ki-67, Bmi1, and Cyclin E Expression in Esophageal Adenocarcinoma, Squamous Cell Carcinoma, and Precancerous Lesions ». *Human Pathology* 57 (novembre): 126-35. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2016.07.013>.
- Chu, Chi-Shuen, Pei-Wen Lo, Yi-Hsien Yeh, Pang-Hung Hsu, Shih-Huan Peng, Yu-Ching Teng, Ming-Lun Kang, Chi-Huey Wong, et Li-Jung Juan. 2014. « O-GlcNAcylation Regulates EZH2 Protein Stability and Function ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (4): 1355-60. <https://doi.org/10.1073/pnas.1323226111>.
- Chu, Tzong-Shinn, Ming-Shiou Wu, Kwan-Dun Wu, et Bor-Shen Hsieh. 2007. « Endothelin-1 Activates MAPKs and Modulates Cell Cycle Proteins in OKP Cells ». *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan Yi Zhi* 106 (4): 273-80. [https://doi.org/10.1016/S0929-6646\(09\)60252-7](https://doi.org/10.1016/S0929-6646(09)60252-7).
- Chuang, Li-Chiou, Leonardo K. Teixeira, James A. Wohlschlegel, Martha Henze, John R. Yates, Juan Méndez, et Steven I. Reed. 2009. « Phosphorylation of Mcm2 by Cdc7 Promotes Pre-Replication Complex Assembly during Cell-Cycle Re-Entry ». *Molecular Cell* 35 (2): 206-16. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.06.014>.
- Chuh, Kelly N., Anna R. Batt, Balyn W. Zaro, Narek Darabedian, Nicholas P. Marotta, Caroline K. Brennan, Arya Amirhekmat, et Matthew R. Pratt. 2017. « The New Chemical Reporter 6-Alkynyl-6-Deoxy-GlcNAc Reveals O-GlcNAc Modification of the Apoptotic Caspases That Can Block the Cleavage/Activation of Caspase-8 ». *Journal of the American Chemical Society* 139 (23): 7872-85. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b02213>.
- Cioci, Gianluca, Edward P. Mitchell, Valerie Chazalet, Henri Debray, Stefan Oscarson, Martina Lahmann, Catherine Gautier, Christelle Breton, Serge Perez, et Anne Imberty. 2006. « Beta-Propeller Crystal Structure of Psathyrella Velutina Lectin: An Integrin-like Fungal Protein Interacting with Monosaccharides and Calcium ». *Journal of Molecular Biology* 357 (5): 1575-91. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.01.066>.
- Clark, Peter M., Jessica F. Dweck, Daniel E. Mason, Courtenay R. Hart, Suzanne B. Buck, Eric C. Peters, Brian J. Agnew, et Linda C. Hsieh-Wilson. 2008. « Direct In-Gel Fluorescence Detection and Cellular Imaging of O-GlcNAc-Modified Proteins ». *Journal of the American Chemical Society* 130 (35): 11576-77. <https://doi.org/10.1021/ja8030467>.
- Clark, Peter M., Jessica E. Rexach, et Linda C. Hsieh-Wilson. 2013. « Visualization of O-GlcNAc Glycosylation Stoichiometry and Dynamics using Resolvable Poly(ethylene glycol) Mass Tags ». *Current protocols in chemical biology* 5 (4): 281-302. <https://doi.org/10.1002/9780470559277.ch130153>.
- Clevers, Hans. 2006. « Wnt/Beta-Catenin Signaling in Development and Disease ». *Cell* 127 (3): 469-80. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.018>.
- Comer, F. I., et G. W. Hart. 2001. « Reciprocity between O-GlcNAc and O-Phosphate on the Carboxyl Terminal Domain of RNA Polymerase II ». *Biochemistry* 40 (26): 7845-52.
- Comer, F. I., K. Vosseller, L. Wells, M. A. Accavitti, et G. W. Hart. 2001. « Characterization of a Mouse Monoclonal Antibody Specific for O-Linked N-Acetylglucosamine ». *Analytical Biochemistry* 293 (2): 169-77. <https://doi.org/10.1006/abio.2001.5132>.

- Comtesse, N., E. Maldener, et E. Meese. 2001. « Identification of a Nuclear Variant of MGEA5, a Cytoplasmic Hyaluronidase and a Beta-N-Acetylglucosaminidase ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 283 (3): 634-40.  
<https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4815>.
- Cordes, V., I. Waizenegger, et G. Krohne. 1991. « Nuclear Pore Complex Glycoprotein P62 of *Xenopus Laevis* and Mouse: CDNA Cloning and Identification of Its Glycosylated Region ». *European Journal of Cell Biology* 55 (1): 31-47.
- Costa, Alessandro, Ivar Ilves, Nele Tamberg, Tatjana Petojevic, Eva Nogales, Michael R. Botchan, et James M. Berger. 2011. « The Structural Basis for MCM2-7 Helicase Activation by GINS and Cdc45 ». *Nature Structural & Molecular Biology* 18 (4): 471-77.  
<https://doi.org/10.1038/nsmb.2004>.
- Costa, Alessandro, Ludovic Renault, Paolo Swuec, Tatjana Petojevic, James J. Pesavento, Ivar Ilves, Kirsty MacLellan-Gibson, Roland A. Fleck, Michael R. Botchan, et James M. Berger. 2014. « DNA Binding Polarity, Dimerization, and ATPase Ring Remodeling in the CMG Helicase of the Eukaryotic Replisome ». *ELife* 3: e03273. <https://doi.org/10.7554/eLife.03273>.
- Coster, Gideon, Jordi Frigola, Fabienne Beuron, Edward P. Morris, et John F. X. Diffley. 2014. « Origin Licensing Requires ATP Binding and Hydrolysis by the MCM Replicative Helicase ». *Molecular Cell* 55 (5): 666-77. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.06.034>.
- Coué, M., F. Amariglio, D. Maiorano, S. Bocquet, et M. Méchali. 1998. « Evidence for Different MCM Subcomplexes with Differential Binding to Chromatin in *Xenopus* ». *Experimental Cell Research* 245 (2): 282-89. <https://doi.org/10.1006/excr.1998.4271>.
- Courbet, Sylvain, Sophie Gay, Nausica Arnoult, Gerd Wronka, Mauro Anglana, Olivier Brison, et Michelle Debatisse. 2008. « Replication Fork Movement Sets Chromatin Loop Size and Origin Choice in Mammalian Cells ». *Nature* 455 (7212): 557-60.  
<https://doi.org/10.1038/nature07233>.
- Coverley, D., C. Pelizon, S. Trewick, et R. A. Laskey. 2000. « Chromatin-Bound Cdc6 Persists in S and G2 Phases in Human Cells, While Soluble Cdc6 Is Destroyed in a Cyclin A-Cdk2 Dependent Process ». *Journal of Cell Science* 113 ( Pt 11) (juin): 1929-38.
- Crevel, G., A. Ivetic, K. Ohno, M. Yamaguchi, et S. Cotterill. 2001. « Nearest Neighbour Analysis of MCM Protein Complexes in *Drosophila Melanogaster* ». *Nucleic Acids Research* 29 (23): 4834-42.
- Crosio, Claudia, Gian Maria Fimia, Romain Loury, Masashi Kimura, Yukio Okano, Hongyi Zhou, Subrata Sen, C. David Allis, et Paolo Sassone-Corsi. 2002. « Mitotic Phosphorylation of Histone H3: Spatio-Temporal Regulation by Mammalian Aurora Kinases ». *Molecular and Cellular Biology* 22 (3): 874-85.
- Cuvier, Olivier, Malik Lutzmann, et Marcel Méchali. 2006. « ORC Is Necessary at the Interphase-to-Mitosis Transition to Recruit Cdc2 Kinase and Disassemble RPA Foci ». *Current Biology: CB* 16 (5): 516-23. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.01.059>.

## D

- D'Angiolella, Vincenzo, Valerio Donato, Sangeetha Vijayakumar, Anita Saraf, Laurence Florens, Michael P. Washburn, Brian Dynlacht, et Michele Pagano. 2010. « SCF(Cyclin F) Controls Centrosome Homeostasis and Mitotic Fidelity through CP110 Degradation ». *Nature* 466 (7302): 138-42. <https://doi.org/10.1038/nature09140>.
- Daou, Salima, Nazar Mashtalir, Ian Hammond-Martel, Helen Pak, Helen Yu, Guangchao Sui, Jodi L. Vogel, Thomas M. Kristie, et El Bachir Affar. 2011. « Crosstalk between O-GlcNAcylation and Proteolytic Cleavage Regulates the Host Cell Factor-1 Maturation Pathway ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (7): 2747-52.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1013822108>.

- Darzynkiewicz, Zbigniew, Elzbieta Bedner, et Piotr Smolewski. 2001. « Flow cytometry in analysis of cell cycle and apoptosis ». *Seminars in Hematology* 38 (2): 179-93.  
[https://doi.org/10.1016/S0037-1963\(01\)90051-4](https://doi.org/10.1016/S0037-1963(01)90051-4).
- Darzynkiewicz, Zbigniew, H. Dorota Halicka, Hong Zhao, et Monika Podhorecka. 2011. « Cell Synchronization by Inhibitors of DNA Replication Induces Replication Stress and DNA Damage Response: Analysis by Flow Cytometry ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 761: 85-96. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-182-6\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-182-6_6).
- Davey, Megan J., Chiara Indiani, et Mike O'Donnell. 2003. « Reconstitution of the Mcm2-7p Heterohexamer, Subunit Arrangement, and ATP Site Architecture ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (7): 4491-99. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210511200>.
- Davis, L. I., et G. Blobel. 1987. « Nuclear Pore Complex Contains a Family of Glycoproteins That Includes P62: Glycosylation through a Previously Unidentified Cellular Pathway ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (21): 7552-56.
- Davis, P. K., A. Ho, et S. F. Dowdy. 2001. « Biological Methods for Cell-Cycle Synchronization of Mammalian Cells ». *BioTechniques* 30 (6): 1322-26, 1328, 1330-31.
- Deegan, Tom D., Joseph Tp Yeeles, et John Fx Diffley. 2016. « Phosphopeptide Binding by Sld3 Links Dbf4-Dependent Kinase to MCM Replicative Helicase Activation ». *The EMBO Journal* 35 (9): 961-73. <https://doi.org/10.15252/embj.201593552>.
- DeGregori, J., G. Leone, A. Miron, L. Jakoi, et J. R. Nevins. 1997. « Distinct Roles for E2F Proteins in Cell Growth Control and Apoptosis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (14): 7245-50.
- Dehennaut, Vanessa, Xavier Hanouille, Jean-François Bodart, Jean-Pierre Vilain, Jean-Claude Michalski, Isabelle Landrieu, Guy Lippens, et Tony Lefebvre. 2008. « Microinjection of Recombinant O-GlcNAc Transferase Potentiates Xenopus Oocytes M-Phase Entry ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 369 (2): 539-46.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.02.063>.
- Dehennaut, Vanessa, Tony Lefebvre, Yves Leroy, Jean-Pierre Vilain, Jean-Claude Michalski, et Jean-François Bodart. 2009. « Survey of O-GlcNAc Level Variations in Xenopus Laevis from Oogenesis to Early Development ». *Glycoconjugate Journal* 26 (3): 301-11.  
<https://doi.org/10.1007/s10719-008-9166-0>.
- Dehennaut, Vanessa, Tony Lefebvre, Chantal Sellier, Yves Leroy, Benjamin Gross, Suzanne Walker, René Cacan, Jean-Claude Michalski, Jean-Pierre Vilain, et Jean-François Bodart. 2007. « O-Linked N-Acetylglucosaminyltransferase Inhibition Prevents G2/M Transition in Xenopus Laevis Oocytes ». *The Journal of Biological Chemistry* 282 (17): 12527-36.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M700444200>.
- Dehennaut, Vanessa, Marie-Christine Slomianny, Adeline Page, Anne-Sophie Vercoutter-Edouart, Catherine Jessus, Jean-Claude Michalski, Jean-Pierre Vilain, Jean-François Bodart, et Tony Lefebvre. 2008. « Identification of Structural and Functional O-Linked N-Acetylglucosamine-Bearing Proteins in Xenopus Laevis Oocyte ». *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 7 (11): 2229-45. <https://doi.org/10.1074/mcp.M700494-MCP200>.
- Delgado, S., M. Gómez, A. Bird, et F. Antequera. 1998. « Initiation of DNA Replication at CpG Islands in Mammalian Chromosomes ». *The EMBO Journal* 17 (8): 2426-35.  
<https://doi.org/10.1093/emboj/17.8.2426>.
- Delmolino, L. M., P. Saha, et A. Dutta. 2001. « Multiple Mechanisms Regulate Subcellular Localization of Human CDC6 ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (29): 26947-54.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M101870200>.
- DePamphilis, Melvin L. 2003. « The "ORC Cycle": A Novel Pathway for Regulating Eukaryotic DNA Replication ». *Gene* 310 (mai): 1-15.
- DePamphilis, Melvin L., J. Julian Blow, Soma Ghosh, Tapas Saha, Kohji Noguchi, et Alex Vassilev. 2006. « Regulating the Licensing of DNA Replication Origins in Metazoa ». *Current Opinion in Cell Biology* 18 (3): 231-39. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2006.04.001>.

- Deplus, Rachel, Benjamin Delatte, Marie K. Schwinn, Matthieu Defrance, Jacqui Méndez, Nancy Murphy, Mark A. Dawson, et al. 2013. « TET2 and TET3 Regulate GlcNAcylation and H3K4 Methylation through OGT and SET1/COMPASS ». *The EMBO Journal* 32 (5): 645-55. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.357>.
- Desai, D., Y. Gu, et D. O. Morgan. 1992. « Activation of Human Cyclin-Dependent Kinases in Vitro ». *Molecular Biology of the Cell* 3 (5): 571-82.
- Devaskar, S. U., et D. E. deMello. 1996. « Cell-Specific Localization of Glucose Transporter Proteins in Mammalian Lung ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 81 (12): 4373-78. <https://doi.org/10.1210/jcem.81.12.8954044>.
- Dewar, James M., Emily Low, Matthias Mann, Markus Räschele, et Johannes C. Walter. 2017. « CRL2Lrr1 Promotes Unloading of the Vertebrate Replisome from Chromatin during Replication Termination ». *Genes & Development* 31 (3): 275-90. <https://doi.org/10.1101/gad.291799.116>.
- Dias, Wagner B., Win D. Cheung, et Gerald W. Hart. 2012. « O-GlcNAcylation of Kinases ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 422 (2): 224-28. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.04.124>.
- Ding, Xiaodan, Wei Jiang, Peipei Zhou, Lulu Liu, Xiaoling Wan, Xiujie Yuan, Xizi Wang, et al. 2015. « 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): e0145023. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145023>.
- Dong, D. L., et 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 (30): 19321-30.
- D'Onofrio, M., C. M. Starr, M. K. Park, G. D. Holt, R. S. Haltiwanger, G. W. Hart, et J. A. Hanover. 1988. « Partial cDNA Sequence Encoding a Nuclear Pore Protein Modified by O-Linked N-Acetylglucosamine ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (24): 9595-99.
- Dorfmueller, Helge C., Vladimir S. Borodkin, David E. Blair, Shalini Pathak, Iva Navratilova, et Daan M. F. van Aalten. 2011. « Substrate and Product Analogues as Human O-GlcNAc Transferase Inhibitors ». *Amino Acids* 40 (3): 781-92. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0688-y>.
- Dorfmueller, Helge C., Vladimir S. Borodkin, Marianne Schimpl, Sharon M. Shepherd, Natalia A. Shpiro, et Daan 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 (51): 16484-85. <https://doi.org/10.1021/ja066743n>.
- Downing, James R. 2011. « A New FOXO Pathway Required for Leukemogenesis ». *Cell* 146 (5): 669-70. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.019>.
- Drougat, Ludivine, Stéphanie Olivier-Van Stichelen, Marlène Mortuaire, François Foulquier, Anne-Sophie Lacoste, Jean-Claude Michalski, Tony Lefebvre, et Anne-Sophie 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 (12): 1839-48. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.08.024>.
- Duggirala, R., J. Blangero, L. Almasy, T. D. Dyer, K. L. Williams, R. J. Leach, P. O'Connell, et M. P. Stern. 1999. « Linkage of Type 2 Diabetes Mellitus and of Age at Onset to a Genetic Location on Chromosome 10q in Mexican Americans ». *American Journal of Human Genetics* 64 (4): 1127-40.

## E

- Egloff, Sylvain, et Shona Murphy. 2008. « Cracking the RNA Polymerase II CTD Code ». *Trends in Genetics: TIG* 24 (6): 280-88. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2008.03.008>.

- Ekholm-Reed, Susanna, Juan Méndez, Donato Tedesco, Anders Zetterberg, Bruce Stillman, et Steven I. Reed. 2004. « Deregulation of Cyclin E in Human Cells Interferes with Prereplication Complex Assembly ». *The Journal of Cell Biology* 165 (6): 789-800.  
<https://doi.org/10.1083/jcb.200404092>.
- Elsasser, S., Y. Chi, P. Yang, et J. L. Campbell. 1999. « Phosphorylation Controls Timing of Cdc6p Destruction: A Biochemical Analysis ». *Molecular Biology of the Cell* 10 (10): 3263-77.
- Evans, T., E. T. Rosenthal, J. Youngblom, D. Distel, et T. Hunt. 1983. « Cyclin: A Protein Specified by Maternal mRNA in Sea Urchin Eggs That Is Destroyed at Each Cleavage Division ». *Cell* 33 (2): 389-96.
- Ewen, M. E., H. K. Sluss, C. J. Sherr, H. Matsushime, J. Kato, et D. M. Livingston. 1993. « Functional Interactions of the Retinoblastoma Protein with Mammalian D-Type Cyclins ». *Cell* 73 (3): 487-97.

## F

- Fagotto, F., U. Glück, et B. M. Gumbiner. 1998. « Nuclear Localization Signal-Independent and Importin/Karyopherin-Independent Nuclear Import of Beta-Catenin ». *Current Biology: CB* 8 (4): 181-90.
- Falaschi, Arturo, Gulnara Abdurashidova, Oscar Sandoval, Sorina Radulescu, Giuseppe Biamonti, et Silvano Riva. 2007. « Molecular and Structural Transactions at Human DNA Replication Origins ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 6 (14): 1705-12.  
<https://doi.org/10.4161/cc.6.14.4495>.
- Fallahi, Emma, Niamh A. O'Driscoll, et David Matallanas. 2016. « The MST/Hippo Pathway and Cell Death: A Non-Canonical Affair ». *Genes* 7 (6). <https://doi.org/10.3390/genes7060028>.
- Fardini, Yann, Vanessa Dehennaut, Tony Lefebvre, et Tarik Issad. 2013. « O-GlcNAcylation: A New Cancer Hallmark? ». *Frontiers in Endocrinology* 4: 99.  
<https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00099>.
- Fernández-Cid, Alejandra, Alberto Riera, Silvia Tognetti, M. Carmen Herrera, Stefan Samel, Cecile Evrin, Christian Winkler, Emanuela Gardenal, Stefan Uhle, et Christian Speck. 2013. « An ORC/Cdc6/MCM2-7 Complex Is Formed in a Multistep Reaction to Serve as a Platform for MCM Double-Hexamer Assembly ». *Molecular Cell* 50 (4): 577-88.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.03.026>.
- Ferrer, C. M., T. Y. Lu, Z. A. Bacigalupa, C. D. Katsetos, D. A. Sinclair, et M. J. Reginato. 2017. « O-GlcNAcylation Regulates Breast Cancer Metastasis via SIRT1 Modulation of FOXM1 Pathway ». *Oncogene* 36 (4): 559-69. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.228>.
- Ferrer, Christina M., Thomas P. Lynch, Valerie L. Sodi, John N. Falcone, Luciana P. Schwab, Danielle L. Peacock, David J. Vocadlo, Tiffany N. Seagroves, et Mauricio J. Reginato. 2014. « O-GlcNAcylation Regulates Cancer Metabolism and Survival Stress Signaling via Regulation of the HIF-1 Pathway ». *Molecular Cell* 54 (5): 820-31.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.04.026>.
- Ferrer, Christina M., Valerie L. Sodi, et Mauricio J. Reginato. 2016. « O-GlcNAcylation in Cancer Biology: Linking Metabolism and Signaling ». *Journal of Molecular Biology* 428 (16): 3282-94.  
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.05.028>.
- Finlay, D. R., D. D. Newmeyer, T. M. Price, et D. J. Forbes. 1987. « Inhibition of in Vitro Nuclear Transport by a Lectin That Binds to Nuclear Pores ». *The Journal of Cell Biology* 104 (2): 189-200.
- Fisher, R. P., et D. O. Morgan. 1994. « A Novel Cyclin Associates with MO15/CDK7 to Form the CDK-Activating Kinase ». *Cell* 78 (4): 713-24.
- Fong, Jerry J., Brenda L. Nguyen, Robert Bridger, Estela E. Medrano, Lance Wells, Shujuan Pan, et Richard N. Sifers. 2012. «  $\beta$ -N-Acetylglucosamine (O-GlcNAc) Is a Novel Regulator of Mitosis-

- Specific Phosphorylations on Histone H3 ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (15): 12195-203. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.315804>.
- Force, T., J. V. Bonventre, G. Heidecker, U. Rapp, J. Avruch, et J. M. Kyriakis. 1994. « Enzymatic Characteristics of the C-Raf-1 Protein Kinase ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (4): 1270-74.
- Forte, Gabriella M. A., Martin R. Pool, et Colin J. Stirling. 2011. « N-Terminal Acetylation Inhibits Protein Targeting to the Endoplasmic Reticulum ». *PLoS Biology* 9 (5): e1001073. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001073>.
- Fragkos, Michalis, Olivier Ganier, Philippe Coulombe, et Marcel Méchali. 2015. « DNA Replication Origin Activation in Space and Time ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 16 (6): 360-74. <https://doi.org/10.1038/nrm4002>.
- Francis, Laura I., John C. W. Randell, Thomas J. Takara, Lilen Uchima, et Stephen P. Bell. 2009. « Incorporation into the Prereplicative Complex Activates the Mcm2–7 Helicase for Cdc7–Dbf4 Phosphorylation ». *Genes & Development* 23 (5): 643-54. <https://doi.org/10.1101/gad.1759609>.
- Frigola, Jordi, Jun He, Kerstin Kinkelin, Valerie E. Pye, Ludovic Renault, Max E. Douglas, Dirk Remus, Peter Cherepanov, Alessandro Costa, et John F. X. Diffley. 2017. « Cdt1 Stabilizes an Open MCM Ring for Helicase Loading ». *Nature Communications* 8 (juin): 15720. <https://doi.org/10.1038/ncomms15720>.
- Frigola, Jordi, Dirk Remus, Amina Mehanna, et John F. X. Diffley. 2013. « ATPase-Dependent Quality Control of DNA Replication Origin Licensing ». *Nature* 495 (7441): 339-43. <https://doi.org/10.1038/nature11920>.
- Fu, Yu V., Hasan Yardimci, David T. Long, The Vinh Ho, Angelo Guainazzi, Vladimir P. Bermudez, Jerard Hurwitz, Antoine van Oijen, Orlando D. Schärer, et Johannes C. Walter. 2011. « Selective Bypass of a Lagging Strand Roadblock by the Eukaryotic Replicative DNA Helicase ». *Cell* 146 (6): 931-41. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.045>.
- Fujiki, Ryoji, Waka Hashiba, Hiroki Sekine, Atsushi Yokoyama, Toshihiro Chikanishi, Saya Ito, Yuuki Imai, et al. 2011. « GlcNAcylation of Histone H2B Facilitates Its Monoubiquitination ». *Nature* 480 (7378): 557-60. <https://doi.org/10.1038/nature10656>.
- Fujita, M., T. Kiyono, Y. Hayashi, et M. Ishibashi. 1997. « In Vivo Interaction of Human MCM Heterohexameric Complexes with Chromatin. Possible Involvement of ATP ». *The Journal of Biological Chemistry* 272 (16): 10928-35.
- Fujita, Naoya, Saori Sato, Kazuhiro Katayama, et Takashi Tsuruo. 2002. « Akt-Dependent Phosphorylation of P27Kip1 Promotes Binding to 14-3-3 and Cytoplasmic Localization ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (32): 28706-13. <https://doi.org/10.1074/jbc.M203668200>.
- Fukui, Tomoyuki, Kazumi Yamauchi, Taketo Muroya, Masahiro Akiyama, Hisaji Maki, Akio Sugino, et Shou Waga. 2004. « Distinct Roles of DNA Polymerases Delta and Epsilon at the Replication Fork in Xenopus Egg Extracts ». *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 9 (3): 179-91.
- Furuno, N., N. den Elzen, et J. Pines. 1999. « Human Cyclin A Is Required for Mitosis until Mid Prophase ». *The Journal of Cell Biology* 147 (2): 295-306.

## G

- Gagnon, Jessica, Salima Daou, Natalia Zamorano, Nicholas V. G. Iannantuono, Ian Hammond-Martel, Nazar Mashtalir, Eric Bonneil, Hugo Wurtele, Pierre Thibault, et El Bachir Affar. 2015. « Undetectable Histone O-GlcNAcylation in Mammalian Cells ». *Epigenetics* 10 (8): 677-91. <https://doi.org/10.1080/15592294.2015.1060387>.

- Gambus, Agnieszka, Richard C. Jones, Alberto Sanchez-Diaz, Masato Kanemaki, Frederick van Deursen, Ricky D. Edmondson, et Karim Labib. 2006. « GINS Maintains Association of Cdc45 with MCM in Replisome Progression Complexes at Eukaryotic DNA Replication Forks ». *Nature Cell Biology* 8 (4): 358-66. <https://doi.org/10.1038/ncb1382>.
- Gao, Y., L. Wells, F. I. Comer, G. J. Parker, et 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 (13): 9838-45. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010420200>.
- Geiss-Friedlander, Ruth, et Frauke Melchior. 2007. « Concepts in Sumoylation: A Decade On ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 8 (12): 947-56. <https://doi.org/10.1038/nrm2293>.
- Giaginis, Constantinos, Maria Georgiadou, Konstantina Dimakopoulou, Gerasimos Tsourouflis, Elisavet Gatzidou, Gregorios Kouraklis, et Stamatios Theocharis. 2009. « Clinical Significance of MCM-2 and MCM-5 Expression in Colon Cancer: Association with Clinicopathological Parameters and Tumor Proliferative Capacity ». *Digestive Diseases and Sciences* 54 (2): 282-91. <https://doi.org/10.1007/s10620-008-0305-z>.
- Giaginis, Constantinos, Stephanie Vgenopoulou, Philippe Vielh, et Stamatios Theocharis. 2010. « MCM Proteins as Diagnostic and Prognostic Tumor Markers in the Clinical Setting ». *Histology and Histopathology* 25 (3): 351-70.
- Gialeli, Chrisostomi, Achilleas D. Theocharis, et Nikos K. Karamanos. 2011. « Roles of Matrix Metalloproteinases in Cancer Progression and Their Pharmacological Targeting ». *The FEBS Journal* 278 (1): 16-27. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07919.x>.
- Gillespie, Peter J., Agnieszka Gambus, et J. Julian Blow. 2012. « Preparation and Use of Xenopus Egg Extracts to Study DNA Replication and Chromatin Associated Proteins ». *Methods (San Diego, Calif.)* 57 (2): 203-13. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.03.029>.
- Gladden, Andrew B., et J. Alan Diehl. 2003. « The Cyclin D1-Dependent Kinase Associates with the Pre-Replication Complex and Modulates RB.MCM7 Binding ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (11): 9754-60. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212088200>.
- Gloster, Tracey M., et David J. Vocadlo. 2010. « Mechanism, Structure, and Inhibition of O-GlcNAc Processing Enzymes ». *Current Signal Transduction Therapy* 5 (1): 74-91.
- Gloster, Tracey M., Wesley F. Zandberg, Julia E. Heinonen, David L. Shen, Lehua Deng, et David J. Vocadlo. 2011. « Hijacking a Biosynthetic Pathway Yields a Glycosyltransferase Inhibitor within Cells ». *Nature Chemical Biology* 7 (3): 174-81. <https://doi.org/10.1038/nchembio.520>.
- Gómez, Eliana B., Michael G. Catlett, et Susan L. Forsburg. 2002. « Different Phenotypes in Vivo Are Associated with ATPase Motif Mutations in Schizosaccharomyces Pombe Minichromosome Maintenance Proteins ». *Genetics* 160 (4): 1305-18.
- Gong, Cheng-Xin, Fei Liu, et Khalid Iqbal. 2016. « O-GlcNAcylation: A Regulator of Tau Pathology and Neurodegeneration ». *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, avril. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.02.011>.
- Gozuacik, Devrim, Mounia Chami, David Lagorce, Jamila Faivre, Yoshiaki Murakami, Olivier Poch, Esther Biermann, Rolf Knippers, Christian Bréchet, et Patrizia Paterlini-Bréchet. 2003. « Identification and Functional Characterization of a New Member of the Human Mcm Protein Family: HMcm8 ». *Nucleic Acids Research* 31 (2): 570-79.
- Grigorian, Ani, Sung-Uk Lee, Wenqiang Tian, I.-Ju Chen, Guoyan Gao, Richard Mendelsohn, James W. Dennis, et Michael Demetriou. 2007. « Control of T Cell-Mediated Autoimmunity by Metabolite Flux to N-Glycan Biosynthesis ». *The Journal of Biological Chemistry* 282 (27): 20027-35. <https://doi.org/10.1074/jbc.M701890200>.
- Gu, Bo, et Wei-Guo Zhu. 2012. « Surf the Post-Translational Modification Network of P53 Regulation ». *International Journal of Biological Sciences* 8 (5): 672-84. <https://doi.org/10.7150/ijbs.4283>.
- Gu, Yuanyuan, Sudharsana R. Ande, et Suresh Mishra. 2011. « Altered O-GlcNAc Modification and Phosphorylation of Mitochondrial Proteins in Myoblast Cells Exposed to High Glucose ».

*Archives of Biochemistry and Biophysics* 505 (1): 98-104.

<https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.09.024>.

- Gu, Yuchao, Jiangang Gao, Cuifang Han, Xinling Zhang, Haiyan Liu, Leina Ma, Xiaoqing Sun, et Wengong Yu. 2014. « O-GlcNAcylation Is Increased in Prostate Cancer Tissues and Enhances Malignancy of Prostate Cancer Cells ». *Molecular Medicine Reports* 10 (2): 897-904. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2269>.
- Gu, Yuchao, Wenyi Mi, Yuqing Ge, Haiyan Liu, Qiong Fan, Cuifang Han, Jing Yang, Feng Han, Xinzhi Lu, et Wengong Yu. 2010. « GlcNAcylation Plays an Essential Role in Breast Cancer Metastasis ». *Cancer Research* 70 (15): 6344-51. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1887>.
- Guinez, Céline, Anne-Marie Mir, Vanessa Dehennaut, René Cacan, Anne Harduin-Lepers, Jean-Claude Michalski, et Tony Lefebvre. 2008. « Protein Ubiquitination Is Modulated by O-GlcNAc Glycosylation ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22 (8): 2901-11. <https://doi.org/10.1096/fj.07-102509>.
- Gundogdu, Mehmet, Salomé Llabrés, Andrii Gorelik, Andrew T. Ferenbach, Ulrich Zachariae, et Daan M. F. van Aalten. 2018. « The O-GlcNAc Transferase Intellectual Disability Mutation L254F Distorts the TPR Helix ». *Cell Chemical Biology*, mars. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2018.03.004>.
- Guo, Liwen, et Lisong Teng. 2015. « YAP/TAZ for Cancer Therapy: Opportunities and Challenges (Review) ». *International Journal of Oncology* 46 (4): 1444-52. <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.2877>.
- Gurcel, Caroline, Anne-Sophie Vercoutter-Edouart, Catherine Fonbonne, Marlène Mortuaire, Arnaud Salvador, Jean-Claude Michalski, et Jérôme Lemoine. 2008. « Identification of New O-GlcNAc Modified Proteins Using a Click-Chemistry-Based Tagging ». *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 390 (8): 2089-97. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-1950-y>.

## H

- Ha, Changhoon, et Kihong Lim. 2015. « O-GlcNAc Modification of Sp3 and Sp4 Transcription Factors Negatively Regulates Their Transcriptional Activities ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 467 (2): 341-47. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.09.155>.
- Ha, Jacqueline R., Li Hao, Geetha Venkateswaran, Yu Hao Huang, Elizabeth Garcia, et Sujata Persad. 2014. «  $\beta$ -Catenin Is O-GlcNAc Glycosylated at Serine 23: Implications for  $\beta$ -Catenin's Subcellular Localization and Transactivator Function ». *Experimental Cell Research* 321 (2): 153-66. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.11.021>.
- Hagting, A., M. Jackman, K. Simpson, et J. Pines. 1999. « Translocation of Cyclin B1 to the Nucleus at Prophase Requires a Phosphorylation-Dependent Nuclear Import Signal ». *Current Biology: CB* 9 (13): 680-89.
- Hahne, Hannes, et Bernhard Kuster. 2011. « A Novel Two-Stage Tandem Mass Spectrometry Approach and Scoring Scheme for the Identification of O-GlcNAc Modified Peptides ». *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 22 (5): 931-42. <https://doi.org/10.1007/s13361-011-0107-y>.
- Hahne, Hannes, Nadine Sobotzki, Tamara Nyberg, Dominic Helm, Vladimir S. Borodkin, Daan M. F. van Aalten, Brian Agnew, et Bernhard Kuster. 2013. « Proteome Wide Purification and Identification of O-GlcNAc-Modified Proteins Using Click Chemistry and Mass Spectrometry ». *Journal of Proteome Research* 12 (2): 927-36. <https://doi.org/10.1021/pr300967y>.
- Halim, Adnan, Ida Signe Bohse Larsen, Patrick Neubert, Hiren Jitendra Joshi, Bent Larsen Petersen, Sergey Y. Vakhrushev, Sabine Strahl, et Henrik Clausen. 2015. « Discovery of a Nucleocytoplasmic O-Mannose Glycoproteome in Yeast ». *Proceedings of the National*



- Academy of Sciences of the United States of America* 112 (51): 15648-53.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1511743112>.
- Haltiwanger, R. S., M. A. Blomberg, et 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 (13): 9005-13.
- Haltiwanger, R. S., K. Grove, et G. A. Philipsberg. 1998. « Modulation of O-Linked N-Acetylglucosamine Levels on Nuclear and Cytoplasmic Proteins in Vivo Using the Peptide O-GlcNAc-Beta-N-Acetylglucosaminidase Inhibitor O-(2-Acetamido-2-Deoxy-D-Glucopyranosylidene)Amino-N-Phenylcarbamate ». *The Journal of Biological Chemistry* 273 (6): 3611-17.
- Haltiwanger, R. S., G. D. Holt, et 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 (5): 2563-68.
- Han, I., et J. E. Kudlow. 1997. « Reduced O Glycosylation of Sp1 Is Associated with Increased Proteasome Susceptibility ». *Molecular and Cellular Biology* 17 (5): 2550-58.
- Han, Xiangzi, Aaron Aslanian, Kang Fu, Toshiya Tsuji, et Youwei Zhang. 2014. « The Interaction between Checkpoint Kinase 1 (Chk1) and the Minichromosome Maintenance (MCM) Complex Is Required for DNA Damage-Induced Chk1 Phosphorylation ». *The Journal of Biological Chemistry* 289 (35): 24716-23. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.575035>.
- Han, Xiangzi, Franklin Mayca Pozo, Jacob N. Wisotsky, Benlian Wang, James W. Jacobberger, et Youwei Zhang. 2015. « Phosphorylation of Minichromosome Maintenance 3 (MCM3) by Checkpoint Kinase 1 (Chk1) Negatively Regulates DNA Replication and Checkpoint Activation ». *The Journal of Biological Chemistry* 290 (19): 12370-78.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M114.621532>.
- Hannon, G. J., D. Casso, et D. Beach. 1994. « KAP: A Dual Specificity Phosphatase That Interacts with Cyclin-Dependent Kinases ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (5): 1731-35.
- Hanover, J. A., C. K. Cohen, M. C. Willingham, et 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 (20): 9887-94.
- Hanover, J. A., Z. Lai, G. Lee, W. A. Lubas, et S. M. Sato. 1999. « Elevated O-Linked N-Acetylglucosamine Metabolism in Pancreatic Beta-Cells ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 362 (1): 38-45. <https://doi.org/10.1006/abbi.1998.1016>.
- Hanover, John A. 2011. « A Versatile Sugar Transferase Makes the Cut ». *Cell* 144 (3): 321-23.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.01.025>.
- Hanover, John A., Michele E. Forsythe, Patrick T. Hennessey, Thomas M. Brodigan, Dona C. Love, Gilbert Ashwell, et Michael Krause. 2005. « A Caenorhabditis Elegans Model of Insulin Resistance: Altered Macronutrient Storage and Dauer Formation in an OGT-1 Knockout ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (32): 11266-71. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408771102>.
- Hanover, John A., Michael W. Krause, et Dona C. Love. 2010. « The Hexosamine Signaling Pathway: O-GlcNAc Cycling in Feast or Famine ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1800 (2): 80-95.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.07.017>.
- Hanover, John A., Song Yu, William B. Lubas, Sang Hoon Shin, Maria Ragano-Caracciola, Jarema Kochran, et Dona C. Love. 2003. « Mitochondrial and Nucleocytoplasmic Isoforms of O-Linked GlcNAc Transferase Encoded by a Single Mammalian Gene ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 409 (2): 287-97.
- Harashima, Hirofumi, Nico Dismeyer, et Arp Schnittger. 2013. « Cell Cycle Control across the Eukaryotic Kingdom ». *Trends in Cell Biology* 23 (7): 345-56.  
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.03.002>.

- Hardivillé, Stéphan, Esthelle Hoedt, Christophe Mariller, Monique Benaïssa, et Annick Pierce. 2010. « O-GlcNAcylation/Phosphorylation Cycling at Ser10 Controls Both Transcriptional Activity and Stability of Delta-Lactoferrin ». *The Journal of Biological Chemistry* 285 (25): 19205-18. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.080572>.
- Harosh-Davidovich, Shani Ben, et Isam Khalaila. 2018a. « O-GlcNAcylation Affects  $\beta$ -Catenin and E-Cadherin Expression, Cell Motility and Tumorigenicity of Colorectal Cancer ». *Experimental Cell Research*, janvier. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2018.01.024>.
- . 2018b. « O-GlcNAcylation Affects  $\beta$ -Catenin and E-Cadherin Expression, Cell Motility and Tumorigenicity of Colorectal Cancer ». *Experimental Cell Research* 364 (1): 42-49. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2018.01.024>.
- Harper, Jane V. 2005. « Synchronization of Cell Populations in G1/S and G2/M Phases of the Cell Cycle ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 296: 157-66.
- Hart, Gerald W., Chad Slawson, Genaro Ramirez-Correa, et Olof Lagerlof. 2011. « Cross Talk between O-GlcNAcylation and Phosphorylation: Roles in Signaling, Transcription, and Chronic Disease ». *Annual Review of Biochemistry* 80: 825-58. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060608-102511>.
- Hartweck, Lynn M., Ruth K. Genger, William M. Grey, et Neil E. Olszewski. 2006. « SECRET AGENT and SPINDLY Have Overlapping Roles in the Development of Arabidopsis Thaliana L. Heyn ». *Journal of Experimental Botany* 57 (4): 865-75. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj071>.
- Hartweck, Lynn M., Cheryl L. Scott, et Neil 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 (3): 1279-91.
- Harwood, Katryn R., et John A. Hanover. 2014. « Nutrient-Driven O-GlcNAc Cycling - Think Globally but Act Locally ». *Journal of Cell Science* 127 (Pt 9): 1857-67. <https://doi.org/10.1242/jcs.113233>.
- Hashimoto, Y., K. Kohri, Y. Kaneko, H. Morisaki, T. Kato, K. Ikeda, et M. Nakanishi. 1998. « Critical Role for the 310 Helix Region of P57(Kip2) in Cyclin-Dependent Kinase 2 Inhibition and Growth Suppression ». *The Journal of Biological Chemistry* 273 (26): 16544-50.
- Hastings, Nicholas B., Xiaohai Wang, Lixin Song, Brent D. Butts, Diane Grotz, Richard Hargreaves, J. Fred Hess, et al. 2017. « Inhibition of O-GlcNAcase Leads to Elevation of O-GlcNAc Tau and Reduction of Tauopathy and Cerebrospinal Fluid Tau in RTg4510 Mice ». *Molecular Neurodegeneration* 12 (1): 39. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0181-0>.
- Havens, Courtney G., et Johannes C. Walter. 2009. « Docking of a Specialized PIP Box onto Chromatin-Bound PCNA Creates a Degron for the Ubiquitin Ligase CRL4Cdt2 ». *Molecular Cell* 35 (1): 93-104. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.05.012>.
- Heese-Peck, A., R. N. Cole, O. N. Borkhsenius, G. W. Hart, et N. V. Raikhel. 1995. « Plant Nuclear Pore Complex Proteins Are Modified by Novel Oligosaccharides with Terminal N-Acetylglucosamine ». *The Plant Cell* 7 (9): 1459-71. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.9.1459>.
- Heese-Peck, A., et N. V. Raikhel. 1998. « A Glycoprotein Modified with Terminal N-Acetylglucosamine and Localized at the Nuclear Rim Shows Sequence Similarity to Aldose-1-Epimerases ». *The Plant Cell* 10 (4): 599-612.
- Hein, Marco Y., Nina C. Hubner, Ina Poser, Jürgen Cox, Nagarjuna Nagaraj, Yusuke Toyoda, Igor A. Gak, et al. 2015. « A Human Interactome in Three Quantitative Dimensions Organized by Stoichiometries and Abundances ». *Cell* 163 (3): 712-23. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.053>.
- Heller, Ryan C., Sukhyun Kang, Wendy M. Lam, Shuyan Chen, Clara S. Chan, et Stephen P. Bell. 2011. « Eukaryotic Origin-Dependent DNA Replication in Vitro Reveals Sequential Action of DDK and S-CDK Kinases ». *Cell* 146 (1): 80-91. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.012>.
- Hennessy, K. M., A. Lee, E. Chen, et D. Botstein. 1991. « A Group of Interacting Yeast DNA Replication Genes ». *Genes & Development* 5 (6): 958-69.
- Herzog, Rebecca, Thorsten O. Bender, Andreas Vychytil, Katarzyna Bialas, Christoph Aufricht, et Klaus Kratochwill. 2014. « Dynamic O-Linked N-Acetylglucosamine Modification of Proteins Affects

- Stress Responses and Survival of Mesothelial Cells Exposed to Peritoneal Dialysis Fluids ». *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 25 (12): 2778-88.  
<https://doi.org/10.1681/ASN.2013101128>.
- Hesketh, Emma L., Richard P. Parker-Manuel, Yuriy Chaban, Rabab Satti, Dawn Coverley, Elena V. Orlova, et James P. J. Chong. 2015. « DNA Induces Conformational Changes in a Recombinant Human Minichromosome Maintenance Complex ». *The Journal of Biological Chemistry* 290 (12): 7973-79. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.622738>.
- Hiramoto, K., T. Fujino, et K. Kikugawa. 1996. « DNA Strand Cleavage by Tumor-Inhibiting Antibiotic 6-Diazo-5-Oxo-L-Norleucine ». *Mutation Research* 360 (2): 95-100.
- Hirschberg, C. B., et M. D. Snider. 1987. « Topography of Glycosylation in the Rough Endoplasmic Reticulum and Golgi Apparatus ». *Annual Review of Biochemistry* 56: 63-87.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.bi.56.070187.000431>.
- Holt, G. D., R. S. Haltiwanger, C. R. Torres, et G. W. Hart. 1987. « Erythrocytes Contain Cytoplasmic Glycoproteins. O-Linked GlcNAc on Band 4.1 ». *The Journal of Biological Chemistry* 262 (31): 14847-50.
- Holt, G. D., et G. W. Hart. 1986. « The Subcellular Distribution of Terminal N-Acetylglucosamine Moieties. Localization of a Novel Protein-Saccharide Linkage, O-Linked GlcNAc ». *The Journal of Biological Chemistry* 261 (17): 8049-57.
- Holt, G. D., C. M. Snow, A. Senior, R. S. Haltiwanger, L. Gerace, et G. W. Hart. 1987. « Nuclear Pore Complex Glycoproteins Contain Cytoplasmically Disposed O-Linked N-Acetylglucosamine ». *The Journal of Cell Biology* 104 (5): 1157-64.
- Honda, Reiko, Roman Körner, et Erich A. Nigg. 2003. « Exploring the Functional Interactions between Aurora B, INCENP, and Survivin in Mitosis ». *Molecular Biology of the Cell* 14 (8): 3325-41.  
<https://doi.org/10.1091/mbc.E02-11-0769>.
- Honeycutt, K. A., Z. Chen, M. I. Koster, M. Miers, J. Nuchtern, J. Hicks, D. R. Roop, et J. M. Shohet. 2006. « Deregulated Minichromosomal Maintenance Protein MCM7 Contributes to Oncogene Driven Tumorigenesis ». *Oncogene* 25 (29): 4027-32.  
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209435>.
- Hu, Yong, Jorge Suarez, Eduardo Fricovsky, Hong Wang, Brian T. Scott, Sunia A. Trauger, Wenlong Han, Ying Hu, Mary O. Oyeleye, et Wolfgang H. Dillmann. 2009. « Increased Enzymatic O-GlcNAcylation of Mitochondrial Proteins Impairs Mitochondrial Function in Cardiac Myocytes Exposed to High Glucose ». *The Journal of Biological Chemistry* 284 (1): 547-55.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M808518200>.
- Hubbi, Maimon E., Weibo Luo, Jin H. Baek, et Gregg L. Semenza. 2011. « MCM Proteins Are Negative Regulators of Hypoxia-Inducible Factor 1 ». *Molecular Cell* 42 (5): 700-712.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.03.029>.
- Hurford, R. K., D. Cobrinik, M. H. Lee, et N. Dyson. 1997. « PRB and P107/P130 Are Required for the Regulated Expression of Different Sets of E2F Responsive Genes ». *Genes & Development* 11 (11): 1447-63.
- Hwang, In Sun, Sang Uk Woo, Ji-Woong Park, Seung Ki Lee, et Hyungshin Yim. 2014. « Two Nuclear Export Signals of Cdc6 Are Differentially Associated with CDK-Mediated Phosphorylation Residues for Cytoplasmic Translocation ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1843 (2): 223-33.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.10.024>.
- Ibarra, Arkaitz, Etienne Schwob, et Juan Méndez. 2008. « Excess MCM Proteins Protect Human Cells from Replicative Stress by Licensing Backup Origins of Replication ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (26): 8956-61.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0803978105>.

- Ilves, Ivar, Tatjana Petojevic, James J. Pesavento, et Michael R. Botchan. 2010. « Activation of the MCM2-7 Helicase by Association with Cdc45 and GINS Proteins ». *Molecular Cell* 37 (2): 247-58. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.12.030>.
- Inoue, Yosuke, Kazumasa Moriwaki, Yasuhiro Ueda, Toshihisa Takeuchi, Kazuhide Higuchi, et Michio Asahi. 2018. « Elevated O-GlcNAcylation stabilizes FOXM1 by its reduced degradation through GSK-3 $\beta$  inactivation in a human gastric carcinoma cell line, MKN45 cells ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 495 (2): 1681-87. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.11.179>.
- Ishida, Noriko, Taichi Hara, Takumi Kamura, Minoru Yoshida, Keiko Nakayama, et Keiichi I. Nakayama. 2002. « Phosphorylation of P27Kip1 on Serine 10 Is Required for Its Binding to CRM1 and Nuclear Export ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (17): 14355-58. <https://doi.org/10.1074/jbc.C100762200>.
- Ishimi, Y. 1997. « A DNA Helicase Activity Is Associated with an MCM4, -6, and -7 Protein Complex ». *The Journal of Biological Chemistry* 272 (39): 24508-13.
- Ishimi, Y., et Y. Komamura-Kohno. 2001. « Phosphorylation of Mcm4 at Specific Sites by Cyclin-Dependent Kinase Leads to Loss of Mcm4,6,7 Helicase Activity ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (37): 34428-33. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104480200>.
- Ishimi, Y., Y. Komamura-Kohno, K. Arai, et H. Masai. 2001. « Biochemical Activities Associated with Mouse Mcm2 Protein ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (46): 42744-52. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106861200>.
- Isono, Takahiro. 2011. « O-GlcNAc-Specific Antibody CTD110.6 Cross-React with N-GlcNAc2-Modified Proteins Induced under Glucose Deprivation ». *PLoS One* 6 (4): e18959. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018959>.
- Itkonen, Harri M., Saurabh S. Gorad, Damien Y. Duveau, Sara E. S. Martin, Anna Barkovskaya, Tone F. Bathen, Siver A. Moestue, et Ian G. Mills. 2016. « Inhibition of O-GlcNAc Transferase Activity Reprograms Prostate Cancer Cell Metabolism ». *Oncotarget* 7 (11): 12464-76. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7039>.
- Itkonen, Harri M., Sarah Minner, Ingrid J. Guldvik, Mareike Julia Sandmann, Maria Christina Tsourlakis, Viktor Berge, Aud Svindland, Thorsten Schlomm, et Ian G. Mills. 2013. « O-GlcNAc Transferase Integrates Metabolic Pathways to Regulate the Stability of c-MYC in Human Prostate Cancer Cells ». *Cancer Research* 73 (16): 5277-87. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-0549>.
- Ito, Ryo, Shogo Katsura, Hiroki Shimada, Hikaru Tsuchiya, Masashi Hada, Tomoko Okumura, Akira Sugawara, et Atsushi Yokoyama. 2014. « TET3-OGT Interaction Increases the Stability and the Presence of OGT in Chromatin ». *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 19 (1): 52-65. <https://doi.org/10.1111/gtc.12107>.
- Iyer, Lakshminarayan M., Detlef D. Leipe, Eugene V. Koonin, et L. Aravind. 2004. « Evolutionary History and Higher Order Classification of AAA+ ATPases ». *Journal of Structural Biology* 146 (1-2): 11-31. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2003.10.010>.
- Iyer, N. V., L. E. Kotch, F. Agani, S. W. Leung, E. Laughner, R. H. Wenger, M. Gassmann, et al. 1998. « Cellular and Developmental Control of O<sub>2</sub> Homeostasis by Hypoxia-Inducible Factor 1 Alpha ». *Genes & Development* 12 (2): 149-62.
- Iyer, N. V., S. W. Leung, et G. L. Semenza. 1998. « The Human Hypoxia-Inducible Factor 1alpha Gene: HIF1A Structure and Evolutionary Conservation ». *Genomics* 52 (2): 159-65. <https://doi.org/10.1006/geno.1998.5416>.
- Iyer, Sai Prasad N., et Gerald W. Hart. 2003. « Roles of the Tetratricopeptide Repeat Domain in O-GlcNAc Transferase Targeting and Protein Substrate Specificity ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (27): 24608-16. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300036200>.
- Izawa, Ichiro, et Masaki Inagaki. 2006. « Regulatory Mechanisms and Functions of Intermediate Filaments: A Study Using Site- and Phosphorylation State-Specific Antibodies ». *Cancer Science* 97 (3): 167-74. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2006.00161.x>.

# J

- Jackman, J., et P. M. O'Connor. 2001. « Methods for Synchronizing Cells at Specific Stages of the Cell Cycle ». *Current Protocols in Cell Biology* Chapter 8 (mai): Unit 8.3. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0803s00>.
- Jackman, Mark, Yumiko Kubota, Nicole den Elzen, Anja Hagting, et Jonathon Pines. 2002. « Cyclin A- and Cyclin E-Cdk Complexes Shuttle between the Nucleus and the Cytoplasm ». *Molecular Biology of the Cell* 13 (3): 1030-45. <https://doi.org/10.1091/mbc.01-07-0361>.
- Jackman, Mark, Catherine Lindon, Erich A. Nigg, et Jonathon Pines. 2003. « Active Cyclin B1-Cdk1 First Appears on Centrosomes in Prophase ». *Nature Cell Biology* 5 (2): 143-48. <https://doi.org/10.1038/ncb918>.
- Jackson, S. P., et R. Tjian. 1988. « O-Glycosylation of Eukaryotic Transcription Factors: Implications for Mechanisms of Transcriptional Regulation ». *Cell* 55 (1): 125-33.
- Jacob, Yannick, Elisa Bergamin, Mark T. A. Donoghue, Vanessa Mongeon, Chantal LeBlanc, Philipp Voigt, Charles J. Underwood, et al. 2014. « Selective Methylation of Histone H3 Variant H3.1 Regulates Heterochromatin Replication ». *Science (New York, N.Y.)* 343 (6176): 1249-53. <https://doi.org/10.1126/science.1248357>.
- Jagannathan, Madhav, Tin Nguyen, David Gallo, Niharika Luthra, Grant W. Brown, Vivian Saridakis, et Lori Frappier. 2014. « A Role for USP7 in DNA Replication ». *Molecular and Cellular Biology* 34 (1): 132-45. <https://doi.org/10.1128/MCB.00639-13>.
- Jagannathan, Madhav, Amos M. Sakwe, Tin Nguyen, et Lori Frappier. 2012. « The MCM-Associated Protein MCM-BP Is Important for Human Nuclear Morphology ». *Journal of Cell Science* 125 (Pt 1): 133-43. <https://doi.org/10.1242/jcs.089938>.
- Jentsch, Stefan, et Sebastian Rumpf. 2007. « Cdc48 (P97): A "Molecular Gearbox" in the Ubiquitin Pathway? ». *Trends in Biochemical Sciences* 32 (1): 6-11. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.11.005>.
- Jiang, Shuai, Yijie Chen, Man Wang, Yalin Yin, Yongfu Pan, Bianli Gu, Guojun Yu, et al. 2012. « A Novel Lectin from *Agroclype aegerita* Shows High Binding Selectivity for Terminal N-Acetylglucosamine ». *The Biochemical Journal* 443 (2): 369-78. <https://doi.org/10.1042/BJ20112061>.
- Jínek, Martin, Jan Rehwinkel, Brooke D. Lazarus, Elisa Izaurralde, John A. Hanover, et Elena Conti. 2004. « The Superhelical TPR-Repeat Domain of O-Linked GlcNAc Transferase Exhibits Structural Similarities to Importin Alpha ». *Nature Structural & Molecular Biology* 11 (10): 1001-7. <https://doi.org/10.1038/nsmb833>.
- Johansson, Erik, et Nicholas Dixon. 2013. « Replicative DNA Polymerases ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (6). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012799>.
- Jóźwiak, Paweł, Ewa Forma, Magdalena Bryś, et Anna Krześlak. 2014. « O-GlcNAcylation and Metabolic Reprogramming in Cancer ». *Frontiers in Endocrinology* 5: 145. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00145>.
- Julien, Eric, et Winship Herr. 2003. « Proteolytic Processing Is Necessary to Separate and Ensure Proper Cell Growth and Cytokinesis Functions of HCF-1 ». *The EMBO Journal* 22 (10): 2360-69. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg242>.

# K

- Kaasik, Krista, Saul Kivimäe, Jasmina J. Allen, Robert J. Chalkley, Yong Huang, Kristin Baer, Holger Kissel, et al. 2013. « Glucose Sensor O-GlcNAcylation Coordinates with Phosphorylation to Regulate Circadian Clock ». *Cell Metabolism* 17 (2): 291-302. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.12.017>.
- Kaleem, Afshan, Daniel C. Hoessli, Ishtiaq Ahmad, Evelyne Walker-Nasir, Anwar Nasim, Abdul Rauf Shakoori, et null Nasir-ud-Din. 2008. « Immediate-Early Gene Regulation by Interplay between Different Post-Translational Modifications on Human Histone H3 ». *Journal of Cellular Biochemistry* 103 (3): 835-51. <https://doi.org/10.1002/jcb.21454>.
- Kamura, Takumi, Taichi Hara, Masaki Matsumoto, Noriko Ishida, Fumihiko Okumura, Shigetsugu Hatakeyama, Minoru Yoshida, Keiko Nakayama, et Keiichi I. Nakayama. 2004. « Cytoplasmic Ubiquitin Ligase KPC Regulates Proteolysis of P27(Kip1) at G1 Phase ». *Nature Cell Biology* 6 (12): 1229-35. <https://doi.org/10.1038/ncb1194>.
- Kanemaki, Masato, et Karim Labib. 2006. « Distinct Roles for Sld3 and GINS during Establishment and Progression of Eukaryotic DNA Replication Forks ». *The EMBO Journal* 25 (8): 1753-63. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601063>.
- Kang, Sukhyun, Megan D. Warner, et Stephen P. Bell. 2014. « Multiple Functions for Mcm2-7 ATPase Motifs during Replication Initiation ». *Molecular Cell* 55 (5): 655-65. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.06.033>.
- Kato, J., H. Matsushime, S. W. Hiebert, M. E. Ewen, et C. J. Sherr. 1993. « Direct Binding of Cyclin D to the Retinoblastoma Gene Product (PRb) and PRb Phosphorylation by the Cyclin D-Dependent Kinase CDK4 ». *Genes & Development* 7 (3): 331-42.
- Kayano, T., H. Fukumoto, R. L. Eddy, Y. S. Fan, M. G. Byers, T. B. Shows, et G. I. Bell. 1988. « Evidence for a Family of Human Glucose Transporter-like Proteins. Sequence and Gene Localization of a Protein Expressed in Fetal Skeletal Muscle and Other Tissues ». *The Journal of Biological Chemistry* 263 (30): 15245-48.
- Keembiyehetty, Chithra, Dona C. Love, Katryn R. Harwood, Oksana Gavrilova, Marcella E. Comly, et John A. Hanover. 2015. « Conditional Knock-out Reveals a Requirement for O-Linked N-Acetylglucosaminase (O-GlcNAcase) in Metabolic Homeostasis ». *The Journal of Biological Chemistry* 290 (11): 7097-7113. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.617779>.
- Keembiyehetty, Chithra N., Anna Krzeslak, Dona C. Love, et John A. Hanover. 2011a. « A Lipid-Droplet-Targeted O-GlcNAcase Isoform Is a Key Regulator of the Proteasome ». *Journal of Cell Science* 124 (Pt 16): 2851-60. <https://doi.org/10.1242/jcs.083287>.
- . 2011b. « A Lipid-Droplet-Targeted O-GlcNAcase Isoform Is a Key Regulator of the Proteasome ». *Journal of Cell Science* 124 (Pt 16): 2851-60. <https://doi.org/10.1242/jcs.083287>.
- Kelly, W. G., M. E. Dahmus, et 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 (14): 10416-24.
- Kelly, W. G., et G. W. Hart. 1989. « Glycosylation of Chromosomal Proteins: Localization of O-Linked N-Acetylglucosamine in Drosophila Chromatin ». *Cell* 57 (2): 243-51.
- Khidekel, Nelly, Scott B. Ficarro, Peter M. Clark, Marian C. Bryan, Danielle L. Swaney, Jessica E. Rexach, Yi E. Sun, Joshua J. Coon, Eric C. Peters, et Linda C. Hsieh-Wilson. 2007. « Probing the Dynamics of O-GlcNAc Glycosylation in the Brain Using Quantitative Proteomics ». *Nature Chemical Biology* 3 (6): 339-48. <https://doi.org/10.1038/nchembio881>.
- Kim, Eun J., Benjamin Amorelli, Mohannad Abdo, Craig J. Thomas, Dona C. Love, Spencer Knapp, et John A. Hanover. 2007. « Distinctive Inhibition of O-GlcNAcase Isoforms by an Alpha-GlcNAc

- Thiolsulfonate ». *Journal of the American Chemical Society* 129 (48): 14854-55.  
<https://doi.org/10.1021/ja076038u>.
- Kim, Eun J., Michelle R. Bond, Dona C. Love, et John A. Hanover. 2014. « Chemical Tools to Explore Nutrient-Driven O-GlcNAc Cycling ». *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 49 (4): 327-42. <https://doi.org/10.3109/10409238.2014.931338>.
- Kim, Eun Ju. 2017. « In Vitro Biochemical Assays for O-GlcNAc Processing Enzymes ». *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology*, mai. <https://doi.org/10.1002/cbic.201700138>.
- Kim, Eun Ju, Dae Ook Kang, Dona C. Love, et John A. Hanover. 2006. « Enzymatic Characterization of O-GlcNAcase Isoforms Using a Fluorogenic GlcNAc Substrate ». *Carbohydrate Research* 341 (8): 971-82. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2006.03.004>.
- Kim, Woong, Eric J. Bennett, Edward L. Huttlin, Ailan Guo, Jing Li, Anthony Possemato, Mathew E. Sowa, et al. 2011. « Systematic and Quantitative Assessment of the Ubiquitin-Modified Proteome ». *Molecular Cell* 44 (2): 325-40. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.08.025>.
- Kisner, D. L., R. Catane, et F. M. Muggia. 1980. « The Rediscovery of DON (6-Diazo-5-Oxo-L-Norleucine) ». *Recent Results in Cancer Research. Fortschritte Der Krebsforschung. Progres Dans Les Recherches Sur Le Cancer* 74: 258-63.
- Koepp, D. M., L. K. Schaefer, X. Ye, K. Keyomarsi, C. Chu, J. W. Harper, et S. J. Elledge. 2001. « Phosphorylation-Dependent Ubiquitination of Cyclin E by the SCFFbw7 Ubiquitin Ligase ». *Science (New York, N.Y.)* 294 (5540): 173-77. <https://doi.org/10.1126/science.1065203>.
- Koff, A., A. Giordano, D. Desai, K. Yamashita, J. W. Harper, S. Elledge, T. Nishimoto, D. O. Morgan, B. R. Franza, et J. M. Roberts. 1992. « Formation and Activation of a Cyclin E-Cdk2 Complex during the G1 Phase of the Human Cell Cycle ». *Science (New York, N.Y.)* 257 (5077): 1689-94.
- Koike, Makiko, Shingo Kose, Maiko Furuta, Naoko Taniguchi, Fumihiko Yokoya, Yoshihiro Yoneda, et Naoko Imamoto. 2004. « Beta-Catenin Shows an Overlapping Sequence Requirement but Distinct Molecular Interactions for Its Bidirectional Passage through Nuclear Pores ». *The Journal of Biological Chemistry* 279 (32): 34038-47.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M405821200>.
- Komamura-Kohno, Yuki, Kumiko Karasawa-Shimizu, Takako Saitoh, Michio Sato, Fumio Hanaoka, Shoji Tanaka, et Yukio Ishimi. 2006. « Site-Specific Phosphorylation of MCM4 during the Cell Cycle in Mammalian Cells ». *The FEBS Journal* 273 (6): 1224-39.  
<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05146.x>.
- Konrad, R. J., K. M. Janowski, et J. E. Kudlow. 2000. « Glucose and Streptozotocin Stimulate P135 O-Glycosylation in Pancreatic Islets ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 267 (1): 26-32. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1895>.
- Konrad, R. J., I. Mikolaenko, J. F. Tolar, K. Liu, et J. E. Kudlow. 2001. « The Potential Mechanism of the Diabetogenic Action of Streptozotocin: Inhibition of Pancreatic Beta-Cell O-GlcNAc-Selective N-Acetyl-Beta-D-Glucosaminidase ». *The Biochemical Journal* 356 (Pt 1): 31-41.
- Konrad, Robert J., Fengxue Zhang, John E. Hale, Michael D. Knierman, Gerald W. Becker, et Jeffrey E. Kudlow. 2002. « Alloxan Is an Inhibitor of the Enzyme O-Linked N-Acetylglucosamine Transferase ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 293 (1): 207-12.  
[https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00200-0](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00200-0).
- Koonin, E. V. 1993. « A Common Set of Conserved Motifs in a Vast Variety of Putative Nucleic Acid-Dependent ATPases Including MCM Proteins Involved in the Initiation of Eukaryotic DNA Replication ». *Nucleic Acids Research* 21 (11): 2541-47.
- Kötzler, Miriam P., et Stephen G. Withers. 2016. « Proteolytic Cleavage Driven by Glycosylation ». *The Journal of Biological Chemistry* 291 (1): 429-34. <https://doi.org/10.1074/jbc.C115.698696>.
- Krek, Wilhelm, et James A. DeCaprio. 1995. « [7] Cell synchronization ». In *Methods in Enzymology*, 254:114-24. Oncogene techniques. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(95\)54009-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(95)54009-1).
- Kreppel, L. K., M. A. Blomberg, et 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 (14): 9308-15.

- Kreppel, L. K., et G. W. Hart. 1999. « Regulation of a Cytosolic and Nuclear O-GlcNAc Transferase. Role of the Tetratricopeptide Repeats ». *The Journal of Biological Chemistry* 274 (45): 32015-22.
- Krzeslak, Anna, Lech Pomorski, et Anna Lipinska. 2010. « Elevation of Nucleocytoplasmic Beta-N-Acetylglucosaminidase (O-GlcNAcase) Activity in Thyroid Cancers ». *International Journal of Molecular Medicine* 25 (4): 643-48.
- Kuipers, Marjorie A., Timothy J. Stasevich, Takayo Sasaki, Korey A. Wilson, Kristin L. Hazelwood, James G. McNally, Michael W. Davidson, et David M. Gilbert. 2011. « Highly Stable Loading of Mcm Proteins onto Chromatin in Living Cells Requires Replication to Unload ». *The Journal of Cell Biology* 192 (1): 29-41. <https://doi.org/10.1083/jcb.201007111>.
- Kunitoku, Naoko, Takashi Sasayama, Tomotoshi Marumoto, Dongwei Zhang, Shinobu Honda, Osamu Kobayashi, Katsuyoshi Hatakeyama, Yukitaka Ushio, Hideyuki Saya, et Toru Hirota. 2003. « CENP-A Phosphorylation by Aurora-A in Prophase Is Required for Enrichment of Aurora-B at Inner Centromeres and for Kinetochore Function ». *Developmental Cell* 5 (6): 853-64.
- Kupferschmid, Mattis, Moyira Osny Aquino-Gil, Hosam Shams-Eldin, Jörg Schmidt, Nao Yamakawa, Frédéric Krzewinski, Ralph T. Schwarz, et Tony Lefebvre. 2017. « Identification of O-GlcNAcylated Proteins in Plasmodium Falciparum ». *Malaria Journal* 16 (1): 485. <https://doi.org/10.1186/s12936-017-2131-2>.

## L

- Langan, Thomas J., et Richard C. Chou. 2011. « Synchronization of Mammalian Cell Cultures by Serum Deprivation ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 761: 75-83. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-182-6\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-182-6_5).
- Lanza, Chris, Ee Phie Tan, Zhen Zhang, Miranda Machacek, Amanda E. Brinker, Mizuki Azuma, et Chad Slawson. 2016. « Reduced O-GlcNAcase Expression Promotes Mitotic Errors and Spindle Defects ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 15 (10): 1363-75. <https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1167297>.
- Lazarus, Brooke D., Dona C. Love, et John A. Hanover. 2006. « Recombinant O-GlcNAc Transferase Isoforms: Identification of O-GlcNAcase, Yes Tyrosine Kinase, and Tau as Isoform-Specific Substrates ». *Glycobiology* 16 (5): 415-21. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwj078>.
- Lazarus, Michael B., Jiaoyang Jiang, Tracey M. Gloster, Wesley F. Zandberg, Garrett E. Whitworth, David J. Vocadlo, et Suzanne Walker. 2012. « Structural Snapshots of the Reaction Coordinate for O-GlcNAc Transferase ». *Nature Chemical Biology* 8 (12): 966-68. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1109>.
- Lazarus, Michael B., Jiaoyang Jiang, Vaibhav Kapuria, Tanja Bhuiyan, John Janetzko, Wesley F. Zandberg, David J. Vocadlo, Winship Herr, et Suzanne Walker. 2013. « HCF-1 Is Cleaved in the Active Site of O-GlcNAc Transferase ». *Science (New York, N.Y.)* 342 (6163): 1235-39. <https://doi.org/10.1126/science.1243990>.
- Lazarus, Michael B., Yunsun Nam, Jiaoyang Jiang, Piotr Sliz, et Suzanne Walker. 2011. « Structure of Human O-GlcNAc Transferase and Its Complex with a Peptide Substrate ». *Nature* 469 (7331): 564-67. <https://doi.org/10.1038/nature09638>.
- Lee, J. K., et J. Hurwitz. 2000. « Isolation and Characterization of Various Complexes of the Minichromosome Maintenance Proteins of Schizosaccharomyces Pombe ». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (25): 18871-78. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001118200>.
- Lee, Jong-Sun, et Zhiguo Zhang. 2016. « O-Linked N-Acetylglucosamine Transferase (OGT) Interacts with the Histone Chaperone HIRA Complex and Regulates Nucleosome Assembly and Cellular Senescence ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (23): E3213-3220. <https://doi.org/10.1073/pnas.1600509113>.



- Lee, Thomas N., William E. Alborn, Michael D. Knierman, et Robert J. Konrad. 2006a. « The Diabetogenic Antibiotic Streptozotocin Modifies the Tryptic Digest Pattern for Peptides of the Enzyme O-GlcNAc-Selective N-Acetyl-Beta-d-Glucosaminidase That Contain Amino Acid Residues Essential for Enzymatic Activity ». *Biochemical Pharmacology* 72 (6): 710-18. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.06.005>.
- . 2006b. « Alloxan Is an Inhibitor of O-GlcNAc-Selective N-Acetyl-Beta-D-Glucosaminidase ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 350 (4): 1038-43. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.09.155>.
- Lefebvre, T., C. Alonso, S. Mahboub, M. J. Dupire, J. P. Zanetta, M. L. Caillet-Boudin, et J. C. Michalski. 1999. « Effect of Okadaic Acid on O-Linked N-Acetylglucosamine Levels in a Neuroblastoma Cell Line ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1472 (1-2): 71-81.
- Lefebvre, Tony, Vanessa Dehennaut, Céline Guinez, Stéphanie Olivier, Ludivine Drougat, Anne-Marie Mir, Marlène Mortuaire, Anne-Sophie Vercoutter-Edouart, et Jean-Claude Michalski. 2010. « 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 (2): 67-79. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.08.008>.
- Lefebvre, Tony, Ludivine Drougat, Stephanie Olivier-Van Stichelen, Jean-Claude Michalski, et Anne-Sophie Vercoutter-Edouart. 2013. « Antibodies and Activity Measurements for the Detection of O-GlcNAc Transferase and Assay of Its Substrate, UDP-GlcNAc ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1022: 147-59. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-465-4\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-465-4_12).
- Lehman, Donna M., Dong-Jing Fu, Angela B. Freeman, Kelly J. Hunt, Robin J. Leach, Teresa Johnson-Pais, Jeanette Hamlington, et al. 2005. « A Single Nucleotide Polymorphism in MGEA5 Encoding O-GlcNAc-Selective N-Acetyl-Beta-D Glucosaminidase Is Associated with Type 2 Diabetes in Mexican Americans ». *Diabetes* 54 (4): 1214-21.
- Lei, Ming, Irene H. Cheng, Louis A. Roberts, Michael A. McAlear, et Bik K. Tye. 2002. « Two Mcm3 Mutations Affect Different Steps in the Initiation of DNA Replication ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (34): 30824-31. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201816200>.
- Leney, Aneika C., Dris El Atmioui, Wei Wu, Huib Ovaa, et Albert J. R. Heck. 2017. « Elucidating Crosstalk Mechanisms between Phosphorylation and O-GlcNAcylation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (35): E7255-61. <https://doi.org/10.1073/pnas.1620529114>.
- Lenzen, S., et R. Munday. 1991. « Thiol-Group Reactivity, Hydrophilicity and Stability of Alloxan, Its Reduction Products and Its N-Methyl Derivatives and a Comparison with Ninhydrin ». *Biochemical Pharmacology* 42 (7): 1385-91.
- Leone, G., J. DeGregori, Z. Yan, L. Jakoi, S. Ishida, R. S. Williams, et J. R. Nevins. 1998. « E2F3 Activity Is Regulated during the Cell Cycle and Is Required for the Induction of S Phase ». *Genes & Development* 12 (14): 2120-30.
- Leturcq, Maïté, Tony Lefebvre, et Anne-Sophie Vercoutter-Edouart. 2017. « O-GlcNAcylation and Chromatin Remodeling in Mammals: An up-to-Date Overview ». *Biochemical Society Transactions* 45 (2): 323-38. <https://doi.org/10.1042/BST20160388>.
- Leturcq, Maïté, Marlène Mortuaire, Stéphan Hardivillé, Céline Schulz, Tony Lefebvre, et Anne-Sophie Vercoutter-Edouart. 2018. « O-GlcNAc Transferase Associates with the MCM2-7 Complex and Its Silencing Destabilizes MCM-MCM Interactions ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, août. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2874-0>.
- Levine, Zebulon, Chenguang Fan, Michael S. Melicher, Marina Orman, Tania Benjamin, et Suzanne Walker. 2018. « O-GlcNAc Transferase Recognizes Protein Substrates Using an Asparagine Ladder in the TPR Superhelix ». *Journal of the American Chemical Society*, février. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b13546>.
- Lewis, Brian A., Alma L. Burlingame, et Samuel A. Myers. 2016. « Human RNA Polymerase II Promoter Recruitment In Vitro Is Regulated by O-Linked N-Acetylglucosaminyltransferase (OGT) ». *The Journal of Biological Chemistry* 291 (27): 14056-61. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.684365>.

- Li, Cong-Jun, et Melvin L. DePamphilis. 2002. « Mammalian Orc1 Protein Is Selectively Released from Chromatin and Ubiquitinated during the S-to-M Transition in the Cell Division Cycle ». *Molecular and Cellular Biology* 22 (1): 105-16.
- Li, Cong-jun, Alex Vassilev, et Melvin L. DePamphilis. 2004. « Role for Cdk1 (Cdc2)/Cyclin A in Preventing the Mammalian Origin Recognition Complex's Largest Subunit (Orc1) from Binding to Chromatin during Mitosis ». *Molecular and Cellular Biology* 24 (13): 5875-86. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.13.5875-5886.2004>.
- Li, Huilin, et Bruce Stillman. 2012. « The Origin Recognition Complex: A Biochemical and Structural View ». *Sub-Cellular Biochemistry* 62: 37-58. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-4572-8\\_3](https://doi.org/10.1007/978-94-007-4572-8_3).
- Li, Jing, Jiajia Wang, Liuqing Wen, He Zhu, Shanshan Li, Kenneth Huang, Kuan Jiang, et al. 2016. « An OGA-Resistant Probe Allows Specific Visualization and Accurate Identification of O-GlcNAc-Modified Proteins in Cells ». *ACS Chemical Biology* 11 (11): 3002-6. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b00678>.
- Li, Junhui, Min Deng, Qian Wei, Ting Liu, Xiaomei Tong, et Xin Ye. 2011. « Phosphorylation of MCM3 Protein by Cyclin E/Cyclin-Dependent Kinase 2 (Cdk2) Regulates Its Function in Cell Cycle ». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (46): 39776-85. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.226464>.
- Li, Lili, Miaomiao Shao, Peike Peng, Caiting Yang, Shushu Song, Fangfang Duan, Dongwei Jia, et al. 2017. « High Expression of GFAT1 Predicts Unfavorable Prognosis in Patients with Hepatocellular Carcinoma ». *Oncotarget* 8 (12): 19205-17. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15164>.
- Li, Min-Dian, Hai-Bin Ruan, Michael E. Hughes, Jeong-Sang Lee, Jay P. Singh, Steven P. Jones, Michael N. Nitabach, et Xiaoyong Yang. 2013. « O-GlcNAc Signaling Entrain the Circadian Clock by Inhibiting BMAL1/CLOCK Ubiquitination ». *Cell Metabolism* 17 (2): 303-10. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.12.015>.
- Li, Zhe, Xueyan Li, Shanshan Nai, Qizhi Geng, Ji Liao, Xingzhi Xu, et Jing Li. 2017. « Checkpoint Kinase 1-Induced Phosphorylation of O-Linked  $\beta$ -N-Acetylglucosamine Transferase Regulates the Intermediate Filament Network during Cytokinesis ». *The Journal of Biological Chemistry*, octobre. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.811646>.
- Lim, Shuhui, et Philipp Kaldis. 2013. « Cdks, Cyclins and CKIs: Roles beyond Cell Cycle Regulation ». *Development (Cambridge, England)* 140 (15): 3079-93. <https://doi.org/10.1242/dev.091744>.
- Lin, Douglas I., Priya Aggarwal, et J. Alan Diehl. 2008. « Phosphorylation of MCM3 on Ser-112 regulates its incorporation into the MCM2-7 complex ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (23): 8079-84. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800077105>.
- Liu, Changdong, Rentian Wu, Bo Zhou, Jiafeng Wang, Zhun Wei, Bik K. Tye, Chun Liang, et Guang Zhu. 2012. « Structural Insights into the Cdt1-Mediated MCM2-7 Chromatin Loading ». *Nucleic Acids Research* 40 (7): 3208-17. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1118>.
- Liu, Chunming, Yiming Li, Mikhail Semenov, Chun Han, Gyeong Hun Baeg, Yi Tan, Zhuohua Zhang, Xinhua Lin, et Xi He. 2002. « Control of Beta-Catenin Phosphorylation/Degradation by a Dual-Kinase Mechanism ». *Cell* 108 (6): 837-47.
- Liu, Hongtao, Zhongxiao Wang, Shujie Yu, et Jian Xu. 2014. « Proteasomal Degradation of O-GlcNAc Transferase Elevates Hypoxia-Induced Vascular Endothelial Inflammatory Response† ». *Cardiovascular Research* 103 (1): 131-39. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvu116>.
- Liu, J. J., J. R. Chao, M. C. Jiang, S. Y. Ng, J. J. Yen, et H. F. Yang-Yen. 1995. « Ras Transformation Results in an Elevated Level of Cyclin D1 and Acceleration of G1 Progression in NIH 3T3 Cells ». *Molecular and Cellular Biology* 15 (7): 3654-63.
- Liu, K., A. J. Paterson, E. Chin, et J. E. Kudlow. 2000. « Glucose Stimulates Protein Modification by O-Linked GlcNAc in Pancreatic Beta Cells: Linkage of O-Linked GlcNAc to Beta Cell Death ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (6): 2820-25.

- Liu, Kan, Andrew J. Paterson, Fengxue Zhang, Joanne McAndrew, Ken-Ichiro Fukuchi, J. Michael Wyss, Ling Peng, Yong Hu, et Jeffrey E. Kudlow. 2004. « Accumulation of Protein O-GlcNAc Modification Inhibits Proteasomes in the Brain and Coincides with Neuronal Apoptosis in Brain Areas with High O-GlcNAc Metabolism ». *Journal of Neurochemistry* 89 (4): 1044-55. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02389.x>.
- Liu, Peijun, Damien M. Slater, Marc Lenburg, Kathleen Nevis, Jeanette Gowen Cook, et Cyrus Vaziri. 2009. « Replication Licensing Promotes Cyclin D1 Expression and G1 Progression in Untransformed Human Cells ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 8 (1): 125-36. <https://doi.org/10.4161/cc.8.1.7528>.
- Liu, Wei, Guanghui Han, Yalin Yin, Shuai Jiang, Guojun Yu, Qing Yang, Wenhui Yu, et al. 2018. « AANL (Agrocybe Aegerita Lectin 2) Is a New Facile Tool to Probe for O-GlcNAcylation ». *Glycobiology*, mars. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwy029>.
- Liu, Ying, Xiaojing Li, Yang Yu, Jianhua Shi, Zhihou Liang, Xiaoqin Run, Yi Li, et al. 2012. « Developmental Regulation of Protein O-GlcNAcylation, O-GlcNAc Transferase, and O-GlcNAcase in Mammalian Brain ». *PLoS One* 7 (8): e43724. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043724>.
- Liu, Yuan, Thomas A. Richards, et Stephen J. Aves. 2009. « Ancient Diversification of Eukaryotic MCM DNA Replication Proteins ». *BMC Evolutionary Biology* 9 (mars): 60. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-60>.
- Love, Dona C., Jarema Kochan, R. Lamont Cathey, Sang-Hoon Shin, John A. Hanover, et Jarema Kochran. 2003. « Mitochondrial and Nucleocytoplasmic Targeting of O-Linked GlcNAc Transferase ». *Journal of Cell Science* 116 (Pt 4): 647-54.
- Lubas, W. A., D. W. Frank, M. Krause, et J. A. Hanover. 1997. « O-Linked GlcNAc Transferase Is a Conserved Nucleocytoplasmic Protein Containing Tetratricopeptide Repeats ». *The Journal of Biological Chemistry* 272 (14): 9316-24.
- Lubas, W. A., et J. A. Hanover. 2000. « Functional Expression of O-Linked GlcNAc Transferase. Domain Structure and Substrate Specificity ». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (15): 10983-88.
- Luger, K., A. W. Mäder, R. K. Richmond, D. F. Sargent, et T. J. Richmond. 1997. « Crystal Structure of the Nucleosome Core Particle at 2.8 Å Resolution ». *Nature* 389 (6648): 251-60. <https://doi.org/10.1038/38444>.
- Lutzmann, Malik, Corinne Grey, Sabine Traver, Olivier Ganier, Apolinar Maya-Mendoza, Noemie Ranisavljevic, Florence Bernex, et al. 2012. « MCM8- and MCM9-Deficient Mice Reveal Gametogenesis Defects and Genome Instability Due to Impaired Homologous Recombination ». *Molecular Cell* 47 (4): 523-34. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.05.048>.
- Lutzmann, Malik, Domenico Maiorano, et Marcel Méchali. 2005. « Identification of Full Genes and Proteins of MCM9, a Novel, Vertebrate-Specific Member of the MCM2-8 Protein Family ». *Gene* 362 (décembre): 51-56. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.07.031>.
- . 2006. « A Cdt1-Geminin Complex Licenses Chromatin for DNA Replication and Prevents Rereplication during S Phase in *Xenopus* ». *The EMBO Journal* 25 (24): 5764-74. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601436>.
- Lutzmann, Malik, et Marcel Méchali. 2008. « MCM9 Binds Cdt1 and Is Required for the Assembly of Prereplication Complexes ». *Molecular Cell* 31 (2): 190-200. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.07.001>.
- . 2009. « How to Load a Replicative Helicase onto Chromatin: A More and More Complex Matter during Evolution ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 8 (9): 1309-13. <https://doi.org/10.4161/cc.8.9.8216>.
- Lynch, Thomas P., Christina M. Ferrer, S. RaElla Jackson, Kristina S. Shahriari, Keith Vosseller, et Mauricio J. Reginato. 2012. « Critical Role of O-Linked  $\beta$ -N-Acetylglucosamine Transferase in Prostate Cancer Invasion, Angiogenesis, and Metastasis ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (14): 11070-81. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.302547>.

Lynch, Thomas P., et Mauricio J. Reginato. 2011. « O-GlcNAc Transferase: A Sweet New Cancer Target ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 10 (11): 1712-13.  
<https://doi.org/10.4161/cc.10.11.15561>.

## M

- Ma, Junfeng, et Gerald W. Hart. 2017. « Analysis of Protein O-GlcNAcylation by Mass Spectrometry ». *Current Protocols in Protein Science* 87 (février): 24.10.1-24.10.16.  
<https://doi.org/10.1002/cpp.24>.
- Ma, Junfeng, Ting Liu, An-Chi Wei, Partha Banerjee, Brian O'Rourke, et Gerald W. Hart. 2015. « O-GlcNAc Profiling Identifies Widespread O-Linked  $\beta$ -N-Acetylglucosamine Modification (O-GlcNAcylation) in Oxidative Phosphorylation System Regulating Cardiac Mitochondrial Function ». *The Journal of Biological Chemistry* 290 (49): 29141-53.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M115.691741>.
- Ma, Xiaofeng, He Li, Yating He, et Junwei Hao. 2017. « The Emerging Link between O-GlcNAcylation and Neurological Disorders ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 74 (20): 3667-86.  
<https://doi.org/10.1007/s00018-017-2542-9>.
- Ma, Yiqin, Kiriaki Kanakousaki, et Laura Buttitta. 2015. « How the Cell Cycle Impacts Chromatin Architecture and Influences Cell Fate ». *Frontiers in Genetics* 6: 19.  
<https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00019>.
- Ma, Zhiyuan, Robert J. Chalkley, et Keith Vosseller. 2017. « Hyper-O-GlcNAcylation Activates Nuclear Factor  $\kappa$ -Light-Chain-Enhancer of Activated B Cells (NF- $\kappa$ B) Signaling through Interplay with Phosphorylation and Acetylation ». *Journal of Biological Chemistry* 292 (22): 9150-63.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M116.766568>.
- Ma, Zhiyuan, David J. Vocadlo, et Keith Vosseller. 2013. « Hyper-O-GlcNAcylation Is Anti-Apoptotic and Maintains Constitutive NF- $\kappa$ B Activity in Pancreatic Cancer Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 288 (21): 15121-30. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.470047>.
- Macauley, Matthew S., et David J. Vocadlo. 2009. « Enzymatic Characterization and Inhibition of the Nuclear Variant of Human O-GlcNAcase ». *Carbohydrate Research* 344 (9): 1079-84.  
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.04.017>.
- . 2010. « Increasing O-GlcNAc Levels: An Overview of Small-Molecule Inhibitors of O-GlcNAcase ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1800 (2): 107-21.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.07.028>.
- Macauley, Matthew S., Garrett E. Whitworth, Aleksandra W. Debowski, Danielle Chin, et David 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 (27): 25313-22. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413819200>.
- Machon, Oriane, Steffi F. Baldini, João P. Ribeiro, Agata Steenackers, Annabelle Varrot, Tony Lefebvre, et Anne Imberty. 2017. « Recombinant Fungal Lectin as a New Tool to Investigate O-GlcNAcylation Processes ». *Glycobiology* 27 (2): 123-28.  
<https://doi.org/10.1093/glycob/cww105>.
- Maiato, Helder, Conly L. Rieder, et Alexey Khodjakov. 2004. « Kinetochore-Driven Formation of Kinetochore Fibers Contributes to Spindle Assembly during Animal Mitosis ». *The Journal of Cell Biology* 167 (5): 831-40. <https://doi.org/10.1083/jcb.200407090>.
- Maiato, Helder, et Claudio E. Sunkel. 2004. « Kinetochore-Microtubule Interactions during Cell Division ». *Chromosome Research: An International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology* 12 (6): 585-97.  
<https://doi.org/10.1023/B:CHRO.0000036587.26566.81>.
- Maine, G. T., P. Sinha, et B. K. Tye. 1984. « Mutants of *S. Cerevisiae* Defective in the Maintenance of Minichromosomes ». *Genetics* 106 (3): 365-85.

- Maiorano, Domenico, Olivier Cuvier, Etienne Danis, et Marcel Méchali. 2005. « MCM8 Is an MCM2-7-Related Protein That Functions as a DNA Helicase during Replication Elongation and Not Initiation ». *Cell* 120 (3): 315-28. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.010>.
- Maiorano, Domenico, Malik Lutzmann, et Marcel Méchali. 2006. « MCM Proteins and DNA Replication ». *Current Opinion in Cell Biology* 18 (2): 130-36. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2006.02.006>.
- Maiorano, Domenico, Wilfrid Rul, et Marcel Méchali. 2004. « Cell Cycle Regulation of the Licensing Activity of Cdt1 in *Xenopus Laevis* ». *Experimental Cell Research* 295 (1): 138-49. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2003.11.018>.
- Malumbres, Marcos. 2014. « Cyclin-Dependent Kinases ». *Genome Biology* 15 (6): 122.
- Malumbres, Marcos, Edward Harlow, Tim Hunt, Tony Hunter, Jill M. Lahti, Gerard Manning, David O. Morgan, Li-Huei Tsai, et Debra J. Wolgemuth. 2009. « Cyclin-Dependent Kinases: A Family Portrait ». *Nature Cell Biology* 11 (11): 1275-76. <https://doi.org/10.1038/ncb1109-1275>.
- Mariappa, Daniel, Nithya Selvan, Vladimir Borodkin, Jana Alonso, Andrew T. Ferenbach, Claire Shepherd, Iva Hopkins Navratilova, et Daan M. F. van Aalten. 2015. « A Mutant O-GlcNAcase as a Probe to Reveal Global Dynamics of Protein O-GlcNAcylation during *Drosophila* Embryonic Development ». *The Biochemical Journal* 470 (2): 255-62. <https://doi.org/10.1042/BJ20150610>.
- Mariappa, Daniel, Xiaowei Zheng, Marianne Schimpl, Olawale Raimi, Andrew T. Ferenbach, H.-Arno J. Müller, et Daan M. F. van Aalten. 2015. « Dual Functionality of O-GlcNAc Transferase Is Required for *Drosophila* Development ». *Open Biology* 5 (12): 150234. <https://doi.org/10.1098/rsob.150234>.
- Maric, Marija, Progya Mukherjee, Michael H. Tatham, Ronald Hay, et Karim Labib. 2017. « Ufd1-Npl4 Recruit Cdc48 for Disassembly of Ubiquitylated CMG Helicase at the End of Chromosome Replication ». *Cell Reports* 18 (13): 3033-42. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.03.020>.
- Marsh, Susan A., Helen E. Collins, et John C. Chatham. 2014. « Protein O-GlcNAcylation and Cardiovascular (Patho)Physiology ». *The Journal of Biological Chemistry* 289 (50): 34449-56. <https://doi.org/10.1074/jbc.R114.585984>.
- Marsh, Susan A., Louis J. Dell'Italia, et John C. Chatham. 2011. « Activation of the Hexosamine Biosynthesis Pathway and Protein O-GlcNAcylation Modulate Hypertrophic and Cell Signaling Pathways in Cardiomyocytes from Diabetic Mice ». *Amino Acids* 40 (3): 819-28. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0699-8>.
- Marshall, S., V. Bacote, et 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 (8): 4706-12.
- Marshall, Stephen, Ryo Okuyama, et John M. Rumberger. 2005. « Turnover and Characterization of UDP-N-Acetylglucosaminyl Transferase in a Stably Transfected HeLa Cell Line ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 332 (1): 263-70. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.04.122>.
- Martin, Nicholas G., Peter C. McAndrew, Paul D. Eve, et Michelle D. Garrett. 2008. « Phosphorylation of Cyclin Dependent Kinase 4 on Tyrosine 17 Is Mediated by Src Family Kinases ». *The FEBS Journal* 275 (12): 3099-3109. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06463.x>.
- Martinez-Fleites, Carlos, Matthew S. Macauley, Yuan He, David L. Shen, David J. Vocadlo, et Gideon J. Davies. 2008. « Structure of an O-GlcNAc Transferase Homolog Provides Insight into Intracellular Glycosylation ». *Nature Structural & Molecular Biology* 15 (7): 764-65. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1443>.
- Marumoto, Tomotoshi, Toru Hirota, Tetsuro Morisaki, Naoko Kunitoku, Dongwei Zhang, Yasuko Ichikawa, Takashi Sasayama, et al. 2002. « Roles of Aurora-A Kinase in Mitotic Entry and G2 Checkpoint in Mammalian Cells ». *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 7 (11): 1173-82.

- Marumoto, Tomotoshi, Dongwei Zhang, et Hideyuki Saya. 2005. « Aurora-A - a Guardian of Poles ». *Nature Reviews. Cancer* 5 (1): 42-50. <https://doi.org/10.1038/nrc1526>.
- Matsuura, Aiko, Makiko Ito, Yuta Sakaidani, Tatsuhiko Kondo, Kosuke Murakami, Koichi Furukawa, Daita Nadano, Tsukasa Matsuda, et Tetsuya Okajima. 2008. « O-Linked N-Acetylglucosamine Is Present on the Extracellular Domain of Notch Receptors ». *The Journal of Biological Chemistry* 283 (51): 35486-95. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806202200>.
- Maury, Julien Jean Pierre, Chadi A. El Farran, Daniel Ng, Yui-Han Loh, Xuezhi Bi, Muriel Bardor, et Andre Boon-Hwa Choo. 2015. « RING1B O-GlcNAcylation Regulates Gene Targeting of Polycomb Repressive Complex 1 in Human Embryonic Stem Cells ». *Stem Cell Research* 15 (1): 182-89. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2015.06.007>.
- McKnight, G. L., S. L. Mudri, S. L. Mathewes, R. R. Traxinger, S. Marshall, P. O. Sheppard, et P. J. O'Hara. 1992. « Molecular Cloning, cDNA Sequence, and Bacterial Expression of Human Glutamine:Fructose-6-Phosphate Amidotransferase ». *The Journal of Biological Chemistry* 267 (35): 25208-12.
- Méchal, Marcel. 2010. « Eukaryotic DNA Replication Origins: Many Choices for Appropriate Answers ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 11 (10): 728-38. <https://doi.org/10.1038/nrm2976>.
- Mehdy, Ali, Willy Morelle, Claire Rosnoblet, Dominique Legrand, Tony Lefebvre, Sandrine Duvet, et François Foulquier. 2012. « PUGNAc Treatment Leads to an Unusual Accumulation of Free Oligosaccharides in CHO Cells ». *Journal of Biochemistry* 151 (4): 439-46. <https://doi.org/10.1093/jb/mvs012>.
- Merrill, G. F. 1998. « Cell Synchronization ». *Methods in Cell Biology* 57: 229-49.
- Mertins, Philipp, D. R. Mani, Kelly V. Ruggles, Michael A. Gillette, Karl R. Clauser, Pei Wang, Xianlong Wang, et al. 2016. « Proteogenomics Connects Somatic Mutations to Signalling in Breast Cancer ». *Nature* 534 (7605): 55-62. <https://doi.org/10.1038/nature18003>.
- Mertins, Philipp, Feng Yang, Tao Liu, D. R. Mani, Vladislav A. Petyuk, Michael A. Gillette, Karl R. Clauser, et al. 2014. « Ischemia in Tumors Induces Early and Sustained Phosphorylation Changes in Stress Kinase Pathways but Does Not Affect Global Protein Levels ». *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 13 (7): 1690-1704. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.036392>.
- Meyer, Hemmo. 2012. « P97 Complexes as Signal Integration Hubs ». *BMC Biology* 10 (juin): 48. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-48>.
- Meyer, Natalie, et Linda Z. Penn. 2008. « Reflecting on 25 Years with MYC ». *Nature Reviews. Cancer* 8 (12): 976-90. <https://doi.org/10.1038/nrc2231>.
- Meyerson, M., G. H. Enders, C. L. Wu, L. K. Su, C. Gorka, C. Nelson, E. Harlow, et L. H. Tsai. 1992. « A Family of Human Cdc2-Related Protein Kinases ». *The EMBO Journal* 11 (8): 2909-17.
- Meyerson, M., et E. Harlow. 1994. « Identification of G1 Kinase Activity for Cdk6, a Novel Cyclin D Partner ». *Molecular and Cellular Biology* 14 (3): 2077-86.
- Miller, Donald M., Shelia D. Thomas, Ashraful Islam, David Muench, et Kara Sedoris. 2012. « C-Myc and Cancer Metabolism ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 18 (20): 5546-53. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0977>.
- Miller-Patrick, K., D. L. Vincent, R. J. Early, Y. S. Weems, Y. Tanaka, D. T. Ashimine, K. D. Nusser, C. N. Lee, K. S. Ledgerwood, et C. W. Weems. 1993. « Effects of the Purine Biosynthesis Pathway Inhibitors Azaserine, Hadacidin, and Mycophenolic Acid on the Developing Ovine Corpus Luteum ». *The Chinese Journal of Physiology* 36 (4): 245-52.
- Miotto, Benoit, et Kevin Struhl. 2010. « HBO1 Histone Acetylase Activity Is Essential for DNA Replication Licensing and Inhibited by Geminin ». *Molecular Cell* 37 (1): 57-66. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.12.012>.
- Mitxelena, Jone, Aintzane Apraiz, Jon Vallejo-Rodríguez, Marcos Malumbres, et Ana M. Zubiaga. 2016. « E2F7 Regulates Transcription and Maturation of Multiple MicroRNAs to Restrain Cell Proliferation ». *Nucleic Acids Research*, mars. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw146>.

- Montagnoli, Alessia, Barbara Valsasina, Deborah Brotherton, Sonia Troiani, Sonia Rainoldi, Pierluigi Tenca, Antonio Molinari, et Corrado Santocanale. 2006. « Identification of Mcm2 Phosphorylation Sites by S-Phase-Regulating Kinases ». *The Journal of Biological Chemistry* 281 (15): 10281-90. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512921200>.
- Moreau, Matthew J., Adam T. McGeoch, Alan R. Lowe, Laura S. Itzhaki, et Stephen D. Bell. 2007. « ATPase Site Architecture and Helicase Mechanism of an Archaeal MCM ». *Molecular Cell* 28 (2): 304-14. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.08.013>.
- Moreno, Sara Priego, Rachael Bailey, Nicholas Campion, Suzanne Herron, et Agnieszka Gambus. 2014. « Polyubiquitylation Drives Replisome Disassembly at the Termination of DNA Replication ». *Science (New York, N.Y.)* 346 (6208): 477-81. <https://doi.org/10.1126/science.1253585>.
- Moullier, P., D. Daveloose, F. Leterrier, et J. Hoebeke. 1986. « Comparative Binding of Wheat Germ Agglutinin and Its Succinylated Form on Lymphocytes ». *European Journal of Biochemistry* 161 (1): 197-204.
- Moyer, Stephen E., Peter W. Lewis, et Michael R. Botchan. 2006. « Isolation of the Cdc45/Mcm2-7/GINS (CMG) Complex, a Candidate for the Eukaryotic DNA Replication Fork Helicase ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (27): 10236-41. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602400103>.
- Mueller, P. R., T. R. Coleman, A. Kumagai, et W. G. Dunphy. 1995. « Myt1: A Membrane-Associated Inhibitory Kinase That Phosphorylates Cdc2 on Both Threonine-14 and Tyrosine-15 ». *Science (New York, N.Y.)* 270 (5233): 86-90.
- Mukherjee, Piyali, Sherry L. Winter, et Mark G. Alexandrow. 2010. « Cell Cycle Arrest by Transforming Growth Factor Beta1 near G1/S Is Mediated by Acute Abrogation of Prereplication Complex Activation Involving an Rb-MCM Interaction ». *Molecular and Cellular Biology* 30 (3): 845-56. <https://doi.org/10.1128/MCB.01152-09>.
- Müller, Reto, Andreas Jenny, et Pamela Stanley. 2013. « The EGF Repeat-Specific O-GlcNAc-Transferase Eogt Interacts with Notch Signaling and Pyrimidine Metabolism Pathways in *Drosophila* ». *PLoS One* 8 (5): e62835. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062835>.
- Muramatsu, Sachiko, Kazuyuki Hirai, Yon-Soo Tak, Yoichiro Kamimura, et Hiroyuki Araki. 2010. « CDK-Dependent Complex Formation between Replication Proteins Dpb11, Sld2, Pol (Epsilon), and GINS in Budding Yeast ». *Genes & Development* 24 (6): 602-12. <https://doi.org/10.1101/gad.1883410>.
- Muthusamy, Senthilkumar, Kyung U. Hong, Sujith Dassanayaka, Tariq Hamid, et Steven P. Jones. 2015. « E2F1 Transcription Factor Regulates O-Linked N-Acetylglucosamine (O-GlcNAc) Transferase and O-GlcNAcase Expression ». *The Journal of Biological Chemistry* 290 (52): 31013-24. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.677534>.
- Myatt, Stephen S., et Eric W.-F. Lam. 2007. « The Emerging Roles of Forkhead Box (Fox) Proteins in Cancer ». *Nature Reviews. Cancer* 7 (11): 847-59. <https://doi.org/10.1038/nrc2223>.

## N

- Nakanishi, Hideki, Feng Li, Baoxian Han, Seisuke Arai, et Xiao-Dong Gao. 2017. « Yeast Cells as an Assay System for in Vivo O-GlcNAc Modification ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1861 (5 Pt A): 1159-67. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.03.002>.
- Navon, A., et A. L. Goldberg. 2001. « Proteins Are Unfolded on the Surface of the ATPase Ring before Transport into the Proteasome ». *Molecular Cell* 8 (6): 1339-49.
- Neuwald, A. F., L. Aravind, J. L. Spouge, et E. V. Koonin. 1999. « AAA+: A Class of Chaperone-like ATPases Associated with the Assembly, Operation, and Disassembly of Protein Complexes ». *Genome Research* 9 (1): 27-43.

- Nevins, J. R., G. Leone, J. DeGregori, et L. Jakoi. 1997. « Role of the Rb/E2F Pathway in Cell Growth Control ». *Journal of Cellular Physiology* 173 (2): 233-36. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(199711\)173:2<233::AID-JCP27>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(199711)173:2<233::AID-JCP27>3.0.CO;2-F).
- Nick McElhinny, Stephanie A., Dmitry A. Gordenin, Carrie M. Stith, Peter M. J. Burgers, et Thomas A. Kunkel. 2008. « Division of Labor at the Eukaryotic Replication Fork ». *Molecular Cell* 30 (2): 137-44. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.02.022>.
- Nigg, E. A. 2001. « Mitotic Kinases as Regulators of Cell Division and Its Checkpoints ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 2 (1): 21-32. <https://doi.org/10.1038/35048096>.
- Nigg, Erich A., et Tim Stearns. 2011. « The Centrosome Cycle: Centriole Biogenesis, Duplication and Inherent Asymmetries ». *Nature Cell Biology* 13 (10): 1154-60. <https://doi.org/10.1038/ncb2345>.
- Nishiyama, Atsuya, Lori Frappier, et Marcel Méchali. 2011. « MCM-BP Regulates Unloading of the MCM2-7 Helicase in Late S Phase ». *Genes & Development* 25 (2): 165-75. <https://doi.org/10.1101/gad.614411>.
- Noort, Mascha van, Marc van de Wetering, et Hans Clevers. 2002. « Identification of Two Novel Regulated Serines in the N Terminus of Beta-Catenin ». *Experimental Cell Research* 276 (2): 264-72. <https://doi.org/10.1006/excr.2002.5520>.

## O

- Odintsova, Tatyana I., Eva-Christina Müller, Anton V. Ivanov, Tsezi A. Egorov, Ralf Bienert, Serguei N. Vladimirov, Susanne Kostka, Albrecht Otto, Brigitte Wittmann-Liebold, et Galina G. Karpova. 2003. « Characterization and Analysis of Posttranslational Modifications of the Human Large Cytoplasmic Ribosomal Subunit Proteins by Mass Spectrometry and Edman Sequencing ». *Journal of Protein Chemistry* 22 (3): 249-58.
- O'Donnell, Michael, Lance Langston, et Bruce Stillman. 2013. « Principles and Concepts of DNA Replication in Bacteria, Archaea, and Eukarya ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (7). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010108>.
- O'Donnell, Niall, Natasha E. Zachara, Gerald W. Hart, et Jamey 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 (4): 1680-90.
- Ohtani, K., J. DeGregori, et J. R. Nevins. 1995. « Regulation of the Cyclin E Gene by Transcription Factor E2F1 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (26): 12146-50.
- Ohtani, K., R. Iwanaga, M. Nakamura, M. Ikeda, N. Yabuta, H. Tsuruga, et H. Nojima. 1999. « Cell Growth-Regulated Expression of Mammalian MCM5 and MCM6 Genes Mediated by the Transcription Factor E2F ». *Oncogene* 18 (14): 2299-2309. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202544>.
- Ohtsubo, M., A. M. Theodoras, J. Schumacher, J. M. Roberts, et M. Pagano. 1995. « Human Cyclin E, a Nuclear Protein Essential for the G1-to-S Phase Transition ». *Molecular and Cellular Biology* 15 (5): 2612-24.
- Ohya, Tomoko, Yasuo Kawasaki, Shin-Ichiro Hiraga, Sakie Kanbara, Kou Nakajo, Naomi Nakashima, Akiko Suzuki, et Akio Sugino. 2002. « The DNA Polymerase Domain of Pol(Epsilon) Is Required for Rapid, Efficient, and Highly Accurate Chromosomal DNA Replication, Telomere Length Maintenance, and Normal Cell Senescence in *Saccharomyces Cerevisiae* ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (31): 28099-108. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111573200>.
- Okuno, Y., A. J. McNairn, N. den Elzen, J. Pines, et D. M. Gilbert. 2001. « Stability, Chromatin Association and Functional Activity of Mammalian Pre-Replication Complex Proteins during the Cell Cycle ». *The EMBO Journal* 20 (15): 4263-77. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.15.4263>.



- Okuyama, Ryo, et Stephen Marshall. 2003. « UDP-N-Acetylglucosaminyl Transferase (OGT) in Brain Tissue: Temperature Sensitivity and Subcellular Distribution of Cytosolic and Nuclear Enzyme ». *Journal of Neurochemistry* 86 (5): 1271-80.
- Olivier-Van Stichelen, S., L. Drougat, V. Dehennaut, I. El Yazidi-Belkoura, C. Guinez, A.-M. Mir, J.-C. Michalski, A.-S. Vercoutter-Edouart, et T. Lefebvre. 2012. « Serum-Stimulated Cell Cycle Entry Promotes NcOGT Synthesis Required for Cyclin D Expression ». *Oncogenesis* 1: e36. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2012.36>.
- Olivier-Van Stichelen, Stéphanie, Vanessa Dehennaut, Armelle Buzy, Jean-Luc Zachayus, Céline Guinez, Anne-Marie Mir, Ikram 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 (8): 3325-38. <https://doi.org/10.1096/fj.13-243535>.
- Olivier-Van Stichelen, Stéphanie, Céline Guinez, Anne-Marie Mir, Yobana Perez-Cervera, Chunming Liu, Jean-Claude Michalski, et Tony 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 (4): E417-424. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00390.2011>.
- Olsen, Jesper V., Michiel Vermeulen, Anna Santamaria, Chanchal Kumar, Martin L. Miller, Lars J. Jensen, Florian Gnad, et al. 2010. « Quantitative Phosphoproteomics Reveals Widespread Full Phosphorylation Site Occupancy during Mitosis ». *Science Signaling* 3 (104): ra3. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000475>.
- Ortiz-Meoz, Rodrigo F., Jiaoyang Jiang, Michael B. Lazarus, Marina Orman, John Janetzko, Chenguang Fan, Damien Y. Duveau, Zhi-Wei Tan, Craig J. Thomas, et Suzanne Walker. 2015. « A Small Molecule That Inhibits OGT Activity in Cells ». *ACS Chemical Biology* 10 (6): 1392-97. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.5b00004>.
- Ortiz-Meoz, Rodrigo F., Yifat Merbl, Marc W. Kirschner, et Suzanne Walker. 2014. « Microarray Discovery of New OGT Substrates: The Medulloblastoma Oncogene OTX2 Is O-GlcNAcyated ». *Journal of the American Chemical Society* 136 (13): 4845-48. <https://doi.org/10.1021/ja500451w>.
- Ostrowski, Adam, Mehmet Gundogdu, Andrew T. Ferenbach, Andrey A. Lebedev, et Daan M. F. van Aalten. 2015. « Evidence for a Functional O-Linked N-Acetylglucosamine (O-GlcNAc) System in the Thermophilic Bacterium *Thermobaculum Terrenum* ». *The Journal of Biological Chemistry* 290 (51): 30291-305. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.689596>.
- Overath, Thorsten, Ulrike Kuckelkorn, Petra Henklein, Britta Strehl, David Bonar, Alexander Kloss, Dagmar Siele, Peter-Michael Kloetzel, et Katharina Janek. 2012. « Mapping of O-GlcNAc Sites of 20 S Proteasome Subunits and Hsp90 by a Novel Biotin-Cystamine Tag ». *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 11 (8): 467-77. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.015966>.

## P

- Pacek, Marcin, Antonin V. Tutter, Yumiko Kubota, Haruhiko Takisawa, et Johannes C. Walter. 2006. « Localization of MCM2-7, Cdc45, and GINS to the Site of DNA Unwinding during Eukaryotic DNA Replication ». *Molecular Cell* 21 (4): 581-87. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.01.030>.
- Padmanabhan, V., P. Callas, G. Philips, T. D. Trainer, et B. G. Beatty. 2004. « DNA Replication Regulation Protein Mcm7 as a Marker of Proliferation in Prostate Cancer ». *Journal of Clinical Pathology* 57 (10): 1057-62. <https://doi.org/10.1136/jcp.2004.016436>.
- Pagano, M., R. Pepperkok, F. Verde, W. Ansorge, et G. Draetta. 1992. « Cyclin A Is Required at Two Points in the Human Cell Cycle ». *The EMBO Journal* 11 (3): 961-71.

- Pan, Duoqia. 2010. « The Hippo Signaling Pathway in Development and Cancer ». *Developmental Cell* 19 (4): 491-505. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.09.011>.
- Park, Seung Yoon, Jiwon Ryu, et Wan Lee. 2005. « O-GlcNAc Modification on IRS-1 and Akt2 by PUGNAc Inhibits Their Phosphorylation and Induces Insulin Resistance in Rat Primary Adipocytes ». *Experimental & Molecular Medicine* 37 (3): 220-29. <https://doi.org/10.1038/emm.2005.30>.
- Parker, L. L., S. Atherton-Fessler, et H. Piwnica-Worms. 1992. « P107wee1 Is a Dual-Specificity Kinase That Phosphorylates P34cdc2 on Tyrosine 15 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (7): 2917-21.
- Parker, L. L., et H. Piwnica-Worms. 1992. « Inactivation of the P34cdc2-Cyclin B Complex by the Human WEE1 Tyrosine Kinase ». *Science (New York, N.Y.)* 257 (5078): 1955-57.
- Parker, L. L., P. J. Sylvestre, M. J. Byrnes, F. Liu, et H. Piwnica-Worms. 1995. « Identification of a 95-KDa WEE1-like Tyrosine Kinase in HeLa Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (21): 9638-42.
- Pasion, S. G., et S. L. Forsburg. 1999. « Nuclear Localization of Schizosaccharomyces Pombe Mcm2/Cdc19p Requires MCM Complex Assembly ». *Molecular Biology of the Cell* 10 (12): 4043-57.
- Pastor, William A., L. Aravind, et Anjana Rao. 2013. « TETonic Shift: Biological Roles of TET Proteins in DNA Demethylation and Transcription ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 14 (6): 341-56. <https://doi.org/10.1038/nrm3589>.
- Patel, S. S., et K. M. Picha. 2000. « Structure and Function of Hexameric Helicases ». *Annual Review of Biochemistry* 69: 651-97. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.651>.
- Pathak, Shalini, Jana Alonso, Marianne Schimpl, Karim Rafie, David E. Blair, Vladimir S. Borodkin, Osama Albarbarawi, et Daan M. F. van Aalten. 2015. « The Active Site of O-GlcNAc Transferase Imposes Constraints on Substrate Sequence ». *Nature Structural & Molecular Biology* 22 (9): 744-50. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3063>.
- Pchelintsev, Nikolay A., Tony McBryan, Taranjit Singh Rai, John van Tuyn, Dominique Ray-Gallet, Geneviève Almouzni, et Peter D. Adams. 2013. « Placing the HIRA Histone Chaperone Complex in the Chromatin Landscape ». *Cell Reports* 3 (4): 1012-19. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.03.026>.
- Pedrali-Noy, G., S. Spadari, A. Miller-Faurès, A. O. A. Miller, J. Kruppa, et G. Koch. 1980. « Synchronization of HeLa Cell Cultures by Inhibition of DNA Polymerase  $\alpha$  with Aphidicolin ». *Nucleic Acids Research* 8 (2): 377-87. <https://doi.org/10.1093/nar/8.2.377>.
- Peng, Changmin, Yue Zhu, Wanjun Zhang, Qinchao Liao, Yali Chen, Xinyuan Zhao, Qiang Guo, et al. 2017. « Regulation of the Hippo-YAP Pathway by Glucose Sensor O-GlcNAcylation ». *Molecular Cell* 68 (3): 591-604.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.10.010>.
- Peng, Yun-Peng, Yi Zhu, Ling-Di Yin, Jing-Jing Zhang, Song Guo, Yue Fu, Yi Miao, et Ji-Shu Wei. 2016. « The Expression and Prognostic Roles of MCMs in Pancreatic Cancer ». *PLoS One* 11 (10): e0164150. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164150>.
- Pérez, José de Jesús, Namrata D. Udeshi, Jeffrey Shabanowitz, Sergio Ciordia, Silvia Juárez, Cheryl L. Scott, Neil E. Olszewski, Donald F. Hunt, et Juan Antonio García. 2013. « O-GlcNAc Modification of the Coat Protein of the Potyvirus Plum Pox Virus Enhances Viral Infection ». *Virology* 442 (2): 122-31. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.03.029>.
- Perez, M., et C. B. Hirschberg. 1987. « Transport of Sugar Nucleotides into the Lumen of Vesicles Derived from Rat Liver Rough Endoplasmic Reticulum and Golgi Apparatus ». *Methods in Enzymology* 138: 709-15.
- Perez-Arnaiz, Patricia, Irina Bruck, Max K. Colbert, et Daniel L. Kaplan. 2017. « An Intact Mcm10 Coiled-Coil Interaction Surface Is Important for Origin Melting, Helicase Assembly and the Recruitment of Pol- $\alpha$  to Mcm2-7 ». *Nucleic Acids Research* 45 (12): 7261-75. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx438>.

- Perez-Arnaiz, Patricia, et Daniel L. Kaplan. 2016. « An Mcm10 Mutant Defective in SsDNA Binding Shows Defects in DNA Replication Initiation ». *Journal of Molecular Biology* 428 (23): 4608-25. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.10.014>.
- Perez-Cervera, Yobana, Grégoire Harichaux, Jörg Schmidt, Françoise Debierre-Grockiege, Vanessa Dehennaut, Ulrike Bieker, Edwige Meurice, Tony Lefebvre, et Ralph T. Schwarz. 2011. « Direct Evidence of O-GlcNAcylation in the Apicomplexan *Toxoplasma Gondii*: A Biochemical and Bioinformatic Study ». *Amino Acids* 40 (3): 847-56. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0702-4>.
- Perou, C. M., S. S. Jeffrey, M. van de Rijn, C. A. Rees, M. B. Eisen, D. T. Ross, A. Pergamenschikov, et al. 1999. « Distinctive Gene Expression Patterns in Human Mammary Epithelial Cells and Breast Cancers ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (16): 9212-17.
- Pines, J. 1993a. « Cyclins and Cyclin-Dependent Kinases: Take Your Partners ». *Trends in Biochemical Sciences* 18 (6): 195-97.
- . 1993b. « Cyclins and Their Associated Cyclin-Dependent Kinases in the Human Cell Cycle ». *Biochemical Society Transactions* 21 (4): 921-25.
- Pines, J., et T. Hunter. 1989. « Isolation of a Human Cyclin cDNA: Evidence for Cyclin mRNA and Protein Regulation in the Cell Cycle and for Interaction with P34cdc2 ». *Cell* 58 (5): 833-46.
- . 1991. « Human Cyclins A and B1 Are Differentially Located in the Cell and Undergo Cell Cycle-Dependent Nuclear Transport ». *The Journal of Cell Biology* 115 (1): 1-17.
- Polyak, K., M. H. Lee, H. Erdjument-Bromage, A. Koff, J. M. Roberts, P. Tempst, et J. Massagué. 1994. « Cloning of P27Kip1, a Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor and a Potential Mediator of Extracellular Antimitogenic Signals ». *Cell* 78 (1): 59-66.
- Poon, R. Y., et T. Hunter. 1995. « Dephosphorylation of Cdk2 Thr160 by the Cyclin-Dependent Kinase-Interacting Phosphatase KAP in the Absence of Cyclin ». *Science (New York, N.Y.)* 270 (5233): 90-93.
- Poon, R. Y., W. Jiang, H. Toyoshima, et T. Hunter. 1996. « Cyclin-Dependent Kinases Are Inactivated by a Combination of P21 and Thr-14/Tyr-15 Phosphorylation after UV-Induced DNA Damage ». *The Journal of Biological Chemistry* 271 (22): 13283-91.
- Poon, R. Y., H. Toyoshima, et T. Hunter. 1995. « Redistribution of the CDK Inhibitor P27 between Different Cyclin-CDK Complexes in the Mouse Fibroblast Cell Cycle and in Cells Arrested with Lovastatin or Ultraviolet Irradiation ». *Molecular Biology of the Cell* 6 (9): 1197-1213.
- Potter, Michelle, Emma Newport, et Karl J. Morten. 2016. « The Warburg Effect: 80 Years On ». *Biochemical Society Transactions* 44 (5): 1499-1505. <https://doi.org/10.1042/BST20160094>.
- Povlsen, Lou K., Petra Beli, Sebastian A. Wagner, Sara L. Poulsen, Kathrine B. Sylvestersen, Jon W. Poulsen, Michael L. Nielsen, Simon Bekker-Jensen, Niels Mailand, et Chunaram Choudhary. 2012. « Systems-Wide Analysis of Ubiquitylation Dynamics Reveals a Key Role for PAF15 Ubiquitylation in DNA-Damage Bypass ». *Nature Cell Biology* 14 (10): 1089-98. <https://doi.org/10.1038/ncb2579>.
- Pursell, Zachary F., Isabelle Isoz, Else-Britt Lundström, Erik Johansson, et Thomas A. Kunkel. 2007. « Yeast DNA Polymerase Epsilon Participates in Leading-Strand DNA Replication ». *Science (New York, N.Y.)* 317 (5834): 127-30. <https://doi.org/10.1126/science.1144067>.
- Pütz, Stephanie M., Fotini Vogiatzi, Thorsten Stiewe, et Albert Sickmann. 2010. « Malignant Transformation in a Defined Genetic Background: Proteome Changes Displayed by 2D-PAGE ». *Molecular Cancer* 9 (septembre): 254. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-254>.

## Q

- Qiu, Yun-Tan, Wen-Jun Wang, Bing Zhang, Li-Li Mei, et Zhi-Zhou Shi. 2017. « MCM7 Amplification and Overexpression Promote Cell Proliferation, Colony Formation and Migration in Esophageal

Squamous Cell Carcinoma by Activating the AKT1/MTOR Signaling Pathway ». *Oncology Reports* 37 (6): 3590-96. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5614>.

Quan, Yun, Yisui Xia, Lu Liu, Jiamin Cui, Zhen Li, Qinrong Cao, Xiaojiang S. Chen, Judith L. Campbell, et Huiqiang Lou. 2015. « Cell-Cycle-Regulated Interaction between Mcm10 and Double Hexameric Mcm2-7 Is Required for Helicase Splitting and Activation during S Phase ». *Cell Reports* 13 (11): 2576-86. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.11.018>.

Queiroz, Rafaela Muniz de, Erika Carvalho, et Wagner Barbosa Dias. 2014. « O-GlcNAcylation: The Sweet Side of the Cancer ». *Frontiers in Oncology* 4: 132. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00132>.

## R

Rafie, Karim, Olawale Raimi, Andrew T. Ferenbach, Vladimir S. Borodkin, Vaibhav Kapuria, et Daan M. F. van Aalten. 2017. « Recognition of a Glycosylation Substrate by the O-GlcNAc Transferase TPR Repeats ». *Open Biology* 7 (6). <https://doi.org/10.1098/rsob.170078>.

Rajapakse, Angana Gupta, Xiu-Fen Ming, João M. Carvas, et Zhihong Yang. 2009. « The Hexosamine Biosynthesis Inhibitor Azaserine Prevents Endothelial Inflammation and Dysfunction under Hyperglycemic Condition through Antioxidant Effects ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 296 (3): H815-822. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00756.2008>.

Ramakrishnan, Parameswaran, Peter M. Clark, Daniel E. Mason, Eric C. Peters, Linda C. Hsieh-Wilson, et David Baltimore. 2013. « Activation of the Transcriptional Function of the NF-KB Protein c-Rel by O-GlcNAc Glycosylation ». *Science Signaling* 6 (290): ra75. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004097>.

Ramirez-Correa, Genaro A., Junfeng Ma, Chad Slawson, Quira Zeidan, Nahyr S. Lugo-Fagundo, Mingguo Xu, Xiaoxu Shen, et al. 2015. « Removal of Abnormal Myofilament O-GlcNAcylation Restores Ca<sup>2+</sup> Sensitivity in Diabetic Cardiac Muscle ». *Diabetes* 64 (10): 3573-87. <https://doi.org/10.2337/db14-1107>.

Ransom, Monica, Briana K. Dennehey, et Jessica K. Tyler. 2010. « Chaperoning Histones during DNA Replication and Repair ». *Cell* 140 (2): 183-95. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.004>.

Ranuncolo, Stella M., Salil Ghosh, John A. Hanover, Gerald W. Hart, et Brian A. Lewis. 2012. « Evidence of the Involvement of O-GlcNAc-Modified Human RNA Polymerase II CTD in Transcription in Vitro and in Vivo ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (28): 23549-61. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.330910>.

Rao, Francesco V., Helge C. Dorfmüller, Fabrizio Villa, Matthew Allwood, Ian M. Eggleston, et Daan M. F. van Aalten. 2006. « Structural Insights into the Mechanism and Inhibition of Eukaryotic O-GlcNAc Hydrolysis ». *The EMBO Journal* 25 (7): 1569-78. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601026>.

Rao, Francesco V., Alexander W. Schüttelkopf, Helge C. Dorfmüller, Andrew T. Ferenbach, Iva Navratilova, et Daan 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 (10): 130021. <https://doi.org/10.1098/rsob.130021>.

Reason, A. J., H. R. Morris, M. Panico, R. Marais, R. H. Treisman, R. S. Haltiwanger, G. W. Hart, W. G. Kelly, et A. Dell. 1992. « Localization of O-GlcNAc Modification on the Serum Response Transcription Factor ». *The Journal of Biological Chemistry* 267 (24): 16911-21.

Reeves, Russell A., Albert Lee, Roger Henry, et Natasha E. Zachara. 2014. « Characterization of the Specificity of O-GlcNAc Reactive Antibodies under Conditions of Starvation and Stress ». *Analytical Biochemistry* 457 (juillet): 8-18. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.04.008>.

- Ren, B., G. Yu, G. C. Tseng, K. Cieply, T. Gavel, J. Nelson, G. Michalopoulos, Y. P. Yu, et J.-H. Luo. 2006. « MCM7 Amplification and Overexpression Are Associated with Prostate Cancer Progression ». *Oncogene* 25 (7): 1090-98. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209134>.
- Ren, Xiaoming, Shuai Jiang, Defeng Li, Hui Sun, et Dacheng Wang. 2013. « Crystallization and Preliminary Crystallographic Studies of AAL-2, a Novel Lectin from *Agrocybe Aegerita* That Binds Nonreducing Terminal N-Acetylglucosamine ». *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology and Crystallization Communications* 69 (Pt 6): 650-52. <https://doi.org/10.1107/S1744309113011639>.
- Resto, Melissa, Bong-Hyun Kim, Alfonso G. Fernandez, Brian J. Abraham, Keji Zhao, et Brian A. Lewis. 2016. « O-GlcNAcase Is an RNA Pol II Elongation Factor Coupled to Pausing Factors SPT5 and TIF1 $\beta$  ». *The Journal of Biological Chemistry*, septembre. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.751420>.
- Rexach, Jessica E., Claude J. Rogers, Seok-Ho Yu, Jifang Tao, Yi E. Sun, et Linda C. Hsieh-Wilson. 2010. « Quantification of O-Glycosylation Stoichiometry and Dynamics Using Resolvable Mass Tags ». *Nature Chemical Biology* 6 (9): 645-51. <https://doi.org/10.1038/nchembio.412>.
- Rhind, Nicholas, Scott Cheng-Hsin Yang, et John Bechhoefer. 2010. « Reconciling Stochastic Origin Firing with Defined Replication Timing ». *Chromosome Research: An International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology* 18 (1): 35-43. <https://doi.org/10.1007/s10577-009-9093-3>.
- Riera, Alberto, Marta Barbon, Yasunori Noguchi, L. Maximilian Reuter, Sarah Schneider, et Christian Speck. 2017. « From Structure to Mechanism-Understanding Initiation of DNA Replication ». *Genes & Development* 31 (11): 1073-88. <https://doi.org/10.1101/gad.298232.117>.
- Rios, Pablo, Tom S. Carter, Tiddo J. Mooibroek, Matthew P. Crump, Micke Lisbjerg, Michael Pittelkow, Nitin T. Supekar, Geert-Jan Boons, et Anthony P. Davis. 2016. « Synthetic Receptors for the High-Affinity Recognition of O-GlcNAc Derivatives ». *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 55 (10): 3387-92. <https://doi.org/10.1002/anie.201510611>.
- Roos, M. D., et J. A. Hanover. 2000. « Structure of O-Linked GlcNAc Transferase: Mediator of Glycan-Dependent Signaling ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 271 (2): 275-80. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2600>.
- Roos, M. D., W. Xie, K. Su, J. A. Clark, X. Yang, E. Chin, A. J. Paterson, et 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 (5): 422-32.
- Rowlands, Hollie, Piriththiv Dhavarasa, Ashley Cheng, et Krassimir Yankulov. 2017. « Forks on the Run: Can the Stalling of DNA Replication Promote Epigenetic Changes? ». *Frontiers in Genetics* 8. <https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00086>.
- Rubin, Seth M., Anne-Laure Gall, Ning Zheng, et Nikola P. Pavletich. 2005. « Structure of the Rb C-Terminal Domain Bound to E2F1-DP1: A Mechanism for Phosphorylation-Induced E2F Release ». *Cell* 123 (6): 1093-1106. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.09.044>.

## S

- Sacoman, Juliana L., Raul Y. Dagda, Amanda R. Burnham-Marusich, Ruben K. Dagda, et Patricia M. Berninsone. 2017. « Mitochondrial O-GlcNAc Transferase (MOGT) Regulates Mitochondrial Structure, Function, and Survival in HeLa Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 292 (11): 4499-4518. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.726752>.
- Saha, P., J. Chen, K. C. Thome, S. J. Lawlis, Z. H. Hou, M. Hendricks, J. D. Parvin, et A. Dutta. 1998. « Human CDC6/Cdc18 Associates with Orc1 and Cyclin-Cdk and Is Selectively Eliminated from the Nucleus at the Onset of S Phase ». *Molecular and Cellular Biology* 18 (5): 2758-67.

- Sakabe, Kaoru, et Gerald W. Hart. 2010. « O-GlcNAc Transferase Regulates Mitotic Chromatin Dynamics ». *The Journal of Biological Chemistry* 285 (45): 34460-68. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.158170>.
- Sakabe, Kaoru, Zihao Wang, et Gerald W. Hart. 2010. « Beta-N-Acetylglucosamine (O-GlcNAc) Is Part of the Histone Code ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (46): 19915-20. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009023107>.
- Sakaidani, Yuta, Koichi Furukawa, et Tetsuya Okajima. 2010. « O-GlcNAc Modification of the Extracellular Domain of Notch Receptors ». *Methods in Enzymology* 480: 355-73. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(10\)80016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(10)80016-3).
- Sakaidani, Yuta, Naoki Ichiyanagi, Chika Saito, Tomoko Nomura, Makiko Ito, Yosuke Nishio, Daita Nadano, Tsukasa Matsuda, Koichi Furukawa, et Tetsuya Okajima. 2012. « O-Linked-N-Acetylglucosamine Modification of Mammalian Notch Receptors by an Atypical O-GlcNAc Transferase Eogt1 ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 419 (1): 14-19. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.01.098>.
- Sakaidani, Yuta, Tomoko Nomura, Aiko Matsuura, Makiko Ito, Emiko Suzuki, Kosuke Murakami, Daita Nadano, Tsukasa Matsuda, Koichi Furukawa, et Tetsuya Okajima. 2011. « O-Linked-N-Acetylglucosamine on Extracellular Protein Domains Mediates Epithelial Cell-Matrix Interactions ». *Nature Communications* 2 (décembre): 583. <https://doi.org/10.1038/ncomms1591>.
- Samel, Stefan A., Alejandra Fernández-Cid, Jingchuan Sun, Alberto Riera, Silvia Tognetti, M. Carmen Herrera, Huilin Li, et Christian Speck. 2014. « A Unique DNA Entry Gate Serves for Regulated Loading of the Eukaryotic Replicative Helicase MCM2-7 onto DNA ». *Genes & Development* 28 (15): 1653-66. <https://doi.org/10.1101/gad.242404.114>.
- Sancar, Aziz, Laura A. Lindsey-Boltz, Keziban Unsal-Kaçmaz, et Stuart Linn. 2004. « Molecular Mechanisms of Mammalian DNA Repair and the DNA Damage Checkpoints ». *Annual Review of Biochemistry* 73: 39-85. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.073723>.
- Sánchez, M., A. Calzada, et A. Bueno. 1999. « The Cdc6 Protein Is Ubiquitinated in Vivo for Proteolysis in *Saccharomyces Cerevisiae* ». *The Journal of Biological Chemistry* 274 (13): 9092-97.
- Sansam, Christopher L., Jennifer L. Shepard, Kevin Lai, Alessandra Ianari, Paul S. Danielian, Adam Amsterdam, Nancy Hopkins, et Jacqueline A. Lees. 2006. « DTL/CDT2 Is Essential for Both CDT1 Regulation and the Early G2/M Checkpoint ». *Genes & Development* 20 (22): 3117-29. <https://doi.org/10.1101/gad.1482106>.
- Sato, M., T. Gotow, Z. You, Y. Komamura-Kohno, Y. Uchiyama, N. Yabuta, H. Nojima, et Y. Ishimi. 2000. « Electron Microscopic Observation and Single-Stranded DNA Binding Activity of the Mcm4,6,7 Complex ». *Journal of Molecular Biology* 300 (3): 421-31. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3865>.
- Sato, S., C. L. Ward, et R. R. Kopito. 1998. « Cotranslational Ubiquitination of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator in Vitro ». *The Journal of Biological Chemistry* 273 (13): 7189-92.
- Sayat, Ria, Brian Leber, Vanja Grubac, Lesley Wiltshire, et Sujata Persad. 2008. « O-GlcNAc-Glycosylation of Beta-Catenin Regulates Its Nuclear Localization and Transcriptional Activity ». *Experimental Cell Research* 314 (15): 2774-87. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.05.017>.
- Schimpl, Marianne, Vladimir S. Borodkin, Lindsey J. Gray, et Daan M. F. van Aalten. 2012. « Synergy of Peptide and Sugar in O-GlcNAcase Substrate Recognition ». *Chemistry & Biology* 19 (2): 173-78. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.01.011>.
- Schimpl, Marianne, Alexander W. Schüttelkopf, Vladimir S. Borodkin, et Daan M. F. van Aalten. 2010. « Human OGA Binds Substrates in a Conserved Peptide Recognition Groove ». *The Biochemical Journal* 432 (1): 1-7. <https://doi.org/10.1042/BJ20101338>.
- Schimpl, Marianne, Xiaowei Zheng, Vladimir S. Borodkin, David E. Blair, Andrew T. Ferenbach, Alexander W. Schüttelkopf, Iva Navratilova, et al. 2012. « O-GlcNAc Transferase Invokes

- Nucleotide Sugar Pyrophosphate Participation in Catalysis ». *Nature Chemical Biology* 8 (12): 969-74. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1108>.
- Schirm, M., M. Kalmokoff, A. Aubry, P. Thibault, M. Sandoz, et S. M. Logan. 2004. « Flagellin from *Listeria Monocytogenes* Is Glycosylated with Beta-O-Linked N-Acetylglucosamine ». *Journal of Bacteriology* 186 (20): 6721-27. <https://doi.org/10.1128/JB.186.20.6721-6727.2004>.
- Schorderet-Slatkine, Sabine. 1972. « Action of progesterone and related steroids on oocyte maturation in *Xenopus laevis*. An in vitro study ». *Cell Differentiation* 1 (3): 179-89. [https://doi.org/10.1016/0045-6039\(72\)90027-9](https://doi.org/10.1016/0045-6039(72)90027-9).
- Schultz, Jörg, et Birgit Pils. 2002. « Prediction of Structure and Functional Residues for O-GlcNAcase, a Divergent Homologue of Acetyltransferases ». *FEBS Letters* 529 (2-3): 179-82.
- Schwacha, A., et S. P. Bell. 2001. « Interactions between Two Catalytically Distinct MCM Subgroups Are Essential for Coordinated ATP Hydrolysis and DNA Replication ». *Molecular Cell* 8 (5): 1093-1104.
- Scovassi, A. Ivana, et Ennio Prosperi. 2006. « Analysis of Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) Associated with DNA ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 314: 457-75.
- Sears, Rosalie C. 2004. « The Life Cycle of C-Myc: From Synthesis to Degradation ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 3 (9): 1133-37.
- Semenza, G. L. 2010. « Defining the Role of Hypoxia-Inducible Factor 1 in Cancer Biology and Therapeutics ». *Oncogene* 29 (5): 625-34. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.441>.
- Sender, Ron, Shai Fuchs, et Ron Milo. 2016. « Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body ». *PLoS Biology* 14 (8): e1002533. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533>.
- Sengupta, Sugopa, Frederick van Deursen, Giacomo de Piccoli, et Karim Labib. 2013. « Dpb2 Integrates the Leading-Strand DNA Polymerase into the Eukaryotic Replisome ». *Current Biology: CB* 23 (7): 543-52. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.02.011>.
- Seo, Hyeon Gyu, Han Byeol Kim, Min Jueng Kang, Joo Hwan Ryum, Eugene C. Yi, et Jin Won Cho. 2016. « Identification of the Nuclear Localisation Signal of O-GlcNAc Transferase and Its Nuclear Import Regulation ». *Scientific Reports* 6 (octobre): 34614. <https://doi.org/10.1038/srep34614>.
- Shafi, R., S. P. Iyer, L. G. Ellies, N. O'Donnell, K. W. Marek, D. Chui, G. W. Hart, et 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 (11): 5735-39. <https://doi.org/10.1073/pnas.100471497>.
- Shaw, Reuben J., et Lewis C. Cantley. 2012. « Decoding Key Nodes in the Metabolism of Cancer Cells: Sugar & Spice and All Things Nice ». *F1000 Biology Reports* 4: 2. <https://doi.org/10.3410/B4-2>.
- Shen, Aimee, Heather D. Kamp, Angelika Gründling, et Darren E. Higgins. 2006. « A Bifunctional O-GlcNAc Transferase Governs Flagellar Motility through Anti-Repression ». *Genes & Development* 20 (23): 3283-95. <https://doi.org/10.1101/gad.1492606>.
- Shen, Bingquan, Wanjun Zhang, Zhaomei Shi, Fang Tian, Yulin Deng, Changqing Sun, Guangshun Wang, Weijie Qin, et Xiaohong Qian. 2017. « A Novel Strategy for Global Mapping of O-GlcNAc Proteins and Peptides Using Selective Enzymatic Deglycosylation, HILIC Enrichment and Mass Spectrometry Identification ». *Talanta* 169 (juillet): 195-202. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.03.049>.
- Shen, David L., Tracey M. Gloster, Scott A. Yuzwa, et David J. Vocadlo. 2012. « Insights into O-Linked N-Acetylglucosamine ([O-9]O-GlcNAc) Processing and Dynamics through Kinetic Analysis of O-GlcNAc Transferase and O-GlcNAcase Activity on Protein Substrates ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (19): 15395-408. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.310664>.
- Sherman, D. A., et S. L. Forsburg. 1998. « Schizosaccharomyces Pombe Mcm3p, an Essential Nuclear Protein, Associates Tightly with Nda4p (Mcm5p) ». *Nucleic Acids Research* 26 (17): 3955-60.

- Sherman, D. A., S. G. Pasion, et S. L. Forsburg. 1998. « Multiple Domains of Fission Yeast Cdc19p (MCM2) Are Required for Its Association with the Core MCM Complex ». *Molecular Biology of the Cell* 9 (7): 1833-45.
- Sheu, Yi-Jun, Justin B. Kinney, Armelle Lengronne, Philippe Pasero, et Bruce Stillman. 2014. « Domain within the Helicase Subunit Mcm4 Integrates Multiple Kinase Signals to Control DNA Replication Initiation and Fork Progression ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (18): E1899-1908. <https://doi.org/10.1073/pnas.1404063111>.
- Sheu, Yi-Jun, et Bruce Stillman. 2006. « Cdc7-Dbf4 Phosphorylates MCM Proteins via a Docking Site-Mediated Mechanism to Promote S Phase Progression ». *Molecular Cell* 24 (1): 101-13. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.07.033>.
- . 2010. « The Dbf4-Cdc7 Kinase Promotes S Phase by Alleviating an Inhibitory Activity in Mcm4 ». *Nature* 463 (7277): 113-17. <https://doi.org/10.1038/nature08647>.
- Shi, Feng-Tao, Hyeung Kim, Weisi Lu, Quanyuan He, Dan Liu, Margaret A. Goodell, Ma Wan, et Zhou 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 (29): 20776-84. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.460386>.
- Shi, Jie, Tihomir Tomašič, Suhela Sharif, Arwin J. Brouwer, Marko Anderluh, Rob Ruijtenbeek, et Roland J. Pieters. 2017. « Peptide Microarray Analysis of the Cross-Talk Between O-GlcNAcylation and Tyrosine Phosphorylation ». *FEBS Letters*, juin. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12708>.
- Shi, Wei-Wei, Yong-Liang Jiang, Fan Zhu, Yi-Hu Yang, Qiu-Yan Shao, Hong-Bo Yang, Yan-Min Ren, Hui Wu, Yuxing Chen, et Cong-Zhao Zhou. 2014. « Structure of a Novel O-Linked N-Acetyl-D-Glucosamine (O-GlcNAc) Transferase, GtfA, Reveals Insights into the Glycosylation of Pneumococcal Serine-Rich Repeat Adhesins ». *The Journal of Biological Chemistry* 289 (30): 20898-907. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.581934>.
- Shi, Y., J. Tomic, F. Wen, S. Shaha, A. Bahlo, R. Harrison, J. W. Dennis, et al. 2010. « Aberrant O-GlcNAcylation Characterizes Chronic Lymphocytic Leukemia ». *Leukemia* 24 (9): 1588-98. <https://doi.org/10.1038/leu.2010.152>.
- Shibata, Etsuko, Manjari Kiran, Yoshiyuki Shibata, Samarendra Singh, Shashi Kiran, et Anindya Dutta. 2016. « Two Subunits of Human ORC Are Dispensable for DNA Replication and Proliferation ». *ELife* 5 (décembre). <https://doi.org/10.7554/eLife.19084>.
- Shin, Heon, Hyun-Jeong Cha, Keun Na, Min Jung Lee, Jin-Young Cho, Chae-Yeon Kim, Eun Kyung Kim, Chang Moo Kang, Hoguen Kim, et Young-Ki Paik. 2018. « O-GlcNAcylation of the Tumor Suppressor FOXO3 Triggers Aberrant Cancer Cell Growth ». *Cancer Research*, janvier. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-3512>.
- Shin, Incheol, Jeremy Rotty, Frederick Y. Wu, et Carlos L. Arteaga. 2005. « Phosphorylation of P27Kip1 at Thr-157 Interferes with Its Association with Importin Alpha during G1 and Prevents Nuclear Re-Entry ». *The Journal of Biological Chemistry* 280 (7): 6055-63. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412367200>.
- Shin, Sang-Hoon, Dona C. Love, et John A. Hanover. 2011. « Elevated O-GlcNAc-Dependent Signaling through Inducible MOGT Expression Selectively Triggers Apoptosis ». *Amino Acids* 40 (3): 885-93. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0719-8>.
- Siddiqui, Khalid, et Bruce Stillman. 2007. « ATP-Dependent Assembly of the Human Origin Recognition Complex ». *The Journal of Biological Chemistry* 282 (44): 32370-83. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705905200>.
- Sikorski, R. S., M. S. Boguski, M. Goebel, et P. Hieter. 1990. « A Repeating Amino Acid Motif in CDC23 Defines a Family of Proteins and a New Relationship among Genes Required for Mitosis and RNA Synthesis ». *Cell* 60 (2): 307-17.
- Simon, Aline C., Jin C. Zhou, Rajika L. Perera, Frederick van Deursen, Cecile Evrin, Marina E. Ivanova, Mairi L. Kilkenny, et al. 2014. « A Ctf4 trimer couples the CMG helicase to DNA polymerase  $\alpha$



- in the eukaryotic replisome ». *Nature* 510 (7504): 293-97.  
<https://doi.org/10.1038/nature13234>.
- Simon, Jeffrey A., et Robert E. Kingston. 2009. « Mechanisms of Polycomb Gene Silencing: Knowns and Unknowns ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 10 (10): 697-708.  
<https://doi.org/10.1038/nrm2763>.
- Simon, Nicholas, Matthew L. Bochman, Sandlin Seguin, Jeffrey L. Brodsky, William L. Seibel, et Anthony Schwacha. 2013. « Ciprofloxacin is an inhibitor of the Mcm2-7 replicative helicase ». *Bioscience Reports* 33 (5). <https://doi.org/10.1042/BSR20130083>.
- Sims, Robert J., et Danny Reinberg. 2008. « Is There a Code Embedded in Proteins That Is Based on Post-Translational Modifications? » *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 9 (10): 815-20.  
<https://doi.org/10.1038/nrm2502>.
- Singh, Jay Prakash, Kaisi Zhang, Jing Wu, et Xiaoyong Yang. 2015. « O-GlcNAc Signaling in Cancer Metabolism and Epigenetics ». *Cancer Letters* 356 (2 Pt A): 244-50.  
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.04.014>.
- Slawson, C., R. J. Copeland, et G. W. Hart. 2010. « O-GlcNAc Signaling: A Metabolic Link between Diabetes and Cancer? » *Trends in Biochemical Sciences* 35 (10): 547-55.  
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.04.005>.
- Slawson, C., J. Pidala, et R. Potter. 2001. « Increased N-Acetyl-Beta-Glucosaminidase Activity in Primary Breast Carcinomas Corresponds to a Decrease in N-Acetylglucosamine Containing Proteins ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1537 (2): 147-57.
- Slawson, Chad, et Gerald W. Hart. 2011. « O-GlcNAc Signaling: Implications for Cancer Cell Biology ». *Nature Reviews. Cancer* 11 (9): 678-84. <https://doi.org/10.1038/nrc3114>.
- Slawson, Chad, Michael P. Housley, et Gerald W. Hart. 2006. « O-GlcNAc Cycling: How a Single Sugar Post-Translational Modification Is Changing the Way We Think about Signaling Networks ». *Journal of Cellular Biochemistry* 97 (1): 71-83. <https://doi.org/10.1002/jcb.20676>.
- Slawson, Chad, T. Lakshmanan, Spencer Knapp, et Gerald W. Hart. 2008. « A Mitotic GlcNAcylation/Phosphorylation Signaling Complex Alters the Posttranslational State of the Cytoskeletal Protein Vimentin ». *Molecular Biology of the Cell* 19 (10): 4130-40.  
<https://doi.org/10.1091/mbc.E07-11-1146>.
- Slawson, Chad, Susan Shafii, James Amburgey, et Robert Potter. 2002. « Characterization of the O-GlcNAc Protein Modification in *Xenopus Laevis* Oocyte during Oogenesis and Progesterone-Stimulated Maturation ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1573 (2): 121-29.
- Slawson, Chad, Natasha E. Zachara, Keith Vosseller, Win D. Cheung, M. Daniel Lane, et Gerald W. Hart. 2005. « Perturbations in O-Linked Beta-N-Acetylglucosamine Protein Modification Cause Severe Defects in Mitotic Progression and Cytokinesis ». *The Journal of Biological Chemistry* 280 (38): 32944-56. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503396200>.
- Snow, C. M., A. Senior, et L. Gerace. 1987. « Monoclonal Antibodies Identify a Group of Nuclear Pore Complex Glycoproteins ». *The Journal of Cell Biology* 104 (5): 1143-56.
- Sodi, V. L., Z. A. Bacigalupa, C. M. Ferrer, J. V. Lee, W. A. Gocal, D. Mukhopadhyay, K. E. Wellen, M. Ivan, et M. J. Reginato. 2017. « Nutrient Sensor O-GlcNAc Transferase Controls Cancer Lipid Metabolism via SREBP-1 Regulation ». *Oncogene*, octobre.  
<https://doi.org/10.1038/onc.2017.395>.
- Spadari, Silvio, Francesco Sala, et Guido Pedrali-Noy. 1982. « Aphidicolin: a specific inhibitor of nuclear DNA replication in eukaryotes ». *Trends in Biochemical Sciences* 7 (1): 29-32.  
[https://doi.org/10.1016/0968-0004\(82\)90061-5](https://doi.org/10.1016/0968-0004(82)90061-5).
- Starr, C. M., et J. A. Hanover. 1990. « Glycosylation of Nuclear Pore Protein P62. Reticulocyte Lysate Catalyzes O-Linked N-Acetylglucosamine Addition in Vitro ». *The Journal of Biological Chemistry* 265 (12): 6868-73.
- Staudt, Louis M. 2010. « Oncogenic Activation of NF-KappaB ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (6): a000109. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000109>.
- Steenackers, Agata, Stéphanie Olivier-Van Stichelen, Steffi F. Baldini, Vanessa Dehennaut, Robert-Alain Toillon, Xuefen Le Bourhis, Ikram El Yazidi-Belkoura, et Tony Lefebvre. 2016. « Silencing

- the Nucleocytoplasmic O-GlcNAc Transferase Reduces Proliferation, Adhesion, and Migration of Cancer and Fetal Human Colon Cell Lines ». *Frontiers in Endocrinology* 7: 46. <https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00046>.
- Stefanovic, Dragana, Slavica Stanojic, Alessandro Vindigni, Alexander Ochem, et Arturo Falaschi. 2003. « In Vitro Protein-DNA Interactions at the Human Lamin B2 Replication Origin ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (44): 42737-43. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307058200>.
- Sterner, J. M., S. Dew-Knight, C. Musahl, S. Kornbluth, et J. M. Horowitz. 1998. « Negative Regulation of DNA Replication by the Retinoblastoma Protein Is Mediated by Its Association with MCM7 ». *Molecular and Cellular Biology* 18 (5): 2748-57.
- Stinchcomb, D. T., K. Struhl, et R. W. Davis. 1979. « Isolation and Characterisation of a Yeast Chromosomal Replicator ». *Nature* 282 (5734): 39-43.
- Stoeber, K., A. D. Mills, Y. Kubota, T. Krude, P. Romanowski, K. Marheineke, R. A. Laskey, et G. H. Williams. 1998. « Cdc6 Protein Causes Premature Entry into S Phase in a Mammalian Cell-Free System ». *The EMBO Journal* 17 (24): 7219-29. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.24.7219>.
- Stoeber, K., T. D. Tlsty, L. Happerfield, G. A. Thomas, S. Romanov, L. Bobrow, E. D. Williams, et G. H. Williams. 2001. « DNA Replication Licensing and Human Cell Proliferation ». *Journal of Cell Science* 114 (Pt 11): 2027-41.
- Sugimoto, Nozomi, Yasutoshi Tatsumi, Tatsuya Tsurumi, Akio Matsukage, Tohru Kiyono, Hideo Nishitani, et Masatoshi Fujita. 2004. « Cdt1 Phosphorylation by Cyclin A-Dependent Kinases Negatively Regulates Its Function without Affecting Geminin Binding ». *The Journal of Biological Chemistry* 279 (19): 19691-97. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313175200>.
- Sümeği, Máté, Eva Hunyadi-Gulyás, Katalin F. Medzihradzsky, et Andor Udvardy. 2003. « 26S Proteasome Subunits Are O-Linked N-Acetylglucosamine-Modified in *Drosophila Melanogaster* ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 312 (4): 1284-89.
- Sun, Jingchuan, Cecile Evrin, Stefan A. Samel, Alejandra Fernández-Cid, Alberto Riera, Hironori Kawakami, Bruce Stillman, Christian Speck, et Huilin Li. 2013. « Cryo-EM Structure of a Helicase Loading Intermediate Containing ORC-Cdc6-Cdt1-MCM2-7 Bound to DNA ». *Nature Structural & Molecular Biology* 20 (8): 944-51. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2629>.
- Sun, Jingchuan, Alejandra Fernandez-Cid, Alberto Riera, Silvia Tognetti, Zuanning Yuan, Bruce Stillman, Christian Speck, et Huilin Li. 2014. « Structural and Mechanistic Insights into Mcm2-7 Double-Hexamer Assembly and Function ». *Genes & Development* 28 (20): 2291-2303. <https://doi.org/10.1101/gad.242313.114>.
- Sun, Jingchuan, Hironori Kawakami, Juergen Zech, Christian Speck, Bruce Stillman, et Huilin Li. 2012. « Cdc6-Induced Conformational Changes in ORC Bound to Origin DNA Revealed by Cryo-Electron Microscopy ». *Structure (London, England: 1993)* 20 (3): 534-44. <https://doi.org/10.1016/j.str.2012.01.011>.
- Sun, Jingchuan, Yi Shi, Roxana E. Georgescu, Zuanning Yuan, Brian T. Chait, Huilin Li, et Michael E. O'Donnell. 2015. « The Architecture of a Eukaryotic Replisome ». *Nature Structural & Molecular Biology* 22 (12): 976-82. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3113>.
- Susaki, Etsuo, Keiko Nakayama, et Keiichi I. Nakayama. 2007. « Cyclin D2 Translocates P27 out of the Nucleus and Promotes Its Degradation at the G0-G1 Transition ». *Molecular and Cellular Biology* 27 (13): 4626-40. <https://doi.org/10.1128/MCB.00862-06>.
- Symeonidou, Ioanna-Eleni, Panagiotis Kotsantis, Vassilis Roukos, Maria-Anna Rapsomaniki, Hernán E. Grecco, Philippe Bastiaens, Stavros Taraviras, et Zoi Lygerou. 2013. « Multi-Step Loading of Human Minichromosome Maintenance Proteins in Live Human Cells ». *Journal of Biological Chemistry* 288 (50): 35852-67. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.474825>.

# T

- Tada, S., A. Li, D. Maiorano, M. Méchali, et J. J. Blow. 2001. « Repression of Origin Assembly in Metaphase Depends on Inhibition of RLF-B/Cdt1 by Geminin ». *Nature Cell Biology* 3 (2): 107-13. <https://doi.org/10.1038/35055000>.
- Tahiliani, Mamta, Kian Peng Koh, Yinghua Shen, William A. Pastor, Hozefa Bandukwala, Yevgeny Brudno, Suneet Agarwal, et al. 2009. « Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1 ». *Science (New York, N.Y.)* 324 (5929): 930-35. <https://doi.org/10.1126/science.1170116>.
- Tai, Hwan-Ching, Nelly Khidekel, Scott B. Ficarro, Eric C. Peters, et Linda C. Hsieh-Wilson. 2004. « Parallel Identification of O-GlcNAc-Modified Proteins from Cell Lysates ». *Journal of the American Chemical Society* 126 (34): 10500-501. <https://doi.org/10.1021/ja047872b>.
- Takahashi, K., H. Yamada, et M. Yanagida. 1994. « Fission Yeast Minichromosome Loss Mutants Mis Cause Lethal Aneuploidy and Replication Abnormality ». *Molecular Biology of the Cell* 5 (10): 1145-58.
- Takahashi, Y., J. B. Rayman, et B. D. Dynlacht. 2000. « Analysis of Promoter Binding by the E2F and PRB Families in Vivo: Distinct E2F Proteins Mediate Activation and Repression ». *Genes & Development* 14 (7): 804-16.
- Takayama, Yuko, Yoichiro Kamimura, Mariko Okawa, Sachiko Muramatsu, Akio Sugino, et Hiroyuki Araki. 2003. « GINS, a Novel Multiprotein Complex Required for Chromosomal DNA Replication in Budding Yeast ». *Genes & Development* 17 (9): 1153-65. <https://doi.org/10.1101/gad.1065903>.
- Takei, Y., M. Swietlik, A. Tanoue, G. Tsujimoto, T. Kouzarides, et R. Laskey. 2001. « MCM3AP, a Novel Acetyltransferase That Acetylates Replication Protein MCM3 ». *EMBO Reports* 2 (2): 119-23. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kve026>.
- Tan, Ee Phie, Sarah Caro, Anish Potnis, Christopher Lanza, et Chad Slawson. 2013. « O-Linked N-Acetylglucosamine Cycling Regulates Mitotic Spindle Organization ». *The Journal of Biological Chemistry* 288 (38): 27085-99. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.470187>.
- Tan, Ee Phie, Maria T. Villar, Lezi E, Jianghua Lu, J. Eva Selfridge, Antonio Artigues, Russell H. Swerdlow, et Chad Slawson. 2014. « Altering O-Linked  $\beta$ -N-Acetylglucosamine Cycling Disrupts Mitochondrial Function ». *The Journal of Biological Chemistry* 289 (21): 14719-30. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.525790>.
- Tanaka, Seiji, Toshiko Umemori, Kazuyuki Hirai, Sachiko Muramatsu, Yoichiro Kamimura, et Hiroyuki Araki. 2007. « CDK-Dependent Phosphorylation of Sld2 and Sld3 Initiates DNA Replication in Budding Yeast ». *Nature* 445 (7125): 328-32. <https://doi.org/10.1038/nature05465>.
- Tashima, Yuko, et Pamela Stanley. 2014. « Antibodies That Detect O-Linked  $\beta$ -D-N-Acetylglucosamine on the Extracellular Domain of Cell Surface Glycoproteins ». *The Journal of Biological Chemistry* 289 (16): 11132-42. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.492512>.
- Taylor, Rodrick P., Glendon J. Parker, Mark W. Hazel, Yudi Soesanto, William Fuller, Marla J. Yazzie, et Donald A. McClain. 2008. « Glucose Deprivation Stimulates O-GlcNAc Modification of Proteins through up-Regulation of O-Linked N-Acetylglucosaminyltransferase ». *The Journal of Biological Chemistry* 283 (10): 6050-57. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707328200>.
- Tessarz, Peter, et Tony Kouzarides. 2014. « Histone Core Modifications Regulating Nucleosome Structure and Dynamics ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 15 (11): 703-8. <https://doi.org/10.1038/nrm3890>.
- Thomer, Marguerite, Noah R. May, Bhagwan D. Aggarwal, Garrick Kwok, et Brian R. Calvi. 2004. « Drosophila Double-Parked Is Sufficient to Induce Re-Replication during Development and Is Regulated by Cyclin E/CDK2 ». *Development (Cambridge, England)* 131 (19): 4807-18. <https://doi.org/10.1242/dev.01348>.

- Thompson, John W., Matthew E. Griffin, et Linda C. Hsieh-Wilson. 2018. « Methods for the Detection, Study, and Dynamic Profiling of O-GlcNAc Glycosylation ». *Methods in Enzymology* 598: 101-35. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2017.06.009>.
- Thorens, Bernard, et Mike Mueckler. 2010. « Glucose Transporters in the 21st Century ». *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 298 (2): E141-145. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00712.2009>.
- Ticau, Simina, Larry J. Friedman, Nikola A. Ivica, Jeff Gelles, et Stephen P. Bell. 2015. « Single-Molecule Studies of Origin Licensing Reveal Mechanisms Ensuring Bidirectional Helicase Loading ». *Cell* 161 (3): 513-25. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.012>.
- Todorov, I. T., R. Pepperkok, R. N. Philipova, S. E. Kearsey, W. Ansorge, et D. Werner. 1994. « A Human Nuclear Protein with Sequence Homology to a Family of Early S Phase Proteins Is Required for Entry into S Phase and for Cell Division ». *Journal of Cell Science* 107 ( Pt 1) (janvier): 253-65.
- Toleman, Clifford, Andrew J. Paterson, et Jeffrey E. Kudlow. 2006. « Location and Characterization of the O-GlcNAcase Active Site ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1760 (5): 829-39. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.01.017>.
- Toleman, Clifford, Andrew J. Paterson, Ronald Shin, et Jeffrey E. Kudlow. 2006. « Streptozotocin Inhibits O-GlcNAcase via the Production of a Transition State Analog ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 340 (2): 526-34. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.12.041>.
- Toleman, Clifford, Andrew J. Paterson, Thomas R. Whisenhunt, et Jeffrey 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 (51): 53665-73. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410406200>.
- Torres, C. R., et G. W. Hart. 1984. « Topography and Polypeptide Distribution of Terminal N-Acetylglucosamine Residues on the Surfaces of Intact Lymphocytes. Evidence for O-Linked GlcNAc ». *The Journal of Biological Chemistry* 259 (5): 3308-17.
- Toyoshima, H., et T. Hunter. 1994. « P27, a Novel Inhibitor of G1 Cyclin-Cdk Protein Kinase Activity, Is Related to P21 ». *Cell* 78 (1): 67-74.
- Trapannone, Riccardo, Daniel Mariappa, Andrew T. Ferenbach, et Daan Mf van Aalten. 2016. « Nucleocytoplasmic Human O-GlcNAc Transferase Is Sufficient for O-GlcNAcylation of Mitochondrial Proteins ». *The Biochemical Journal*, avril. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160092>.
- Trapannone, Riccardo, Karim Rafie, et Daan M. F. van Aalten. 2016. « O-GlcNAc Transferase Inhibitors: Current Tools and Future Challenges ». *Biochemical Society Transactions* 44 (1): 88-93. <https://doi.org/10.1042/BST20150189>.
- Traxinger, R. R., et 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 (16): 10148-54.
- Trinca, Gloria M., Merit L. Goodman, Evangelia K. Papachristou, Clive S. D'Santos, Prabhakar Chalise, Rashna Madan, Chad Slawson, et Christy R. Hagan. 2017. « O-GlcNAc-Dependent Regulation of Progesterone Receptor Function in Breast Cancer ». *Hormones & Cancer*, septembre. <https://doi.org/10.1007/s12672-017-0310-9>.
- Trinidad, Jonathan C., David T. Barkan, Brittany F. Gullledge, Agnes Thalhammer, Andrej Sali, Ralf Schoepfer, et Alma L. Burlingame. 2012. « Global Identification and Characterization of Both O-GlcNAcylation and Phosphorylation at the Murine Synapse ». *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 11 (8): 215-29. <https://doi.org/10.1074/mcp.O112.018366>.
- Tsuji, Toshiya, Scott B. Ficarro, et Wei Jiang. 2006. « Essential Role of Phosphorylation of MCM2 by Cdc7/Dbf4 in the Initiation of DNA Replication in Mammalian Cells ». *Molecular Biology of the Cell* 17 (10): 4459-72. <https://doi.org/10.1091/mbc.E06-03-0241>.
- Tsunematsu, Takaaki, Yoshihiro Takihara, Naozumi Ishimaru, Michele Pagano, Takashi Takata, et Yasusei Kudo. 2013. « Aurora-A Controls Pre-Replicative Complex Assembly and DNA

Replication by Stabilizing Geminin in Mitosis ». *Nature Communications* 4: 1885.  
<https://doi.org/10.1038/ncomms2859>.

Tsurimoto, T., et B. Stillman. 1991. « Replication Factors Required for SV40 DNA Replication in Vitro. I. DNA Structure-Specific Recognition of a Primer-Template Junction by Eukaryotic DNA Polymerases and Their Accessory Proteins ». *The Journal of Biological Chemistry* 266 (3): 1950-60.

Tsuruga, H., N. Yabuta, K. Hashizume, M. Ikeda, Y. Endo, et H. Nojima. 1997. « Expression, Nuclear Localization and Interactions of Human MCM/P1 Proteins ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 236 (1): 118-25. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.6865>.

## V

Vaidyanathan, Krithika, Tejasvi Niranjana, Nithya Selvan, Chin Fen Teo, Melanie May, Sneha Patel, Brent Weatherly, et al. 2017. « Identification and Characterization of a Missense Mutation in The O-Linked  $\beta$ -N-Acetylglucosamine (O-GlcNAc) Transferase Gene That Segregates with X-Linked Intellectual Disability ». *The Journal of Biological Chemistry* 292 (21): 8948-63.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M116.771030>.

Vaidyanathan, Krithika, et Lance Wells. 2014. « Multiple Tissue-Specific Roles for the O-GlcNAc Post-Translational Modification in the Induction of and Complications Arising from Type II Diabetes ». *The Journal of Biological Chemistry* 289 (50): 34466-71.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.R114.591560>.

Van Damme, Petra, Marta Laso, Bogdan Polevoda, Cristina Gazquez, Alberto Elosegui-Artola, Duk Soo Kim, Elena De Juan-Pardo, et al. 2012. « N-Terminal Acetylome Analyses and Functional Insights of the N-Terminal Acetyltransferase NatB ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (31): 12449-54.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1210303109>.

Vella, Pietro, Andrea Scelfo, Sriganesh Jammula, Fulvio Chiacchiera, Kristine Williams, Alessandro Cuomo, Alessandra Roberto, et al. 2013. « Tet Proteins Connect the O-Linked N-Acetylglucosamine Transferase Ogt to Chromatin in Embryonic Stem Cells ». *Molecular Cell* 49 (4): 645-56. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.12.019>.

Venkatesh, Swaminathan, et Jerry L. Workman. 2015. « Histone Exchange, Chromatin Structure and the Regulation of Transcription ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 16 (3): 178-89.  
<https://doi.org/10.1038/nrm3941>.

Vercoutter-Edouart, Anne-Sophie, Ikram El Yazidi-Belkoura, Céline Guinez, Steffi Baldini, Maité Leturcq, Marlène Mortuaire, Anne-Marie Mir, et al. 2015. « Detection and Identification of O-GlcNAcylated Proteins by Proteomic Approaches ». *Proteomics* 15 (5-6): 1039-50.  
<https://doi.org/10.1002/pmic.201400326>.

Vocadlo, David J. 2012. « O-GlcNAc Processing Enzymes: Catalytic Mechanisms, Substrate Specificity, and Enzyme Regulation ». *Current Opinion in Chemical Biology* 16 (5-6): 488-97.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.10.021>.

Vocadlo, David J., Howard C. Hang, Eun-Ju Kim, John A. Hanover, et Carolyn R. Bertozzi. 2003. « A Chemical Approach for Identifying O-GlcNAc-Modified Proteins in Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (16): 9116-21.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1632821100>.

Volkening, Melanie, et Ingrid Hoffmann. 2005. « Involvement of Human MCM8 in Prereplication Complex Assembly by Recruiting Hcdc6 to Chromatin ». *Molecular and Cellular Biology* 25 (4): 1560-68. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.4.1560-1568.2005>.

Vosseller, Keith, Lance Wells, M. Daniel Lane, et Gerald 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 (8): 5313-18. <https://doi.org/10.1073/pnas.072072399>.

## W

- Wagner, Sebastian A., Petra Beli, Brian T. Weinert, Michael L. Nielsen, Jürgen Cox, Matthias Mann, et Chunaram Choudhary. 2011. « A Proteome-Wide, Quantitative Survey of in Vivo Ubiquitylation Sites Reveals Widespread Regulatory Roles ». *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 10 (10): M111.013284. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.013284>.
- Walter, A. O., W. Seghezzi, W. Korver, J. Sheung, et E. Lees. 2000. « The Mitotic Serine/Threonine Kinase Aurora2/AIK Is Regulated by Phosphorylation and Degradation ». *Oncogene* 19 (42): 4906-16. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203847>.
- Walther, Tobias C., et Robert V. Farese. 2009. « The life of lipid droplets ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, Lipid Droplets as dynamic organelles connecting influx, efflux and storage of lipids, 1791 (6): 459-66. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2008.10.009>.
- Wang, I.-Ching, Yi-Ju Chen, Douglas Hughes, Vladimir Petrovic, Michael L. Major, Hyung Jung Park, Yongjun Tan, Timothy Ackerson, et Robert H. Costa. 2005. « Forkhead Box M1 Regulates the Transcriptional Network of Genes Essential for Mitotic Progression and Genes Encoding the SCF (Skp2-Cks1) Ubiquitin Ligase ». *Molecular and Cellular Biology* 25 (24): 10875-94. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.24.10875-10894.2005>.
- Wang, Xin, Jing Li, Jason Diaz, et Jianxin You. 2014. « Helicase Assays ». *Bio-protocol* 4 (6). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4932906/>.
- Wang, Yang, Jia Liu, Xin Jin, Dapeng Zhang, Dongxue Li, Fengqi Hao, Yunpeng Feng, et al. 2017. « O-GlcNAcylation Destabilizes the Active Tetrameric PKM2 to Promote the Warburg Effect ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, décembre. <https://doi.org/10.1073/pnas.1704145115>.
- Wang, Zhiwei, Sanjeev Banerjee, Dejuan Kong, Yiwei Li, et Fazlul H. Sarkar. 2007. « Down-Regulation of Forkhead Box M1 Transcription Factor Leads to the Inhibition of Invasion and Angiogenesis of Pancreatic Cancer Cells ». *Cancer Research* 67 (17): 8293-8300. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1265>.
- Wang, Zihao, Marjan Gucek, et Gerald 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 (37): 13793-98. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806216105>.
- Wang, Zihao, Namrata D. Udeshi, Chad Slawson, Philip D. Compton, Kaoru Sakabe, Win D. Cheung, Jeffrey Shabanowitz, Donald F. Hunt, et Gerald W. Hart. 2010. « Extensive Crosstalk between O-GlcNAcylation and Phosphorylation Regulates Cytokinesis ». *Science Signaling* 3 (104): ra2. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000526>.
- Warburg, O. 1956. « On the Origin of Cancer Cells ». *Science (New York, N.Y.)* 123 (3191): 309-14.
- Watson, J. D., et F. H. Crick. 1953. « Genetical Implications of the Structure of Deoxyribonucleic Acid ». *Nature* 171 (4361): 964-67.
- Webster, Danielle M., Chin Fen Teo, Yuhua Sun, Dorota Wloga, Steven Gay, Kimberly D. Klonowski, Lance Wells, et Scott T. Dougan. 2009. « O-GlcNAc Modifications Regulate Cell Survival and Epiboly during Zebrafish Development ». *BMC Developmental Biology* 9 (avril): 28. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-9-28>.
- Wei, Lei, et Xiaolan Zhao. 2016. « A New MCM Modification Cycle Regulates DNA Replication Initiation ». *Nature Structural & Molecular Biology* 23 (3): 209-16. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3173>.

- Wells, L., K. Vosseller, et G. W. Hart. 2001. « Glycosylation of Nucleocytoplasmic Proteins: Signal Transduction and O-GlcNAc ». *Science (New York, N.Y.)* 291 (5512): 2376-78.
- Wells, Lance, Yuan Gao, James A. Mahoney, Keith Vosseller, Chen Chen, Antony Rosen, et Gerald W. Hart. 2002. « Dynamic O-Glycosylation of Nuclear and Cytosolic Proteins: Further Characterization of the Nucleocytoplasmic Beta-N-Acetylglucosaminidase, O-GlcNAcase ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (3): 1755-61.
- Wells, Lance, Lisa K. Kreppel, Frank I. Comer, Brian E. Wadzinski, et Gerald W. Hart. 2004. « O-GlcNAc Transferase Is in a Functional Complex with Protein Phosphatase 1 Catalytic Subunits ». *The Journal of Biological Chemistry* 279 (37): 38466-70. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406481200>.
- Wells, Lance, Chad Slawson, et Gerald W. Hart. 2011. « The E2F-1 Associated Retinoblastoma-Susceptibility Gene Product Is Modified by O-GlcNAc ». *Amino Acids* 40 (3): 877-83. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0709-x>.
- Whelan, Stephen A., M. Daniel Lane, et Gerald W. Hart. 2008. « Regulation of the O-Linked Beta-N-Acetylglucosamine Transferase by Insulin Signaling ». *The Journal of Biological Chemistry* 283 (31): 21411-17. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800677200>.
- Whisenhunt, Thomas R., Xiaoyong Yang, Damon B. Bowe, Andrew J. Paterson, Brian A. Van Tine, et Jeffrey E. Kudlow. 2006. « Disrupting the Enzyme Complex Regulating O-GlcNAcylation Blocks Signaling and Development ». *Glycobiology* 16 (6): 551-63. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwj096>.
- Whitfield, Michael L., Gavin Sherlock, Alok J. Saldanha, John I. Murray, Catherine A. Ball, Karen E. Alexander, John C. Matese, et al. 2002. « Identification of Genes Periodically Expressed in the Human Cell Cycle and Their Expression in Tumors ». *Molecular Biology of the Cell* 13 (6): 1977-2000. <https://doi.org/10.1091/mbc.02-02-0030>.
- Willems, Anke P., Mehmet Gundogdu, Marlies J. E. Kempers, Jacques C. Giltay, Rolph Pfundt, Martin Elferink, Bettina F. Loza, et al. 2017. « Mutations in N-Acetylglucosamine (O-GlcNAc) Transferase in Patients with X-Linked Intellectual Disability ». *The Journal of Biological Chemistry*, juin. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.790097>.
- Williams, R. S., R. V. Shohet, et B. Stillman. 1997. « A Human Protein Related to Yeast Cdc6p ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (1): 142-47.
- Wilson, A. C., M. G. Peterson, et W. Herr. 1995. « The HCF Repeat Is an Unusual Proteolytic Cleavage Signal ». *Genes & Development* 9 (20): 2445-58.
- Wojnar, Andrzej, Bartosz Pula, Aleksandra Piotrowska, Aleksandra Jethon, Krzysztof Kujawa, Christopher Kobierzycki, Janusz Rys, Marzena Podhorska-Okolow, et Piotr Dziegiel. 2011. « Correlation of Intensity of MT-I/II Expression with Ki-67 and MCM-2 Proteins in Invasive Ductal Breast Carcinoma ». *Anticancer Research* 31 (9): 3027-33.
- Worth, Matthew, Hao Li, et Jiaoyang Jiang. 2017. « Deciphering the Functions of Protein O-GlcNAcylation with Chemistry ». *ACS Chemical Biology* 12 (2): 326-35. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b01065>.
- Wright, JaLessa N., Helen E. Collins, Adam R. Wende, et John C. Chatham. 2017. « O-GlcNAcylation and Cardiovascular Disease ». *Biochemical Society Transactions* 45 (2): 545-53. <https://doi.org/10.1042/BST20160164>.
- Wu, Hao, et Yi Zhang. 2014. « Reversing DNA Methylation: Mechanisms, Genomics, and Biological Functions ». *Cell* 156 (1-2): 45-68. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.019>.
- Wu, Rentian, Zhiquan Wang, Honglian Zhang, Haiyun Gan, et Zhiguo Zhang. 2017. « H3K9me3 Demethylase Kdm4d Facilitates the Formation of Pre-Initiative Complex and Regulates DNA Replication ». *Nucleic Acids Research* 45 (1): 169-80. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw848>.
- Wysocka, Joanna, Michael P. Myers, Carol D. Laherty, Robert N. Eisenman, et Winship Herr. 2003. « Human Sin3 Deacetylase and Trithorax-Related Set1/Ash2 Histone H3-K4 Methyltransferase Are Tethered Together Selectively by the Cell-Proliferation Factor HCF-1 ». *Genes & Development* 17 (7): 896-911. <https://doi.org/10.1101/gad.252103>.

# X

- Xiao, Jun, Shujuan Xu, Chunhua Li, Yunyuan Xu, Lijing Xing, Yuda Niu, Qing Huan, et al. 2014. « O-GlcNAc-Mediated Interaction between VER2 and TaGRP2 Elicits TaVRN1 MRNA Accumulation during Vernalization in Winter Wheat ». *Nature Communications* 5 (août): 4572. <https://doi.org/10.1038/ncomms5572>.
- Xu, Qiuran, Caihong Yang, Yu Du, Yali Chen, Hailong Liu, Min Deng, Haoxing Zhang, et al. 2014. « AMPK Regulates Histone H2B O-GlcNAcylation ». *Nucleic Acids Research* 42 (9): 5594-5604. <https://doi.org/10.1093/nar/gku236>.

# Y

- Yan, Z., J. DeGregori, R. Shohet, G. Leone, B. Stillman, J. R. Nevins, et R. S. Williams. 1998. « Cdc6 Is Regulated by E2F and Is Essential for DNA Replication in Mammalian Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (7): 3603-8.
- Yang, Caiting, Peike Peng, Lili Li, Miaomiao Shao, Junjie Zhao, Lan Wang, Fangfang Duan, et al. 2016. « High Expression of GFAT1 Predicts Poor Prognosis in Patients with Pancreatic Cancer ». *Scientific Reports* 6 (décembre): 39044. <https://doi.org/10.1038/srep39044>.
- Yang, Won Ho, Ji Eun Kim, Hyung Wook Nam, Jung Won Ju, Hoe Suk Kim, Yu Sam Kim, et Jin Won Cho. 2006. « Modification of P53 with O-Linked N-Acetylglucosamine Regulates P53 Activity and Stability ». *Nature Cell Biology* 8 (10): 1074-83. <https://doi.org/10.1038/ncb1470>.
- Yang, Won Ho, Sang Yoon Park, Hyung Wook Nam, Do Hyun Kim, Jeong Gu Kang, Eun Seok Kang, Yu Sam Kim, Hyun Chul Lee, Kwan Soo Kim, et Jin Won Cho. 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 (45): 17345-50. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806198105>.
- Yang, X., K. Su, M. D. Roos, Q. Chang, A. J. Paterson, et J. E. Kudlow. 2001. « O-Linkage of N-Acetylglucosamine to Sp1 Activation Domain Inhibits Its Transcriptional Capability ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (12): 6611-16. <https://doi.org/10.1073/pnas.111099998>.
- Yang, Xiaoyong, Pat P. Ongusaha, Philip D. Miles, Joyce C. Havstad, Fengxue Zhang, W. Venus So, Jeffrey E. Kudlow, et al. 2008. « Phosphoinositide Signalling Links O-GlcNAc Transferase to Insulin Resistance ». *Nature* 451 (7181): 964-69. <https://doi.org/10.1038/nature06668>.
- Yang, Xiaoyong, Fengxue Zhang, et Jeffrey E. Kudlow. 2002. « Recruitment of O-GlcNAc Transferase to Promoters by Corepressor MSin3A: Coupling Protein O-GlcNAcylation to Transcriptional Repression ». *Cell* 110 (1): 69-80.
- Yang, Yi, Xiaotong Yin, Huirong Yang, et Yanhui Xu. 2015. « Histone Demethylase LSD2 Acts as an E3 Ubiquitin Ligase and Inhibits Cancer Cell Growth through Promoting Proteasomal Degradation of OGT ». *Molecular Cell* 58 (1): 47-59. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.01.038>.
- Yang, Yong Ryoul, Hyun-Jun Jang, Yong Hwa Lee, Il Shin Kim, Ho Lee, Sung Ho Ryu, et Pann-Ghill Suh. 2015. « O-GlcNAc Cycling Enzymes Control Vascular Development of the Placenta by Modulating the Levels of HIF-1 $\alpha$  ». *Placenta* 36 (10): 1063-68. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2015.08.001>.
- Yang, Yong Ryoul, Dae Hyun Kim, Young-Kyo Seo, Dohyun Park, Hyun-Jun Jang, Soo Youn Choi, Yong Hwa Lee, et al. 2015. « Elevated O-GlcNAcylation Promotes Colonic Inflammation and



- Tumorigenesis by Modulating NF-KB Signaling ». *Oncotarget* 6 (14): 12529-42.  
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.3725>.
- Yang, Yong Ryoul, Minseok Song, Ho Lee, Yoon Jeon, Eun-Jeong Choi, Hyun-Jun Jang, Hyo Youl Moon, et al. 2012. « O-GlcNAcase Is Essential for Embryonic Development and Maintenance of Genomic Stability ». *Aging Cell* 11 (3): 439-48. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2012.00801.x>.
- Yeeles, Joseph T. P., Tom D. Deegan, Agnieszka Janska, Anne Early, et John F. X. Diffley. 2015. « Regulated Eukaryotic DNA Replication Origin Firing with Purified Proteins ». *Nature* 519 (7544): 431-35. <https://doi.org/10.1038/nature14285>.
- Yeh, Elizabeth, Melissa Cunningham, Hugh Arnold, Dawn Chasse, Teresa Monteith, Giovanni Ivaldi, William C. Hahn, et al. 2004. « A Signalling Pathway Controlling C-Myc Degradation That Impacts Oncogenic Transformation of Human Cells ». *Nature Cell Biology* 6 (4): 308-18. <https://doi.org/10.1038/ncb1110>.
- Yeung, S. J., J. Pan, et M.-H. Lee. 2008. « Roles of P53, MYC and HIF-1 in Regulating Glycolysis - the Seventh Hallmark of Cancer ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 65 (24): 3981-99. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8224-x>.
- Yi, Wen, Peter M. Clark, Daniel E. Mason, Marie C. Keenan, Collin Hill, William A. Goddard, Eric C. Peters, Edward M. Driggers, et Linda C. Hsieh-Wilson. 2012. « Phosphofructokinase 1 Glycosylation Regulates Cell Growth and Metabolism ». *Science (New York, N.Y.)* 337 (6097): 975-80. <https://doi.org/10.1126/science.1222278>.
- Ying, Haoqiang, Alec C. Kimmelman, Costas A. Lyssiotis, Sujun Hua, Gerald C. Chu, Eliot Fletcher-Sananikone, Jason W. Locasale, et al. 2012. « Oncogenic Kras Maintains Pancreatic Tumors through Regulation of Anabolic Glucose Metabolism ». *Cell* 149 (3): 656-70. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.058>.
- Yoshida, Kazumasa, Haruhiko Takisawa, et Yumiko Kubota. 2005. « Intrinsic Nuclear Import Activity of Geminin Is Essential to Prevent Re-Initiation of DNA Replication in Xenopus Eggs ». *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 10 (1): 63-73. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2005.00815.x>.
- You, Zhiying, Yukio Ishimi, Hisao Masai, et Fumio Hanaoka. 2002. « Roles of Mcm7 and Mcm4 Subunits in the DNA Helicase Activity of the Mouse Mcm4/6/7 Complex ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (45): 42471-79. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205769200>.
- Young, M. R., K. Suzuki, H. Yan, S. Gibson, et B. K. Tye. 1997. « Nuclear Accumulation of *Saccharomyces Cerevisiae* Mcm3 Is Dependent on Its Nuclear Localization Sequence ». *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 2 (10): 631-43.
- Yu, Yonghao, Hong Ji, Jennifer A. Doudna, et Julie A. Leary. 2005. « Mass Spectrometric Analysis of the Human 40S Ribosomal Subunit: Native and HCV IRES-Bound Complexes ». *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 14 (6): 1438-46. <https://doi.org/10.1110/ps.041293005>.
- Yu, Zhiling, Daorong Feng, et Chun Liang. 2004. « Pairwise Interactions of the Six Human MCM Protein Subunits ». *Journal of Molecular Biology* 340 (5): 1197-1206. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.05.024>.
- Yuzwa, Scott A., Matthew S. Macauley, Julia E. Heinonen, Xiaoyang Shan, Rebecca J. Dennis, Yuan He, Garrett E. Whitworth, et al. 2008. « A Potent Mechanism-Inspired O-GlcNAcase Inhibitor That Blocks Phosphorylation of Tau in Vivo ». *Nature Chemical Biology* 4 (8): 483-90. <https://doi.org/10.1038/nchembio.96>.
- Yuzwa, Scott A., Xiaoyang Shan, Matthew S. Macauley, Thomas Clark, Yuliya Skorobogatko, Keith Vosseller, et David J. Vocadlo. 2012. « Increasing O-GlcNAc Slows Neurodegeneration and Stabilizes Tau against Aggregation ». *Nature Chemical Biology* 8 (4): 393-99. <https://doi.org/10.1038/nchembio.797>.

# Z

- Zachara, Natasha E. 2009. « Detecting the “O-GlcNAc-Ome”; Detection, Purification, and Analysis of O-GlcNAc Modified Proteins ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 534: 251-79. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-022-5\\_19](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-022-5_19).
- Zachara, Natasha E., et Gerald W. Hart. 2004. « O-GlcNAc Modification: A Nutritional Sensor That Modulates Proteasome Function ». *Trends in Cell Biology* 14 (5): 218-21. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.03.005>.
- Zachara, Natasha E., Keith Vosseller, et Gerald W. Hart. 2011. « Detection and Analysis of Proteins Modified by O-Linked N-Acetylglucosamine ». *Current Protocols in Protein Science* Chapter 12 (novembre): Unit12.8. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps1208s66>.
- Zanconato, Francesca, Michelangelo Cordenonsi, et Stefano Piccolo. 2016. « YAP/TAZ at the Roots of Cancer ». *Cancer Cell* 29 (6): 783-803. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.05.005>.
- Zarkowska, T., et S. Mittnacht. 1997. « Differential Phosphorylation of the Retinoblastoma Protein by G1/S Cyclin-Dependent Kinases ». *The Journal of Biological Chemistry* 272 (19): 12738-46.
- Zegerman, Philip, et John F. X. Diffley. 2007. « Phosphorylation of Sld2 and Sld3 by Cyclin-Dependent Kinases Promotes DNA Replication in Budding Yeast ». *Nature* 445 (7125): 281-85. <https://doi.org/10.1038/nature05432>.
- Zeidan, Quira, et Gerald W. Hart. 2010. « The Intersections between O-GlcNAcylation and Phosphorylation: Implications for Multiple Signaling Pathways ». *Journal of Cell Science* 123 (Pt 1): 13-22. <https://doi.org/10.1242/jcs.053678>.
- Zeidan, Quira, Zihao Wang, Antonio De Maio, et Gerald W. Hart. 2010. « O-GlcNAc Cycling Enzymes Associate with the Translational Machinery and Modify Core Ribosomal Proteins ». *Molecular Biology of the Cell* 21 (12): 1922-36. <https://doi.org/10.1091/mbc.E09-11-0941>.
- Zentella, Rodolfo, Jianhong Hu, Wen-Ping Hsieh, Peter A. Matsumoto, Andrew Dawdy, Benjamin Barnhill, Harriette Oldenhof, et al. 2016. « O-GlcNAcylation of Master Growth Repressor DELLA by SECRET AGENT Modulates Multiple Signaling Pathways in Arabidopsis ». *Genes & Development* 30 (2): 164-76. <https://doi.org/10.1101/gad.270587.115>.
- Zentella, Rodolfo, Ning Sui, Benjamin Barnhill, Wen-Ping Hsieh, Jianhong Hu, Jeffrey Shabanowitz, Michael Boyce, et al. 2017. « The Arabidopsis O-Fucosyltransferase SPINDLY Activates Nuclear Growth Repressor DELLA ». *Nature Chemical Biology* 13 (5): 479-85. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2320>.
- Zetterberg, A., et O. Larsson. 1985. « Kinetic Analysis of Regulatory Events in G1 Leading to Proliferation or Quiescence of Swiss 3T3 Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82 (16): 5365-69.
- Zetterberg, A., O. Larsson, et K. G. Wiman. 1995. « What Is the Restriction Point? » *Current Opinion in Cell Biology* 7 (6): 835-42.
- Zhan, T., N. Rindtorff, et M. Boutros. 2017. « Wnt Signaling in Cancer ». *Oncogene* 36 (11): 1461-73. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.304>.
- Zhang, Feng, et Xiaochun Yu. 2011. « WAC, a Functional Partner of RNF20/40, Regulates Histone H2B Ubiquitination and Gene Transcription ». *Molecular Cell* 41 (4): 384-97. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.01.024>.
- Zhang, Fengxue, Kaihong Su, Xiaoyong Yang, Damon B. Bowe, Andrew J. Paterson, et Jeffrey E. Kudlow. 2003. « O-GlcNAc Modification Is an Endogenous Inhibitor of the Proteasome ». *Cell* 115 (6): 715-25.
- Zhang, H., G. J. Hannon, et D. Beach. 1994. « P21-Containing Cyclin Kinases Exist in Both Active and Inactive States ». *Genes & Development* 8 (15): 1750-58.
- Zhang, Jingjing, Lan Yu, Xing Wu, Lan Zou, Kelvin K. L. Sou, Zhun Wei, Xue Cheng, Guang Zhu, et Chun Liang. 2010. « The Interacting Domains of HCdt1 and HMcm6 Involved in the Chromatin

- Loading of the MCM Complex in Human Cells ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 9 (24): 4848-57. <https://doi.org/10.4161/cc.9.24.14136>.
- Zhang, Qiao, Xiaoguang Liu, Wenqi Gao, Pishun Li, Jingli Hou, Jiwen Li, et Jiemin Wong. 2014. « Differential Regulation of the Ten-Eleven Translocation (TET) Family of Dioxygenases by O-Linked  $\beta$ -N-Acetylglucosamine Transferase (OGT) ». *The Journal of Biological Chemistry* 289 (9): 5986-96. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.524140>.
- Zhang, Suisheng, Kevin Roche, Heinz-Peter Nasheuer, et Noel Francis Lowndes. 2011. « Modification of Histones by Sugar  $\beta$ -N-Acetylglucosamine (GlcNAc) Occurs on Multiple Residues, Including Histone H3 Serine 10, and Is Cell Cycle-Regulated ». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (43): 37483-95. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.284885>.
- Zhang, Xiao, Yongxia Qiao, Qi Wu, Yan Chen, Shaowu Zou, Xiangfan Liu, Guoqing Zhu, et al. 2017. « The Essential Role of YAP O-GlcNAcylation in High-Glucose-Stimulated Liver Tumorigenesis ». *Nature Communications* 8 (mai): 15280. <https://doi.org/10.1038/ncomms15280>.
- Zhang, Zhen, Ee Phie Tan, Nicole J. VandenHull, Kenneth R. Peterson, et Chad Slawson. 2014. « O-GlcNAcase Expression Is Sensitive to Changes in O-GlcNAc Homeostasis ». *Frontiers in Endocrinology* 5: 206. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00206>.
- Zhao, Peng, Rosa Viner, Chin Fen Teo, Geert-Jan Boons, David Horn, et Lance Wells. 2011. « Combining High-Energy C-Trap Dissociation and Electron Transfer Dissociation for Protein O-GlcNAc Modification Site Assignment ». *Journal of Proteome Research* 10 (9): 4088-4104. <https://doi.org/10.1021/pr2002726>.
- Zhao, Zhuo-Shen, Jet Phey Lim, Yuen-Wai Ng, Louis Lim, et Ed Manser. 2005. « The GIT-Associated Kinase PAK Targets to the Centrosome and Regulates Aurora-A ». *Molecular Cell* 20 (2): 237-49. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.08.035>.
- Zhou, Houjiang, Serena Di Palma, Christian Preisinger, Mao Peng, Ayse Nur Polat, Albert J. R. Heck, et Shabaz Mohammed. 2013. « Toward a Comprehensive Characterization of a Human Cancer Cell Phosphoproteome ». *Journal of Proteome Research* 12 (1): 260-71. <https://doi.org/10.1021/pr300630k>.
- Zhou, Peipei, Zhilong Wang, Xiujie Yuan, Cuihong Zhou, Lulu Liu, Xiaoling Wan, Feng Zhang, et al. 2013. « Mixed Lineage Leukemia 5 (MLL5) Protein Regulates Cell Cycle Progression and E2F1-Responsive Gene Expression via Association with Host Cell Factor-1 (HCF-1) ». *The Journal of Biological Chemistry* 288 (24): 17532-43. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.439729>.
- Zhu, L., S. van den Heuvel, K. Helin, A. Fattaey, M. Ewen, D. Livingston, N. Dyson, et E. Harlow. 1993. « Inhibition of Cell Proliferation by P107, a Relative of the Retinoblastoma Protein ». *Genes & Development* 7 (7A): 1111-25.
- Zhu, Yanping, Ta-Wei Liu, Samy Cecioni, Razieh Eskandari, Wesley F. Zandberg, et David J. Vocadlo. 2015. « O-GlcNAc Occurs Cotranslationally to Stabilize Nascent Polypeptide Chains ». *Nature Chemical Biology* 11 (5): 319-25. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1774>.
- Zhu, Yonghong, Yukio Ishimi, Marcel Tanudji, et Emma Lees. 2005. « Human CDK2 Inhibition Modifies the Dynamics of Chromatin-Bound Minichromosome Maintenance Complex and Replication Protein A ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 4 (9): 1254-63. <https://doi.org/10.4161/cc.4.9.1975>.



# Annexes





# *O*-GlcNAc transferase associates with the MCM2–7 complex and its silencing destabilizes MCM–MCM interactions

Maité Leturcq<sup>1</sup> · Marlène Mortuaire<sup>1</sup> · Stéphan Hardivillé<sup>1</sup> · Céline Schulz<sup>1</sup> · Tony Lefebvre<sup>1</sup> · Anne-Sophie Vercoutter-Edouart<sup>1</sup>

Received: 17 January 2018 / Revised: 6 July 2018 / Accepted: 13 July 2018  
© The Author(s) 2018

## Abstract

*O*-GlcNAcylation of proteins is governed by *O*-GlcNAc transferase (OGT) and *O*-GlcNAcase (OGA). The homeostasis of *O*-GlcNAc cycling is regulated during cell cycle progression and is essential for proper cellular division. We previously reported the *O*-GlcNAcylation of the minichromosome maintenance proteins MCM2, MCM3, MCM6 and MCM7. These proteins belong to the MCM2–7 complex which is crucial for the initiation of DNA replication through its DNA helicase activity. Here we show that the six subunits of MCM2–7 are *O*-GlcNAcyated and that *O*-GlcNAcylation of MCM proteins mainly occurs in the chromatin-bound fraction of synchronized human cells. Moreover, we identify stable interaction between OGT and several MCM subunits. We also show that down-regulation of OGT decreases the chromatin binding of MCM2, MCM6 and MCM7 without affecting their steady-state level. Finally, OGT silencing or OGA inhibition destabilizes MCM2/6 and MCM4/7 interactions in the chromatin-enriched fraction. In conclusion, OGT is a new partner of the MCM2–7 complex and *O*-GlcNAcylation homeostasis might regulate MCM2–7 complex by regulating the chromatin loading of MCM6 and MCM7 and stabilizing MCM/MCM interactions.

**Keywords** *O*-GlcNAcylation · Post-translational modification · Pre-replicative complex · DNA replication · Chromatin · Cell cycle

## Introduction

*O*-GlcNAcylation (*O*-linked  $\beta$ -*N*-acetylglucosaminylation) of proteins is catalysed by *O*-GlcNAc transferase (OGT) which uses uridine-diphospho-*N*-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) to transfer the GlcNAc moiety onto serine or threonine residues of cytosolic, nuclear and mitochondrial proteins [1–4]. Conversely, *O*-GlcNAcase (OGA) reverses this abundant post-translational modification by removing the GlcNAc residue [5, 6]. *O*-GlcNAcylation regulates various cellular processes including transcription, translation, chromatin remodelling and cell cycle progression by

modulating protein activity, stability, subcellular localization or protein–protein interaction [4, 7–10]. Moreover, a crosstalk can occur between *O*-GlcNAcylation and phosphorylation, either on adjacent sites or at the same sites of the target proteins [7, 9, 11–13]. Recently, the motif (pSp/T)P(V/A/T) (gS/gT) has been defined as a very specific and stringent phospho/*O*-GlcNAc crosstalk motif [14].

In mammalian cells, *O*-GlcNAcylation levels and the expression of OGT and OGA are highly regulated during the cell cycle, and disruption of *O*-GlcNAc cycling induces defects in cell cycle progression and mitosis [15–24]. The loss in *O*-GlcNAc homeostasis alters the expression of the early-induced transcription factors c-Fos, c-Jun, c-Myc and Sp1 [15] and the expression of cyclin D and p27<sup>KIP1</sup> cell-cycle inhibitor [21, 25, 26]. It can also induce abnormal oscillations in the levels of cyclins E, A and B, resulting in aberrant mitotic-specific phosphorylation and defects in cytokinesis [12, 16–18, 23, 24]. To identify new targets of OGT during G1/S transition, we previously performed a differential analysis of the *O*-GlcNAcome of G1- and S phase synchronized human cells

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00018-018-2874-0>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Anne-Sophie Vercoutter-Edouart  
anne-sophie.vercoutter@univ-lille.fr

<sup>1</sup> Univ. Lille, CNRS, UMR 8576, UGSF, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, 59000 Lille, France

and identified the minichromosome maintenance (MCM) proteins MCM2/3/6/7 [22].

MCM2–7 complex is composed of six distinct MCM subunits assembled in a highly defined order: MCM5–MCM3–MCM7–MCM4–MCM6–MCM2. MCM proteins display a well-conserved organization of their functional domains, and possess an AAA+ ATPase activity in their C-terminal domain [27–29]. The heterohexameric MCM2–7 complex has a ring-shaped structure to encircle DNA, the MCM2–MCM5 interaction being identified as the gate that promotes the opening of the MCM2–7 complex [29, 30]. Sub-complexes containing MCM2/4/6/7, MCM4/6/7 or MCM3/5 have also been isolated from yeast and mammalian cells [31–36]. In vitro, the sub-assembly MCM4/6/7 exhibits the DNA helicase activity [37–40]. MCM2 which is weakly associated with this sub-complex negatively regulates its helicase activity [36, 37]. The strong interaction between MCM3 and MCM5 serves also negative regulatory function on MCM2–7 ATPase activity [36, 39, 41].

The MCM2–7 complex plays an essential role in the initiation of DNA replication which is a two-step process: licensing and firing. In G1 phase, MCM2–7 takes part in the formation of the pre-replicative complex (pre-RC) which is composed of ORC (origin replication complex, Orc1-6) and the licensing factors Cdc6 and Cdt1. During this licensing step, inactive head-to-head double MCM2–7 hexamers encircle DNA origins. As cells enter the S phase, the firing step requires the recruitment of Cdc45 and GINS to the MCM ring. Within the Cdc45/MCM2–7/GINS (CMG) complex, MCM2–7 exhibits the core replicative helicase activity necessary for parental DNA strands to unwind [29, 42, 43]. Finally, as cells progress in late S phase, MCM2–7 complexes progressively dissociate from chromatin to prevent DNA re-replication [44–47]. Importantly, most of the origins on which MCM2–7 complexes have been loaded constitute dormant origins that are not used normally in S phase. However, under conditions of replicative stress that induces replication fork stalling, excess MCM2–7 complexes license latent origins as a backup mechanism to prevent under-replication and maintain genome integrity [42, 48–51].

Phosphorylation of MCM subunits dramatically changes during cell cycle progression to finely regulate the functionality of MCM2–7 complex, from the licensing step to the dissociation of the complex from chromatin in late S phase [44, 52–62]. In this work, we investigate the role of *O*-GlcNAc post-translational modification on MCM2–7 complex. We show that all the MCM subunits are modified by OGT, mostly in the chromatin-bound fraction. We identify stable interaction between OGT and the MCM3, MCM6 and MCM7 proteins. Moreover, dysregulation of *O*-GlcNAc cycling by OGT silencing decreases the amount

of chromatin-bound MCM2, MCM6 and MCM7 proteins and destabilizes MCM–MCM interactions.

## Materials and methods

### Antibodies, siRNA and chemicals

Thymidine (T1895), propidium iodide solution (P4864), RNase A (R4875), complete protease inhibitor cocktail tablets and OGA inhibitor Thiamet G (ThG) were from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France). ThG was used at 1  $\mu$ M (prepared at 100 mM in DMSO) [63]. The OGT inhibitor acetyl-5S-GlcNAc (5S-G) was kindly provided by Pr. G. W. Hart and used at 50  $\mu$ M (prepared at 50 mM in DMSO) [64]. GlcNAc was from TCI Chemicals (TCI Europe N.V., Belgium).

The following primary antibodies were used for Western blot: RL2 *O*-GlcNAc antibody (1:3000, ThermoScientific, Fisher Scientific, France), OGT (DM17 or Ti-14; 1:2000, Sigma-Aldrich), OGA (1:10,000, anti-MGEA5, ab124807, Abcam, Cambridge, UK), GST, MCM2 (PLA0060) and MCM5 (PLA0064) (1:3000, Sigma-Aldrich); MCM3 (N-19), MCM4 (H-300), MCM6 (H-8), MCM7 (141.2), GAPDH (0411) (1:3000, Santa Cruz, Heidelberg, Germany), Cyclin D1 (A-12), Cdt1 (H-300) (1:1000, Santa Cruz), Cdc6 (DCS-180) (1:1000, Merck, Darmstadt, Germany). The same antibodies were used for immunoprecipitation and indirect immunofluorescence or PLA experiments except for immunoprecipitation of MCM7 (D10A11, Cell Signaling Technology, Ozyme, Montigny-le-Bretonneux, France) and detection of MCM3 by PLA (3E1, Abgent, Euromedex, Souffelweyersheim, France). Normal control IgG polyclonal antibodies were used as negative controls for IP experiments (rabbit, mouse, or goat, Santa Cruz). The following secondary antibodies were also used: anti-goat IgG–HRP linked (1:30,000, Santa Cruz), anti-mouse IgG–HRP-linked and anti-rabbit IgG HRP-linked antibodies (1:10,000, GE Healthcare, V.W.R. Fontenay-sous-Bois, France), anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488 and anti-mouse IgG Alexa Fluor 568 (1:600, ThermoScientific, Fisher Scientific, France). Control siRNA (siRNA univ. negative control) and siRNA against OGT (GGAGGCUAUUCGAAU CAGU[dT][dT] forward, ACUGAUUCGAAUAGCCUC C[dT][dT] reverse) were purchased from Sigma-Aldrich. siRNA against OGA (siGENOME Human MGEA5 (10724) siRNA SMARTpool) was from Dharmacon (GE Healthcare Europe GmbH, Velizy-Villacoublay, France). The p3XFLAG-OGT-siRNA-resistant vector was generated by directed mutagenesis using Phusion® Hot start (NEB), p3XFLAG-OGT as template and, 5'-agcagggaaaactgcaggagctctgatgcattataaagaagcgcagcagattcccttaccttgct-



gatgcctactc-3' and 5'-gagtaggcatcagcaaggtaggggaaatcctgatcgtctttataatgcatcagagcttctcagttttccctgct-3' as primers. Prior to transformation in DH5 $\alpha$ , template was digested for 2 h at 37 °C by 1 U of DpnI (NEB). Positive clones were screened by sequencing.

### Cell culture, transfection and cell cycle synchronization

MCF7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines, and HEK 293T cells were routinely grown at 37 °C in a humidified atmosphere enriched with 5% CO<sub>2</sub> in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Lonza, Basel, Switzerland) containing high glucose (4.5 g/L) and glutamine, and supplemented with 10% foetal calf serum (FCS) (Lonza) (complete medium).

For HA-OGT transfection, HEK293T cells were cultured in complete medium ( $8 \times 10^5$  cells/100-mm dish) and when they reached around 60% of confluence, they were transiently transfected with HA-tagged OGT (1.25  $\mu$ g/100-mm dish) using the Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 (ThermoFisher, Fisher Scientific, France), according to the manufacturer's instructions. HEK293T were harvested 48 h after transfection. For small interfering RNA (siRNA) transfection, MCF7 ( $1.5 \times 10^6$  cells/100-mm dish) and MDA-MB-231 ( $10^6$  cells/100-mm dish) were reverse-transfected with Lipofectamine<sup>®</sup> RNAiMAX (ThermoFisher, Fisher Scientific, France) according to the manufacturer's recommendations, using 60 pmol of siControl, siOGA or siOGT. Cells were harvested, respectively, after 60 or 72 h of transfection. To rescue OGT silencing, 1 day later siRNA transfection, MCF7 cells were transfected with the 3XFLAG-OGT-siRNA-resistant plasmid or the 3X-pCMV plasmid as the negative control (250 ng/w), using 2.5  $\mu$ L Lipofectamine<sup>®</sup> 2000. For both types of experiments (siRNA  $\pm$  3XFLAG-OGT-siRNA), when cell cycle synchronization was needed, cells were serum-starved 24 h after transfection and the synchronization protocol was followed, as mentioned below.

Cell cycle synchronization was performed using starvation followed by serum stimulation [22]. After 24 h in complete medium (DMEM-10% FCS), cell monolayer was rinsed with PBS (Lonza) and placed either 24 h in DMEM-0.5% FCS for MCF7 cells, or 48 h in serum-free medium for MDA-MB-231 cells. Cells were either harvested (time 0 h) or grown in complete medium to release cells in cell cycle. Cells were harvested at different time points, according to cell cycle progression that was systematically monitored by propidium iodide (PI) DNA staining and flow cytometry analysis, as previously described [22]. When mentioned, vehicle (DMSO, 1:1000), acetyl-5S-GlcNAc (5S-G, 50  $\mu$ M) and ThG (1  $\mu$ M) were added simultaneously with serum.

### Cell lysis and subcellular fractionation

After two washes of cellular layers with ice-cold PBS, whole cellular lysates (WCL) were obtained using RIPA buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1% (v/v) Triton X-100, 0.2% (w/v) NaDoc, 0.1% (w/v) SDS, containing 1 mM orthovanadate, 10 mM sodium fluoride and protease inhibitors) and placed on ice for 10 min. The lysate was then clarified by centrifugation at 18,800 $\times$ g for 15 min and the supernatant was stored at -20 or -80 °C before use.

Subcellular fractionation was performed as previously described [55]. Cells were lysed in cytoskeleton extraction buffer (CSK) (100 mM NaCl, 10 mM PIPES, pH 7, 300 mM sucrose, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% (v/v) NP-40 with protease inhibitor cocktail and phosphatase inhibitors (10 mM NaF, 1 mM orthovanadate) at 4 °C for 20 min. Lysates were then centrifuged at 300 $\times$ g for 5 min at 4 °C and supernatants were retrieved. A pellet wash was performed in CSK buffer, and after centrifugation at 300 $\times$ g for 5 min at 4 °C, supernatants were retrieved. Combined supernatants were then clarified by centrifugation at 18,800 $\times$ g for 15 min at 4 °C to constitute the soluble fraction (Sol.) containing the nucleocytoplasmic proteins. Finally, pellets were incubated in modified RIPA buffer (350 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7.5, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1% (v/v) Triton X-100) for 20 min on ice, sonicated for 3 min to break DNA, and then centrifuged at 18,800 $\times$ g for 15 min at 4 °C. The clear supernatant was used as the chromatin-bound protein fraction (Chrom.).

### Immunoprecipitation and Western blotting

For co-immunoprecipitation experiments, non-SDS containing lysis and washing buffers were used, and chromatin-bound protein fraction (500  $\mu$ g) was diluted 1/2 in NaCl-free modified RIPA-buffer to reduce NaCl concentration to 175 mM. Total, soluble and chromatin-bound protein extracts were precleared with a mix of protein A- and protein G-Sepharose beads (50:50) (GE Healthcare, V.W.R.) in lysis buffer for 2 h at 4 °C (20  $\mu$ L/mg). After centrifugation (5 min, 5000 $\times$ g), the supernatant was incubated with primary antibodies for 2 h or overnight at 4 °C (5  $\mu$ g/mg). Then, protein A-Sepharose (for rabbit IgG) or protein G-Sepharose (for mouse and goat IgG) was added and incubated for an additional 1 h (30  $\mu$ L/mg). Beads were washed successively three times with RIPA buffer (5 min), once in high-salt containing RIPA buffer (300 mM NaCl), and finally boiled in Laemmli buffer before separation by SDS-PAGE and transfer onto nitrocellulose membranes (Protran supported 0.45  $\mu$ m NC, GE Healthcare).

For Western blot, membranes were blocked in 5% (w/v) nonfat dry milk in Tris-buffered saline (TBS 10 $\times$ , Euro-medex) with 0.05% (v/v) Tween 20 (TBS-T) and probed

with primary antibodies overnight at 4 °C. The membranes were washed three times with TBS-T and incubated with the corresponding HRP-conjugated secondary antibody for 1 h at RT. Membranes were washed three times in TBS-T and immunoblots were developed with enhanced chemiluminescence (ECL prime Reagent, GE Healthcare, Super-signal West Pico Plus or Supersignal West Femto, ThermoScientific, Fisher Scientific, France). Image acquisition was done on a CCD camera (Fusion Solo, Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, France). The membranes were stripped in the antibody stripping buffer (Gene Bio-Application LTD, Euromedex, France) for 15 min at RT, extensively washed in water and TBS-T before reprobing with another antibody.

### sWGA lectin chromatography

Soluble and chromatin-bound proteins were enriched for GlcNAc-modified proteins using the GlcNAc-specific lectin succinylated wheat germ agglutinin (sWGA) immobilized on agarose (Vector Laboratories, Clinisciences, Nanterre, France) [65]. sWGA beads were first equilibrated in the two-fold diluted RIPA-modified buffer used for chromatin-bound protein extraction (175 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7.5, 1.25 mM sodium pyrophosphate, 0.5% (v/v) Triton X-100). For each fraction (Sol. and Chrom.), the volume corresponding to 1 mg of proteins was adjusted to 500 µL in the initial lysis buffer, and then twofold diluted in PBS to get a final concentration of 1 mg/mL. Each fraction (1 mg) was incubated for 2 h at 4 °C with 50 µL of sWGA-beads. Beads were centrifuged at 1000×g for 3 min, and then washed under vigorous stirring successively, twice with 1 mL ½-diluted RIPA-modified buffer and twice with the same buffer containing 300 mM NaCl. Finally, beads were re-suspended in Laemmli buffer before heating at 95 °C for 7 min and SDS-PAGE. A negative control was performed for each fraction by adding 0.5 M free GlcNAc in the lysate before incubation with sWGA-beads.

### GST pull-down assay

Bacterial expression plasmids pGEX-2T for GST and GST-OGT fusion proteins were kindly provided by Drs. D. Leprince and X. Yang, respectively. For GST recombinant protein expression, BL21 DE-3 *Escherichia coli* were transformed with plasmids and cultured in LB medium containing 50 µg/mL ampicillin. When bacteria reached the exponential growth phase, induction was performed at room temperature with 0.1 mM IPTG for 4 h. Bacteria were centrifuged and pellets were resuspended in PBS containing a cocktail of protease inhibitors (Sigma-Aldrich). Crude lysates were obtained using the high-pressure homogenizer Emulsiflex-C3 (Avestin, Mannheim, Germany) and centrifuged at 10,400×g for 45 min. GST fusion proteins

were immobilized on Glutathione Sepharose 4B beads (GE Healthcare) for 2 h at 4 °C under gentle agitation. Beads were successively washed for 5 min by gentle vortex in 20 mM Tris, pH 7.4, with 0.1% (v/v) Triton X-100 (twice) and in the same buffer containing 100 mM NaCl (twice), followed by centrifugation at 500×g for 5 min. For direct elution, beads were equilibrated twice in the elution buffer (50 mM Tris, pH 8, with 0.1% (v/v) Triton X-100) before adding 50 mM reduced glutathione (Sigma-Aldrich) in elution buffer. For GST pull down experiments using human cell lysates, 700 µg of proteins (soluble nucleocytoplasmic and chromatin-bound subcellular fractions) were added in each tube with the beads and incubated overnight at 4 °C with gentle agitation. Beads were successively washed three times in PBS with 0.1% Triton X-100, once in PBS with 0.1% Triton X-100 and 150 mM NaCl, and twice in 50 mM Tris, pH 8, with 0.1% Triton X-100 before elution as described before. Laemmli buffer was added in each eluted fraction, samples were boiled 5 min at 95 °C before SDS-PAGE.

### Click chemistry

We used the Click-It *O*-GlcNAc enzymatic labelling and the Click-It biotin glycoprotein systems (ThermoScientific, Fisher) to enrich *O*-GlcNAc proteins from cell lysates on streptavidin–agarose beads (Merck), as previously described [66]. Briefly, proteins from the chromatin-bound fraction were first precipitated using chloroform/methanol according to the manufacturer's protocol, and then solubilized in the presence of 1% (w/v) SDS in 20 mM HEPES (pH 7.9). *O*-GlcNAcylated proteins were enzymatically labelled with a GalNAz residue using the Y289L galactosyltransferase (GalT) and UDP-GalNAz as the nucleotide sugar. A negative control (time point 18H) in which UDP-GalNAz was omitted, was carried out in parallel and treated exactly in the same conditions than samples. Labelled proteins were then subjected to a click chemistry reaction with a biotin–alkyne probe and enriched on streptavidin–agarose beads. After click-chemistry reaction, 10% of solubilized and Click-It-labelled proteins were removed to attest the presence of MCM proteins in labelled samples (Input Click-It).

We performed *O*-GlcNAc mass tag labelling to detect and quantify *O*-GlcNAcylated fraction of MCM proteins using a 4.4 kDa DBCO-PEG mass tag. After using the Click-It *O*-GlcNAc enzymatic labelling kit following the manufacturer's instructions, 50 µg of GalNAz-labelled proteins were re-suspended in 1% SDS, 20 mM HEPES (pH 7.9) and incubated for 1 h at room temperature, under a gentle agitation, either with a 4.4 kDa DBCO-PEG at a final concentration of 10 mM (PEG+) or with DMSO (PEG–). Finally, labelled protein samples were precipitated using chloroform/methanol to remove excess of DBCO-PEG and boiled with

Laemmli buffer before separation on polyacrylamide gel. For each MCM, electrophoretic Rf values were calculated to estimate the molecular weight of the non-PEGylated and the PEGylated shifted bands and establish how many O-GlcNAc sites are present on MCM proteins. Standard curve was established using the PageRuler Prestained Protein Ladder (10–170 kDa, ThermoScientific, Fisher). In vivo glycosylation stoichiometry was determined by quantifying the relative intensities of each band [67].

### Cell cycle and DNA synthesis analysis

Distribution of cells in G0/G1, S and G2/M was routinely determined by DNA staining with PI as previously described [22]. The rate of DNA synthesis was measured using the Click-iT<sup>®</sup> EdU Flow cytometry assay kit (ThermoScientific, Fisher). After siRNA transfection or treatment with inhibitor and subsequent synchronization, cells were labelled with 10  $\mu$ M EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) for 15 min before harvesting cells. Detection of EdU-positive cells was based on the click reaction (K+) with Alexa Fluor<sup>®</sup> 647 (AF647) azide fluorescent dye according to the manufacturer's recommendations. DNA content was further labelled with PI. Several controls were performed to set up the flow cytometry instrument parameters: no labelled cells, PI-labelled cells, Edu-K+-labelled cells and Edu-K-/PI-labelled cells. Cells were then analysed by flow cytometry on a CyAn ADP LX9 instrument using the Summit V4.3.04 software for data acquisition (Beckman Coulter, Life Sciences). AF647 and PI signals were read, respectively, in FL8 channel (laser 635 nm and  $\lambda_{em}$ : 665/20 nm) and FL3 channel (laser 488 nm,  $\lambda_{em}$ : 613/20 nm). Data were analysed using FlowJo software.

### Immunofluorescence and proximity ligation assay

MCF7 cells were grown on glass coverslips for 72 h and washed three times in cold PBS before fixation in 4% paraformaldehyde in PBS at room temperature for 20 min. After three washes in PBS (5 min per wash, at RT), permeabilization of cells was performed either with 0.5% (v/v) Triton X-100 in PBS for 2 min to detect OGT–MCM interaction [68], or 20 min with 0.5% (v/v) Triton X-100 in CSK buffer without NP-40 for the detection of MCM–MCM interactions [47]. This was followed by a quenching with 100 mM glycine (pH 7.4) in PBS for 20 min and three washes in PBS. Coverslips were incubated with blocking buffer (2% (v/v) FCS, 2% bovine serum albumin (w/v), 0.2% (w/v) gelatin in PBS) for 1 h at RT before incubation with the primary antibodies (1:100) diluted in the blocking buffer, overnight at 4 °C. For indirect immunofluorescence, coverslips were washed three times with 0.5% (v/v) Tween 20 in PBS and incubated with Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies (1:600 in blocking buffer) for 1 h in the dark, at RT For

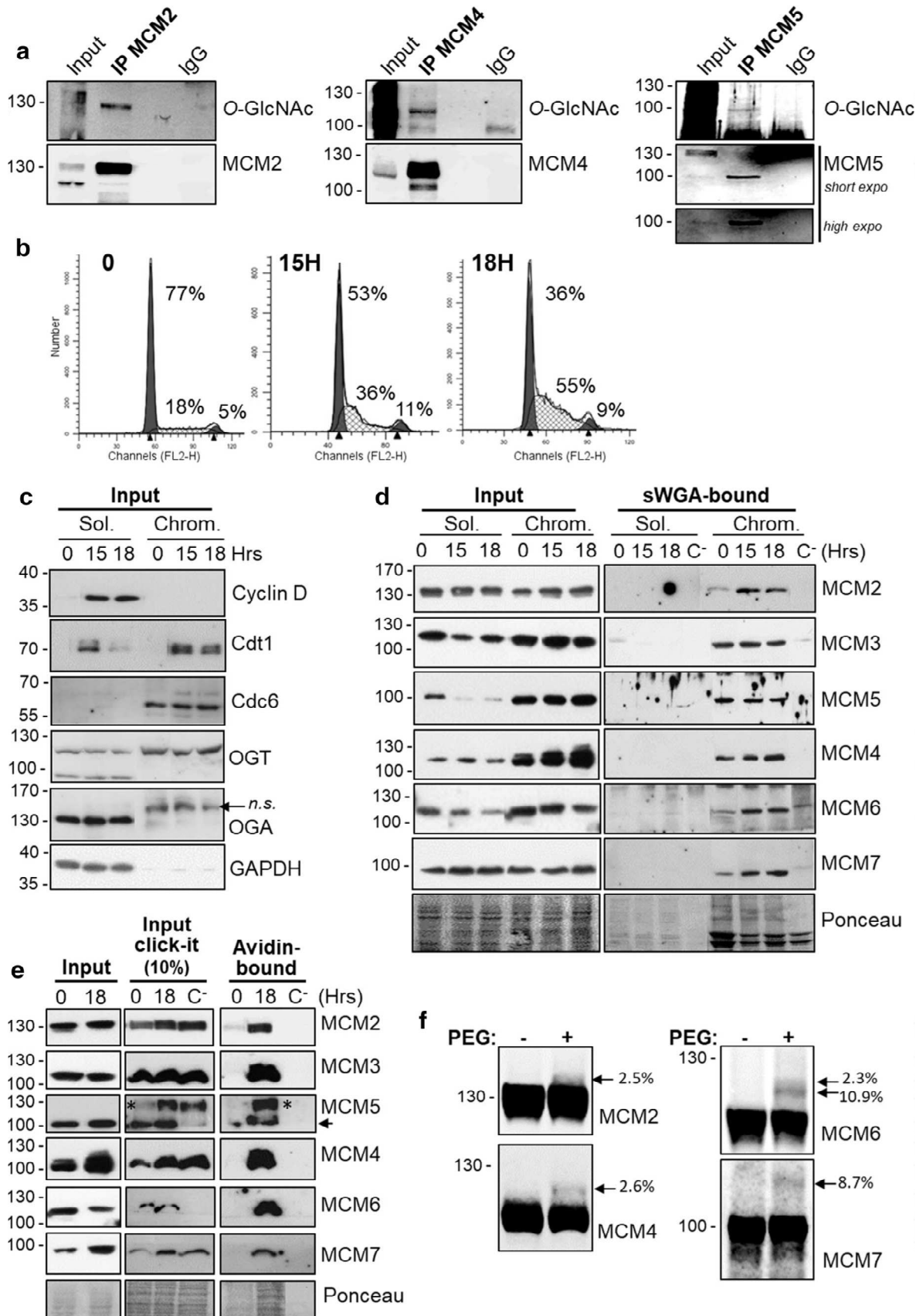
the Proximity ligation assay (Duolink<sup>®</sup> in situ kit, Sigma-Aldrich), after incubation with the primary antibodies and two washes in PBS, the coverslips were incubated with PLA PLUS and MINUS probes for mouse and rabbit, respectively, for 1 h, with the ligase for 30 min (ligation step), and with the polymerase for 2 h (amplification step, Duolink in situ detection reagents Green,  $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ : 495/527 nm) in a humidity chamber at 37 °C. Finally coverslips were washed three times in 0.5% (v/v) Tween 20 in PBS, once in PBS alone, and nuclei were stained with DAPI (50  $\mu$ g/mL) for 2 min before mounting slides in Mowiol solution (Calbiochem, Merck chemicals, Nottingham, UK). Negative controls were done using only one of the primary antibodies. Immunofluorescence was detected through an inverted Zeiss LSM700 confocal microscope with a 40x oil immersion lens at room temperature and data were collected with the ZEN 2010 software (Zeiss, Oberkochen, Germany). Images from PLA were processed with ImageJ<sup>®</sup> using a home-made plugin developed by TISBio to detect and quantify the nuclear fluorescent dots in labelled cells. Briefly, for each PLA file (channel 1, DAPI; channel 2, green PLA fluorescence), the nuclei were detected and labelled in channel 1 to define the r.o.i. (regions of interest) that were then applied to channel 2 to measure and quantify the fluorescence inside each labelled nucleus. The mean of fluorescence per cell is the ratio of the integrated density/area measured for each nucleus. Scatter dot plot (median with interquartile range) showing the mean of fluorescence per cell and statistical analysis (one-way ANOVA test, \* $p < 0.05$ ) were obtained using GraphPad Prism software.

## Results

### All the MCM subunits are O-GlcNAcylated when they are loaded onto chromatin

We previously reported the O-GlcNAcylation of MCM3, MCM6 and MCM7 in MCF7 human cells after immunoprecipitation of endogenous MCM protein and detection by Western blot of the O-GlcNAc status using the anti-O-GlcNAc RL2 antibody [22]. Using the same approach, we show here that immunoprecipitated MCM2, MCM4 and MCM5 proteins are also O-GlcNAcylated in Thiamet G-treated MCF7 cells (Fig. 1a).

The phosphorylation status of MCM proteins regulates the chromatin loading of MCM2–7 complex [44, 53, 56, 57, 59, 61, 62, 69]. To investigate whether O-GlcNAcylated forms of MCM proteins are differentially distributed in the soluble and the chromatin-bound fractions during cell cycle progression, MCF7 cells were arrested in G0 by serum starvation and released in G1 phase by serum stimulation. Cells were harvested in early (15H) and late (18H) S phase, as





**Fig. 1** All MCM2–7 subunits are *O*-GlcNAcylated and mainly found in the chromatin-enriched fraction. **a** MCF7 cells were treated overnight with 1  $\mu$ M ThG before lysis and immunoprecipitation of MCM2, MCM4 and MCM5 followed by Western blot analysis. Membranes were first incubated with anti-*O*-GlcNAc antibody (RL2), stripped and then re probed with anti-MCM antibodies. **b** MCF7 cells were synchronized in cell cycle by starvation (time point 0) then released in S phase (15H, 18H). Cell cycle profiles were determined by FACS analysis after DNA staining with PI. Percentage of cells in G0/G1, S and G2/M phases are indicated. **c** The nucleocytoplasmic soluble fraction (Sol.) and chromatin-bound fraction (Chrom.) were obtained by subcellular fractionation of proteins from synchronized cells. Samples were analysed by Western blot for the indicated proteins (*n.s.* non-specific band). **d** *O*-GlcNAcylated proteins from soluble (Sol.) and chromatin-bound (Chrom.) fractions were enriched on sWGA-agarose beads. Incubation with excess of GlcNAc (0.5 M) was used as negative control (C<sup>-</sup>). MCM proteins were detected by Western blot before (Inp) and after enrichment on sWGA lectin (sWGA-bound). Equal loading was confirmed by Ponceau staining of the membranes. **e** *O*-GlcNAcylated proteins from chromatin-bound proteins of synchronized MCF7 cells were labelled with GalNAz and a biotin–alkyne probe (Input click-it) before enrichment on avidin–agarose beads (avidin bound). Negative controls were done by omitting UDP-GalNAz (C<sup>-</sup>). Samples were analysed by Western blot for MCM proteins before (Input) and after click-chemistry. (\*) these bands correspond to the remnant signal for MCM2, despite membrane stripping. **f** *O*-GlcNAc-modified proteins from whole cell extract of MCF7 cells were enzymatically labelled with GalNAz and chemically modified with a 4.4 kDa DBCO-PEG mass tag (PEG+) or incubated with DMSO (PEG–) as negative control. MCM proteins were detected by Western blot and the number of *O*-GlcNAc sites and *O*-GlcNAcylation stoichiometry (indicated as the percentage of total MCM protein) were determined as reported in “Materials and methods”

measured by FACS (Fig. 1b). Subcellular fractionation from synchronized MCF7 cells was then performed to obtain a nucleocytoplasmic soluble fraction (Sol.) and a chromatin-bound fraction (Chrom.) [55]. Efficiency of fractionation was checked by Western blot using the G1-phase Cyclin D1 and GAPDH which are good markers for the soluble fraction (Fig. 1c). In contrast, as expected, the licensing factors Cdc6 and, to a lesser extent Cdt1, are exclusively detected in the chromatin-bound fraction [70, 71] (Fig. 1c). Interestingly, OGT is more abundant in the chromatin-bound fraction than in the soluble one, while OGA is only detected in the soluble one (Fig. 1c). Each MCM subunit was then detected by Western blot in the two subcellular fractions. Except for MCM2 and MCM7 which are equally detected in both fractions, the four other MCM subunits are preferentially located in the chromatin-bound fraction (Fig. 1d, Input). Then, to assess the *O*-GlcNAcylation of MCM proteins, we enriched *O*-GlcNAc proteins on succinylated WGA (sWGA)-agarose beads before Western blotting [65]. Negative controls in the presence of free GlcNAc were performed to confirm the specificity of the binding of GlcNAc-bearing proteins to the lectin (Fig. 1d, lanes C<sup>-</sup>). Although the six MCM subunits are present in both fractions, sWGA-bound MCM proteins were detected only in the chromatin-bound

fraction (Fig. 1d). The same results were obtained with synchronized MDA-MB-231 cells (Suppl. Figure 1a–c). Our results demonstrate that *O*-GlcNAc-modified MCM proteins are stably loaded onto chromatin.

To ascertain that each chromatin-bound MCM subunit was individually and directly *O*-GlcNAcylated, we used a click chemistry approach to enrich and detect *O*-GlcNAcylated proteins from the chromatin fraction of quiescent and S phase-synchronized MCF7 cells. With this approach, SDS (1%) was used in the solubilization buffer, allowing dissociation and denaturation of protein complexes. *O*-GlcNAcylated proteins were enzymatically labelled with a GalNAz residue before the click chemistry reaction with the biotin–alkyne probe, allowing the enrichment of *O*-GlcNAcylated proteins on avidin–agarose beads [66]. The presence of MCM proteins in click-labelled samples was confirmed by the signal detected in the input (Input Click-It) (Fig. 1e). Western blotting of the avidin-bound proteins with anti-MCMs antibodies allowed us to confirm that all the six MCM2–7 subunits are strongly *O*-GlcNAcylated in the chromatin fraction of S phase-synchronized cells in comparison with quiescent cells (18H versus 0) (Fig. 1e).

Then to evaluate the number of *O*-GlcNAc site and the stoichiometry of *O*-GlcNAcylated isoforms of MCM proteins [67], we performed the chemoenzymatic labelling of *O*-GlcNAc proteins with UDP-GalNAz and GalT1 followed by the click reaction to conjugate a 4.4 kDa DBCO-PEG mass tag to the labelled glycoproteins. After SDS-PAGE separation, immunoblotting with MCM antibodies enabled the detection of both the non-glycosylated and glycosylated forms of MCM (indicated with arrows) from the chromatin fraction of asynchronous MCF7 cells (Fig. 1f). Using this approach, we were able to detect two sites on MCM2 and MCM4 (corresponding to a shift of an estimated MW of  $10.1 \pm 1.5$  and  $9.3 \pm 1.1$  kDa, respectively), the glycosylated forms representing less than 3% of both MCMs (Fig. 1f). For MCM6, we observed two distinct glycosylated species with two and three *O*-GlcNAc sites, representing 10.9 and 2.3% of MCM6 subunit, respectively. For MCM7, only one glycosylated form with three *O*-GlcNAc sites ( $\Delta$ MW  $\approx$  12.3 kDa) was detected, representing nearly 9% of the protein. However, MCM proteins glycosylated at more than two or three sites may also exist in cells. They might be undetectable by immunoblotting due to steric hindrance of PEG molecules which could mask the epitopes and/or are stoichiometrically lower than the limit of detection.

### OGT stably interacts with several subunits of the MCM2–7 complex

The progressive and timely regulated assembly of MCM proteins with their partners is very important for the regulation of MCM2–7 stability and chromatin loading [29,

42]. To investigate whether OGT tightly interacts with the MCM2–7 subunits, we first performed a GST pull-down assay, using recombinant GST-tagged OGT immobilized onto Glutathione Sepharose beads as the bait [72]. Soluble and chromatin-bound extracts from asynchronous MCF7 cells were used as the source of prey proteins. The same experiment was conducted with GST as the negative control. After extensive washes and elution of proteins from the matrix with free glutathione, we first checked that GST and GST–OGT were efficiently eluted from Glutathione Sepharose beads using an anti-GST tag antibody, also confirmed by reprobing the membranes with an anti-OGT (Fig. 2a, lower panel). Then MCM proteins were detected by Western blot in the glutathione-eluted fractions; cellular extracts from both fractions were used as positive controls for the detection of endogenous MCM proteins (Fig. 2b, lanes Inp). Except for MCM4 that does not seem to bind to GST–OGT, both soluble and chromatin-bound MCM2/3/5/7 were able to interact with GST–OGT and not GST (Fig. 2b). For MCM6, we could observe a signal in the GST–OGT lane only in the chromatin-bound fraction. However, a faint band was also revealed in the negative control (GST alone), suggesting that MCM6 may also interact weakly with the GST tag in an unspecific manner (Fig. 2b). The same experiment was conducted with MDA-MB-231 cellular extracts in which we could observe the interaction between GST–OGT and MCM3, MCM5 and MCM7 in the two subcellular fractions (Suppl. Figure 1d). When we conducted the same experiment by adding 0.1% SDS in the MCF7 cellular extracts before incubation with beads, no signal was detected for any MCM in the GST–OGT lanes, indicating that SDS may denature the recombinant GST–OGT protein (data not shown). As we used here soft experimental conditions for the incubation, washing and elution buffers, we cannot exclude that eluted MCM proteins bind to OGT in an indirect manner due to the presence of MCM2–7 hexameric complexes and MCM proteins sub-complexes [31, 34, 37].

Then we conducted co-immunoprecipitation experiments to ascertain the interaction of OGT with MCM proteins in living cells. We first tried in MCF7 cells but we could not detect any co-immunoprecipitation of MCM proteins with endogenous OGT, corroborating the low OGT-bound/OGT-unbound MCM ratio that we observed using the GST pull-down approach (Fig. 2b). We used transitory OGT-transfected HEK293T cells and performed immunoprecipitation of either OGT or MCM from whole cell extracts. Western blot analysis showed that MCM3, MCM6 and MCM7 co-immunoprecipitate with OGT (Fig. 2c). Reverse IP allowed us to confirm that OGT interacts with MCM3 and MCM7 and, to a weaker extent, with MCM6 (Fig. 2d).

We next performed Proximity Ligation Assay (PLA) experiments in asynchronous cells, using antibodies against OGT, MCM3, MCM4, MCM6 and MCM7 for which we

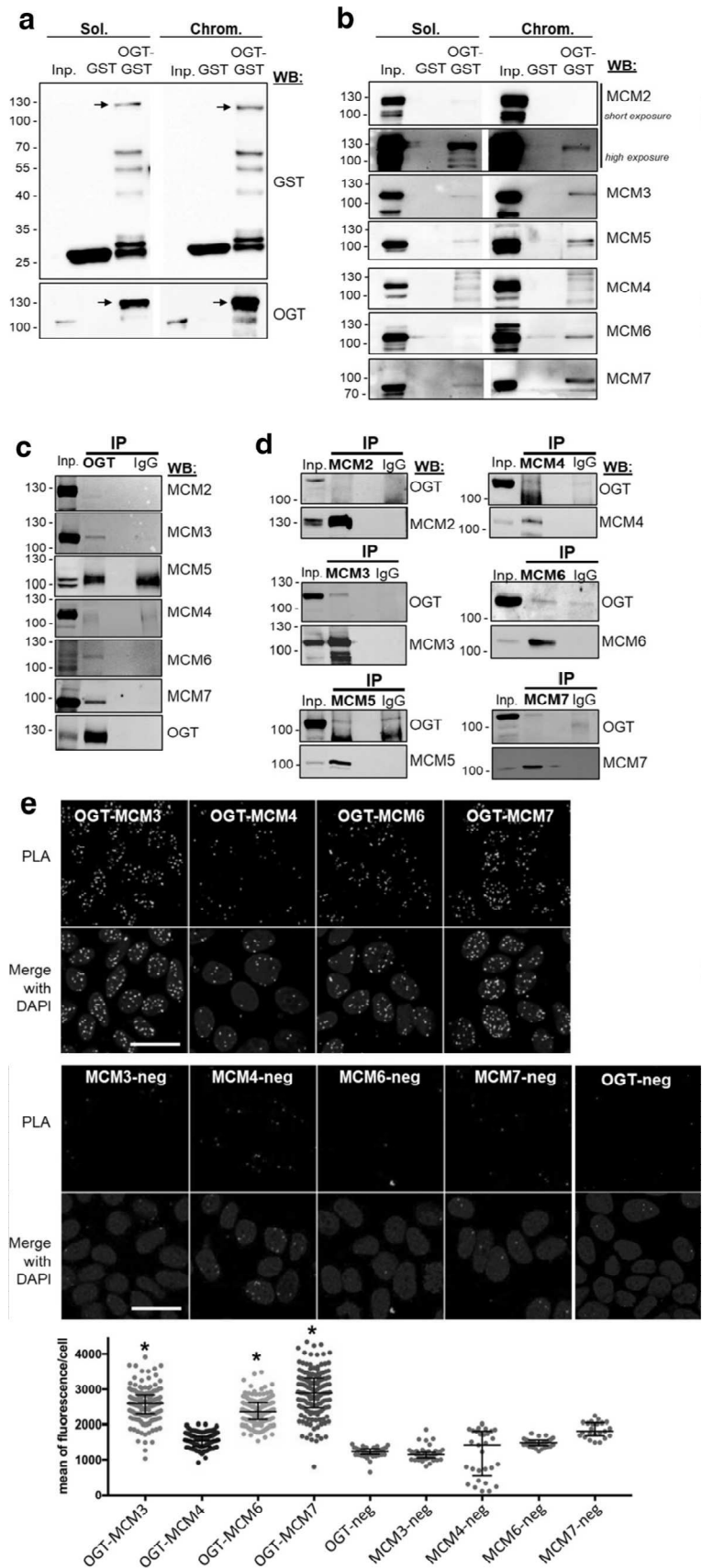
could validate their use in indirect immunofluorescence (data not shown). The specificity of PLA signal between OGT and MCM was confirmed by doing control experiments with only one of the primary antibodies followed by the incubation with both *minus* and *plus* PLA probes (Fig. 2e, lower panel). We observed strong PLA fluorescent signal in nuclei for OGT–MCM3, OGT–MCM6 and OGT–MCM7, in agreement with our GST pull-down and co-IP results (Fig. 2b–d). In contrast, the signal obtained for OGT–MCM4 was not significantly different from the MCM4-negative control (Fig. 2e), indicating that OGT does not stably interact with MCM4, as concluded by our co-IP results (Fig. 2c, d). It is important to note that we had to reduce the time of cell permeabilization to detect OGT–MCM interactions by PLA (2 min in 0.5% Triton X-100 instead of 20 min for the detection of MCM–MCM interactions by PLA, see Fig. 4b). This highlights that OGT is indirectly recruited to the chromatin via stable interaction with DNA-binding factors and chromatin effectors [4, 10, 72], while MCM proteins strongly associate with DNA [28, 29]. Altogether our results indicate that OGT is a new partner of MCM2–7 complex through its direct binding with MCM3, MCM6 and MCM7 subunits.

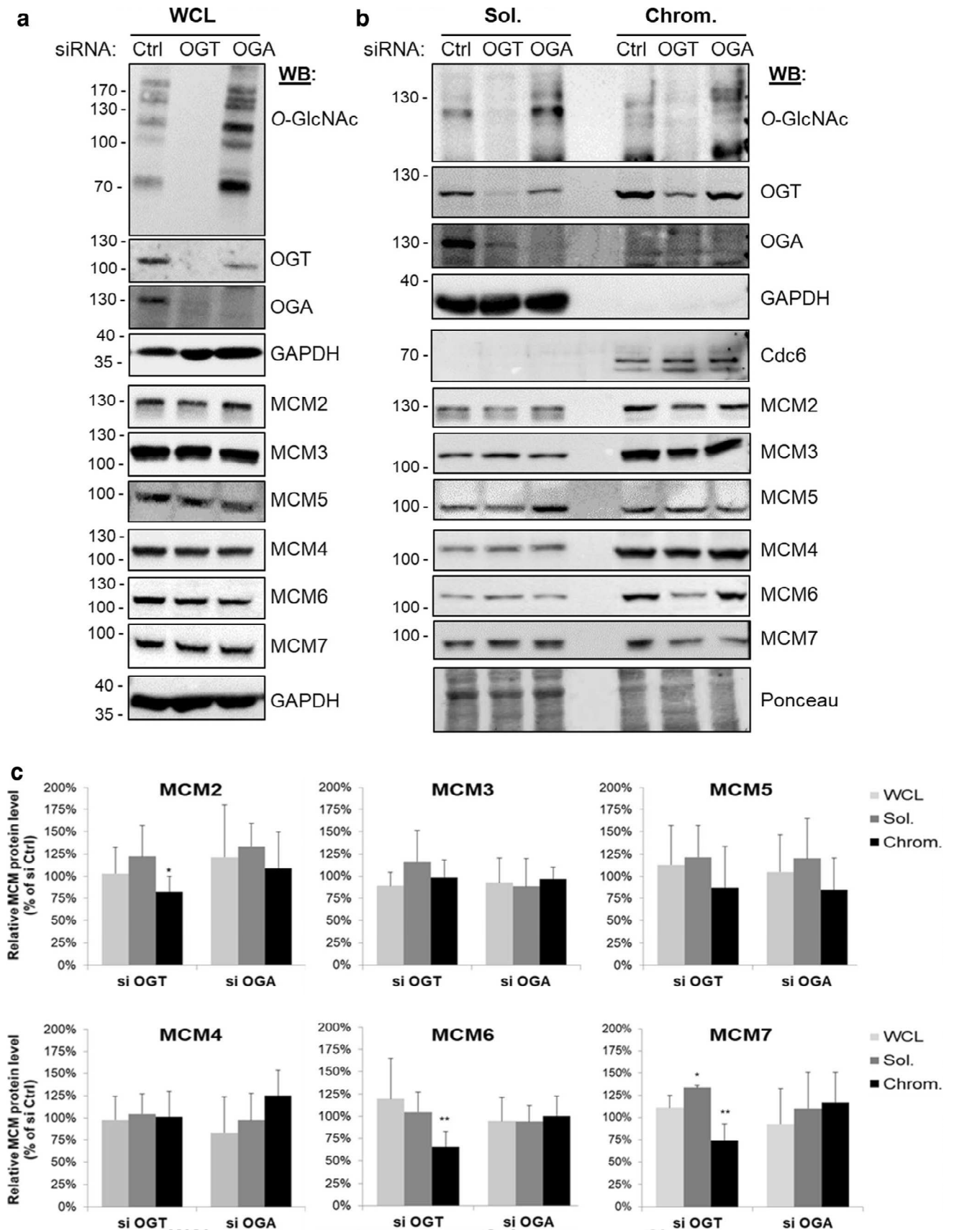
### O-GlcNAcylation does not affect MCM steady-state levels but impacts the loading of MCM2, MCM6 and MCM7 to the chromatin

To test whether OGT and *O*-GlcNAc dynamics could regulate the binding of MCM proteins to chromatin, we induced silencing of either OGT or OGA by small interfering RNA (siRNA). Efficiency of OGT (siOGT) and OGA (siOGA) silencing was determined by Western blot against both enzymes and *O*-GlcNAcylated proteins (*O*-GlcNAc), and compared with random silencing (siCtrl) (Fig. 3a, b). As previously reported, OGT silencing induces a strong decrease in OGA protein level. Conversely, OGA silencing induces a moderate decrease in OGT protein level (Fig. 3a, b) [19, 73, 74]. Efficiency of the subcellular fractionation was attested by Western blot with anti-GAPDH antibody as a control for the soluble fraction, and anti-Cdc6 antibody for the chromatin-bound one (Fig. 3b). We did not observe any change in the expression of the six MCM2–7 subunits in the WCL when *O*-GlcNAcylation levels were disturbed (Fig. 3a–c), indicating that *O*-GlcNAc homeostasis may not regulate the steady-state level of MCM proteins.

Western blot analysis of soluble and chromatin-bound fractions showed that chromatin association of MCM3, MCM4, MCM5 was not affected by OGT or OGA silencing (Fig. 3b, c). In contrast, down-regulation of OGT slightly decreased the association of MCM6, MCM7, and to a lesser extent MCM2, with chromatin, while OGA silencing had no significant impact (Fig. 3b, c). For MCM7, this was accompanied by a moderate increase in the soluble fraction,

**Fig. 2** OGT stably interacts with several subunits of MCM2–7 complex. **a** GST pull-down assay using OGT–GST and GST (negative control) was performed using soluble (Sol.) and chromatin-bound (Chrom.) protein fractions from asynchronous MCF7 cells (Inp). Western blot analysis was performed using anti-GST and anti-OGT antibodies. **b** Eluted MCM proteins were detected by Western blot after GST pull-down assay. **c, d** OGT and subunits of MCM2–7 were immunoprecipitated from whole cell extracts of HEK293T cells transiently transfected with HA-OGT. Co-immunoprecipitated proteins were detected by Western blot using the indicated antibodies. **e** In situ proximity ligation assay was performed in fixed asynchronous MCF7 cells shortly permeabilized with 0.5% T-X100 in PBS to visualize interaction of endogenous OGT with MCM3, MCM4, MCM6 or MCM7. Nuclei were counterstained with DAPI and negative controls were performed by incubating fixed cells with only one of the primary antibodies (*MCM-neg* and *OGT-neg*). Quantification of PLA is presented as scatter dot plot; each dot represents the total signal of PLA in the nucleus of a single cell. Bars represents the median with interquartile range for each experience (one-way ANOVA test,  $*p < 0.05$ ). Scale bar, 30  $\mu$ M







**Fig. 3** Down-regulation of OGT decreases the chromatin loading of MCM2, MCM6 and MCM7. MCF7 cells were treated with siRNA (Ctrl, OGT, OGA) for 60 h before harvesting. **a** The whole cellular extracts (WCL) and **b** the soluble (Sol.) and chromatin-bound (Chrom.) protein fractions were analysed by Western blot using anti-OGT, -OGA and *O*-GlcNAc proteins antibodies to confirm the efficiency of siRNA transfection. MCM proteins were also detected by Western blot using specific antibodies. Equal loading was confirmed using GAPDH antibodies (WCL) and Ponceau staining of the membranes (Sol./Chrom.). GAPDH and Cdc6 were used as markers for the soluble and chromatin fractions, respectively. **c** Band intensity was quantitated using Image J; the relative intensity of each MCM protein level in siOGT and siOGA conditions was normalized to that obtained for the siCtrl condition (100%) and depicted as a graph. Statistical analysis was performed by Student's *t* test. Values are mean  $\pm$  SEM of at least 4 independent experiments (\*\**p* < 0.05, \**p* < 0.1)

suggesting that OGT may contribute to the loading or the stabilization of MCM7 onto chromatin. This hypothesis is reinforced by the strong interaction between OGT and MCM7 that we showed here for the first time (Fig. 2). We showed here a decrease in the chromatin loading of MCM2 when OGT was silenced, despite that no direct interaction between both proteins could be evidenced (Fig. 2c–e). MCM2 weakly interacts with the other MCM subunits and negatively regulates the helicase activity of the MCM4/6/7 sub-complex in vitro [31, 37, 40, 75]. Our results suggest that OGT might indirectly regulate the MCM2–7 complex via the regulation of MCM2–MCM interactions and the chromatin binding of MCM2.

### Perturbation of *O*-GlcNAc cycling destabilizes MCM2–7 complex

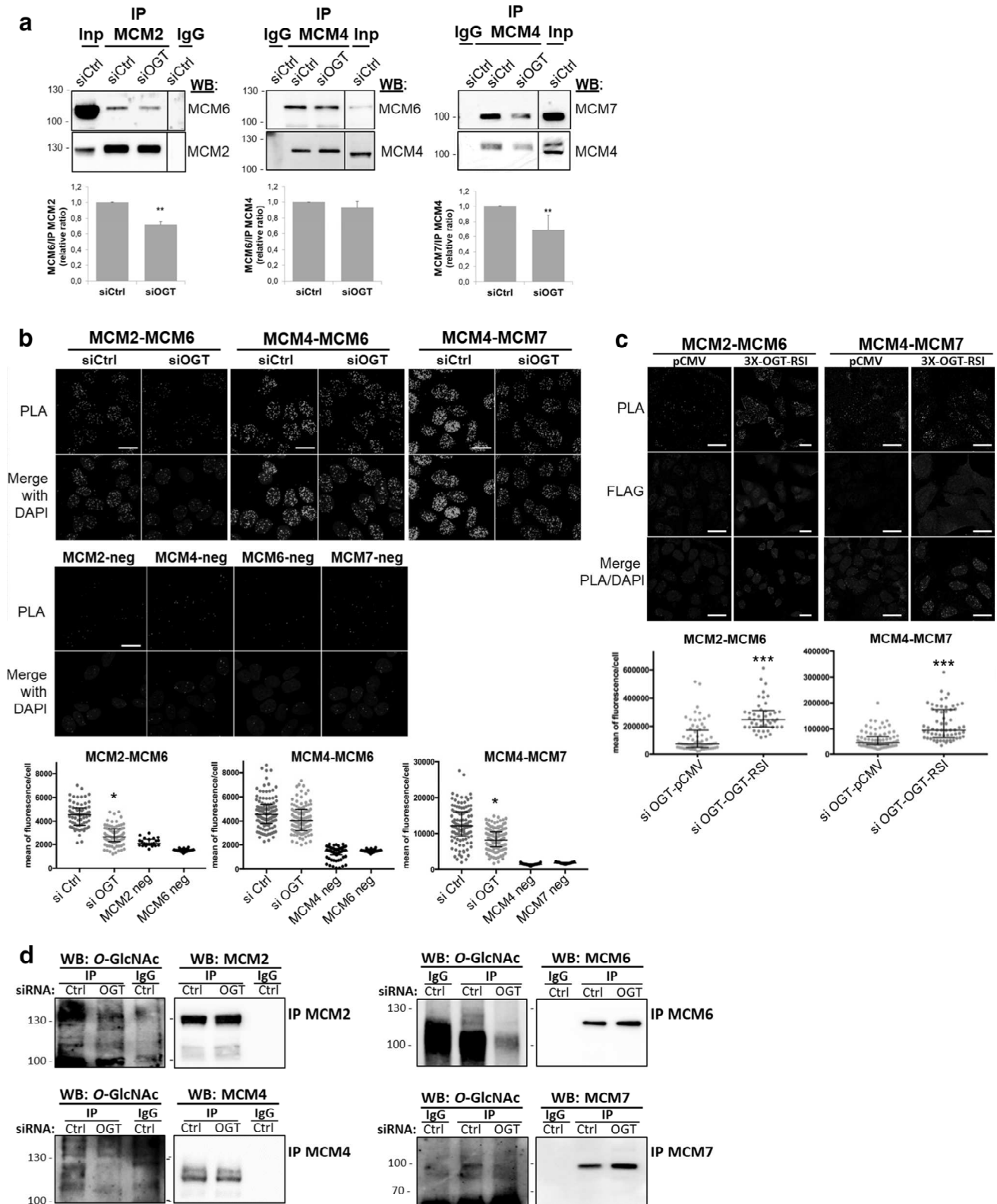
The MCM2–7 helicase complex is a heterohexameric complex but sub-complexes containing MCM2/4/6/7, MCM4/6/7 or MCM3/5 have also been isolated in mammalian cells [31–33, 36]. Furthermore, the proper association of MCM subunits is essential for the establishment of active ATPase sites necessary for the helicase activity of the complex [27]. On the other hand, *O*-GlcNAcylation can alter protein–protein interactions [7]. Then we wondered whether MCM *O*-GlcNAcylation and/or OGT–MCM interaction could be involved in MCM–MCM interactions. To address this question, *O*-GlcNAc levels were reduced by OGT silencing, and co-IP and PLA experiments were performed to analyse MCM–MCM interactions in the chromatin-bound protein fraction (Fig. 4). OGT down-regulation induced a slight decrease of co-immunoprecipitation of MCM6 with MCM2, and MCM7 with MCM4 (Fig. 4a). In situ PLA confirmed these results: nuclear PLA signals between MCM2/MCM6 and MCM4/MCM7 were significantly lower in siOGT-transfected cells compared with those in siCtrl-transfected cells (Fig. 4b). In contrast, interaction between MCM4 and MCM6 tended towards a decrease in

siOGT-cells, while differences in intensity of both co-IP and PLA fluorescence signals were not statistically significant between siCtrl and siOGT conditions (Fig. 4a, b, middle panels). To confirm that the decrease in MCM/MCM interactions that we observed in siOGT cells was due to the downregulation of OGT, we performed a rescue experiment by transfecting siOGT cells with a plasmid coding for a FLAG-tagged and siRNA-resistant OGT (3X-OGT-RSI). As shown in Fig. 4c, PLA signals obtained for both MCM2/MCM6 and MCM4/MCM7 were significantly restored when OGT was overexpressed in synchronized MCF7 cells, indicating that the presence of OGT may be important to maintain such interactions. To determine whether this could be related to a defect in *O*-GlcNAcylation of MCM proteins, we next performed immunoprecipitation of these four subunits from the chromatin-bound fractions of synchronized MCF7 cells and revealed their *O*-GlcNAc status by Western blot. Interestingly, the disturbance in MCM/MCM interactions upon OGT silencing is concomitant with a decrease of the *O*-GlcNAcylation level of MCM2, MCM4, MCM6 and MCM7 in the chromatin-bound fraction (Fig. 4d).

Then we perturbed *O*-GlcNAc cycling in synchronized MCF7 cells using either 5S-G or ThG to inhibit the catalytic activity of OGT or OGA, respectively [63, 64] (Suppl. Figure 2). Surprisingly, we were not able to detect any significant and reproducible changes in MCM2/MCM6 and MCM4/MCM7 interactions in 5S-G-treated cells, as shown by co-IP and PLA experiments (Fig. 5a, b). However, both approaches showed a moderate decrease in MCM2/MCM6 interaction in the chromatin-bound fraction when *O*-GlcNAc levels were increased through OGA inhibition by ThG treatment (Fig. 5a, b). It is important to note that we could not detect MCM2 when MCM6 was immunoprecipitated (data not shown), probably due to the weak association of MCM2 with MCM6 [40]. Moreover, MCM4/MCM6, MCM4/MCM7, and MCM3/MCM5 interactions did not seem to be sensitive to OGT inhibition (Fig. 5c–e). Co-immunoprecipitation of MCM3 and MCM5 was also not significantly perturbed by ThG (Fig. 5e). However, PLA approach shows that inhibition of OGA induced a moderate decrease in MCM4/MCM7 interactions (Fig. 5c), whereas it tended to increase MCM4/MCM6 co-immunoprecipitation albeit in a non-significant manner (Fig. 5d), that we could confirm by in situ PLA (data not shown).

### Effect of perturbation of *O*-GlcNAc cycling on S phase progression and DNA replication

We next determined whether dysregulation in *O*-GlcNAc homeostasis would affect DNA replication and S phase progression. We used synchronized MCF7 cells that were either transfected by siRNA or treated with potent inhibitors of OGT and OGA. After serum stimulation, cells were



harvested at different time points and cell cycle progression was analysed by flow cytometry after staining with PI. DNA replication rate was also evaluated by labelling

nascent DNA within the last 15 min of serum stimulation with EdU. After click chemistry reaction and PI staining, the percentage of EdU-positive cells was determined by

**Fig. 4** Silencing of OGT affects MCM2/MCM6 and MCM4/MCM7 interactions. MCF7 cells were transfected with siRNA (siCtrl, siOGT), then synchronized in S phase by stimulation with serum (18H) after serum starvation. **a** Chromatin-bound protein fraction was used for immunoprecipitation of MCM2 and MCM4 and Western blot analysis of co-immunoprecipitated MCM subunits. Band signal intensity was measured and statistical analysis was performed by Student's *t* test. Values are mean  $\pm$  SEM of three independent experiments (\*\**p* < 0.05). **b** MCM–MCM interactions were detected by in situ PLA and immunofluorescent confocal microscopy after nuclei counterstaining with DAPI. Quantification was performed as in Fig. 2e. Bars represents the median with interquartile range (one-way ANOVA test, \**p* < 0.05). Scale bar, 15  $\mu$ M. **c** pCMV-3X or 3X-OGT-RSI plasmids were transfected in siOGT MCF7 cells for 24 h. Then cells were synchronized in S phase and MCM–MCM interactions were detected by in situ PLA, as described above (*t* test, \*\*\**p* < 0.001). Scale bar, 20  $\mu$ M. **d** MCM2, MCM4, MCM6 and MCM7 were immunoprecipitated from the chromatin-bound protein fractions and Western blots were revealed using the anti-O-GlcNAc antibody (RL2). Membranes were stripped and reincubated with the corresponding anti-MCM antibodies

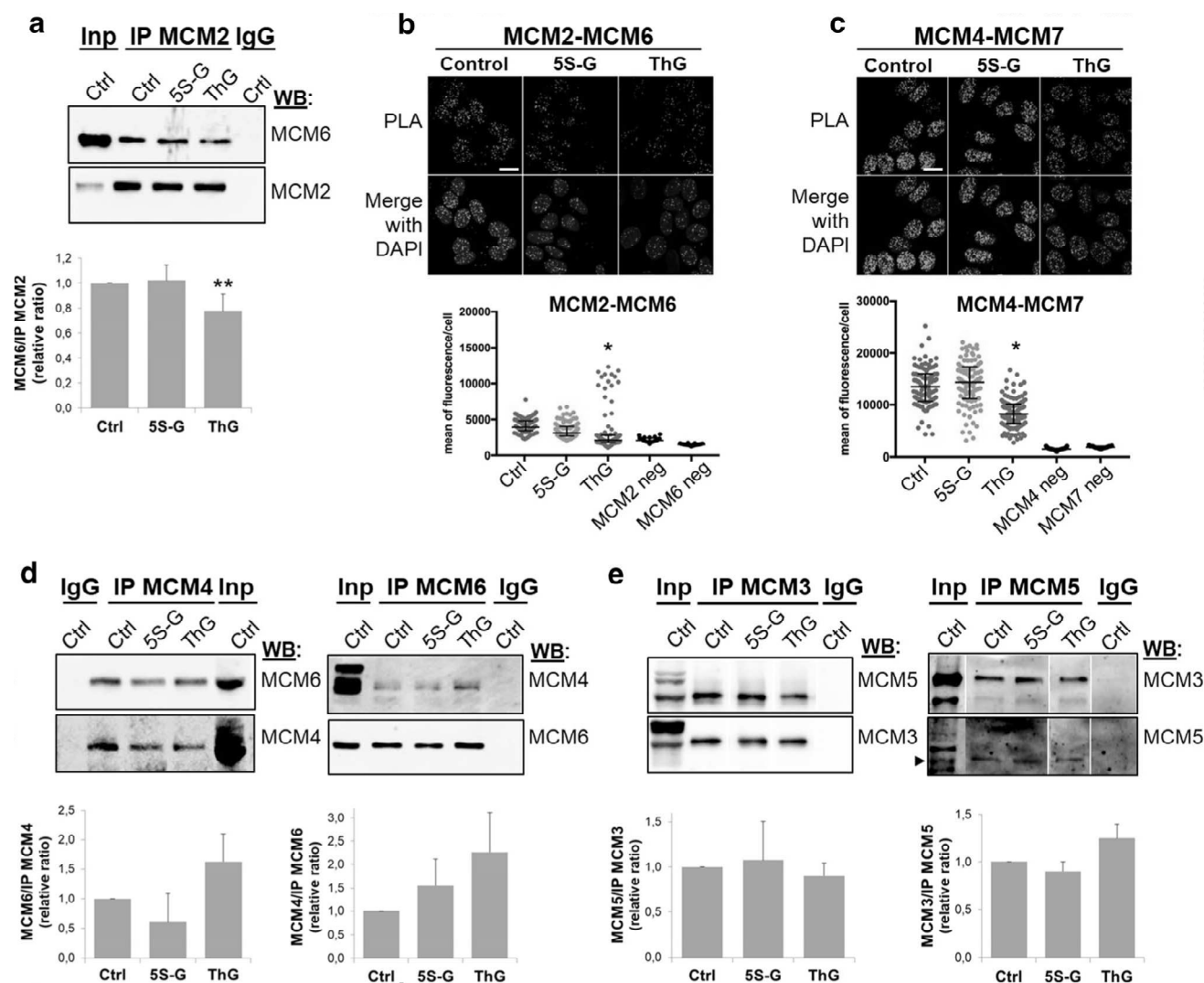
flow cytometry. In parallel, cells were seeded and treated with either siRNA or inhibitors, and counted every day during 5 days.

For each experiment, the efficiency of treatments was systematically confirmed by Western blotting (Suppl. Figure 3). It is noteworthy that the decrease in O-GlcNAcylation levels induced by 5S-G was accompanied by a significant decrease in OGA expression, whereas elevation of O-GlcNAcylation levels induced by ThG treatment was accompanied by a decrease in OGT expression and an increase of OGA protein (Suppl. Figure 3a, see also Suppl. Figure 2). Similarly, as we observed above (Fig. 3), silencing of OGT strongly decreased OGA protein level. Conversely silencing of OGA decreased the levels of OGT, albeit to a lesser extent (Suppl. Figure 3b).

As shown in Fig. 6a, inhibition of OGT by 5S-G induced a moderate decrease in the percentage of MCF7 cells in S phase compared with control condition (35.6 versus 43% at 15H; 32 versus 52% at 24H). However, this was not correlated with changes on the rate of EdU incorporation (Fig. 6b), although the cellular growth of 5S-G-treated cells was significantly reduced by 30% after 5 days of treatment (Fig. 6c). Likewise, inhibition of OGA did not modify the DNA replication rate but tended towards a slowdown in S phase progression; this was accompanied with a decrease of 25% of proliferation after 5 days of treatment (Fig. 6a–c). Surprisingly, S phase progression of siOGT- and siOGA-transfected MCF7 cells was not significantly affected compared with that of control siRNA-transfected cells, nor was the rate of DNA replication (Fig. 6d, e). In agreement with these results, no difference in cellular growth was observed between siCtrl, siOGT and siOGA conditions in MCF7 cells (Fig. 6f).

## Discussion

The heterohexameric MCM2–7 helicase complex is crucial for the initiation of DNA replication and is finely regulated by post-translational modifications, including phosphorylation. We previously showed that MCM3, MCM6 and MCM7 were O-GlcNAcylated by OGT [22]. Here we demonstrate that MCM2, MCM4 and MCM5 are also O-GlcNAcylated in human cells (Fig. 1a, b). This result is strengthened by two recent works which have identified MCM2, MCM3, MCM4 and MCM5 as O-GlcNAc-modified proteins using metabolic incorporation of chemical GlcNAc analogue probes combined with click chemistry labelling [76, 77]. Using a mass-tagging strategy, we show that the O-GlcNAcylated MCM proteins are of low stoichiometry (from less than 3% for MCM2 and MCM4, to 13% for MCM6) (Fig. 1f), as it has been evidenced for many O-GlcNAc-modified proteins [78, 79]. We could detect 2 O-GlcNAc sites on MCM2 and MCM4, 2 and 3 O-GlcNAc sites on MCM6, and 3 O-GlcNAc sites on MCM7, although we cannot exclude that some of the O-GlcNAc sites may not have been detectable using this approach. Many phosphorylation sites have been characterized on MCM proteins, especially within the N-terminal extension of MCM2 and MCM4; some of them are known to play crucial roles in regulating MCM2–7 loading and helicase activity [53–58, 60–62]. It is tempting to speculate that O-GlcNAc modification may cooperate or compete with phosphorylation to regulate MCM2–7 complex. Therefore, we performed the in silico analysis of the potential O-GlcNAc/phosphorylation crosstalk according to the recently published stringent motif (S/T)-P-(V/A/T)-(gT/gS) [14]. We also used the YinOYang1.2 server to predict the O-GlcNAc sites on MCM proteins, by taking into account only the high-scoring potential O-GlcNAc sites (<http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang>). Such prediction tool has to be taken with caution and experimental data are required to ascertain their localization. Using the human primary sequences of MCM2 to MCM7 proteins of the UniProtKB database, we found the specific crosstalk motif [<sup>611</sup>SPVT<sup>614</sup>] within the sensor 2 subdomain of MCM3, which is adjacent to the potential predicted O-GlcNAc site at Thr610. It is noteworthy that phosphorylation of Ser611 of MCM3 has been identified by mass spectrometry in human leukaemia cells, but to date, no functional role has been assigned to this residue [80]. For MCM4, we found the motif [<sup>3</sup>SPAS<sup>6</sup>] in the N-terminal extension of which is known to be phosphorylated at multiple sites (<http://www.PhosphoSitePlus>) [53, 56]. Interestingly, three highly potential O-GlcNAc sites are located within the same N-terminal region of MCM4, at position Ser2, Ser3 and Thr7, suggesting that the N-terminal tail of MCM4 may



**Fig. 5** Hyper-*O*-GlcNAcylation induced by OGA inhibition alters MCM/MCM interactions. Serum-starved MCF7 cells were released in S phase by serum addition (18h), in presence of DMSO (Ctrl), 5S-G or ThG, before harvesting. **a**, **d** MCM proteins were immunoprecipitated from the chromatin-bound fraction and samples were analysed by Western blot using the indicated antibodies. Band signal intensity was measured and statistical analysis was performed by

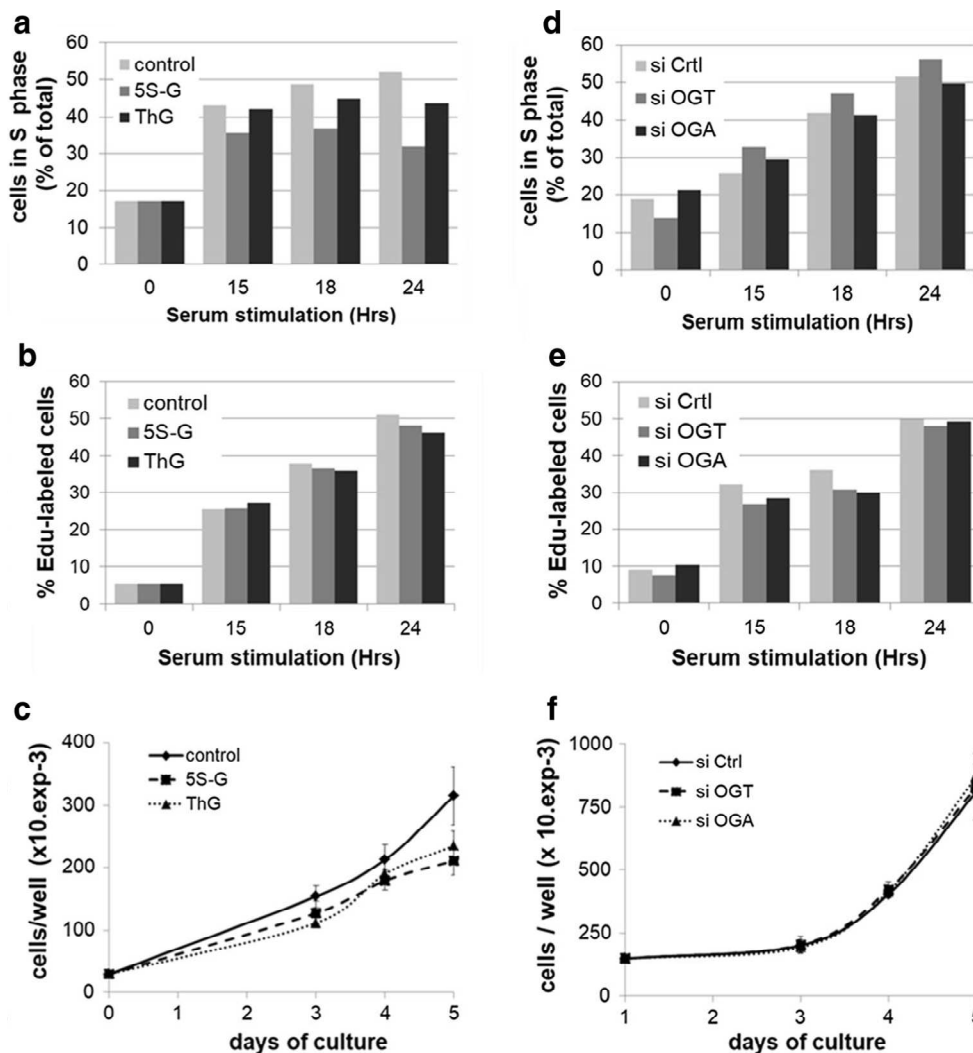
Student's *t* test. Values are mean  $\pm$  SEM of three independent experiments (\*\* $p < 0.05$ ). **b**, **c** MCM-MCM interactions were detected by in situ PLA and immunofluorescent confocal microscopy. Nuclei were counterstained with DAPI. Quantification was performed as in Fig. 2e. Bars represent the median with interquartile range (one-way ANOVA test, \* $p < 0.05$ ). Scale bar, 10  $\mu$ m

be targeted by both kinases and OGT to regulate MCM2–7 helicase complex. On the other hand, for MCM5 subunit, we found the degenerated crosstalk motif [<sup>133</sup>SPSS<sup>136</sup>], which is located at the hinge of two structural subdomains of the N-terminal domain (NTD) of MCM5, NTD-A (A subdomain of NTD, amino acids 32–129) and oligonucleotide/oligosaccharide-binding (OB)-fold (amino acids 136–172) (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/InterPro>) [28]. It is of interest that the two predicted *O*-GlcNAc sites of MCM5, Ser135 and Ser136, are adjacent to Ser133 which is a phosphorylation site with unknown function [81]. Although no such *O*-GlcNAc-phospho crosstalk motif has

been found for MCM2, the potential *O*-GlcNAc site Thr25 is close to Ser27 which is phosphorylated by Cdc7/Dbf4 and takes part in the initiation of DNA replication [54, 59]. This in silico analysis strongly suggests that a crosstalk may occur between *O*-GlcNAcylation and phosphorylation on MCM proteins, adding a layer of complexity to finely regulate MCM2–7 complex. Further mass spectrometry analysis is now required to unambiguously identify the glycosylation sites of human MCM proteins and experimentally test this hypothesis.

Our results show that OGT glycosylates the six subunits of MCM2–7 complex when quiescent cells progress





**Fig. 6** Perturbation of *O*-GlcNAc cycling does not affect DNA replication rate in MCF7 cells. Serum-starved MCF7 cells were released into the cell cycle by serum addition for the indicated times in the presence of OGT and OGA inhibitors (5S-G, ThG) or DMSO (Ctrl). **a** Cell cycle distribution was determined by flow cytometry after DNA staining with PI. Percentage of cells in S phase is indicated for each time point. Results are representative of three independent experiments. **b** EdU was added during the last 15 min of serum stimulation to label nascent DNA using the Click-It EdU flow cytometry assay, and DNA content was stained with PI before flow cytometry analysis. Percentage of EdU-positive cells is indicated for each time point. Results are representative of three independent experiments. **c**

One day after seeding, MCF7 cells were treated with DMSO (Ctrl), 5S-G or ThG. Cells were counted every day for 5 days and medium was replaced every 2 days (with inhibitors). Values are mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. **d** MCF7 cells were transfected with siRNA (siCtrl, siOGT, siOGA) and then synchronized as in **a**. Results are representative of three independent experiments. **e** MCF7 cells were treated as above. Percentage of EdU-positive cells was obtained as in **b**. Results are representative of three independent experiments. **f** MCF7 cells were transfected with siRNA (siCtrl, siOGT, siOGA). Cells were counted every day for 5 days and medium was replaced every 2 days (with siRNA). Values are mean  $\pm$  S.E.M. of three independent experiments

normally in S phase, and that *O*-GlcNAcylated MCM proteins are present nearly exclusively in the chromatin fraction (Fig. 1d, e). This indicates that *O*-GlcNAcylation of MCM2–7 complex may occur mostly when MCM proteins are loaded onto chromatin. Another possible explanation to the lack of *O*-GlcNAc-enriched MCM proteins in the soluble fraction is that the turnover of MCM protein *O*-GlcNAcylation may be higher in the nucleoplasmic soluble fraction in which both OGT and OGA were present, than in the

chromatin-bound fraction in which we could not detect OGA (Figs. 1c, 3b, Suppl. Figure 2). *O*-GlcNAcylation of MCM proteins might help in the recruitment of MCM2–7 complex onto the chromatin, as described for the phosphorylation of MCM2 and MCM3 [54, 60]. In contrast, for MCM4, *O*-GlcNAc modification could act in an opposite manner to phosphorylation, since highly phosphorylated MCM4 is less tightly bound to chromatin than underphosphorylated form of MCM4 [31].

On the other hand, we demonstrate that OGT strongly interacts with distinct MCM2–7 subunits in human cells. Indeed, biochemical and in situ approaches show that OGT is a new partner of MCM2–7 complex through its direct binding with MCM3, MCM6 and MCM7 subunits (Fig. 2). Our findings are in agreement with previous studies that demonstrate that the recruitment of MCM2–7 partners occurs via their specific interaction with one or two MCM subunits, as it has been reported for the interactions of the licensing factor Cdt1 with MCM6 [82] and Cdc45 with MCM2 and MCM5 [43]. It has also been shown for the DDK subunits: whereas Dbf4 strongly binds to MCM2, Cdc7 interacts with both MCM4 and MCM5 subunits [83]. Our data suggest that OGT might regulate the chromatin loading of MCM6 and MCM7 through this strong interaction. Indeed, downregulation of OGT protein level by siRNA decreases the chromatin-bound level of MCM6 and MCM7 (Fig. 3b). This hypothesis is reinforced by the destabilization of MCM2/MCM6 and MCM4/MCM7 interactions when OGT is silenced in synchronized MCF7 cells (Fig. 4a–c). Given the fact that we did not observe significant changes in these interactions when OGT is inhibited by 5S-G (Fig. 5a–c) whereas OGT rescue experiment in siOGT-transfected cells could restore them (Fig. 4c), we hypothesize that in normal culture conditions, OGT protein might be more important than its catalytic activity and act as a scaffold protein to regulate such interactions and recruit MCM2–7 complexes to the chromatin through its direct binding to MCM6 and MCM7 subunits. Moreover, our data show that the destabilization of the interactions between MCM2/MCM6 and MCM4/MCM7 are concomitant with a decrease in the *O*-GlcNAcylation levels of these MCM subunits (Fig. 4d). This suggests that *O*-GlcNAc modification of MCM proteins may be also involved in the stabilization of MCM2–7 complex onto chromatin. Since this glycosylation is known to stabilize protein–protein interactions [4, 6], we would have expected an elevation of MCM/MCM interactions upon OGA inhibition. But it did not, since the increase of the overall *O*-GlcNAcylation levels in ThG-treated cells slightly downregulated the binding of MCM2/MCM6 and MCM4/MCM7 in S phase-synchronized MCF7 cells (Fig. 5b, c). Altogether, our data suggest that *O*-GlcNAc homeostasis might contribute to stabilize MCM–MCM interactions. Further investigations are needed to decipher the molecular mechanisms underlying the regulation of the chromatin loading and stabilization of MCM2–7 complex through the recruitment of OGT and *O*-GlcNAcylation of the MCM2–7 complex subunits.

Here we perturbed *O*-GlcNAc cycling using either siRNA or selective and potent inhibitors of the *O*-GlcNAc enzymes, OGT and OGA. As previously reported, in case of disruption to *O*-GlcNAc homeostasis, cells adjust OGT and OGA expression to compensate for the changes in *O*-GlcNAc

levels, with OGA protein expression being more sensitive to *O*-GlcNAc homeostasis than OGT. Reduction in *O*-GlcNAc levels induces a decrease in OGA protein level and reciprocally, elevation of *O*-GlcNAcylation induces a decrease in the expression of OGT, (Fig. 3, Suppl. Figures 2, 3) [16, 19, 22, 64, 73, 74, 84–86]. Similar results were obtained not only in MDA-MB-231 breast cancer cells, but also in the colorectal cell lines HCT116, HT29 and CCD841CoN (unpublished data). This mutual regulation of OGT and OGA to compensate the loss of *O*-GlcNAc homeostasis is far to be fully understood. To date, no mechanism has been established that can explain how OGA protein is as much downregulated when OGT is inhibited or silenced. However, Zhang and collaborators have shown that Thiamet G increases the transcription of OGA mRNA [84]. Moreover, it has been recently demonstrated that OGT mRNA levels are controlled by an intron splicing silencer (ISS) that induces the nuclear degradation of the mRNA under high *O*-GlcNAcylation conditions, thus allowing a decrease in OGT protein levels [85]. This may explain the lower levels of OGT that we and others have observed upon inhibition or silencing of OGA. In contrast, an overall decrease of *O*-GlcNAcylation upon OGT inhibition induces an efficient splicing of OGT mRNA to produce a cytoplasmic mRNA that will be further translated [85].

Neither silencing nor inhibition of the *O*-GlcNAc-regulating enzymes perturbs significantly the rate of DNA synthesis in synchronized human MCF7 cells (Fig. 6b, e). Nevertheless, the S phase progression and growth rate slow down when OGT is inhibited and to a lesser extent when OGA is inhibited (Fig. 6a, c). Thus, the delay in S phase entry induced by OGT or OGA inhibition may not be related to a defect in DNA synthesis in MCF7 cells. It could be due to an abnormal activity or expression of cell cycle-related proteins that are known to be directly or indirectly regulated by OGT, like transcription factors, Cyclin/CDK, or cell cycle inhibitors [15, 21, 22, 87]. Collectively, our results indicate that the effects of OGT down-regulation on MCM proteins that we report here for the first time are not sufficient to disrupt S phase progression and DNA synthesis in human MCF7 cells. Although we assessed the DNA helicase activity in an indirect manner through the measurement of Edu incorporation, our results are consistent with previous work demonstrating that an acute down-regulation of each one of the MCM2–7 subunits by silencing approach does not slow down the replication fork speed during DNA elongation in human cells [50]. Therefore, we believe that when cells normally progress in S phase, perturbation of *O*-GlcNAc cycling may destabilize MCM/MCM interactions but without interfering with MCM2–7 helicase activity and DNA replication. The possible explanation is that a large excess of MCM2–7 complexes is loaded to chromatin during G1 phase to license dormant replication origins that are not

used during normal DNA replication but are required under conditions of replicative stress to maintain genome integrity [48–50]. This hypothesis is reinforced by recent studies highlighting that OGT relocates to the sites of DNA damage and targets key signalling proteins and DNA polymerase  $\eta$  in response to DNA damage [13, 88, 89]. In conclusion, our work demonstrates that OGT is a new partner of MCM2–7 complex and regulates MCM–MCM interactions. Although further investigations are needed to investigate the molecular mechanisms in detail, it opens up new prospects for the role of OGT and O-GlcNAc post-translational modification in the regulation of DNA replication under conditions of unperturbed replication as well as replicative stress.

**Acknowledgements** We are grateful to Drs. Xiaoyong Yang (Yale University School of Medicine, New Haven, USA) and Dominique LePrince (IBL, Lille, France) for providing, respectively, the GST–OGT construct and the GST plasmid, Prof. Gerald W. Hart (Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, USA) for providing acetyl-5S-GlcNAc, and Dr. T. Issad (INSERM U1016, CNRS UMR8104, Institut Cochin, Paris, France) for the HA-tagged OGT plasmid. We also thank Dr. Olivier Vidal (UMR CNRS 8576) for advices in GST–OGT production, Dr. Corentin Spriet (TISBio core facility, FRABIO FR 3688 CNRS, Lille) for helping in PLA analysis with ImageJ, Nicolas Vossart and Lucie Hurtevent for their technical assistance, and James Biwi (UMR 8576, UGSF) for critical reading of this manuscript. ML was a recipient of a fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. This work was supported by la Ligue Nationale Contre le Cancer (Comités du Nord et de l'Aisne) and the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).

**Author contributions** ASVE conceived the project. ML, TL and ASVE designed experiments. ML, MM, CS, SH and ASVE performed experiments. ML, SH, ASVE analysed data. ML and ASVE wrote the manuscript.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

## References

- Kreppel LK, Blomberg MA, Hart GW (1997) Dynamic glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Cloning and characterization of a unique O-GlcNAc transferase with multiple tetratricopeptide repeats. *J Biol Chem* 272:9308–9315
- Love DC, Kochan J, Cathey RL et al (2003) Mitochondrial and nucleocytoplasmic targeting of O-linked GlcNAc transferase. *J Cell Sci* 116:647–654
- Hanover JA, Yu S, Lubas WB et al (2003) Mitochondrial and nucleocytoplasmic isoforms of O-linked GlcNAc transferase encoded by a single mammalian gene. *Arch Biochem Biophys* 409:287–297
- Yang X, Qian K (2017) Protein O-GlcNAcylation: emerging mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18:452–465. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.22>
- Gao Y, Wells L, Comer FI et al (2001) Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: cloning and characterization of a neutral, cytosolic beta-N-acetylglucosaminidase from human brain. *J Biol Chem* 276:9838–9845. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010420200>
- Nagel AK, Ball LE (2015) Intracellular protein O-GlcNAc modification integrates nutrient status with transcriptional and metabolic regulation. *Adv Cancer Res* 126:137–166. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2014.12.003>
- Hart GW, Slawson C, Ramirez-Correa G, Lagerlof O (2011) Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease. *Annu Rev Biochem* 80:825–858. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060608-102511>
- Bond MR, Hanover JA (2013) O-GlcNAc cycling: a link between metabolism and chronic disease. *Annu Rev Nutr* 33:205–229. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071812-161240>
- Hardivillé S, Hart GW (2014) Nutrient regulation of signaling, transcription, and cell physiology by O-GlcNAcylation. *Cell Metab* 20:208–213. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.07.014>
- Leturcq M, Lefebvre T, Vercoutter-Edouart A-S (2017) O-GlcNAcylation and chromatin remodeling in mammals: an up-to-date overview. *Biochem Soc Trans* 45:323–338. <https://doi.org/10.1042/BST20160388>
- Wang Z, Pandey A, Hart GW (2007) Dynamic interplay between O-linked N-acetylglucosaminylation and glycogen synthase kinase-3-dependent phosphorylation. *Mol Cell Proteom* 6:1365–1379. <https://doi.org/10.1074/mcp.M600453-MCP200>
- Wang Z, Udeshi ND, Slawson C et al (2010) Extensive crosstalk between O-GlcNAcylation and phosphorylation regulates cytokinesis. *Sci Signal* 3:ra2. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000526>
- Zhong J, Martinez M, Sengupta S et al (2015) Quantitative phosphoproteomics reveals crosstalk between phosphorylation and O-GlcNAc in the DNA damage response pathway. *Proteomics* 15:591–607. <https://doi.org/10.1002/pmic.201400339>
- Leney AC, El Atmioui D, Wu W et al (2017) Elucidating crosstalk mechanisms between phosphorylation and O-GlcNAcylation. *Proc Natl Acad Sci USA*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1620529114>
- O'Donnell N, Zachara NE, Hart GW, Marth JD (2004) Ogt-dependent X-chromosome-linked protein glycosylation is a requisite modification in somatic cell function and embryo viability. *Mol Cell Biol* 24:1680–1690
- Slawson C, Zachara NE, Vosseller K et al (2005) Perturbations in O-linked beta-N-acetylglucosamine protein modification cause severe defects in mitotic progression and cytokinesis. *J Biol Chem* 280:32944–32956. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503396200>
- Slawson C, Lakshmanan T, Knapp S, Hart GW (2008) A mitotic GlcNAcylation/phosphorylation signaling complex alters the post-translational state of the cytoskeletal protein vimentin. *Mol Biol Cell* 19:4130–4140. <https://doi.org/10.1091/mbc.E07-11-1146>
- Sakabe K, Hart GW (2010) O-GlcNAc transferase regulates mitotic chromatin dynamics. *J Biol Chem* 285:34460–34468. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.158170>
- Kazemi Z, Chang H, Haserodt S et al (2010) O-linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) regulates stress-induced heat shock protein expression in a GSK-3beta-dependent manner. *J Biol Chem* 285:39096–39107. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.131102>



20. Yang YR, Song M, Lee H et al (2012) O-GlcNAcase is essential for embryonic development and maintenance of genomic stability. *Aging Cell* 11:439–448. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2012.00801.x>
21. Olivier-Van Stichelen S, Drougat L, Dehennaut V et al (2012) Serum-stimulated cell cycle entry promotes ncOGT synthesis required for cyclin D expression. *Oncogenesis* 1:e36. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2012.36>
22. Drougat L, Olivier-Van Stichelen S, Mortuaire M et al (2012) Characterization of O-GlcNAc cycling and proteomic identification of differentially O-GlcNAcylated proteins during G1/S transition. *Biochim Biophys Acta* 1820:1839–1848. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.08.024>
23. Lanza C, Tan EP, Zhang Z et al (2016) Reduced O-GlcNAcase expression promotes mitotic errors and spindle defects. *Cell Cycle* 15:1363–1375. <https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1167297>
24. Tan EP, Duncan FE, Slawson C (2017) The sweet side of the cell cycle. *Biochem Soc Trans* 45:313–322. <https://doi.org/10.1042/BST20160145>
25. Caldwell SA, Jackson SR, Shahriari KS et al (2010) Nutrient sensor O-GlcNAc transferase regulates breast cancer tumorigenesis through targeting of the oncogenic transcription factor FoxM1. *Oncogene* 29:2831–2842. <https://doi.org/10.1038/ncr.2010.41>
26. Ding F, Yu L, Wang M et al (2013) O-GlcNAcylation involvement in high glucose-induced cardiac hypertrophy via ERK1/2 and cyclin D2. *Amino Acids* 45:339–349. <https://doi.org/10.1007/s00726-013-1504-2>
27. Bochman ML, Schwacha A (2009) The Mcm complex: unwinding the mechanism of a replicative helicase. *Microbiol Mol Biol Rev* 73:652–683. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00019-09>
28. Li N, Zhai Y, Zhang Y et al (2015) Structure of the eukaryotic MCM complex at 3.8 Å. *Nature* 524:186–191. <https://doi.org/10.1038/nature14685>
29. Riera A, Barbon M, Noguchi Y et al (2017) From structure to mechanism—understanding initiation of DNA replication. *Genes Dev* 31:1073–1088. <https://doi.org/10.1101/gad.298232.117>
30. Samel SA, Fernández-Cid A, Sun J et al (2014) A unique DNA entry gate serves for regulated loading of the eukaryotic replicative helicase MCM2–7 onto DNA. *Genes Dev* 28:1653–1666. <https://doi.org/10.1101/gad.242404.114>
31. Musahl C, Schulte D, Burkhart R, Knippers R (1995) A human homologue of the yeast replication protein Cdc21. Interactions with other Mcm proteins. *Eur J Biochem* 230:1096–1101
32. Ishimi Y, Ichinose S, Omori A et al (1996) Binding of human minichromosome maintenance proteins with histone H3. *J Biol Chem* 271:24115–24122
33. Ishimi Y (1997) A DNA helicase activity is associated with an MCM4, -6, and -7 protein complex. *J Biol Chem* 272:24508–24513
34. Ritzi M, Baack M, Musahl C et al (1998) Human minichromosome maintenance proteins and human origin recognition complex 2 protein on chromatin. *J Biol Chem* 273:24543–24549
35. Sherman DA, Forsburg SL (1998) *Schizosaccharomyces pombe* Mcm3p, an essential nuclear protein, associates tightly with Nda4p (Mcm5p). *Nucleic Acids Res* 26:3955–3960
36. Lee JK, Hurwitz J (2000) Isolation and characterization of various complexes of the minichromosome maintenance proteins of *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* 275:18871–18878. <https://doi.org/10.1074/jbc.M00118200>
37. Ishimi Y, Komamura Y, You Z, Kimura H (1998) Biochemical function of mouse minichromosome maintenance 2 protein. *J Biol Chem* 273:8369–8375
38. You Z, Ishimi Y, Masai H, Hanaoka F (2002) Roles of Mcm7 and Mcm4 subunits in the DNA helicase activity of the mouse Mcm4/6/7 complex. *J Biol Chem* 277:42471–42479. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205769200>
39. Schwacha A, Bell SP (2001) Interactions between two catalytically distinct MCM subgroups are essential for coordinated ATP hydrolysis and DNA replication. *Mol Cell* 8:1093–1104
40. Sakwe AM, Nguyen T, Athanasopoulos V et al (2007) Identification and characterization of a novel component of the human minichromosome maintenance complex. *Mol Cell Biol* 27:3044–3055. <https://doi.org/10.1128/MCB.02384-06>
41. Chuang C-H, Yang D, Bai G et al (2012) Post-transcriptional homeostasis and regulation of MCM2–7 in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 40:4914–4924. <https://doi.org/10.1093/nar/gks176>
42. Fragkos M, Ganier O, Coulombe P, Méchali M (2015) DNA replication origin activation in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16:360–374. <https://doi.org/10.1038/nrm4002>
43. Simon AC, Sannino V, Costanzo V, Pellegrini L (2016) Structure of human Cdc45 and implications for CMG helicase function. *Nat Commun* 7:11638. <https://doi.org/10.1038/ncomms11638>
44. Todorov IT, Attaran A, Kearsey SE (1995) BM28, a human member of the MCM2–3–5 family, is displaced from chromatin during DNA replication. *J Cell Biol* 129:1433–1445
45. Krude T, Musahl C, Laskey RA, Knippers R (1996) Human replication proteins hCdc21, hCdc46 and P1Mcm3 bind chromatin uniformly before S-phase and are displaced locally during DNA replication. *J Cell Sci* 109(Pt 2):309–318
46. Prasanth SG, Prasanth KV, Siddiqui K et al (2004) Human Orc2 localizes to centrosomes, centromeres and heterochromatin during chromosome inheritance. *EMBO J* 23:2651–2663. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600255>
47. Kuipers MA, Stasevich TJ, Sasaki T et al (2011) Highly stable loading of Mcm proteins onto chromatin in living cells requires replication to unload. *J Cell Biol* 192:29–41. <https://doi.org/10.1083/jcb.201007111>
48. Woodward AM, Göhler T, Luciani MG et al (2006) Excess Mcm2–7 license dormant origins of replication that can be used under conditions of replicative stress. *J Cell Biol* 173:673–683. <https://doi.org/10.1083/jcb.200602108>
49. Ge XQ, Jackson DA, Blow JJ (2007) Dormant origins licensed by excess Mcm2–7 are required for human cells to survive replicative stress. *Genes Dev* 21:3331–3341. <https://doi.org/10.1101/gad.457807>
50. Ibarra A, Schwob E, Méndez J (2008) Excess MCM proteins protect human cells from replicative stress by licensing backup origins of replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:8956–8961. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803978105>
51. Courbet S, Gay S, Arnoult N et al (2008) Replication fork movement sets chromatin loop size and origin choice in mammalian cells. *Nature* 455:557–560. <https://doi.org/10.1038/nature07233>
52. Masai H, Matsui E, You Z et al (2000) Human Cdc7-related kinase complex. In vitro phosphorylation of MCM by concerted actions of Cdk5 and Cdc7 and that of a critical threonine residue of Cdc7 bY Cdk5. *J Biol Chem* 275:29042–29052. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002713200>
53. Ishimi Y, Komamura-Kohno Y (2001) Phosphorylation of Mcm4 at specific sites by cyclin-dependent kinase leads to loss of Mcm 4,6,7 helicase activity. *J Biol Chem* 276:34428–34433. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104480200>
54. Tsuji T, Ficarro SB, Jiang W (2006) Essential role of phosphorylation of MCM2 by Cdc7/Dbf4 in the initiation of DNA replication in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 17:4459–4472. <https://doi.org/10.1091/mbc.E06-03-0241>
55. Zhu Y, Ishimi Y, Tanudji M, Lees E (2005) Human CDK2 inhibition modifies the dynamics of chromatin-bound minichromosome maintenance complex and replication protein A. *Cell Cycle* 4:1254–1263. <https://doi.org/10.4161/cc.4.9.1975>



56. Komamura-Kohno Y, Karasawa-Shimizu K, Saitoh T et al (2006) Site-specific phosphorylation of MCM4 during the cell cycle in mammalian cells. *FEBS J* 273:1224–1239. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05146>
57. Montagnoli A, Valsasina B, Brotherton D et al (2006) Identification of Mcm2 phosphorylation sites by S-phase-regulating kinases. *J Biol Chem* 281:10281–10290. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512921200>
58. Cho W-H, Lee Y-J, Kong S-I et al (2006) CDC7 kinase phosphorylates serine residues adjacent to acidic amino acids in the minichromosome maintenance 2 protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:11521–11526. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604990103>
59. Chuang L-C, Teixeira LK, Wohlschlegel JA et al (2009) Phosphorylation of Mcm2 by Cdc7 promotes pre-replication complex assembly during cell-cycle re-entry. *Mol Cell* 35:206–216. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.06.014>
60. Lin DI, Aggarwal P, Diehl JA (2008) Phosphorylation of MCM3 on Ser-112 regulates its incorporation into the MCM2–7 complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:8079–8084. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800077105>
61. Francis LI, Randell JCW, Takara TJ et al (2009) Incorporation into the prereplicative complex activates the Mcm2–7 helicase for Cdc7–Dbf4 phosphorylation. *Genes Dev* 23:643–654. <https://doi.org/10.1101/gad.1759609>
62. Wei Q, Li J, Liu T et al (2013) Phosphorylation of minichromosome maintenance protein 7 (MCM7) by cyclin/cyclin-dependent kinase affects its function in cell cycle regulation. *J Biol Chem* 288:19715–19725. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.449652>
63. Yuzwa SA, Macauley MS, Heinonen JE et al (2008) A potent mechanism-inspired O-GlcNAcase inhibitor that blocks phosphorylation of tau in vivo. *Nat Chem Biol* 4:483–490. <https://doi.org/10.1038/nchembio.96>
64. Gloster TM, Zandberg WF, Heinonen JE et al (2011) Hijacking a biosynthetic pathway yields a glycosyltransferase inhibitor within cells. *Nat Chem Biol* 7:174–181. <https://doi.org/10.1038/nchembio.520>
65. Zachara NE (2009) Detecting the “O-GlcNAc-ome”; detection, purification, and analysis of O-GlcNAc modified proteins. *Methods Mol Biol* 534:251–279. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-022-5\\_19](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-022-5_19)
66. Dehennaut V, Slomianny M-C, Page A et al (2008) Identification of structural and functional O-linked N-acetylglucosamine-bearing proteins in *Xenopus laevis* oocyte. *Mol Cell Proteom* 7:2229–2245. <https://doi.org/10.1074/mcp.M700494-MCP200>
67. Clark PM, Rexach JE, Hsieh-Wilson LC (2013) Visualization of O-GlcNAc glycosylation stoichiometry and dynamics using resolvable poly(ethylene glycol) mass tags. *Curr Protoc Chem Biol* 5:281–302. <https://doi.org/10.1002/9780470559277.ch130153>
68. Scovassi AI, Prosperi E (2006) Analysis of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) associated with DNA. *Methods Mol Biol* 314:457–475
69. Li J, Deng M, Wei Q et al (2011) Phosphorylation of MCM3 protein by cyclin E/cyclin-dependent kinase 2 (Cdk2) regulates its function in cell cycle. *J Biol Chem* 286:39776–39785. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.226464>
70. Coverley D, Pelizon C, Treweek S, Laskey RA (2000) Chromatin-bound Cdc6 persists in S and G2 phases in human cells, while soluble Cdc6 is destroyed in a cyclin A-cdk2 dependent process. *J Cell Sci* 113(Pt 11):1929–1938
71. Ballabeni A, Zamponi R, Caprara G et al (2009) Human CDT1 associates with CDC7 and recruits CDC45 to chromatin during S phase. *J Biol Chem* 284:3028–3036. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803609200>
72. Yang X, Zhang F, Kudlow JE (2002) Recruitment of O-GlcNAc transferase to promoters by corepressor mSin3A: coupling protein O-GlcNAcylation to transcriptional repression. *Cell* 110:69–80
73. Yehezkel G, Cohen L, Kligler A et al (2012) O-linked  $\beta$ -N-acetylglucosaminylation (O-GlcNAcylation) in primary and metastatic colorectal cancer clones and effect of N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase silencing on cell phenotype and transcriptome. *J Biol Chem* 287:28755–28769. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.345546>
74. Yang YR, Jang H-J, Yoon S et al (2014) OGA heterozygosity suppresses intestinal tumorigenesis in Apc(min/+) mice. *Oncogenesis* 3:e109. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2014.24>
75. You Z, Komamura Y, Ishimi Y (1999) Biochemical analysis of the intrinsic Mcm4–Mcm6–mcm7 DNA helicase activity. *Mol Cell Biol* 19:8003–8015
76. Li J, Wang J, Wen L et al (2016) An OGA-resistant probe allow specific visualization and accurate identification of O-GlcNAc-modified proteins in cells. *ACS Chem Biol*. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b00678>
77. Chuh KN, Batt AR, Zaro BW et al (2017) The new chemical reporter 6-alkynyl-6-deoxy-GlcNAc reveals O-GlcNAc modification of the apoptotic caspases that can block the cleavage/activation of caspase-8. *J Am Chem Soc* 139:7872–7885. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b02213>
78. Rexach JE, Rogers CJ, Yu S-H et al (2010) Quantification of O-glycosylation stoichiometry and dynamics using resolvable mass tags. *Nat Chem Biol* 6:645–651. <https://doi.org/10.1038/nchembio.412>
79. Trinidad JC, Barkan DT, Gullledge BF et al (2012) Global identification and characterization of both O-GlcNAcylation and phosphorylation at the murine synapse. *Mol Cell Proteom* 11:215–229. <https://doi.org/10.1074/mcp.O112.018366>
80. Zhou H, Di Palma S, Preisinger C et al (2013) Toward a comprehensive characterization of a human cancer cell phosphoproteome. *J Proteome Res* 12:260–271. <https://doi.org/10.1021/pr300630k>
81. Mertins P, Yang F, Liu T et al (2014) Ischemia in tumors induces early and sustained phosphorylation changes in stress kinase pathways but does not affect global protein levels. *Mol Cell Proteom* 13:1690–1704. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.036392>
82. Zhang J, Yu L, Wu X et al (2010) The interacting domains of hCdt1 and hMcm6 involved in the chromatin loading of the MCM complex in human cells. *Cell Cycle* 9:4848–4857. <https://doi.org/10.4161/cc.9.24.14136>
83. Ramer MD, Suman ES, Richter H et al (2013) Dbf4 and Cdc7 proteins promote DNA replication through interactions with distinct Mcm2–7 protein subunits. *J Biol Chem* 288:14926–14935. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.392910>
84. Zhang Z, Tan EP, VandenHull NJ et al (2014) O-GlcNAcase expression is sensitive to changes in O-GlcNAc homeostasis. *Front Endocrinol* 5:206. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00206>
85. Park S-K, Zhou X, Pendleton KE et al (2017) A conserved splicing silencer dynamically regulates O-GlcNAc transferase intron retention and O-GlcNAc homeostasis. *Cell Rep* 20:1088–1099. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.07.017>
86. Burén S, Gomes AL, Teijeiro A et al (2016) Regulation of OGT by URI in response to glucose confers c-MYC-dependent survival mechanisms. *Cancer Cell* 30:290–307. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.06.023>
87. Wells L, Slawson C, Hart GW (2011) The E2F-1 associated retinoblastoma-susceptibility gene product is modified by O-GlcNAc. *Amino Acids* 40:877–883. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0709-6>
88. Chen Q, Yu X (2016) OGT restrains the expansion of DNA damage signaling. *Nucleic Acids Res* 44:9266–9278. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw663>
89. Ma X, Liu H, Li J et al (2017) Pol $\eta$  O-GlcNAcylation governs genome integrity during translesion DNA synthesis. *Nat Commun* 8:1941. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02164-1>

## Review Article

# O-GlcNAcylation and chromatin remodeling in mammals: an up-to-date overview

Maité Leturcq, Tony Lefebvre and Anne-Sophie Vercoutter-Edouart

Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UGSF), UMR 8576, CNRS, Université de Lille, 59000 Lille, France

Correspondence: Vercoutter-Edouart Anne-Sophie (anne-sophie.vercouter@univ-lille1.fr)

Post-translational modifications of histones and the dynamic DNA methylation cycle are finely regulated by a myriad of chromatin-binding factors and chromatin-modifying enzymes. Epigenetic modifications ensure local changes in the architecture of chromatin, thus controlling *in fine* the accessibility of the machinery of transcription, replication or DNA repair to the chromatin. Over the past decade, the nutrient-sensor enzyme O-GlcNAc transferase (OGT) has emerged as a modulator of chromatin remodeling. In mammals, OGT acts either directly through dynamic and reversible O-GlcNAcylation of histones and chromatin effectors, or in an indirect manner through its recruitment into chromatin-bound multiprotein complexes. In particular, there is an increasing amount of evidence of a cross-talk between OGT and the DNA dioxygenase ten–eleven translocation proteins that catalyze active DNA demethylation. Conversely, the stability of OGT itself can be controlled by the histone lysine-specific demethylase 2 (LSD2). Finally, a few studies have explored the role of O-GlcNAcase (OGA) in chromatin remodeling. In this review, we summarize the recent findings on the link between OGT, OGA and chromatin regulators in mammalian cellular models, and discuss their relevance in physiological and pathological conditions.

## Introduction

O-GlcNAcylation of proteins is a ubiquitous post-translational modification (PTM) that consists in the reversible addition of *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) residue onto Ser/Thr residues of nuclear, cytoplasmic and mitochondrial proteins. O-GlcNAc cycling is catalyzed by a unique and well-conserved couple of enzymes, O-GlcNAc transferase (OGT), which uses UDP-GlcNAc as the nucleotide-sugar donor, and O-GlcNAcase (OGA), which removes the GlcNAc moiety [1–3]. A putative histone acetyltransferase (HAT) activity of OGA has been proposed, based on sequence similarity of the C-terminal domain (CTD) of OGA with the catalytic core of acetyltransferase subfamilies and an *in vitro* HAT activity assay [4,5]. However, another study failed to detect any HAT activity of OGA [6]. In addition, even if the CTD of human OGA adopts a variant acetyltransferase fold, two recent structural studies confirm that OGA is not able to bind acetylCoA, the donor for the acetyl group, and is therefore a catalytically incompetent acetyltransferase [7,8]. These results strongly support the conclusion that OGA is unlikely to be a HAT by itself. Mammalian *Ogt* is essential for mouse embryonic stem cell viability and early development, demonstrating the importance of the O-GlcNAc modification for tissue development and function [9,10]. In contrast, *Oga* knockout mice did not show any obvious developmental defects, but embryos showed a delay in development with a reduced size and weight, and exhibited deregulation of metabolism, especially glucose homeostasis, leading to perinatal mortality. Moreover, mouse embryonic fibroblasts MEFs derived from *Oga*<sup>-/-</sup> mice displayed genomic and mitotic abnormalities and became senescent [11,12].

The O-GlcNAc modification is dynamic and concerns widespread classes of intracellular proteins, regulating diverse protein functions like protein–protein interactions, localization, stability, enzymatic activity and substrate specificity [1–3]. Since both O-GlcNAcylation and phosphorylation modify serine and

Received: 11 October 2016  
Revised: 2 December 2016  
Accepted: 5 January 2017

Version of Record published:  
13 April 2017

threonine residues, in a reversible manner and in response to extracellular environment changes, many works have deciphered the complex connection between O-GlcNAcylation and phosphorylation in multiple signaling pathways, including insulin- and ATM-dependent DNA damage response pathways [13–16]. O-GlcNAcylation and phosphorylation can occur independently at distinct serine or threonine residues or compete for the same or proximal residue, thus adding a layer of complexity in the regulation of intracellular signaling [13–15].

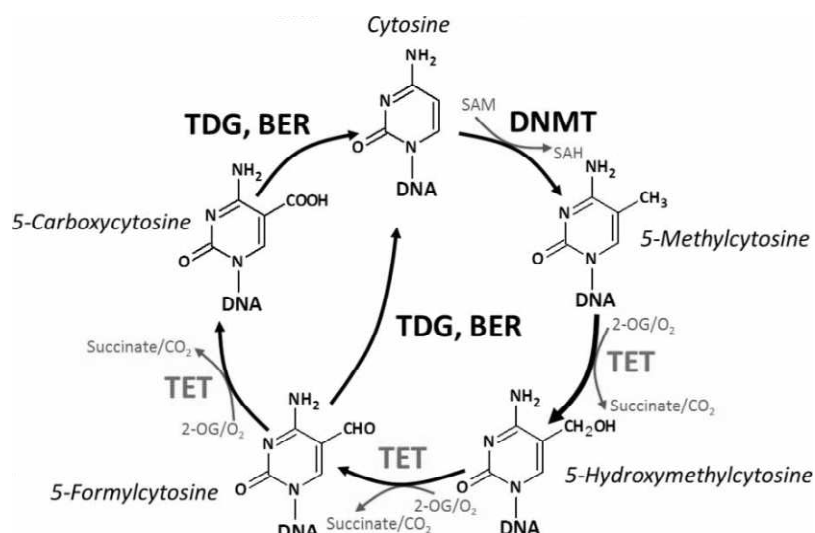
O-GlcNAcylation is considered as a nutrient-sensitive pathway: indeed, O-GlcNAc cycling is tightly connected to nutrient status of cells and organisms since the donor substrate for OGT, UDP-GlcNAc, is the end product of the hexosamine biosynthesis pathway, which depends on metabolic precursors coming from glucose, fatty acid and amino acid metabolisms [2]. Over the last decade, a link between alteration of O-GlcNAcylation levels and several human pathologies has been established, including type 2 diabetes, cancers [17–20], cardiovascular and neurodegenerative diseases [21,22]. Interestingly, connections between nutrient metabolism and epigenetic modifications have been recently under scrutiny. These elements are linked either directly by regulating enzymes that catalyze DNA demethylation or histone modifications, or by altering the availability of substrates necessary for those enzymatic reactions [23–26]. Exciting findings in the O-GlcNAc research field point out the involvement of this nutrient-sensitive pathway in regulation of epigenetic modifications and chromatin remodeling.

Chromatin is composed of double-strand DNA and histones, themselves organized and condensed to form nucleosomes, consisting of a segment of 146 base pairs of DNA wrapped around a core histone octamer composed of a central H3/H4 heterotetramer and two peripheral H2A/H2B dimers. The ordered formation and disassembly of the chromatin structure are tightly controlled by different histone chaperones that prevent incorrect interactions between the negatively charged DNA and the positively charged histones [27,28]. The compaction of chromatin is dynamic and highly regulated during gene transcription, DNA replication and DNA repair [29–31]. During these critical and fundamental processes, chromatin remodeling is principally driven by epigenetic modifications, including DNA methylation and histone PTMs, among which acetylation, methylation, phosphorylation and ubiquitination have been extensively studied for many years [32,33]. Epigenetic modifications naturally occur during embryonic development and terminal cellular differentiation, but can be also altered by environmental or intracellular factors, resulting in damaging effects associated with human diseases [23–26].

Covalent and reversible modifications of histones, also referred to as the *histone code*, can directly affect chromatin compaction [33]. Acetylation is catalyzed by HATs that are dependent on the acetyl donor acetylCoA and reversed by histone deacetylases (HDACs). The negative charge of acetyl groups induces a decondensation of nucleosomes and increases accessibility of DNA to transcriptional complexes or replication machinery [31,33]. Conversely, by removing acetyl groups from histone tails, HDACs contribute to gene silencing through chromatin compaction. Histone modifications can also serve as platforms to facilitate the recruitment of chromatin-associated multiprotein complexes, such as histone-modifying enzymes, transcription factors and pre-replication complex, which *in fine* can positively or negatively modulate the compaction of chromatin [31,33]. In addition to the well-established histone code, O-GlcNAcylation of histones has been described for the first time in 2010 [34] and since then, several studies have shown an impact of O-GlcNAc cycling on histone PTMs either by a direct or indirect way [35–37]. For example, O-GlcNAcylation of Ser112 of histone H2B may favor the anchorage of the BRE1 ubiquitin ligase (E3) to histone H2B, thus facilitating the monoubiquitination of the adjacent residue Lys120, which is correlated with transcription elongation [38]. In addition, O-GlcNAcylation of H2B Ser112 increases locally in response to DNA damage and may help in the recruitment of proteins involved in DNA repair [39]. OGT can also indirectly regulate the histone code by glycosylating histone modifiers, as shown for the protein arginine methyltransferase 4 (PRMT4), also known as CARM1 (co-activator-associated arginine methyltransferase 1), for which O-GlcNAcylation affects its protein substrate specificity [40], as shown for the demethylation of Arg17 on histone H3 (H3R17me2) during mitosis [41].

In contrast with histone PTMs that can either repress or activate transcription, DNA methylation is a repressive epigenetic mark associated with stable gene silencing. The covalent addition of a methyl group to the C-5 position of a cytosine ring (5mC, 5-methylcytosine) from the methyl donor S-adenosylmethionine (SAM) is catalyzed by DNA methyltransferases (DNMTs), which methylate cytosines concentrated in large clusters of CpG islands. DNA methylation blocks the interaction between DNA and transcriptional proteins. In addition, methyl-CpG-binding domain proteins bind to methylated DNA and recruit additional chromatin remodeling factors such as HDACs and histone methyltransferases (HMTs), leading to inactive chromatin and repression of transcription [32]. During DNA replication, the global DNA methylation pattern is maintained in daughter cells by DNMT1 that is recruited to the replication forks by its partner UHRF1 (ubiquitin-like plant





**Figure 1. Epigenetic modification cycle of cytosine.**

2-OG, 2-oxoglutarate; BER, base excision repair; DNMT, DNA methyltransferase; TDG, thymine DNA glycosylase; SAH, S-adenosyl-L-homocysteine; SAM, S-adenosyl-L-methionine; TET, ten-eleven translocation (proteins).

homeodomain and RING finger domain 1) that recognizes hemimethylated CpGs. Nevertheless, DNA demethylation is needed for epigenetic reprogramming during specific embryonic developmental stages, pluripotent stem cell differentiation and DNA repair. In these cases, replication-dependent passive loss of 5mC occurs progressively through successive mitosis in the absence of the DNA methylation maintenance machinery [32]. In addition to passive loss of methylation, an active DNA demethylation process has been recently identified in mammals through the DNA dioxygenase activity of TET (ten-eleven translocation) protein family: TET1, TET2 and TET3 proteins sequentially oxidize 5mC to 5-hydroxymethylcytosine (5hmC), 5-formylcytosine (5fC) and 5-carboxylcytosine (5caC) (Figure 1) [42–44]. *In vivo*, 5hmC is much more abundant than 5fC and 5caC [42,43,45]. These findings are strengthened by a recent structural study which demonstrates that human TET1 and TET2 proteins have higher oxidase activity on 5mC-DNA than on 5hmC or 5fC-DNA substrates, due to distinct intrinsic properties of 5mC, 5hmC and 5fC within the catalytic pocket of TET proteins [46]. TET proteins are thought to down-regulate the pattern of 5mC at specific loci in the genome, in particular in regulatory regions of genes, to dynamically control proper gene transcription and cellular phenotype in mammals [47,48]. The TET-induced epigenetic modifications can act as repressive or activating marks on gene transcription, depending on cell types, cellular differentiation state and development stages [45,48–53]. Moreover, loss of 5hmC has been reported in some cancers [54–56]. Additionally, TET proteins regulate gene expression independently of their enzymatic activity, especially through the recruitment of chromatin-modifying protein complexes, such as the HMT EZH2 and mSin3A co-repressor complex [44,47,48,51]. In this context, OGT has been recently identified as a strong interactor of TET proteins, and a cross-talk regulation of both enzymatic activities will be further discussed in this review.

Numerous reviews focusing on O-GlcNAcylation and epigenetics in metazoans have been recently published [35–37,57]. To get more details on O-GlcNAcylation of histones, the reader is referred to several excellent reviews which discussed this important topic [35–37]. In this review, we focus on the last findings that contribute to give a better understanding of the role of OGT, OGA and O-GlcNAc cycling in epigenetics in mammals in regard to cross-talk with different chromatin regulators. First, we describe OGT-mediated regulation of chromatin-modifying proteins. Second, we summarize the regulation of OGT by TET proteins and *vice versa*. Finally, we discuss about the role of OGA in O-GlcNAc-dependent chromatin remodeling and transcription elongation.

## OGT interacts with the histone cell cycle regulator histone chaperone complex and regulates nucleosome assembly

During transcription or DNA replication, the nucleosome assembly pathways are orchestrated by distinct histone chaperones that play an important role in chromatin remodeling [27]. Among them, the histone cell

cycle regulator (HIRA) complex, composed of HIRA, Ubinuclein 1 (UBN1) and calcineurin-binding protein 1 (CABIN1), mediates the incorporation of the histone H3 variant H3.3 into nucleosomes at genic regions, in a DNA replication-independent manner. Interaction of the HIRA chaperone with different partners affects its distribution and deposit of H3.3 variant across the chromatin epigenome [58]. Histone H3.3 is thought to destabilize nucleosomes and thus facilitate nucleosome dynamics during transcription activation. It has been very recently demonstrated that OGT is recruited into the HIRA complex through its interaction with the UBN1 subunit and enables the association of the HIRA complex with histone H3.3 [59]. Several O-GlcNAc sites have been found in both HIRA and UBN1 proteins (Table 1), but O-GlcNAcylation of UBN1 is likely to be dispensable for the HIRA complex integrity and function because O-GlcNAc site deletion mutants of UBN1 did not show any significant effect on UBN1 association with HIRA, CABIN1 or histone H3. In contrast, two major O-GlcNAc sites of HIRA, Ser231 and Ser876, are functionally important as their single mutation affects consistently the formation of the HIRA–H3.3 complex and H3.3 nucleosome assembly (Figure 2A) [59]. Depletion of OGT leads also to a significant decrease in H3.3 incorporation into chromatin, suggesting that OGT binds and modifies HIRA and promotes HIRA-mediated H3.3 deposition during nucleosome assembly. O-GlcNAc modification may induce conformational changes or directly mediate the interaction of UBN1 with HIRA since Ser231 of HIRA is localized in the HIRA–UBN1 interaction domain [59].

Recent works showed that regulation of chromatin dynamics induced by the HIRA complex and H3.3 is required to suppress cancer cell growth *in vitro* and tumor formation *in vivo* in a mouse xenograft model using MDA-MB-231 breast cancer cells [60]. In the same way, in oncogene-induced senescent cells, HIRA-mediated deposition of H3.3 is responsible for the formation of senescence-associated heterochromatin foci, which in turn induce a stable cell cycle arrest in senescent cells by repressing the transcription of proliferation-related genes, such as Cyclin A and minichromosome maintenance protein 6 (MCM6) [61]. By imposing proliferation arrest in neoplastic cells, oncogene-induced senescence acts as a tumor suppressor mechanism, thereby contributing to premalignant tumor suppression [62]. Interestingly, the level of OGT increases during cell senescence induced by Ras oncogenic signaling [59]. In addition, ectopic expression of OGT is sufficient to drive cellular senescence, while OGT depletion or overexpression of the O-GlcNAc-deficient mutant HIRA S231A does not efficiently promote premature cellular senescence in human primary fibroblasts [59]. These recent findings support the idea that OGT and O-GlcNAcylation of HIRA on Ser231 participate in the oncogene-induced cellular senescence, opening up new perspectives for the understanding of the role of OGT in chromatin remodeling in physiological and pathological contexts.

## OGT regulates HMT mixed lineage leukemia 5 proteasomal degradation

MLL5 (mixed lineage leukemia 5) protein, originally identified as a potential tumor suppressor in human myeloid leukemia, belongs to the H3K4 methyltransferase MLL family that catalyzes the trimethylation of Lys4 on histone H3 (H3K4me3). This epigenetic modification occurs at the promoter regions of target genes and activates their transcription [32,33]. MLL5 is involved in the regulation of cell cycle progression, hematopoiesis and spermatogenesis. OGT stably interacts with the MLL5 protein [63]. The authors further showed that MLL5 also strongly binds to the transcriptional and cell cycle regulator HCF1 (host cell factor C1), which directly participates in the recruitment of MLL5 to the promoters of E2F-responsive genes in order to stimulate H3K4 trimethylation (H3K4me3) and transcriptional activation, and thereby facilitate G1–S transition (Figure 2B) [63]. It should be noted that an unexpected cleavage activity of OGT has been identified for the proteolytic maturation of HCF1 in addition to O-GlcNAc modification of HCF1 [64,65]. It could be interesting to determine whether the proteolytic activity of OGT toward HCF1 may also regulate cell cycle progression, additionally or independently of MLL5 methyltransferase activity. More recently, it has been shown in transiently co-transfected HEK293T cells that the glycosyltransferase activity of OGT enhances MLL5 protein stability by inhibiting its ubiquitination and proteasomal degradation [66]. This protection mechanism is mediated through a direct interaction of both MLL5 and OGT with the deubiquitinase USP7, which decreases the ubiquitination of MLL5 (Figure 2B). This finding is biologically relevant in primary cervical adenocarcinomas in which increased MLL5 protein levels correlate with overexpression of OGT and USP7 [66]. These data support an indirect activating role of OGT in MLL5-mediated chromatin remodeling and transcription activation by regulating the stability of the H3K4 histone methyltransferase MLL5 (Table 1). It remains to ascertain whether OGT can also directly modulate MLL5 activity through O-GlcNAc modification.

**Table 1 An up-to-date overview of chromatin-remodeling proteins interacting with OGT**

Part 1 of 3

OGT interacting partners	Cells	O-GlcNAc sites	Functional effect	Transcriptional effect	Biological impact	Ref.
<b>HIRA histone chaperone complex</b>						
UBN1	HEK293T, HeLa, human primary fibroblasts	UBN1: T861, S866, T989, S999, S1003 HIRA: S231*, S425, S543, S876*	OGT positively regulates the formation of the HIRA–H3.3 complex and H3.3 nucleosome assembly	Activation	O-GlcNAcylation of S231 of HIRA and OGT promotes the premature senescence induced by oncogenic Ras expression in human primary IMR90 fibroblasts	[59]
<b>Histone methyltransferase MLL5</b>						
MLL5	HeLa		OGT interacts with HCF-1 and MLL5	Activation of E2F-target genes, through HCF-1/E2F interaction	Cell cycle regulation (G1/S transition)	[63]
USP7 deubiquitinase	HEK293T, HeLa		USP7 interacts with OGT and MLL5, and enhances MLL5 stability by decreasing its ubiquitination		Overexpression of OGT and USP7 in primary cervical adenocarcinomas with a high level of MLL5	[66]
<b>Polycomb repressive complex PRC1</b>						
E3 ubiquitin–protein ligase RING1B	Human ES cells	T250/S251, S278	May change interaction of RINGB1 with some PRC1 recruitment subunits	Repression (H2AK119Ub)	O-GlcNAcylation of RING1B decreases during differentiation. Glycosylated RING1B is preferentially found near genes related to neural differentiation, while non-O-GlcNAcylated RING1B preferentially binds near genes related to metabolic and cell cycle processes	[68]
<b>Polycomb repressive complex PRC2</b>						
Lysine HMT EZH2	Mouse ES cells		OGT interacts with Sirt1 (HDAC) and the corepressor mSin3A. Correlation with H3K9me3 and H3K27me3 repressive marks	Repression of <i>hcr1</i> gene	Pluripotency of ES cells	[95]
	HEK293T, MCF7 breast cancer cells	S75	Enhances EZH2 stability and activity on H3K27Me3	Repression (H3K27Me3)	OGT and EZH2 co-regulate negatively the expression of a group of 20 potential tumor suppressor genes in breast cancer cells	[73]
<b>Histone demethylase LSD2</b>						
Demethylase LSD2 with an unexpected E3 ubiquitin ligase activity	HEK293T, A549 lung cancer cells		Polyubiquitination and proteasomal degradation of OGT, independently of the demethylase activity of LSD2 on H3K4me2		LSD2 inhibits A549 cellular growth through promoting the degradation of OGT	[82]

Continued

**Table 1 An up-to-date overview of chromatin-remodeling proteins interacting with OGT**

Part 2 of 3

OGT interacting partners	Cells	O-GlcNAc sites	Functional effect	Transcriptional effect	Biological impact	Ref.
<b>mSin3A–HDAC repressive complex</b>						
mSin3A	Mouse ES cells		Favors HDAC activity of Sirt1 onto histones	Repression of <i>hprt</i> gene	Pluripotency of ES cells	[95]
HDAC1	HepG2, Huh7 hepatocarcinoma cells	T114 and S263	Favors HDAC activity on histones	Repression (p21WAF/Cip1 promoter)	Increases cell growth and migration of HepG2	[77]
<b>TET5-methylcytosine hydroxylase protein family</b>						
TET1	AB2.2 mouse ES cells, HEK293T	T535 [74]	OGT positively regulates TET1 protein level and subsequently 5hmC levels to TET1-target genes. The corepressors EZH2, Sin3A and NuRD are also found in TET1–OGT complexes	Repression	Repression of developmental genes in ES cells	[84]
TET1 (TET2)	Mouse ES cells		5hmC partly independent of OGT but OGT stabilizes Tet1 binding at its target promoters, regulating 5hmC levels Promotes OGT catalytic activity. In complex also with HCF-1C and Sin3A mediates global OGT recruitment to chromatin	Repression and activation	Differential regulation of genes in ES cells	[71]
TET2	Mouse ES cells, HEK293T		No effect on global 5hmC. TET2 increases the recruitment of OGT to the chromatin and promotes H2BS112 O-GlcNAc which favors SET1/COMPASS recruitment	Activation (increase in active marks H3K4me3, H3K79me3)		[85]
TET2, TET3	HEK293T, mouse bone marrow cells		TET3–OGT promotes HCF-1 O-GlcNAcylation which is important for the integrity of the HMT SET1/COMPASS complex Favors the binding of the HMT SETD1A	Activation (H3K4me3)	Regulation of hematopoiesis genes (TET2/OGT)	[86]
TET3	HEK293T		No effect on global 5hmC. Enhances OGT stabilization and chromatin localization			[87]

Continued

**Table 1 An up-to-date overview of chromatin-remodeling proteins interacting with OGT**

Part 3 of 3

OGT interacting partners	Cells	O-GlcNAc sites	Functional effect	Transcriptional effect	Biological impact	Ref.
	Primary neurons		OGT–TET3 facilitates binding of the transactivator NeuroD1	Activation (GnT-IX promoter)	Glycosyltransferase brain-specific gene expression	[91]
	HeLa, HEK293T		Favors the nuclear export of TET3 and consequently a decrease in 5hmC		Regulated by glucose metabolism	[89]
TET1	HEK293T	T253, S270, T327, S794, T1327, S2016**				[88]
TET2	HEK293T	T95, S97**, S317, S374**, T514, S545, S552, S561, S562, S565, T625, S746, T778, S807, T1437, S1443, T1613, T1640, S1672				
TET3	HEK293T	S360, S361, S362**, S557**, S1008, T1071, T1072, S1077, S1105, S1252, S1256, S1263, S1282, T1293, T1404, T1412, T1651, S1653, S1654, T1658				

Abbreviation: ES cells, embryonic stem cells. \*O-GlcNAc site with functional impact.  
 \*\*Phosphorylation site.

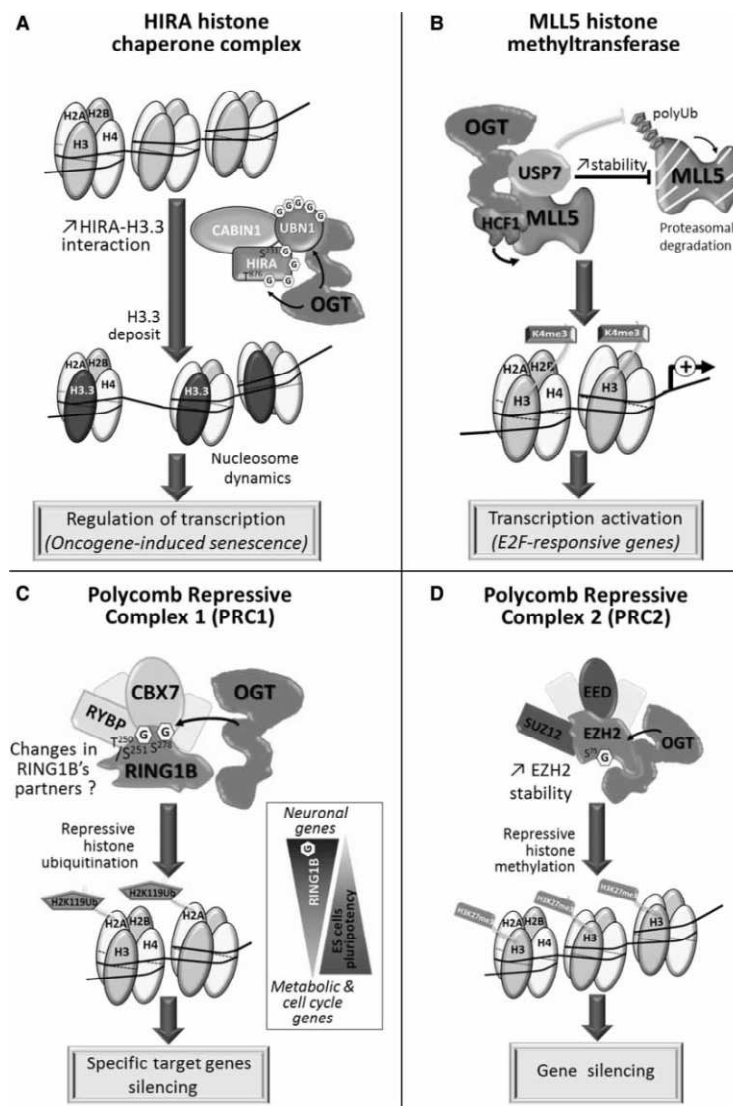
## OGT regulates the E3 ubiquitin–protein RING1B of polycomb repressive complex 1

The RING1B/RNF2 (really interesting new gene 1B/ ring finger protein 2) is the catalytic subunit of PRC1 that monoubiquitylates histone H2A on Lys119 (H2K119Ub), resulting in a strong transcriptional repression [67]. A recent study reports the O-GlcNAcylation of the E3 ubiquitin–protein ligase RING1B in human embryonic stem (ES) cells on at least two sites (Thr250/Ser251 and Ser278) [68]. Interestingly, the O-GlcNAc sites are located in a region that mediates the exclusive binding of RING1B to CBX7 and RYBP, two components of PRC1 that target and repress specific gene subsets (Table 1) [69,70]. The native [(Thr250/Ser251)-HexNAc] RING1B peptide has been quantified by a multiple reaction monitoring-mass spectrometry strategy, showing that O-GlcNAcylation of RING1B decreases during differentiation. Moreover, the glycosylated form of RING1B is preferentially found near genes related to neural differentiation, while non-O-GlcNAcylated RING1B preferentially binds near genes related to metabolic and cell cycle processes (Figure 2C) [68]. These results are consistent with a previous study in which RING1B was not detected in the WGA-enrichment fraction in the mouse E14 ES cell line [71], reinforcing that O-GlcNAcylation of RING1B depends on the differentiation status of stem cells. The authors propose that rather than regulating RING1B activity, OGT-mediated RING1B O-GlcNAcylation may change its interaction with some PRC1 recruitment subunits, thus modulating PRC1 DNA-binding and *in fine* enabling PRC1 to switch off transcription of specific genes, depending on cell fate.

## OGT regulates EZH2/PRC2 HMT stability

Contrary to the methyltransferase MLL family, which positively regulates gene expression, the polycomb proteins are transcriptional repressors through the formation of the multiprotein polycomb repressive complexes PRC1 and PRC2 [72]. PRC2 is involved in the trimethylation of histone H3 on Lys27 (H3K27me3). The transfer of methyl groups to the Lys27 of H3 is catalyzed by the EZH2 (enhancer of zeste 2) subunit of PRC2, resulting in silenced chromatin. A new role of OGT in the establishment of the repressive epigenetic modification H3K27me3 has been recently highlighted in human breast cancer cell lines [73]. OGT interacts with EZH2 in the PRC2 complex and O-GlcNAcylation of Ser75 is required for EZH2 stability, although the precise mechanism is still unknown (Table 1 and Figure 2D). Moreover, OGT and EZH2 co-regulate negatively the expression of a group of potential tumor suppressor genes in MCF7 breast cancer cells [73]. Knowing that both proteins are overexpressed in breast cancer cells, these findings provide new insights into how the OGT–EZH2 axis could promote tumorigenesis through cooperation in chromatin remodeling. However, the functional link





**Figure 2. OGT interacts with and regulates the HIRA histone chaperone complex and various histone modifying proteins to drive chromatin remodeling.**

(A) OGT is recruited into the HIRA complex through its interaction with the UBN1 subunit and enables the association of the HIRA complex with histone H3.3, promoting HIRA-mediated H3.3 deposition during nucleosome assembly. O-GlcNAcylation of HIRA on Ser231 participates in the oncogene-induced cellular senescence. (B) OGT regulates the stability of the H3K4 HMT MLL5. In complex with the cell cycle regulator HCF1, OGT participates in the recruitment of MLL5 to the promoters of E2F-responsive genes to stimulate H3K4me3 and transcriptional activation. In addition, OGT enhances MLL5 protein stability by inhibiting its ubiquitylation and proteasomal degradation through interaction with the deubiquitinase USP7. (C) OGT O-GlcNAcylates the E3-ubiquitin ligase RING1B at two major sites that are located in a region that mediates the exclusive binding of RING1B to CBX7 and RYBP. This may regulate the interaction of RING1B with these two components of PRC1, thus silencing a subset of specific genes. The glycosylated form of RING1B is preferentially found near genes related to neural differentiation in ES cells. (D) OGT interacts with EZH2 in the PRC2 complex and O-GlcNAcylation of Ser75 is required for EZH2 stability. OGT and EZH2 repressed the expression of some genes in MCF7 breast cancer cells.

between OGT and EZH2 may be cell type-dependent because no significant effect on EZH2 steady-state level and activity was observed in OGT-knockdown mouse ESCs [74]. Conversely, mESCs lacking the PRC2 core subunits EED or SUZ12 showed reduced OGT and O-GlcNAc levels [74]. More investigations regarding the dual relationship between OGT and EZH2 are needed to clarify the molecular mechanisms involved in the

maintenance of pluripotency of proliferating stem cells and cancer stem cells, especially in light of the contribution of TET1 to indirectly recruit EZH2 to PRC2-target genes as we will discuss here below [51].

## OGT cooperatively represses transcription through its interaction with and O-GlcNAc modification of mSin3A and HDAC1 corepressors

By allowing compaction of chromatin structure through histone deacetylation, HDACs are a component of many transcriptional repressor complexes [33]. It has been shown that OGT associates with a small fraction of mSin3A–HDAC1 repressive complexes and glycosylates both partners [75]. Moreover, *in vitro* pull-down assays demonstrate that the interaction between OGT and mSin3A is more efficient if OGA is present, indicating that the presence of OGA into the complex is likely to strengthen its stability [76]. These results have been confirmed under physiological conditions in breast cancer cells stimulated with estrogen: in the absence of estrogen, silencing of estrogen-responsive genes mediated by the mSin3A–HDAC1 complex correlates with an increase in the O-GlcNAcylation level of proteins bound to the promoters [75]. Conversely, OGA activity has been shown to be essential for proper estrogen-induced gene activation in cultured cells and *in vivo* for mammary gland development [76]. However, in OGT and mSin3A co-transfected cells combined with a luciferase synthetic promoter activity assay, both partners are able to directly associate and synergistically repress basal and Sp1-driven transcription in a HDAC1-independent manner [75]. A recent study provides new insights into the link between O-GlcNAcylation and HDAC1 in the context of hepatocellular cancer (HCC) progression [77]. Two major O-GlcNAc sites have been identified on HDAC1, Thr114 and Ser263 residues, which are located in the HDAC domain (Table 1). O-GlcNAcylation of HDAC1 correlates with its deacetylase activity on histones and favors the presence of HDAC1 on p21<sup>WAF1/Cip1</sup> promoters and the subsequent transcriptional repression of the cell cycle inhibitor [77]. Consistently with these results, transitory expression of wild-type (WT) HDAC1 increases cell growth and migration of HepG2 HCC cells, compared with HDAC1 O-GlcNAc mutants (T114A or S263A) [77]. Moreover, O-GlcNAcylation of HDAC1 is increased in HCC biopsies and cell lines compared with normal liver cells. These results are in agreement with previous studies reporting that a high HDAC1 expression is correlated with poor prognosis in HCC and that OGT is involved in HCC development [78,79]. Collectively, these studies highlight that mSin3A can recruit OGT to modify the transcriptional machinery both in a HDAC1-dependent and -independent manner and contributes to specific gene repression, but also that cycling of O-GlcNAc modification takes part in the on/off switch of transcription.

## OGT degradation is regulated by the histone lysine-specific demethylase 2

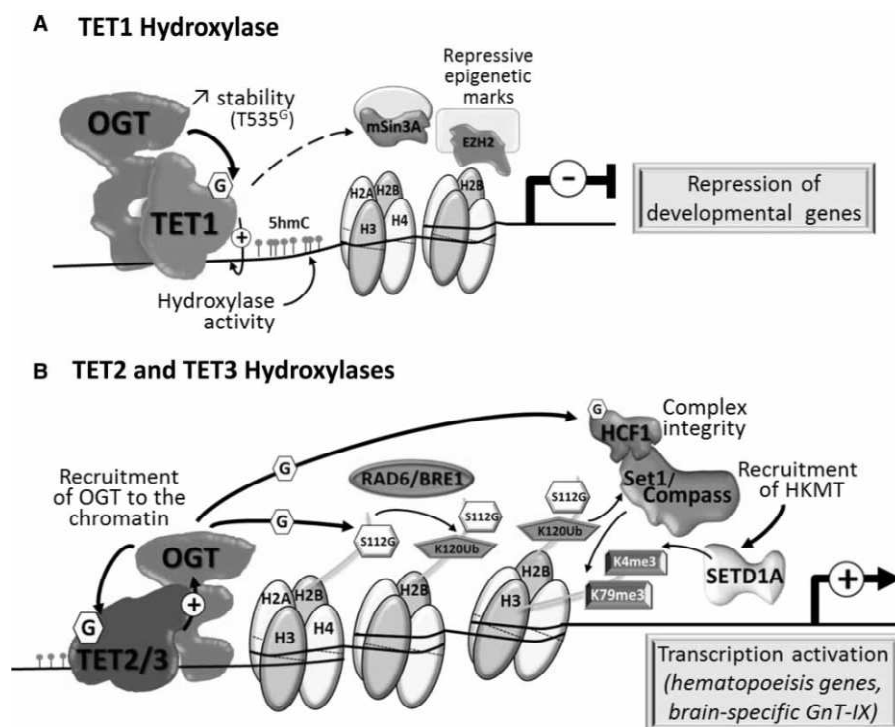
Histone methylation is reversed by histone demethylases among which LSD2 (lysine-specific demethylase 2) is a H3K4me2 demethylase that specifically regulates H3 demethylation within coding regions of actively transcribed genes [80]. Although LSD2 shares similar substrate specificity with the transcriptional corepressor LSD1, it has distinct structural organization and is linked to active gene transcription. In addition, a repression activity of LSD2, independently of its own H3K4 demethylase, has been suggested in 2010 [81]. Very recently, an unexpected E3 ubiquitin ligase activity of LSD2 has been discovered and OGT was identified as a major substrate of its catalytic activity [82]. LSD2 directly ubiquitylates OGT and promotes its proteasomal degradation independently of its histone demethylase activity (Table 1). Furthermore, the E3 ligase activity of LSD2 suppresses the expression of a distinct subset of genes (compared with its demethylase activity), which are mainly involved in metabolic processes, cell migration and proliferation [82]. This is concordant with the result showing that LSD2 inhibits the growth of cancer cells in a manner strictly dependent on its E3 ligase catalytic activity. Previous studies demonstrated that OGT is overexpressed in many cancer cells and favors cell growth of cancer cells, including lung cancer cells [17,83]. Interestingly, overexpression of OGT is able to impair cell growth inhibition mediated by LSD2 in A549 lung cancer cells [82]. These results strongly suggest that LSD2 inhibits cancer cell growth through ubiquitination and promotion of the proteasomal degradation of OGT. These data support also the hypothesis that, in some cancers, the elevated level of OGT required for cancer cell growth and proliferation may result from the loss of LSD2 and the subsequent stabilization of OGT in cancer cells [82].

## Cross-regulation of TET protein family and OGT

The mammalian TET dioxygenase enzymes, TET1, TET2 and TET3, are involved in the DNA demethylation process through the conversion of 5mC into the intermediate 5hmC (Figure 1). In addition to their role in DNA demethylation and gene expression, it is thought that 5hmC might also be an epigenetic mark and recruits specific chromatin-binding proteins which, in turn, could modulate chromatin structure and *in fine* regulate gene transcription. Finally, TET proteins recruit specific partners independently of their catalytic activity, thus inducing activation or repression of transcription [47]. To better understand the roles of TET proteins in the regulation of transcription independently of the DNA demethylation process, many efforts have been done to identify interacting-TET proteins. The presence of TET1 at a promoter is rather correlated with repression of transcription at least in part through the recruitment of Sin3A repressive complexes and PRC2, and is important in the regulation of ES cell pluripotency and cell differentiation [44,47,51,84]. In contrast, TET2 is generally associated with activation of transcription [48]. In this context, several works highlighted that TET1, TET2 and TET3 strongly associate with OGT at the chromatin [71,84–87]. Although OGT binds to and O-GlcNAcylates the three members of the mammalian TET protein family, it does not generally affect the global hydroxylation activity of TET2 and TET3 proteins (Table 1) [71,74,85,87,88]. On the other hand, knockdown of OGT in mouse ES cells decreases the presence of TET1 and 5hmC modification on TET1-target genes and modifies the cell fate determination, leading to differentiation of ES cells through derepression of lineage-specific genes (Figure 3A) [84]. Moreover, O-GlcNAcylation of TET proteins greatly modifies their phosphorylation pattern, as recently demonstrated through the detailed mapping of O-GlcNAc and phosphorylation sites of TET proteins [88]. TET2 and TET3 are highly O-GlcNAcylated compared with TET1 (20 O-GlcNAc sites on each vs. only 6 O-GlcNAc sites on TET1), and O-GlcNAcylation and phosphorylation mostly occur on distinct amino acids, strongly suggesting a proximal rather than a direct site competition between both PTMs on TET protein family (Table 1). The authors further showed that the majority of phosphorylation sites are reduced in occupancy upon O-GlcNAcylation [88]. In response to extracellular environment, OGT might thus regulate TET proteins' functions through a dynamic relationship with phosphorylation. In addition, in HEK293T or HeLa cells ectopically expressing OGT and TET, OGT promotes the nuclear export of TET3, but not TET1 or TET2, and its glycosyltransferase activity is required for regulating TET3 subcellular localization and consequently decreasing TET3 cytosine 5-hydroxymethylation activity (Table 1) [89]. However, it remains to confirm this OGT-dependent regulatory mechanism of TET3 chromatin recruitment and activity in a more relevant biological system. Finally, OGT may positively regulate the steady-state level of TET1 protein in ES cells, through at least O-GlcNAcylation at Thr535 (Table 1) [84]. Conversely, it has been proposed that TET3 stabilizes the level of OGT protein in transfected HEK293T cells, while the molecular mechanism is still unknown [87].

It is unambiguously clear that the interaction with TET proteins is important for the recruitment of OGT to the chromatin and promotes OGT catalytic activity [71,85–87]. TET proteins can promote OGT activity in several ways, depending on the cell type. In ES cells, the recruitment of OGT by TET2 to chromatin correlates with an increase in H2B O-GlcNAcylation of on Ser112 at active transcription start sites of promoters [85], which in turn mediates the monoubiquitination of the adjacent Lys120 residue (H2BK120ub) [38] that is itself required for H3K4 and K3K79 trimethylation by the SET1/COMPASS methyltransferase complex, two marks associated with active transcription (Figure 3B) [90]. In the same way, in HEK293T cells, TET2/3–OGT complex promotes O-GlcNAcylation of HCF1, a component of the H3K4 methyltransferase complex, which is important for the integrity of the H3K4 methyltransferase SET1/COMPASS complex, and favors the binding of the methyltransferase SETD1A to chromatin, allowing activating histone H3K4me3 epigenetic signature and thereby transcriptional activation (Figure 3B) [86]. These findings are biologically relevant *in vivo*: in mouse bone marrow cells, TET2 is essential for both OGT activity and H3K4me3 epigenetic mark, especially on genes involved in the regulation of hematopoiesis [86]. In brain, the OGT–TET3 complex facilitates the recruitment of the transactivator NeuroD1 to the promoter of the brain-specific *N*-acetylglucosaminyltransferase GnT-IX, allowing its transcription [91].

Interestingly, previous work showed that TET1 (but not TET2) associates and co-localizes with Sin3A, mainly at transcription start sites, and that Sin3A contributes significantly to TET1-mediated transcriptional repression [44]. On the other hand, as mentioned above, the Sin3A–OGT transcriptional repressive activities are partly independent of the HDAC deacetylase activity [75]. It would be of great interest to determine whether OGT may be recruited in the TET1–Sin3A complex to repress a subset of genes in a nutrient-sensitive manner, particularly in cancer cells, which exhibit abnormal metabolic activities [92] and epigenetic



**Figure 3. TET proteins recruit OGT to the chromatin and TET-OGT complexes affect epigenetic modifiers and regulate transcription.**

OGT binds to and O-GlcNAcylates TET1, TET2 and TET3. (A) O-GlcNAcylation of TET1 at Thr535 is likely to positively regulate the stability of TET1, and OGT favors the presence of Tet1 and 5hmC modification on TET1-target genes, allowing repression of lineage-specific genes probably through the recruitment and activation of other histone-modifying enzymes like the corepressor mSin3A and the histone-lysine methyltransferase (HKMT) EZH2. (B) The recruitment of OGT by TET2 to chromatin increases the O-GlcNAcylation of H2B on Ser112 (S112g), which in turn mediates the ubiquitination of the adjacent Lys120 residue of H2B (K120ub) by the RAD6/BRE1 ubiquitin ligase complex. This epigenetic modification allows the subsequent activating methylation K4me3 and K79me3 marks on H3 catalyzed by SETD1A and the SET1/COMPASS complex. In addition, the TET2/3-OGT complex promotes O-GlcNAcylation of HCF1, which is important for the integrity of the SET1/COMPASS methyltransferase complex, and favors the binding of the methyltransferase SETD1A to chromatin, thereby allowing transcriptional activation.

modifications [93], as well as loss of O-GlcNAc homeostasis [17–19]. In addition, it is noteworthy that, in mouse ES cells, TET1 contributes to the recruitment of the HMT EZH2 to a large fraction of PRC2-binding sites, although it occurs in an indirect manner since no stable interaction between TET1 and PRC2 subunits was detected [51]. Given the strong interaction between OGT and TET1, further investigations are needed to explore whether the nutrient-dependent enzyme OGT might be an intermediate partner between EZH2 and TET1 and therefore could participate in the control of substrate availability and specificity of PRC2 and, *in fine*, in the cell fate decision of stem cells. The regulation by extracellular or intracellular factors of the binary interaction between TET1/OGT, OGT/EZH2 and TET1/EZH2 within the ternary complex might also explain the discrepancy of results concerning the functional link between OGT and EZH2 in cancerous cells vs. mouse ESCs, as mentioned above [73,74].

## O-GlcNAcase regulates transcription through regulation of histone acetylation and RNA polymerase II

Most of the recent studies if not all focused on how OGT regulates and is regulated during chromatin remodeling associated with transcription regulation. Few data are available concerning the presence of OGA into the regulatory multiprotein complexes and whether its glycoside hydrolase activity is required in mammalian cells to finely



modulate the epigenetic marks through O-GlcNAc modification cycling. In view of a recent study in an insect model, it is likely that OGA functional importance is largely underestimated and unexplored in mammals. Indeed in *Drosophila*, OGA deletion globally affects the epigenetic machinery and induces altered expression of a distinct set of genes, although active transcription is more sensitive to loss of OGT than OGA [94].

In CHO and mammary cells, OGA is part of the corepressor complex within OGT, mSin3A and HDAC, and strengthens the stability of the complex [76]. As mentioned earlier, OGA is essential for proper estrogen-induced response by reversing the transcriptional repression of estradiol-responsive genes [76]. More recently, it has been shown that loss of O-GlcNAcylation is a pivotal step in the transformation process from the silent state to the active state of the *hcrt* gene, which is involved in the generation of orexin neurons from pluripotent mouse ES (mES) cells [95]. This gene encodes the hypothalamic neuropeptide precursor prepro-orexin that gives rise to two mature neuropeptides, orexin A and orexin B, after proteolytic cleavage. Orexin neurons play a central role in the regulation of the whole body metabolism by integrating the circadian rhythm and feeding behaviors. In mouse ES cells, O-GlcNAcylation plays a suppressive role in *hcrt* gene activation, whereas OGA expression increases *hcrt* gene expression in ManNAc-induced differentiated cells [95]. Silencing of *hcrt* in pluripotent mES cells is associated with both histone hypoacetylation through activity of the HDAC Sirt1, which is sensitive to cellular energy levels, and repressive histone marks H3K9me3 and H3K27me3. In addition, *hcrt* silencing correlates with colocalization of Sirt1 with OGT and O-GlcNAc modification, the transcriptional repressor Sin3A and the HMT EZH2 around the transcription start site of *hcrt*. In contrast, in orexin neurons harboring an active state of *hcrt*, acetylation of histones is markedly elevated in accordance with the accumulation of HAT p300/CREB-binding protein (CBP) and OGA [95]. The authors further investigated whether the putative HAT activity of OGA could be involved in histone acetylation. For that purpose, neural differentiated mES cells were transfected with WT OGA, an O-GlcNAcase-deficient OGA mutant (D175A) or a HAT domain–OGA mutant (Y891F), and levels of K3K14 and H4K8 acetylation were detected by western blot. Interestingly, acetylated histone levels were decreased in both OGA mutants compared with WT OGA. In regard to structural data showing that OGA does not possess by itself an acetyltransferase catalytic activity [7,8], these results suggest that both the catalytic glycoside hydrolase and the pseudo-HAT domains of OGA are required for histone acetylation *in vivo*, especially toward H3K14Ac and H4K8Ac [95]. It can be also proposed that OGA might serve as a molecular scaffold to recruit HATs at specific loci, including p300/CBP [95], and thus positively regulate the transcription. Furthermore, it is noteworthy that OGT has been identified as a component of the multiprotein HAT complex called the NSL (non-specific lethal) complex, in which MOF (males absent of the first; MYST1) is the catalytic HAT subunit [96]. The authors also showed that the substrate specificity of NSL-associated MOF toward lysines 5, 8 and 16 of histone H4 is dependent on its association with the other NSL subunits. It remains to investigate whether OGA is also present into the NSL complexes, possibly through OGT interaction, and whether O-GlcNAc cycling could participate in the regulation of MOF HAT specificity and activity, especially as recent findings link MOF functions to tumorigenesis [97].

Finally, downstream from epigenetic modifications, OGA is able to regulate the RNA polymerase II-dependent transcription elongation. Although O-GlcNAcylation of the RNA polymerase II has been described a long time ago [57,98], two recent elegant studies bring new insights into the regulation of RNA pol II transcription by O-GlcNAc dynamics [99,100]. The first study shows that O-GlcNAcylation of the CTD of RNA Pol II is necessary for its entry into the preinitiation complex and that OGT is essential for the optimal recruitment of RNA pol II onto the promoters [99]. In the second study, a stable OGA elongation complex has been discovered in which OGA physically interacts with the elongation factors SPT5 and TIF1 $\beta$  [100]. The authors further demonstrate that OGT and OGA activities are necessary for RNA pol II pausing and elongation, indicating that O-GlcNAc cycling is an integral part of the regulatory steps into the transcription elongation process [99,100].

## Conclusions

Overall, these latest findings demonstrate that OGT, OGA and O-GlcNAc cycling add a layer of complexity to chromatin remodeling by modulating recruitment, stability and activity of key chromatin regulators, including histone chaperones, HDACs, HATs and TET proteins. Conversely, epigenetic effectors can regulate the recruitment or stability of OGT. These findings provide further evidence that, depending on cell fate decision or cellular environment, OGT and O-GlcNAc cycling contribute to the tight regulation of chromatin structure, resulting in differential transcriptional regulation. On the other hand, chromatin remodeling is highly dynamic during cell cycle progression and DNA repair [29–31]. Despite several studies highlighting O-GlcNAcylation of

proteins involved in the replication machinery and DNA damage response pathways [16,39,101–103], much work remains to be done to understand how OGT, OGA and O-GlcNAc cycling are integrated into the molecular mechanisms regulating DNA replication and DNA repair. Further investigations are also required to understand the relationship between the loss of O-GlcNAc homeostasis and its impact on chromatin remodeling in a pathological context, including metabolic disorders and cancers.

### Abbreviations

5caC, 5-carboxylcytosine; 5fC, 5-formylcytosine; 5hmC, 5-hydroxymethylcytosine; 5mC, 5-methylcytosine; CABIN1, calcineurin-binding protein 1; CBP, CREB-binding protein; CTD, C-terminal domain; DNMT, DNA methyltransferase; ES cell, embryonic stem cell; HAT, histone acetyltransferase; HBP, hexosamine biosynthesis pathway; HCC, hepatocellular cancer; HCF1, host cell factor C1; HDAC, histone deacetylase; HIRA, histone cell cycle regulator; HKMT, histone-lysine methyltransferase; HMTs, histone methyltransferases; LSD2, lysine-specific demethylase 2; mES, mouse ES; MLL5, mixed lineage leukemia 5; MOF, males absent of the first; NSL, non-specific lethal; OGA, O-GlcNAcase; OGT, O-linked N-acetylglucosamine transferase; PRC, polycomb repressive complex; PTM, post-translational modification; TET, ten–eleven translocation; UBN1, Ubinuclein 1; WT, wild type.

### Funding

M.L. is recipient of a fellowship from the *Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche*. T.L. and A.-S.V.-E. are supported by the *Comité du Nord de la Ligue Nationale Contre le Cancer*, the *Centre National de la Recherche Scientifique* (CNRS), the *Fondation ARC (Association pour la Recherche contre le Cancer)* and the *Communauté d'Universités et d'Établissements (COMUE) Lille Nord de France*.

### Acknowledgements

The authors thank the *Research Federation FRABio* (Univ. Lille, CNRS, FR 3688, FRABio, Biochimie Structurale et Fonctionnelle des Assemblages Biomoléculaires).

### Competing Interests

The Authors declare that there are no competing interests associated with the manuscript.

### References

- 1 Bond, M.R. and Hanover, J.A. (2015) A little sugar goes a long way: the cell biology of O-GlcNAc. *J. Cell Biol.* **208**, 869–880 doi:10.1083/jcb.201501101
- 2 Nagel, A.K. and Ball, L.E. (2015) Intracellular protein O-GlcNAc modification integrates nutrient status with transcriptional and metabolic regulation. *Adv. Cancer Res.* **126**, 137–166 doi:10.1016/bs.acr.2014.12.003
- 3 Levine, Z.G. and Walker, S. (2016) The biochemistry of O-GlcNAc transferase: which functions make it essential in mammalian cells? *Annu. Rev. Biochem.* **85**, 631–657 doi:10.1146/annurev-biochem-060713-035344
- 4 Toleman, C., Paterson, A.J., Whisenhunt, T.R. and Kudlow, J.E. (2004) Characterization of the histone acetyltransferase (HAT) domain of a bifunctional protein with activable O-GlcNAcase and HAT activities. *J. Biol. Chem.* **279**, 53665–53673 doi:10.1074/jbc.M410406200
- 5 Toleman, C.A., Paterson, A.J. and Kudlow, J.E. (2006) The histone acetyltransferase NCOAT contains a zinc finger-like motif involved in substrate recognition. *J. Biol. Chem.* **281**, 3918–3925 doi:10.1074/jbc.M510485200
- 6 Butkinaree, C., Cheung, W.D., Park, S., Park, K., Barber, M. and Hart, G.W. (2008) Characterization of  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase cleavage by caspase-3 during apoptosis. *J. Biol. Chem.* **283**, 23557–23566 doi:10.1074/jbc.M804116200
- 7 He, Y., Roth, C., Turkenburg, J.P. and Davies, G.J. (2014). Three-dimensional structure of a *Streptomyces sviveus* GNAT acetyltransferase with similarity to the C-terminal domain of the human GH84 O-GlcNAcase. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **70**, 186–195 doi:10.1107/S1399004713029155
- 8 Rao, F.V., Schüttelkopf, A.W., Dorfmueller, H.C., Ferenbach, A.T., Navratilova, I. and van Aalten, D.M.F. (2013) Structure of a bacterial putative acetyltransferase defines the fold of the human O-GlcNAcase C-terminal domain. *Open Biol.* **3**, 130021 doi:10.1098/rsob.130021
- 9 Shafi, R., Iyer, S.P.N., Ellies, L.G., O'Donnell, N., Marek, K.W., Chui, D. et al. (2000) The O-GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 5735–5739 doi:10.1073/pnas.100471497
- 10 O'Donnell, N., Zachara, N.E., Hart, G.W. and Marth, J.D. (2004) Ogt-dependent X-chromosome-linked protein glycosylation is a requisite modification in somatic cell function and embryo viability. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 1680–1690 doi:10.1128/MCB.24.4.1680-1690.2004
- 11 Yang, Y.R., Song, M., Lee, H., Jeon, Y., Choi, E.-J., Jang, H.-J. et al. (2012) O-GlcNAcase is essential for embryonic development and maintenance of genomic stability. *Aging Cell* **11**, 439–448 doi:10.1111/j.1474-9726.2012.00801.x
- 12 Keembiyehetty, C., Love, D.C., Harwood, K.R., Gavrilova, O., Comly, M.E. and Hanover, J.A. (2015) Conditional knock-out reveals a requirement for O-linked N-Acetylglucosaminase (O-GlcNAcase) in metabolic homeostasis. *J. Biol. Chem.* **290**, 7097–7113 doi:10.1074/jbc.M114.617779
- 13 Zeidan, Q. and Hart, G.W. (2010) The intersections between O-GlcNAcylation and phosphorylation: implications for multiple signaling pathways. *J. Cell Sci.* **123**, 13–22 doi:10.1242/jcs.053678

- 14 Hardivillé, S. and Hart, G.W. (2014) Nutrient regulation of signaling, transcription, and cell physiology by *O*-GlcNAcylation. *Cell Metab.* **20**, 208–213 doi:10.1016/j.cmet.2014.07.014
- 15 Wang, Z., Udeshi, N.D., Slawson, C., Compton, P.D., Sakabe, K., Cheung, W.D. et al. (2010) Extensive crosstalk between *O*-GlcNAcylation and phosphorylation regulates cytokinesis. *Sci. Signal.* **3**, ra2 doi:10.1126/scisignal.2000526
- 16 Zhong, J., Martinez, M., Sengupta, S., Lee, A., Wu, X., Chaerkady, R. et al. (2015) Quantitative phosphoproteomics reveals crosstalk between phosphorylation and *O*-GlcNAc in the DNA damage response pathway. *Proteomics* **15**, 591–607 doi:10.1002/pmic.201400339
- 17 Fardini, Y., Dehennaut, V., Lefebvre, T. and Issad, T. (2013) *O*-GlcNAcylation: a new cancer hallmark? *Front. Endocrinol.* **4**, 99 doi:10.3389/fendo.2013.00099
- 18 Ma, Z. and Vosseller, K. (2014) Cancer metabolism and elevated *O*-GlcNAc in oncogenic signaling. *J. Biol. Chem.* **289**, 34457–34465 doi:10.1074/jbc.R114.577718
- 19 Swamy, M., Pathak, S., Grzes, K.M., Damerow, S., Sinclair, L.V., van Aalten, D.M.F. et al. (2016) Glucose and glutamine fuel protein *O*-GlcNAcylation to control T cell self-renewal and malignancy. *Nat. Immunol.* **17**, 712–720 doi:10.1038/ni.3439
- 20 Banerjee, P.S., Lagerlöf, O. and Hart, G.W. (2016) Roles of *O*-GlcNAc in chronic diseases of aging. *Mol. Aspects Med.* **51**, 1–15 doi:10.1016/j.mam.2016.05.005
- 21 Dassanayaka, S. and Jones, S.P. (2014) *O*-GlcNAc and the cardiovascular system. *Pharmacol. Ther.* **142**, 62–71 doi:10.1016/j.pharmthera.2013.11.005
- 22 Yuzwa, S.A. and Vocadlo, D.J. (2014) *O*-GlcNAc and neurodegeneration: biochemical mechanisms and potential roles in Alzheimer's disease and beyond. *Chem. Soc. Rev.* **43**, 6839–6858 doi:10.1039/C4CS00038B
- 23 Choi, S.-W. and Friso, S. (2010) Epigenetics: a new bridge between nutrition and health. *Adv. Nutr.* **1**, 8–16 doi:10.3945/an.110.1004
- 24 Lu, C. and Thompson, C.B. (2012) Metabolic regulation of epigenetics. *Cell Metab.* **16**, 9–17 doi:10.1016/j.cmet.2012.06.001
- 25 Gut, P. and Verdin, E. (2013) The nexus of chromatin regulation and intermediary metabolism. *Nature* **502**, 489–498 doi:10.1038/nature12752
- 26 Keating, S.T. and El-Osta, A. (2015) Epigenetics and metabolism. *Circ. Res.* **116**, 715–736 doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.303936
- 27 Ransom, M., Dennehey, B.K. and Tyler, J.K. (2010) Chaperoning histones during DNA replication and repair. *Cell* **140**, 183–195 doi:10.1016/j.cell.2010.01.004
- 28 Venkatesh, S. and Workman, J.L. (2015) Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**, 178–189 doi:10.1038/nrm3941
- 29 Méchali, M., Yoshida, K., Coulombe, P. and Pasero, P. (2013) Genetic and epigenetic determinants of DNA replication origins, position and activation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **23**, 124–131 doi:10.1016/j.gde.2013.02.010
- 30 House, N.C.M., Koch, M.R. and Freudenreich, C.H. (2014) Chromatin modifications and DNA repair: beyond double-strand breaks. *Front. Genet.* **5**, 296 doi:10.3389/fgene.2014.00296
- 31 Ma, Y., Kanakousaki, K. and Buttitta, L. (2015) How the cell cycle impacts chromatin architecture and influences cell fate. *Front. Genet.* **6**, 19 doi:10.3389/fgene.2015.00019
- 32 Wu, H. and Zhang, Y. (2014) Reversing DNA methylation: mechanisms, genomics, and biological functions. *Cell* **156**, 45–68 doi:10.1016/j.cell.2013.12.019
- 33 Tessarz, P. and Kouzarides, T. (2014) Histone core modifications regulating nucleosome structure and dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 703–708 doi:10.1038/nrm3890
- 34 Sakabe, K., Wang, Z. and Hart, G.W. (2010)  $\beta$ -*N*-acetylglucosamine (*O*-GlcNAc) is part of the histone code. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 19915–19920 doi:10.1073/pnas.1009023107
- 35 Dehennaut, V., Leprince, D. and Lefebvre, T. (2014) *O*-GlcNAcylation, an epigenetic mark. Focus on the histone code, TET family proteins, and polycomb group proteins. *Front. Endocrinol.* **5**, 155 doi:10.3389/fendo.2014.00155
- 36 Gambetta, M.C. and Müller, J. (2015) A critical perspective of the diverse roles of *O*-GlcNAc transferase in chromatin. *Chromosoma* **124**, 429–442 doi:10.1007/s00412-015-0513-1
- 37 Hardivillé, S. and Hart, G.W. (2016) Nutrient regulation of gene expression by *O*-GlcNAcylation of chromatin. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **33**, 88–94 doi:10.1016/j.cbpa.2016.06.005
- 38 Fujiki, R., Hashiba, W., Sekine, H., Yokoyama, A., Chikanishi, T., Ito, S. et al. (2011) GlcNAcylation of histone H2B facilitates its monoubiquitination. *Nature* **480**, 557–560 doi:10.1038/nature10656
- 39 Wang, P., Peng, C., Liu, X., Liu, H., Chen, Y., Zheng, L. et al. (2015) OGT mediated histone H2B S112 GlcNAcylation regulates DNA damage response. *J. Genet. Genomics* **42**, 467–475 doi:10.1016/j.jgg.2015.07.002
- 40 Charoensuksai, P., Kuhn, P., Wang, L., Sherer, N. and Xu, W. (2015) *O*-GlcNAcylation of co-activator-associated arginine methyltransferase 1 regulates its protein substrate specificity. *Biochem. J.* **466**, 587–599 doi:10.1042/BJ20141072
- 41 Sakabe, K. and Hart, G.W. (2010) *O*-GlcNAc transferase regulates mitotic chromatin dynamics. *J. Biol. Chem.* **285**, 34460–34468 doi:10.1074/jbc.M110.158170
- 42 Tahiliani, M., Koh, K.P., Shen, Y., Pastor, W.A., Bandukwala, H., Brudno, Y. et al. (2009) Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* **324**, 930–935 doi:10.1126/science.1170116
- 43 Ito, S., Shen, L., Dai, Q., Wu, S.C., Collins, L.B., Swenberg, J.A. et al. (2011) Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science* **333**, 1300–1303 doi:10.1126/science.1210597
- 44 Williams, K., Christensen, J., Pedersen, M.T., Johansen, J.V., Cloos, P.A.C., Rappsilber, J. et al. (2011) TET1 and hydroxymethylcytosine in transcription and DNA methylation fidelity. *Nature* **473**, 343–348 doi:10.1038/nature10066
- 45 Song, C.-X., Szulwach, K.E., Dai, Q., Fu, Y., Mao, S.-Q., Lin, L. et al. (2013) Genome-wide profiling of 5-formylcytosine reveals its roles in epigenetic priming. *Cell* **153**, 678–691 doi:10.1016/j.cell.2013.04.001
- 46 Hu, L., Lu, J., Cheng, J., Rao, Q., Li, Z., Hou, H. et al. (2015) Structural insight into substrate preference for TET-mediated oxidation. *Nature* **527**, 118–122 doi:10.1038/nature15713
- 47 Delatte, B. and Fuks, F. (2013) TET proteins: on the frenetic hunt for new cytosine modifications. *Briefings Funct. Genomics* **12**, 191–204 doi:10.1093/bfpg/elt010

- 48 Pastor, W.A., Aravind, L. and Rao, A. (2013) TETonic shift: biological roles of TET proteins in DNA demethylation and transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 341–356 doi:10.1038/nrm3589
- 49 Ficž, G., Branco, M.R., Seisenberger, S., Santos, F., Krueger, F., Hore, T.A. et al. (2011) Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. *Nature* **473**, 398–402 doi:10.1038/nature10008
- 50 Koh, K.P., Yabuuchi, A., Rao, S., Huang, Y., Cunniff, K., Nardone, J. et al. (2011) Tet1 and Tet2 regulate 5-hydroxymethylcytosine production and cell lineage specification in mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* **8**, 200–213 doi:10.1016/j.stem.2011.01.008
- 51 Wu, H., D'Alessio, A.C., Ito, S., Xia, K., Wang, Z., Cui, K. et al. (2011) Dual functions of Tet1 in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells. *Nature* **473**, 389–393 doi:10.1038/nature09934
- 52 Khare, T., Pai, S., Koncevicus, K., Pal, M., Kriukiene, E., Liutkeviciute, Z. et al. (2012) 5-hmC in the brain is abundant in synaptic genes and shows differences at the exon-intron boundary. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 1037–1043 doi:10.1038/nsmb.2372
- 53 Wang, L., Zhou, Y., Xu, L., Xiao, R., Lu, X., Chen, L. et al. (2015) Molecular basis for 5-carboxycytosine recognition by RNA polymerase II elongation complex. *Nature* **523**, 621–625 doi:10.1038/nature14482
- 54 Moran-Crusio, K., Reavie, L., Shih, A., Abdel-Wahab, O., Ndiaye-Lobry, D., Lobry, C. et al. (2011) Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation. *Cancer Cell* **20**, 11–24 doi:10.1016/j.ccr.2011.06.001
- 55 Lian, C.G., Xu, Y., Ceol, C., Wu, F., Larson, A., Dresser, K. et al. (2012) Loss of 5-hydroxymethylcytosine is an epigenetic hallmark of melanoma. *Cell* **150**, 1135–1146 doi:10.1016/j.cell.2012.07.033
- 56 Kraus, T.F.J., Greiner, A., Steinmaurer, M., Dietinger, V., Guibourt, V. and Kretschmar, H.A. (2015) Genetic characterization of ten-eleven-translocation methylcytosine dioxygenase alterations in human glioma. *J. Cancer* **6**, 832–842 doi:10.7150/jca.12010
- 57 Lewis, B.A. and Hanover, J.A. (2014) O-GlcNAc and the epigenetic regulation of gene expression. *J. Biol. Chem.* **289**, 34440–34448 doi:10.1074/jbc.R114.595439
- 58 Pchelintsev, N.A., McBryan, T., Rai, T.S., van Tuyn, J., Ray-Gallet, D., Almouzni, G. et al. (2013) Placing the HIRA histone chaperone complex in the chromatin landscape. *Cell Rep.* **3**, 1012–1019 doi:10.1016/j.celrep.2013.03.026
- 59 Lee, J.-S. and Zhang, Z. (2016) O-linked N-acetylglucosamine transferase (OGT) interacts with the histone chaperone HIRA complex and regulates nucleosome assembly and cellular senescence. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **113**, E3213–E3220 doi:10.1073/pnas.1600509113
- 60 Wen, H., Li, Y., Xi, Y., Jiang, S., Stratton, S., Peng, D. et al. (2014) ZMYND11 links histone H3.3K36me3 to transcription elongation and tumour suppression. *Nature* **508**, 263–268 doi:10.1038/nature13045
- 61 Rai, T.S., Cole, J.J., Nelson, D.M., Dikovskaya, D., Faller, W.J., Vizioli, M.G. et al. (2014) HIRA orchestrates a dynamic chromatin landscape in senescence and is required for suppression of neoplasia. *Genes Dev.* **28**, 2712–2725 doi:10.1101/gad.247528.114
- 62 Muñoz-Espín, D. and Serrano, M. (2014) Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat. Mol. Cell Biol.* **15**, 482–496 doi:10.1038/nrm3823
- 63 Zhou, P., Wang, Z., Yuan, X., Zhou, C., Liu, L., Wan, X. et al. (2013) Mixed lineage leukemia 5 (MLL5) protein regulates cell cycle progression and E2F1-responsive gene expression via association with host cell factor-1 (HCF-1). *J. Biol. Chem.* **288**, 17532–17543 doi:10.1074/jbc.M112.439729
- 64 Capotosti, F., Guernier, S., Lammers, F., Waridel, P., Cai, Y., Jin, J. et al. (2011) O-GlcNAc transferase catalyzes site-specific proteolysis of HCF-1. *Cell* **144**, 376–388 doi:10.1016/j.cell.2010.12.030
- 65 Daou, S., Mashtalir, N., Hammond-Martel, I., Pak, H., Yu, H., Sui, G. et al. (2011) Crosstalk between O-GlcNAcylation and proteolytic cleavage regulates the host cell factor-1 maturation pathway. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 2747–2752 doi:10.1073/pnas.1013822108
- 66 Ding, X., Jiang, W., Zhou, P., Liu, L., Wan, X., Yuan, X. et al. (2015) Mixed lineage leukemia 5 (MLL5) protein stability is cooperatively regulated by O-GlcNAc transferase (OGT) and ubiquitin specific protease 7 (USP7). *PLoS ONE* **10**, e0145023 doi:10.1371/journal.pone.0145023
- 67 Vidal, M. (2009) Role of polycomb proteins Ring1A and Ring1B in the epigenetic regulation of gene expression. *Int. J. Dev. Biol.* **53**, 355–370 doi:10.1387/ijdb.082690mv
- 68 Maury, J.J.P., El Farran, C.A., Ng, D., Loh, Y.-H., Bi, X., Bardor, M. et al. (2015) RING1B O-GlcNAcylation regulates gene targeting of polycomb repressive complex 1 in human embryonic stem cells. *Stem Cell Res.* **15**, 182–189 doi:10.1016/j.scr.2015.06.007
- 69 Wang, R., Taylor, A.B., Leal, B.Z., Chadwell, L.V., Ilangovan, U., Robinson, A.K. et al. (2010) Polycomb group targeting through different binding partners of RING1B C-terminal domain. *Structure* **18**, 966–975 doi:10.1016/j.str.2010.04.013
- 70 Morey, L., Aloia, L., Cozzuto, L., Benitah, S.A. and Di Croce, L. (2013) RYBP and Cbx7 define specific biological functions of polycomb complexes in mouse embryonic stem cells. *Cell Rep.* **3**, 60–69 doi:10.1016/j.celrep.2012.11.026
- 71 Vella, P., Scelfo, A., Jammula, S., Chiacchiera, F., Williams, K., Cuomo, A. et al. (2013) Tet proteins connect the O-linked N-acetylglucosamine transferase Ogt to chromatin in embryonic stem cells. *Mol. Cell* **49**, 645–656 doi:10.1016/j.molcel.2012.12.019
- 72 Blackledge, N.P., Rose, N.R. and Klose, R.J. (2015) Targeting Polycomb systems to regulate gene expression: modifications to a complex story. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**, 643–649 doi:10.1038/nrm4067
- 73 Chu, C.-S., Lo, P.-W., Yeh, Y.-H., Hsu, P.-H., Peng, S.-H., Teng, Y.-C. et al. (2014) O-GlcNAcylation regulates EZH2 protein stability and function. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 1355–1360 doi:10.1073/pnas.1323226111
- 74 Myers, S.A., Panning, B. and Burlingame, A.L. (2011) Polycomb repressive complex 2 is necessary for the normal site-specific O-GlcNAc distribution in mouse embryonic stem cells. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 9490–9495 doi:10.1073/pnas.1019289108
- 75 Yang, X., Zhang, F. and Kudlow, J.E. (2002) Recruitment of O-GlcNAc transferase to promoters by corepressor mSin3A: coupling protein O-GlcNAcylation to transcriptional repression. *Cell* **110**, 69–80 doi:10.1016/S0092-8674(02)00810-3
- 76 Whisenant, T.R., Yang, X., Bowe, D.B., Paterson, A.J., Van Tine, B.A. and Kudlow, J.E. (2006) Disrupting the enzyme complex regulating O-GlcNAcylation blocks signaling and development. *Glycobiology* **16**, 551–563 doi:10.1093/glycob/cwj096
- 77 Zhu, G., Tao, T., Zhang, D., Liu, X., Qiu, H., Han, L. et al. (2016) O-GlcNAcylation of histone deacetylases 1 in hepatocellular carcinoma promotes cancer progression. *Glycobiology* **26**, 820–833 doi:10.1093/glycob/cww025
- 78 Rikimaru, T., Taketomi, A., Yamashita, Y., Shirabe, K., Hamatsu, T., Shimada, M. et al. (2007) Clinical significance of histone deacetylase 1 expression in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncology* **72**, 69–74 doi:10.1159/000111106
- 79 Zhu, Q., Zhou, L., Yang, Z., Lai, M., Xie, H., Wu, L. et al. (2012) O-GlcNAcylation plays a role in tumor recurrence of hepatocellular carcinoma following liver transplantation. *Med. Oncol.* **29**, 985–993 doi:10.1007/s12032-011-9912-1



- 80 Fang, R., Barbera, A.J., Xu, Y., Rutenberg, M., Leonor, T., Bi, Q. et al. (2010) Human LSD2/KDM1b/AOF1 regulates gene transcription by modulating intragenic H3K4me2 methylation. *Mol. Cell* **39**, 222–233 doi:10.1016/j.molcel.2010.07.008
- 81 Yang, Z., Jiang, J., Stewart, D.M., Qi, S., Yamane, K., Li, J. et al. (2010). AOF1 is a histone H3K4 demethylase possessing demethylase activity-independent repression function. *Cell Res.* **20**, 276–287 doi:10.1038/cr.2010.12
- 82 Yang, Y., Yin, X., Yang, H. and Xu, Y. (2015) Histone demethylase LSD2 acts as an E3 ubiquitin ligase and inhibits cancer cell growth through promoting proteasomal degradation of OGT. *Mol. Cell* **58**, 47–59 doi:10.1016/j.molcel.2015.01.038
- 83 Mi, W., Gu, Y., Han, C., Liu, H., Fan, Q., Zhang, X. et al. (2011). O-GlcNAcylation is a novel regulator of lung and colon cancer malignancy. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Basis Dis.* **1812**, 514–519 doi:10.1016/j.bbadis.2011.01.009
- 84 Shi, F.-T., Kim, H., Lu, W., He, Q., Liu, D., Goodell, M.A. et al. (2013) Ten-eleven translocation 1 (Tet1) is regulated by O-linked N-acetylglucosamine transferase (Ogt) for target gene repression in mouse embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* **288**, 20776–20784 doi:10.1074/jbc.M113.460386
- 85 Chen, Q., Chen, Y., Bian, C., Fujiki, R. and Yu, X. (2013) TET2 promotes histone O-GlcNAcylation during gene transcription. *Nature* **493**, 561–564 doi:10.1038/nature11742
- 86 Deplus, R., Delatte, B., Schwinn, M.K., Defrance, M., Méndez, J., Murphy, N. et al. (2013) TET2 and TET3 regulate GlcNAcylation and H3K4 methylation through OGT and SET1/COMPASS. *EMBO J.* **32**, 645–655 doi:10.1038/emboj.2012.357
- 87 Ito, R., Katsura, S., Shimada, H., Tsuchiya, H., Hada, M., Okumura, T. et al. (2014) TET3-OGT interaction increases the stability and the presence of OGT in chromatin. *Genes Cells* **19**, 52–65 doi:10.1111/gtc.12107
- 88 Bauer, C., Göbel, K., Nagaraj, N., Colantuoni, C., Wang, M., Müller, U. et al. (2015) Phosphorylation of TET proteins is regulated via O-GlcNAcylation by the O-linked N-acetylglucosamine transferase (OGT). *J. Biol. Chem.* **290**, 4801–4812 doi:10.1074/jbc.M114.605881
- 89 Zhang, Q., Liu, X., Gao, W., Li, P., Hou, J., Li, J. et al. (2014) Differential regulation of the ten-eleven translocation (TET) family of dioxygenases by O-linked β-N-acetylglucosamine transferase (OGT). *J. Biol. Chem.* **289**, 5986–5996 doi:10.1074/jbc.M113.524140
- 90 Bonnet, J., Devys, D. and Tora, L. (2014) Histone H2B ubiquitination: signaling not scrapping. *Drug Discov. Today Technol.* **12**, e19–e27 doi:10.1016/j.ddtec.2012.09.002
- 91 Kizuka, Y., Kitazume, S., Okahara, K., Villagra, A., Sotomayor, E.M. and Taniguchi, N. (2014) Epigenetic regulation of a brain-specific glycosyltransferase N-acetylglucosaminyl-transferase-IX (GnT-IX) by specific chromatin modifiers. *J. Biol. Chem.* **289**, 11253–11261 doi:10.1074/jbc.M114.554311
- 92 DeBerardinis, R.J. and Chandel, N.S. (2016) Fundamentals of cancer metabolism. *Sci. Adv.* **2**, e1600200 doi:10.1126/sciadv.1600200
- 93 Rodríguez-Paredes, M. and Esteller, M. (2011) Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nat. Med.* **17**, 330–339 doi:10.1038/nm.2305
- 94 Akan, I., Love, D.C., Harwood, K.R., Bond, M.R. and Hanover, J.A. (2016) O-GlcNAcase deletion globally perturbs chromatin O-GlcNAcylation. *J. Biol. Chem.* **291**, 9906–9919 doi:10.1074/jbc.M115.704783
- 95 Hayakawa, K., Hirokawa, M., Tabei, Y., Arai, D., Tanaka, S., Murakami, N. et al. (2013) Epigenetic switching by the metabolism-sensing factors in the generation of orexin neurons from mouse embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* **288**, 17099–17110 doi:10.1074/jbc.M113.455899
- 96 Cai, Y., Jin, J., Swanson, S.K., Cole, M.D., Choi, S.H., Florens, L. et al. (2010) Subunit composition and substrate specificity of a MOF-containing histone acetyltransferase distinct from the male-specific lethal (MSL) complex. *J. Biol. Chem.* **285**, 4268–4272 doi:10.1074/jbc.C109.087981
- 97 Su, J., Wang, F., Cai, Y. and Jin, J. (2016) The functional analysis of histone acetyltransferase MOF in tumorigenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 99 pii: E99 doi:10.3390/ijms17010099
- 98 Kelly, W.G., Dahmus, M.E. and Hart, G.W. (1993) RNA polymerase II is a glycoprotein. Modification of the COOH-terminal domain by O-GlcNAc. *J. Biol. Chem.* **268**, 10416–10424 PMID:8486697
- 99 Lewis, B.A., Burlingame, A.L. and Myers, S.A. (2016) Human RNA polymerase II promoter recruitment *in vitro* is regulated by O-linked N-acetylglucosaminyltransferase (OGT). *J. Biol. Chem.* **291**, 14056–14061 doi:10.1074/jbc.M115.684365
- 100 Resto, M., Kim, B.-H., Fernandez, A.G., Abraham, B.J., Zhao, K. and Lewis, B.A. (2016) O-GlcNAcase is an RNA polymerase II elongation factor coupled to pausing factors SPT5 and TIF1β. *J. Biol. Chem.* **291**, 22703–22713 doi:10.1074/jbc.M116.751420
- 101 Drougat, L., Olivier-Van Stichelen, S., Mortuaire, M., Foulquier, F., Lacoste, A.-S., Michalski, J.-C. et al. (2012) Characterization of O-GlcNAc cycling and proteomic identification of differentially O-GlcNAcylated proteins during G1/S transition. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **1820**, 1839–1848 doi:10.1016/j.bbagen.2012.08.024
- 102 Miura, Y., Sakurai, Y. and Endo, T. (2012) O-GlcNAc modification affects the ATM-mediated DNA damage response. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **1820**, 1678–1685 doi:10.1016/j.bbagen.2012.06.013
- 103 Chen, Q. and Yu, X. (2016) OGT restrains the expansion of DNA damage signaling. *Nucleic Acids Res.* **44**, 9266–9278 doi:10.1093/nar/gkw663

## REVIEW

# Detection and identification of O-GlcNAcylated proteins by proteomic approaches

Anne-Sophie Vercoutter-Edouart, Ikram El Yazidi-Belkoura, Céline Guinez, Steffi Baldini, Maité Leturcq, Marlène Mortuaire, Anne-Marie Mir, Agata Steenackers, Vanessa Dehennaut, Annick Pierce and Tony Lefebvre

Unit of Structural and Functional Glycobiology, University of Lille 1, Villeneuve d'Ascq, France

O-GlcNAcylation (O-linked beta-N-acetylglucosaminylation) is a widespread 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 click-chemistry-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 CID. To tentatively overcome this technical limitation, electron-capture dissociation, or electron-transfer dissociation 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 from being used in routine.

Received: July 11, 2014  
Revised: October 3, 2014  
Accepted: November 24, 2014

**Keywords:**

Glycoproteomics / Mass Spectrometry / O-GlcNAcylation / O-GlcNAcome / Post-translational modification / Site mapping

## 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:

**Correspondence:** Dr. Tony Lefebvre, Unit of Structural and Functional Glycobiology, UMR CNRS no8576, IFR 147, University of Lille 1, 59655 Villeneuve d'Ascq, France  
**E-mail:** tony.lefebvre@univ-lille1.fr  
**Fax:** +33-3-20-43-65-55

**Abbreviations:** BEMAD, beta-elimination followed by Michael addition with dithiothreitol; CAD, collision-activated dissociation; CAZY, carbohydrate-active enzymes; ETD, electron-transfer dissociation; GalT, galactosyltransferase; HBP, hexosamine biosynthetic pathway; HCD, high energy C-trap dissociation; IP, immunoprecipitation; LWAC, lectin weak affinity chromatography; OGA, O-GlcNAcase; OGT, O-GlcNAc transferase; WGA, wheat germ agglutinin

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 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 N-acetylglucosamine moiety through a

**Colour Online:** See the article online to view Fig. 1 in colour.



**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 III,  $\Gamma$ , T, I, Y,  $\gamma$ ). 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.

beta-linkage 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].

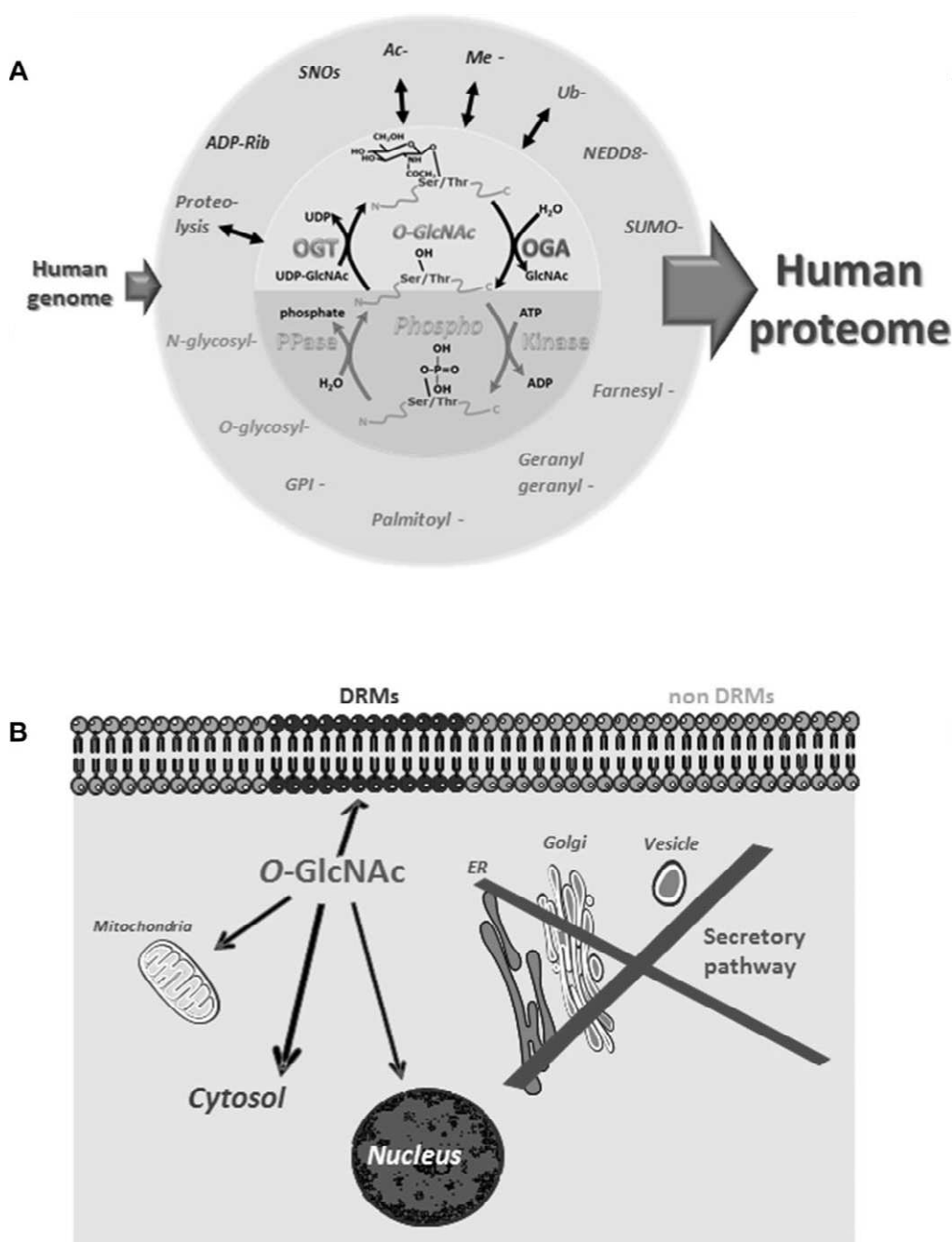
Thus, elucidating the molecular and cellular processes regulated by O-GlcNAcylation is strongly supported by the characterization of the O-GlcNAcome based on the identification of O-GlcNAcylated proteins, the steady state level of O-GlcNAc proteins (i.e. quantification and cycling of O-GlcNAc/de-O-GlcNAc protein 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- $^3\text{H}$ -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 mAb, 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 O-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 mAb 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 C-terminal 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 bromide-activated sepharose or agarose to perform the immunoaffinity chromatography [47, 48], as it has been done to enrich O-GlcNAc-modified proteins from rat brain [44] and COS-7 cells [49]. A mixture of anti-O-GlcNAc antibodies was also used to immunoprecipitate and identify more than 200 O-GlcNAc proteins in HEK293 T cells [37]. This approach is useful to selectively enrich O-GlcNAcylated



**Figure 2.** The main characteristics of *O*-GlcNAcylation. (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*-GlcNAcylation 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. DRMs, detergent-resistant membranes.

**Table 1.** Identification of *O*-GlcNAc proteins and *O*-GlcNAc sites using antibodies and lectins

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 [58]	Rat skeletal muscle	WGA beads and 2D-electrophoresis	MALDI-TOF MS	14	
Vosseller et al., 2006 [83]	Mouse brain (post-synaptic preparation)	LWAC and BEMAD	CID/ECD MS/MS	18	65 peptides, 42 sites
Wang et al., 2007 [49]	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 et al., 2008 [35]	UO2S cells (ribonucleoproteins granules)	IP RL2	MS/MS	51	
Chalkley et al., 2009 [86]	Mouse brain (post-synaptic preparation)	LWAC	CID/ETD MS/MS	15	58 sites
Teo et al., 2010 [37]	HEK293T cells	IP <i>O</i> -GlcNAc (18B10.C7, 9D1.E4, 1F5.D6, CTD110.6)	MS/MS	215	
Zeidan et al., 2010 [41]	Hela cells and rat liver	Ribosome preparation	MS/MS	21	
	Rat liver	Ribosome preparation	CID MS/MS	4	4 sites
Fujiki et al., 2011 [11]	HeLa cells (chromatin preparation)	WGA beads and IP RL2	Q-TOF MS/MS and ETD MS/MS	257	3 sites (H2B)
Myers et al., 2011 [42]	Mouse embryonic stem cells	LWAC	ETD-MS/MS	62	142 sites
Zachara et al., 2011 [48]	Cos-7 cells	CTD110.6 Immunochromatography	Q-TOF MS/MS	30	7 peptides
Zhao et al., 2011 [50]	HEK293T cells	IP <i>O</i> -GlcNAc (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 et al., 2013 [91]	MC3T3E1 differentiated osteoblasts	LWAC	CID/ETD MS/MS and HCD/ETD MS/MS		23 sites
Olivier-Van Stichelen et al., 2014 [89]	HT29 cells	IP beta-catenin	ETD MS/MS	1	4 sites



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 et al. discovered novel OGT substrates including low abundant signaling and regulatory proteins [54].

### 2.1.2 Lectins

Alternatively, the lectin prepared from *Triticum vulgare*, 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 N-azidoacetylglucosamine (Ac<sub>4</sub>GlcNAz) (bio-orthogonal conjugation of azide-tagged GlcNAc) [67–72] or per-O-acetylated N-alkyne-acetylglucosamine (Ac<sub>4</sub>GlcNAalk) 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, 49, 66, 70, 71, 73–76]. To improve the exact localization of GlcNAc sites on tagged-peptides, 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 β-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 et al. synthesized a resolvable mass tag using amino-oxy-functionalized PEG 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

**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 transfer 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 et al., 2004 [66]	Rat brain	UDP-ketoGal	Aminoxy biotin	Avidin beads	CID MS/MS	25	34 peptides
Khidekel et al., 2007 [45]	Cortical neurons from embryonic rats	UDP-ketoGal	Aminoxy biotin	Avidin beads	CID/ETD MS/MS	26	29 peptides
Wang et al., 2007 [49]	COS7 cells	UDP-GalNAz	Biotin alkyne	Avidin beads and BEMAD	MS/MS	24	1 site
Dehennaut et al., 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	35 sites
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 dioxide beads	HCD/ETD MS/MS	31 sites and 11 peptides	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 et al., 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)	UDP-GalNAz	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 et al., 2005 [69]	Drosophila S2 cells	Ac <sub>4</sub> -GlcNAz	Biotin phosphine	Streptavidin beads	MS/MS	51	
Nandi et al., 2006 [70]	HeLa cells	Ac <sub>4</sub> -GlcNAz	Biotin phosphine	Streptavidin beads	MS/MS	199	
Guroel et al., 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> -GlcNAz	Phosphine-FLAG-His6 or phosphine-biotin azido-azo-biotin	IP FLAG and Ni-NTA column	MS/MS	18	
Zaro et al., 2011 [73]	NIH3T3 cells	Ac <sub>4</sub> -GlcNAIk		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

[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 non-cleavable 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, 49, 75]. BEMAD consists in a mild beta-elimination of O-linked residues from the protein/peptide backbone and the addition of DTT to the protein via a Michael addition (BEMAD). These modified proteins/peptides are then enriched by thiol-sepharose 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 MS [44, 83]. However, since peptides initially modified by phosphorylation or other glycosylations can also react to BEMAD, controls with alkaline phosphatase and beta-hexosaminidase 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, 49, 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<sup>0</sup>/biCy-d<sup>4</sup>) 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 CID conventional peptide fragmentation technique in a MS analysis [24, 41, 45, 85]. In the last decade, technological advances in the field of MS including novel fragmentation methods significantly contribute to overcome O-GlcNAc site mapping. Electron-capture 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 by one or several antibodies before identification by MS/MS (Table 1) [35, 37, 44, 48–50]. Moreover, the combination of two-dimensional electrophoresis separation and anti-O-GlcNAc or WGA Western-blot helps in identifying O-GlcNAc modified protein spots [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 proteins in HEK293T cells after immunoprecipitation of O-GlcNAcylated 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 weak interaction between a single N-acetylglucosamine 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 enables the elution of O-GlcNAc proteins or peptides before MS analysis (Table 2) [45, 49, 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 [49, 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 [49] and stress response [48] 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 et al. 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 MS 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.

*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 “Site de Recherche Intégrée sur le Cancer” ONCOLille.

The authors have declared no conflict of interest.

## 5 References

- [1] 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, D. J., *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-N-acetylglucosamine (*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 nOGT 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 glucose-induced 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*, 825–858.
- [18] 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 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- $\kappa$ B activity in pancreatic cancer cells. *J. Biol. Chem.* 2013, *288*, 15121–15130.
- [23] Hardivillé, S., Escobar-Ramirez, A., Pina-Canceco, S., Ellass, E., Pierce, A., Delta-lactoferrin induces cell death via the mitochondrial death signaling pathway by upregulating bax expression. *Biomaterials* 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*, 1224–1231.
- [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., DeMaio, 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] Zachara, N. E., *Detection and analysis of (O-linked beta-N-Acetylglucosamine)-modified proteins.* The Nucleus (Vol. 2, Chapter 13), Humana Press, Totowa, NJ 2008.
- [48] Zachara, N. E., Molina, H., Wong, K. Y., Pandey, A., Hart, G. W., The dynamic stress-induced “O-GlcNAc-ome” highlights functions for O-GlcNAc in regulating DNA damage/repair and other cellular pathways. *Amino Acids.* 2011, *40*, 793–808.
- [49] Wang, Z., Pandey, A., Hart, G. W., Dynamic interplay between O-linked N-acetylglucosaminylation and glycogen synthase kinase-3-dependent phosphorylation. *Mol. Cell. Proteomics.* 2007, *6*, 1365–1379.
- [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 N-acetylglucosamine. *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 O-linked 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-GlcNAc-ome”: 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 chromatography 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., Structure-based design of beta 1,4-galactosyltransferase I (beta 4Gal-T1) with equally efficient N-acetylgalactosaminyltransferase 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-GlcNAc-modified 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-GlcNAc-modified 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 click-chemistry-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-GlcNAc-modified 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 N-acetylglucosamine-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-acetylglucosamine-modified 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, *109*, 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*, 975–980.
- [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 copper-free click chemistry. *Anal. Biochem.* 2014, *464*, 70–72.
- [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 post-translational 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-N-acetylglucosamine modification of serum response factor using quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics.* 2003 *2*, 182–190.
- [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: Clin. Appl.* 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*, 3325–3338.
- [90] Trinidad, J. C., Barkan, D. T., Gullledge, 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*, 1449–1458.
- [93] Ong, S. E., Mann, M., A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). *Nat. Protoc.* 2007, *1*, 2650–2660.
- [94] Hughes, C., Krijgsveld, J., Developments in quantitative mass spectrometry for the analysis of proteome dynamics. *Trends Biotechnol.* 2012, *30*, 668–676.
- [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.